

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“FRECUENCIA DE LA MUTACION LEIDEN DEL FACTOR V DE LA COAGULACION  
Y DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA EN LA POBLACION  
MEXICANA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ABRAHAM SALVADOR MAJLUF CRUZ**

TUTOR:

DR. JOSÉ CLEMENTE DÍAZ MAQUEO

COTUTORES:

DR. FABIO SALAMANCA  
DR. GUILLERMO RUIZ ARGÜELLES



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.

**ÍNDICE.**

Resumen.....	3
Abstract.....	5
Introducción.....	6
Justificación.....	19
Planeamiento del problema.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	24
Metodología.....	25
Consideraciones éticas.....	35
Resultados.....	36
Discusión.....	45
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	52
Anexos.....	58

## RESUMEN

Los fenómenos trombóticos son una de las causas líder de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En la mayor parte del mundo, la resistencia a la proteína C activada (RPCA) es la causa de trombofilia hereditaria más común y la mayoría de estos casos son secundarios a la mutación Leiden del factor V de la hemostasia. Se ha descrito además la presencia del fenotipo de la RPCA sin asociación con el factor V Leiden. En este estudio, evaluamos las características de estos dos fenómenos en un estudio transversal, descriptivo, no aleatorio de una muestra de las poblaciones indígena y mestiza en México. Incluimos mujeres y hombres adultos y sanos. La prueba de RPCA se realizó mediante dos equipos comercialmente disponibles (Stago APC-R<sup>®</sup> y Coatest<sup>®</sup> APC Resistance V). La prueba para evaluar la presencia de la mutación Leiden del factor V se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento aceptado internacionalmente. Analizamos 4,345 muestras incluyendo 600 nativos mexicanos provenientes de 19 grupos étnicos. La prevalencia de la RPCA fue 0% en la población indígena. La RPCA se encontró en 82 mestizos mexicanos (51 mujeres y 31 hombres). En esta última población, la prueba de RPCA se llevó a cabo nuevamente utilizando ambos equipos comerciales y luego de esto, 50 sujetos tuvieron una prueba negativa. Treinta y dos sujetos se mantuvieron positivos y todos ellos tenían la mutación Leiden del factor V. Por lo tanto, la prevalencia de la mutación Leiden del factor V en la población mestiza mexicana es de 0.85%. Es de llamar la atención que sólo 31% de los portadores de la RPCA fueron portadores de la mutación Leiden. La prevalencia de la RPCA adquirida alcanzó 1.33%. Nuestros resultados muestran una prevalencia baja de la RPCA y de la mutación Leiden en México. Hemos confirmado que ni la RPCA ni la mutación Leiden

afectan a los indígenas mexicanos. Excepto la mutación Leiden, no existen otras mutaciones en el gen del FV responsables del fenotipo de la RPCA. La RPCA en su variante adquirida es casi dos veces más prevalente que la variante hereditaria.

Palabras clave: mutación Leiden del factor V, Resistencia a la proteína C activada, trombosis, indígenas americanos.

## **ABSTRACT**

Thrombosis is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Activated protein C resistance (APCR) is the single most common cause of hereditary thrombophilia, the majority of these cases due to FV Leiden mutation. An APCR phenotype without association with FV Leiden has been described. We evaluated the characteristics of these two phenomena in a transversal, observational, non-randomized study of Indigenous and Mestizo Mexican populations. We included healthy adult men and women. APCR assay was performed using two commercially available kits (Stago APC-R<sup>®</sup> and Coatest<sup>®</sup> APC Resistance V). FV Leiden assay was performed according to the procedure accepted worldwide. We analyzed 4,345 samples, including 600 Mexican natives from 19 ethnical groups. Prevalence of APCR was 0% in Indigenous population. APCR was found in 82 Mestizos (51 women and 31 men). In the latter population, APCR test was performed again using both assays, and 50 subjects had a negative test. Thirty two subjects remained positive, all FV Leiden carriers. Therefore, prevalence of FV Leiden in Mestizo Mexican population is 0.85%. It is noteworthy that only 31% of carriers of APCR were carriers of FV Leiden. Prevalence of acquired APCR reached 1.33%. Our results show a very low prevalence of APCR and FV Leiden in Mexico. We confirmed that neither APCR nor FV Leiden affect Native Mexicans. Except for FV Leiden, there are no other mutations in the FV gene responsible for the APCR phenotype. Acquired APCR is nearly twice as prevalent as the inherited variant.

Key Words: FV Leiden, Activated Protein C Resistance, Thrombosis, Native Americans

## **INTRODUCCION.**

Los fenómenos tromboembólicos, que en los países desarrollados tienen una incidencia anual de 1/1000, son un grave problema de salud causantes de altos índices de incapacidad física y morbimortalidad asociadas (1,2). Desde este punto de vista, la enfermedad trombótica en todas sus manifestaciones es la causa líder de muerte y mortalidad en todo el mundo (1,2).

Normalmente, el balance entre los anticoagulantes y procoagulantes favorece a los primeros: la sangre se mantiene líquida. Cuando aparece una lesión vascular, el sistema anticoagulante es inhibido y los procoagulantes prevalecen, permitiendo el fenómeno de la coagulación. En respuesta a una lesión vascular, la unión del factor VII (FVII) al factor tisular expuesto en el subendotelio inicia una serie de reacciones que generan trombina (3,4). La trombina activa plaquetas, convierte fibrinógeno en fibrina y activa al FVIII y al FV. Estos últimos factores, ya activados, se unen a plaquetas y sirven como receptores/cofactores de los factores Xa y IXa, respectivamente (5). FVa y FVIIIa aumentan la eficiencia catalítica de sus enzimas >1,000 veces (5). En el sitio de la lesión, la amplificación de la hemostasia genera trombina que transforma al fibrinógeno en fibrina. En el vaso intacto la trombina promueve la activación del sistema anticoagulante de la proteína C (PC) (6,7), al unirse con gran afinidad a su receptor endotelial, la trombomodulina. La trombina unida a la trombomodulina se convierte en el activador más potente de la PC. La PC activada (PCA), cataliza e inactiva al FVa y al FVIIIa unidos a los fosfolípidos de las membranas de las células adyacentes a la lesión lo que resulta en la inhibición y regulación de la hemostasia (Figura 1). La proteína S (PS) es el cofactor fisiológico de la PCA y tanto ésta como el FV aumentan la actividad

de la PCA (8,9). La actividad plasmática de la PCA se regula lentamente por inhibidores de proteasas (10). Los puntos clave en la función de la PCA son su vida media prolongada y su alta especificidad por FVa y FVIIIa. Estos dos son glicoproteínas homólogas (11). Ambos se sintetizan en el hígado y el endotelio como zimógenos. Si estos factores activados se unen a la membrana celular se degradan específicamente por la PCA mientras que inactivos son sustratos pobres para la PCA.

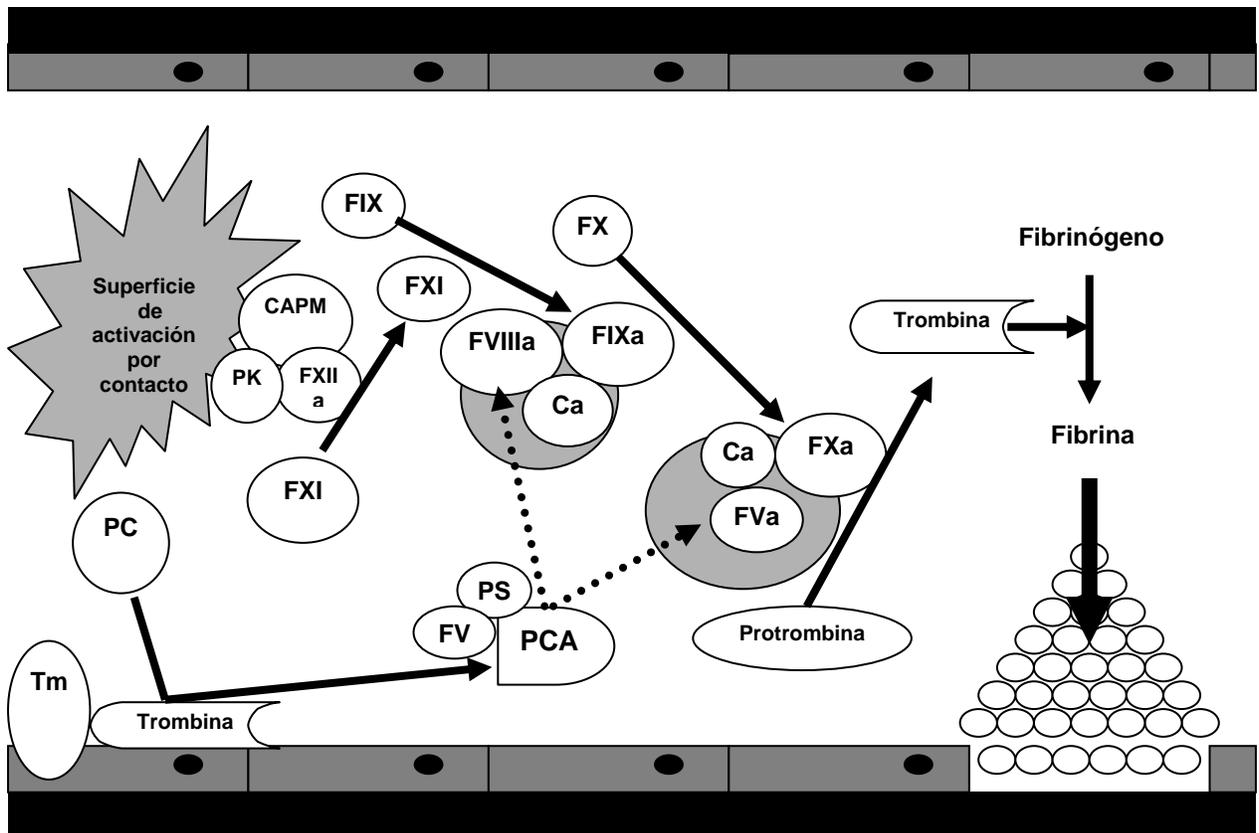


Figura 1. La vía intrínseca de la hemostasia y su regulación por el sistema de la PC. La trombina procoagulante generada en esta vía se convierte en anticoagulante al unirse en el endotelio a la trombomodulina (Tm). Así, la PC es activada. En presencia de FV y su cofactor la PS, la PCA inhibe (líneas punteadas) a los dos factores aceleradores de la vía intrínseca: FVIIIa y el FVa. De esta manera, la trombina se autorregula mediante el sistema de la PC. (PK: precalicreína; CAPM: cininógeno de alto peso molecular).

El sistema anticoagulante de la PC se forma por tres proteínas: PC, trombomodulina y PS (Figura 1). La PC es un zimógeno que depende de la vitamina K para su producción hepática. Se convierte en una proteasa de serina con actividad anticoagulante luego de activarse (12). La trombina unida a la trombomodulina rompe a la PC cerca de su región N terminal liberando un péptido de 12 aminoácidos y exponiendo el sitio catalítico de la molécula (6,12). La trombomodulina es una glicoproteína endotelial con gran afinidad por la trombina ( $K_d=3nM$ ) (6,7). La trombina unida a la trombomodulina es, al menos, 20,000 veces más eficiente en activar a la PC que la trombina libre (6). La gran concentración de trombomodulina endotelial en la microcirculación permite concentrar una gran cantidad de trombina anticoagulante a este nivel (7). La PS es una proteína plasmática que también requiere vitamina K para su producción y que, a diferencia de las demás proteínas del sistema de coagulación, no es una proteasa de serina (6,8,9). Casi 60% circula unida a la proteína de unión del factor C4b del complemento y sólo su forma libre funciona como factor para la PCA (13). La PS aumenta la unión de PCA a los fosfolípidos de la membrana. Hay una sinergia paradójica entre la PS y el FV, ya que ambos aumentan la eficiencia de la PCA (9). Así, en presencia de PS y FV, la PCA inactiva al FVIIIa mientras que la PCA sola o con FV es ineficiente y la unión de PCA con PS es menos potente en ausencia de FV.

La formación del coágulo es un mecanismo inmediato de defensa. Sin embargo, la un coágulo puede terminar en una respuesta anormal o patológica (trombo), especialmente cuando el sujeto se encuentra bajo ciertas condiciones especiales como cirugía, fracturas, estados inflamatorios, inmovilización, embarazo, entre otras. Estas asociaciones demuestran que existen múltiples factores en la patogénesis de las trombosis (14,15). No obstante, con frecuencia aparecen otros tipos de trombosis en las

que no hay asociación directa clara con un evento fisiopatológico subyacente y en las que existe un componente de origen familiar muy evidente. Estos hechos sugieren un factor genético importante para este tipo de entidades.

El estado de predisposición a la trombosis o trombofilia puede ser hereditario o adquirido. Los estados hereditarios se generan por la deficiencia funcional o cuantitativa de diversas proteínas, la mayoría de ellas anticoagulantes naturales: antitrombina, PC, PS, plasminógeno, etc. Sin embargo, todas estas deficiencias juntas sólo explican entre el 5 y el 10% de todas las trombosis (14-16). La relevancia del sistema de la PC queda de manifiesto desde el momento en que un porcentaje alto de las trombosis espontáneas tiene alteraciones en este sistema. La deficiencia de PC causa entre 2 y 5% de todas las trombosis en el mundo (16), aunque si se consideran solamente a los sujetos jóvenes, entonces se asocia hasta con 15% de los eventos trombóticos (17). En portadores de este defecto, el riesgo de sufrir una trombosis antes de los 40 años es de 50% (18). A pesar de que el mecanismo de acción exacto de la PS no está totalmente dilucidado, su importancia como anticoagulante natural también queda clara por su asociación con trombosis (aunque menos frecuentemente), en aquéllos casos con deficiencia hereditaria de esta proteína (1,19).

Recientemente, se describió un fenómeno hereditario en el que existe una refractariedad al efecto anticoagulante de la PCA, un mecanismo importante en la génesis de la trombofilia (20). En la mayoría de los casos, esta resistencia al efecto anticoagulante de la PCA (RPCA) se origina de una mutación puntual en el gen del FV, mutación que hace menos sensible a este factor a la inactivación natural por la PCA. Por algún tiempo, muchos pacientes con trombosis fueron erróneamente

diagnosticados como portadores de deficiencia funcional de PS (tipo II) (21), ya que en ambos casos, el problema es una baja actividad de la PCA.

La RPCA se reconoce en muchos países como la causa más común de trombofilia hereditaria (21,22,23-26). Se considera que la mayoría de casos con RPCA son debidos a una mutación puntual en el gen del FV denominada mutación Leiden (FV Leiden) o bien, aunque con mucha menor frecuencia, puede estar determinada por algunas otras mutaciones en el gen de este factor hemostático (27). En un porcentaje variable de los casos, no existe una explicación genética para explicar la aparición del genotipo de la RPCA y, por otra parte, la ocurrencia de este fenotipo se asocia a diversas entidades nosológicas no hereditarias. La importancia de estas asociaciones específicas parece crucial ya que estos mismos fenómenos patológicos se asocian ampliamente con fenómenos trombóticos. Además, la RPCA puede estar presente en un individuo sin que se tenga noticia del fenotipo trombótico, un hecho que eleva el riesgo trombogénico para este grupo de sujetos. Por lo tanto, esta variedad de RPCA no asociada a un genotipo hereditario, también denominada variedad adquirida de la RPCA, puede ser un factor importante -aunque muy poco reconocido- para elevar el riesgo de trombosis (28).

El cADN para el FV tiene cerca de 7 Kb (5). Codifica para un péptido líder de 28 aminoácidos y una proteína madura de 2,196 aminoácidos. La secuencia 3' no codificadora contiene una secuencia típica AATAAA que funciona como una señal de poliadenilación (29). El gen codificador para el FV está localizado en el cromosoma 1q21-25 dentro de 300 Kb de genes para la familia de selectinas de las moléculas de adhesión de leucocitos (30). El gen del FV se abre a lo largo de más de 80 Kb de ADN y consiste de 25 exones (31). Estos exones tienen un tamaño que varía desde 72 a

2,820 pb. La organización del gen del FV muestra una impresionante homología con el del FVIII aunque este último es más grande. La comparación de las secuencias de ambos genes muestra que 21 de las uniones exón/intrón ocurren exactamente en la misma localización en la secuencia de aminoácidos (Figura 2).

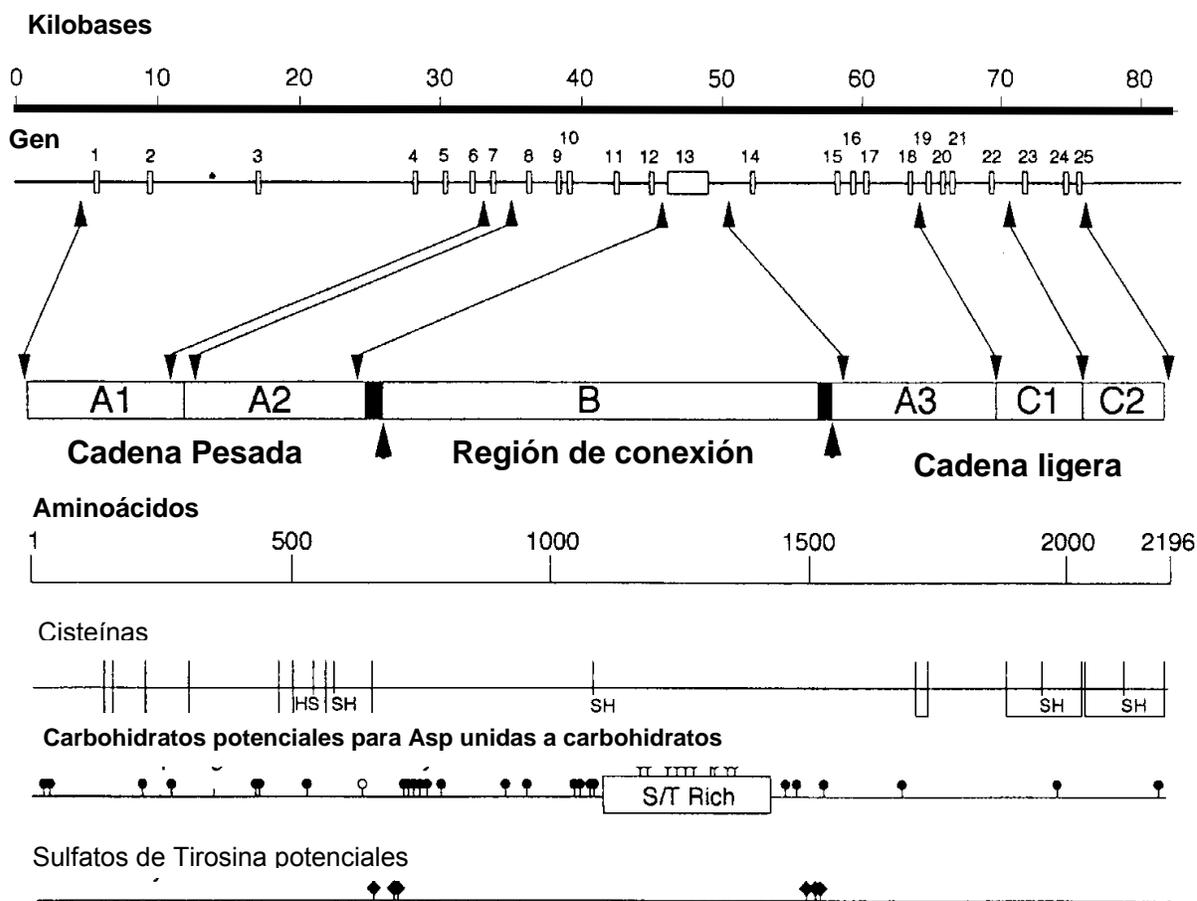


Figura 2. El gen del FV de la hemostasia.

El FV de la hemostasia es una proteína de 330,000 Da que participa en las fases finales de la fase fluida de la hemostasia. Se sintetiza como una molécula de cadena única en el hígado y megacariocitos y circula en la sangre como cofactor inactivo (32). Cerca del 25% del FV en la sangre está presente en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas y el resto

circula libre en el plasma (33). El FV funciona como cofactor en la conversión de protrombina en trombina, una reacción que es catalizada por el FX y que ocurre en presencia de calcio y fosfolípidos. Antes de participar en la fase fluida de la hemostasia, la proteína única de 2,196 aminoácidos es proteolizada por la trombina (5). Los sitios en donde la trombina cataliza al FV para su activación son Arg709, Arg1,018 y en Arg1,545 (Figura 3).

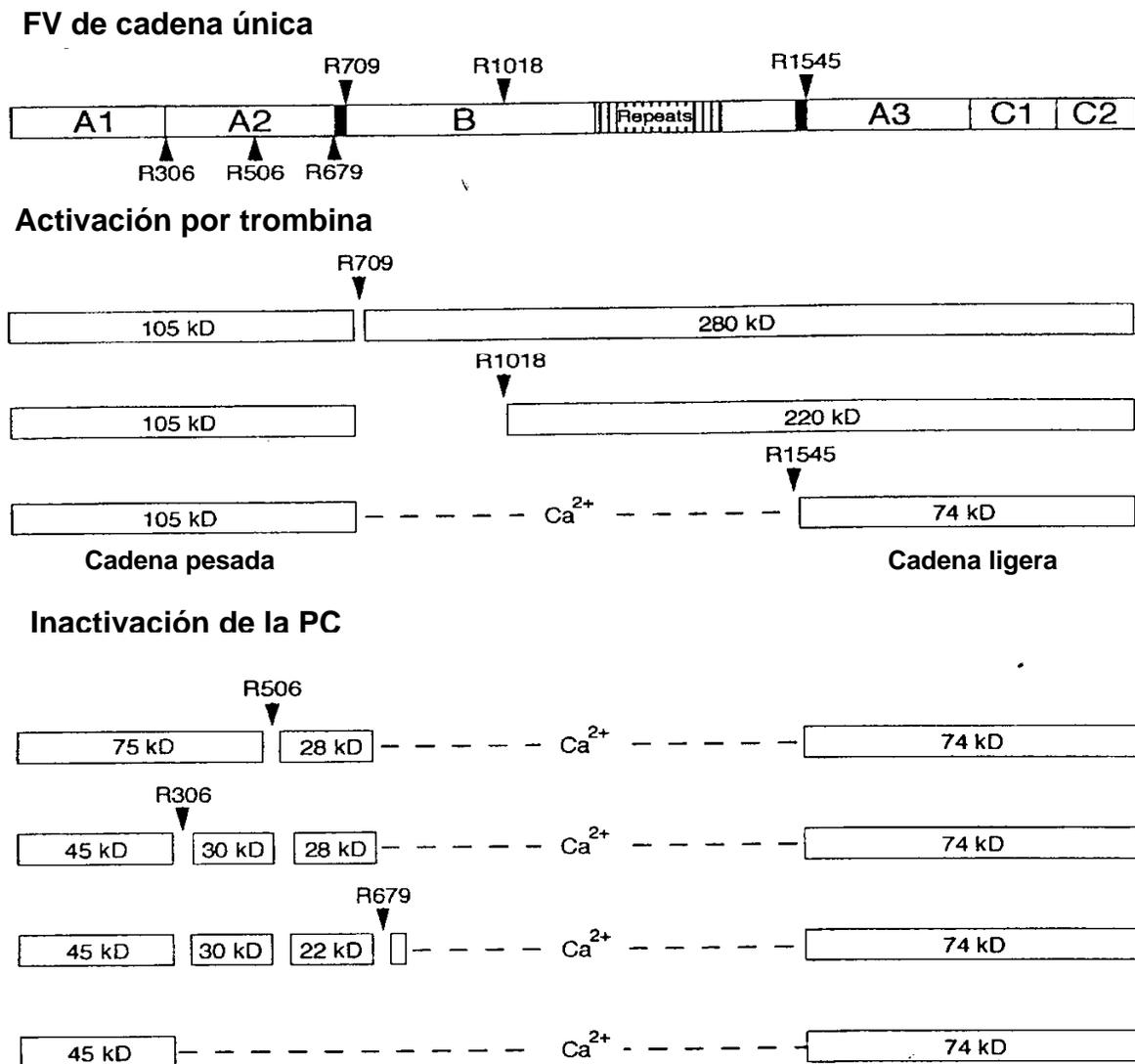


Figura 3. El FV de la hemostasia. Se muestra la proteína en su estado monomérico inactivo, el rompimiento mediado por la trombina para generar la enzima activa y los rompimientos dependientes de la misma trombina necesarios para su inactivación.

El FV contiene diversas repeticiones internas altamente homólogas con algunas presentes en el FVIII y en la ceruloplasmina (34). Cada una de estas tres proteínas contiene tres dominios A compuestos por cerca de 350 aminoácidos. Los dominios A en el FV y FVIII son 30% homólogos a los tres dominios A presentes en la ceruloplasmina. Los dominios A segundos y terceros están separados por regiones largas de conexión. La región de conexión en el FV tiene 836 aminoácidos y se localiza entre los aminoácidos 710 y 1545. Esta región se caracteriza por la presencia de múltiples cadenas de oligosacáridos ligadas a la región N-terminal y por un gran contenido de Thr y Ser. Esta región también contiene dos repeticiones en tándem de 17 aminoácidos y 31 repeticiones en tándem de 9 aminoácidos. El tercer dominio A del FV y en el FVIII es seguido por dos dominios C los cuales están formados por cerca de 150 aminoácidos. La homología entre ambos es de hasta 50% (Figuras 3 y 4). En vista de las grandes similitudes entre la secuencia de aminoácidos y la organización genética de los factores V y VIII, es claro que estas dos proteínas así como la ceruloplasmina evolucionaron del mismo ancestro.

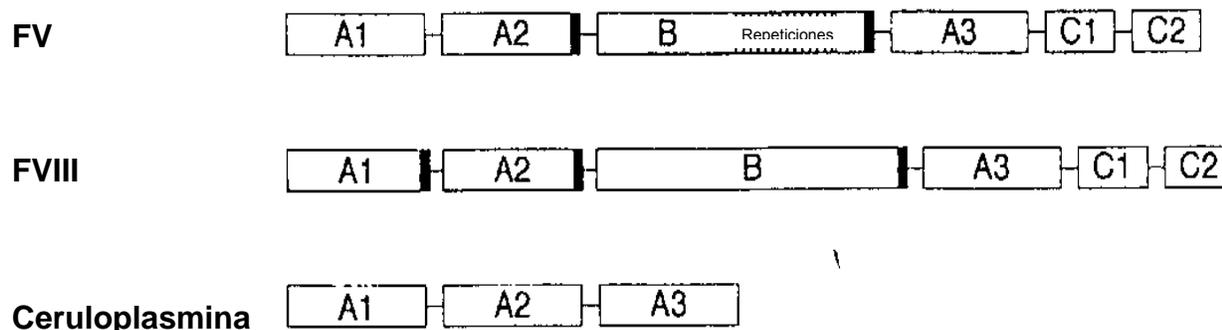


Figura 4. Homología entre los factores V y VIII y la ceruloplasmina.

La mutación Leiden del FV (FVLei) y su resultado fenotípico, la RPCA, son la causa de trombosis familiar más importante en todo el mundo (21,23-26). El FVLei se genera por una mutación puntual en un nucleótido CpG del gen del FV lo que traduce la sustitución de Arg por Gln en la posición 506 (R-506-Q) (23,35-37) (Figura 4). La PCA rompe e inactiva al FVa exactamente en Arg506 (38). Como resultado, el FV mutante tiene la misma capacidad procoagulante del FV normal pero es mucho menos sensible a su inhibidor fisiológico, la PCA. La inactivación deficiente del FVa resulta en la estabilización del complejo de protrombinasa (FXa, FVa, fosfolípidos y  $Ca^{++}$ ), aumento en la generación de trombina y fibrina e incremento de la activación de la coagulación, es decir, se produce un estado trombofílico permanente. Ya que 50% de los familiares de pacientes con trombosis y FVLei son portadores de la misma mutación, se considera que el modo de transmisión de la mutación es autosómico dominante.

El fenotipo de la RPCA, tanto la que resulta de alguna mutación del gen del FV como la que aparece de manera adquirida, se establece mediante una prueba coagulométrica (es decir, una prueba que mide el tiempo en que una muestra plasmática tarda en coagular luego de su recalcificación), denominada tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). En términos generales, la prueba mide el efecto anticoagulante de PCA añadida al plasma. Normalmente, el TTPa se prolonga ya que la PCA inhibe al FVa y al FVIIIa. En contraste, los pacientes con FVLei mantienen el TTPa "normal" o acortado a pesar de la PCA exógena. Esta "resistencia" al efecto anticoagulante de la PCA se comprueba añadiendo FV normal al plasma problema lo que prolonga el TTPa. Se desconoce el mecanismo por el que ocurre esta corrección de la prueba (39,40). Por otra parte, el adicionar a un plasma normal el plasma de un sujeto con RPCA resulta en

acortamiento del TTPa (35,41). La prueba es muy confiable para diagnosticar RPCA si se estandariza adecuadamente (Figura 5).

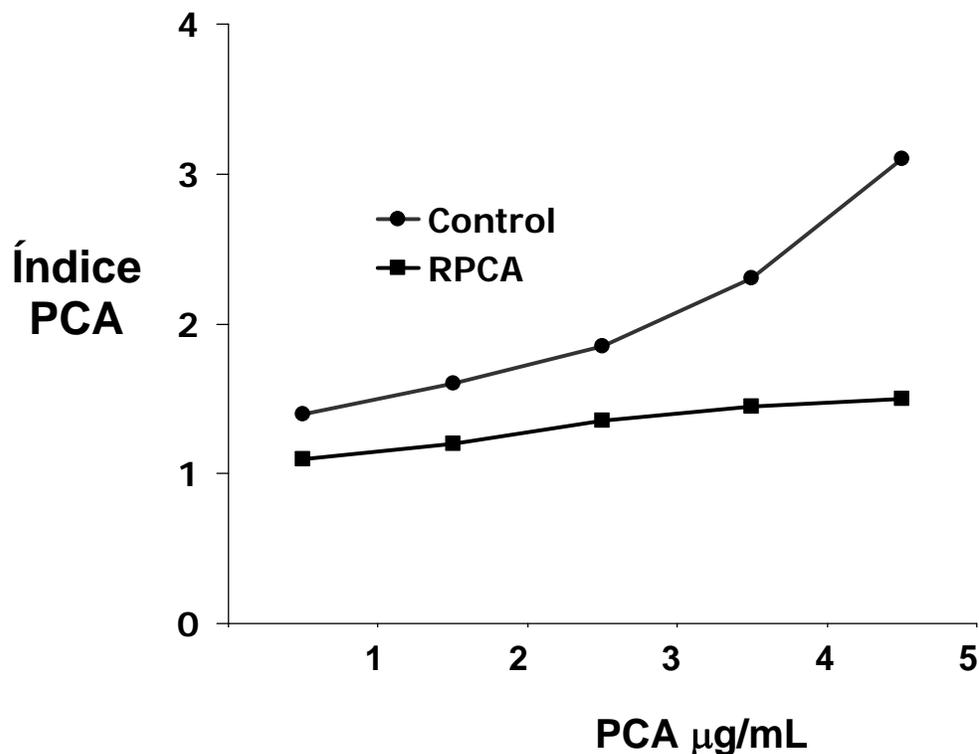


Figura 5. El efecto “resistencia a la proteína C activada”. En condiciones normales, la adición de la PCA (un anticoagulante natural), prolonga el TTPa (círculos). Sin embargo, en la RPCA el efecto sobre el TTPa no se observa (cuadros).

En pacientes con trombosis, se estima que la frecuencia de FVLei llega a 50% mientras que en la población general oscila entre 0.0 y 13.3%. Esto tiene un significado clínico ya que las deficiencias de los anticoagulantes naturales PC, PS y AT sólo explican 5-10% de las trombosis (42) (Tabla 1).

**Tabla 1. Frecuencia de los estados trombofílicos más comunes en México y en el resto del mundo entre pacientes con trombosis venosa profunda.**

	<b>TVP en el mundo (%)</b>	<b>TVP en México (%)</b>
<b>Deficiencia de AT-III</b>	<b>1-2</b>	<b>1</b>
<b>Deficiencia de PC</b>	<b>2-3</b>	<b>5</b>
<b>Deficiencia de PS</b>	<b>2-3</b>	<b>2</b>
<b>FVLei / RPCA</b>	<b>10-60</b>	<b>39</b>
<b>HHC</b>	<b>10-20</b>	<b>35</b>
<b>Protrombina 20210A</b>	<b>5-6</b>	<b>3</b>
<b>FVIII ↑</b>	<b>10-15</b>	<b>?</b>

Lancet 1999;353:479; Am J Hematol 1999;60:1 Hematol1999;60:1

Veinticinco por ciento de los familiares de enfermos con RPCA sufren una trombosis antes de los 50 años (42). Casi 60% de mujeres embarazadas que sufren una trombosis tienen RPCA (43). Los homocigotos para RPCA (15% de los pacientes) y los heterocigotos tienen un aumento del riesgo de trombosis de entre 50 y 100 y de entre 5 y 10 veces, respectivamente. Más de 80% de los casos con trombosis familiar por RPCA tienen FVLei, aunque otras mutaciones del mismo gen causan RPCA (pero son infrecuentes) (27). Como ya se mencionó, existen casos en los que existe RPCA sin evidencia de alguna mutación en el gen del FV, fenómeno denominado RPCA adquirida. Se sugiere que puede existir un porcentaje alto de sujetos sin antecedentes o alteraciones clínicas evidentes (“sanos”) y que son portadores de RPCA adquirida.

La alta frecuencia del FVLei en algunos países y razas y su relación con el aumento del riesgo de trombosis hicieron que se comenzara a sugerir la necesidad de descartar esta alteración en candidatos a cirugía, en mujeres que inician anticonceptivos orales o en el protocolo de control del embarazo. Sin embargo, ya que las frecuencia en poblaciones

"sanas" es muy variable (Tabla 2) (44) y ya que no se ha demostrado un buen costo-beneficio para estas estrategias, las propuestas no han progresado (Tabla 2).

**Tabla 2. Frecuencias de FVLei en el mundo.**

País o Etnia	%	País o Etnia	%
<b>EUROPA</b>		<b>MEDIO ORIENTE</b>	
Reino Unido	3.4	Arabia Saudita	0
	5.6		2.5
	8.8	Judíos Azkenazi	4.9
	2.9	Judíos Iraquíes	7.6
Irlanda del Norte	5.9	Judíos Marroquíes	4.7
Islandia	4.1	Judíos Iraníes	0.7
Holanda	2.9	Judíos de Yemen	0.8
Francia (Lille)	0.6	Árabes israelíes	12.8
	9.6		
	2.9	<b>AFRICA</b>	
	2.2	Kenia	0
	8.6	Senegal	0
	3.2	Zambia	0
	5.6	África Sub-Sahariana	0
Finlandia	2.9	Etiopía	0
Alemania	4.3		
	7.9	<b>ASIA</b>	
	7.1	Indonesia	0
	7.7	Corea	0
Italia	2.6	Japón	0
	2.9	Taiwán	0
	2.5	Mongolia	0
	3.0	Hong Kong	0
Grecia	13.3	China	0
	6.3	Pakistán	0
Turquía	9.1	India	2.0
Suecia	10.8		4.2
	11.1	Nepal	1.8
Rusia	3.4	Sri Lanka	0
<b>ESPAÑA</b>	3.7	Dagestán	7.6
		Kasistán	2.0
<b>AMERICA</b>			
Canadá	5.6	<b>INDÍGENAS AMERICANOS</b>	
	8.8	Indios de Vancouver	0
Estados Unidos	6.0	Cayapa	0
	6.7	Pima	0.3
	5.2	De Estados Unidos	1.2
<i>Hispanos</i>	2.2	Incas	0
<i>Afroamericanos</i>	1.0	Amazónicos	0
<i>Afroamericanos</i>	1.4	Esquimales	0
<i>Afroamericanos</i>	1.2		
<i>Asiáticos</i>	0.4	<b>OCEANIA</b>	
Brasil	2.0	Australia	3.9
<i>Afroamericanos</i>	0.7	Indígenas australianos	0
Argentina	2.5	Indígenas de Nueva Guinea	0
		Polinesia	0.5

De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of FV Leiden: Clinical implications. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:367-379.

Hace algunos años, Cesarman y cols., encontraron en una población indígena mexicana una frecuencia de FVLei de 0.1% (45). Sin embargo, aunque de interés, esta información carece de valor epidemiológico por el tamaño mínimo de la muestra (19 individuos). Por otra parte, en América Latina sólo hay dos referencias acerca de la frecuencia de esta mutación. En una población indígena peruana y en otra amazónica se encontró una frecuencia de 0% (45), mientras que en la población mestiza Argentina, la frecuencia de la mutación es 2.5%, muy similar a la mayoría de las poblaciones europeas (46).

## **JUSTIFICACION.**

En nuestro país, los fenómenos trombóticos son tan frecuentes y devastadores como en todos los países del mundo. A este respecto, nuestros datos epidemiológicos no son diferentes de los que se encuentran en otras poblaciones por lo que los fenómenos tromboembólicos también son un problema de salud grave. Por ejemplo, sólomente en el Instituto Mexicano del Seguro Social y de acuerdo a los diagnósticos más frecuentes durante 1994 (47), se registraron 2,088 nuevos casos bajo los rubros "enfermedades cerebrovasculares" e "infarto cerebral" (excluyendo los apartados "hemorragia intracerebral y otras hemorragias intracraneales"), con una letalidad inmediata del 17.32%. Quince por ciento de los casos ocurrieron en individuos menores de 54 años, es decir, en edad productiva. Por esta patología, se registraron 8,130 hospitalizaciones representando 11,173 días/cama con un costo cercano a 26 millones de pesos (47), sin tomar en cuenta gastos por incapacidad laboral temporal y permanente, medicamentos del paciente internado y ambulatorio, fisioterapia, métodos auxiliares de diagnóstico, etc. Debe subrayarse que estos son datos de un año, en una institución y de una patología trombótica (infartos cerebrales) ya que existen otras condiciones asociadas con tromboembolismo con el mismo impacto médico y socioeconómico: trombosis venosa profunda, tromboembolia pulmonar, un porcentaje de infarto agudo de miocardio, trombosis visceral, etc.

Por todo lo expuesto anteriormente, es necesario contar en nuestro país con estudios que nos indiquen cuales son las medidas de escrutinio trombogénico más elementales para llevar a cabo una prevención más adecuada de los fenómenos trombóticos.

Al observar las frecuencias de la mutación FVLei en el mundo, se aprecia que las más altas se encuentran en Europa y el Medio Oriente. A medida que se mira hacia el Oriente, se aprecia de inmediato una disminución importante en la frecuencia de la mutación. Sobre la base de la teoría de la migración hacia América a través del Estrecho de Behring, sería posible hipotetizar que, si la frecuencia en las poblaciones indígenas americanas es tan baja como en las poblaciones asiáticas, la mutación desapareció a medida que las migraciones fueron sucediendo. Si la mutación tiene una incidencia más alta entre los mestizos mexicanos, entonces se podrá sugerir que la mutación fue importada a América, posteriormente, en el transcurso de la colonización.

Los datos arrojados por esta investigación permitirían determinar si la búsqueda intencionada del FVLei o de la RPCA debe ser una prioridad tanto en la atención clínica como en los programas de salud pública de nuestro país. Los datos arrojados por la investigación permitirían determinar con fundamento si se requieren medidas preventivas específicas para limitar el impacto de estas dos trombofilias sobre la prevalencia de la trombosis en nuestra población. Esto es importante porque, como se discute en la introducción, además de ser devastadores desde el punto de vista clínico, familiar y humano, los eventos trombóticos también implican una enorme erogación económica, no sólo con relación a los costos de atención médica sino también en cuanto a días e ausencia laboral, incapacidades económicas, etc.

Finalmente, ya se mencionó la posibilidad de que exista un porcentaje de individuos sin antecedentes patológicos o alteraciones clínicas evidentes pero portadores de la RPCA. Los sujetos con este tipo de RPCA adquirida serían portadores de un estado trombofílico latente de alto riesgo ya que en ellos nunca se establecería sospecha clínica o epidemiológica para un fenómeno trombótico. Aún contando con el mejor

laboratorio de escrutinio hemostático, el diagnóstico etiológico de una trombosis espontánea sólo se logra en el 50% de los casos. Por lo tanto, conocer la prevalencia de esta variante adquirida de RPCA en la población abierta mexicana (sujetos “sanos”), permitiría saber si es lo suficientemente frecuente para intervenir en la génesis de las trombosis espontáneas en las cuales, sólo en la mitad, se llega a un diagnóstico final.

Debido a la importancia de la RPCA y el FVLei en la patogénesis de la trombosis y ya que el impacto epidemiológico de este estado protrombótico no ha sido claramente establecido en México, el objetivo de este trabajo fue evaluar las características de estos dos fenómenos en una muestra de la población mexicana.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

General:

¿Cuál es la prevalencia del FVLei y de la RPCA, hereditaria y adquirida, en una muestra de la población mexicana?

Específicos:

1. ¿Cuál es la prevalencia del FVLei en una muestra de la población mexicana indígena?
2. ¿Cuál es la prevalencia de la RPCA hereditaria secundaria al FVLei en una muestra de la población mexicana indígena?
3. ¿Cuál es la prevalencia de la RPCA adquirida en la población mexicana indígena?
4. ¿Cuál es la prevalencia del FVLei en una muestra de la población mexicana mestiza?
5. ¿Cuál es la prevalencia de la RPCA hereditaria secundaria al FVLei en una muestra de la población mexicana mestiza abierta?
6. ¿Cuál es la prevalencia de la RPCA adquirida en una muestra de la población mexicana mestiza?

## **HIPOTESIS.**

General:

Las prevalencias del FVLei y de la RPCA hereditaria y adquirida, son menores en una muestra de la población mexicana que en otros grupos étnicos.

Específicas:

1. En una muestra de la población mexicana indígena, la prevalencia del FVLei es menor que en otros grupos étnicos.
2. En una muestra de la población mexicana indígena, la prevalencia de la RPCA secundaria al FVLei es menor que en otros grupos étnicos.
3. En una muestra de la población mexicana indígena, la prevalencia de la RPCA adquirida es menor que en otros grupos étnicos.
4. En una muestra de la población mexicana mestiza, la prevalencia del FVLei es mayor que en la población mexicana indígena pero menor que en otros grupos étnicos.
5. En una muestra de la población mexicana mestiza, la prevalencia de la RPCA secundaria al FVLei es mayor que en la población mexicana indígena pero menor que en otros grupos étnicos.
6. En una muestra de la población mexicana mestiza, la prevalencia de la RPCA adquirida es menor que en otros grupos étnicos.

## **OBJETIVOS.**

General:

Determinar las prevalencias del FVLei y de la RPCA hereditaria y adquirida en una muestra de la población mexicana, indígena y mestiza.

Específicos:

1. Determinar la prevalencia del FVLei en una muestra de la población mexicana indígena.
2. Determinar la prevalencia de la RPCA secundaria al FVLei en una muestra de la población mexicana indígena.
3. Determinar la prevalencia de la RPCA adquirida en una muestra de la población mexicana indígena.
4. Determinar la prevalencia del FVLei en una muestra de la población mexicana mestiza.
5. Determinar la prevalencia de la RPCA secundaria al FVLei en una muestra de la población mexicana mestiza.
6. Determinar la prevalencia de la RPCA adquirida en una muestra de la población mexicana mestiza.

## **METODOLOGIA.**

### **A. Universo de trabajo.**

Población abierta de sujetos sin enfermedades conocidas (“sanos”), de ambos sexos, adultos, provenientes de diversos grupos mestizos e indígenas residentes en la República Mexicana.

### **B. Tipo de estudio.**

Estudio transversal, observacional, descriptivo, no controlado y no aleatorio en una muestra de la población mexicana mestiza e indígena.

### **C. Descripción de las variables.**

- \* Grupo étnico.
- \* Presencia de la mutación FVLei.
- \* Presencia de la RPCA hereditaria secundaria al FVLei.
- \* Presencia de la RPCA adquirida.
- \* Grupo sanguíneo ABO y Rh

### **D. Descripción operacional de las variables.**

- \* Grupo étnico: descripción del grupo étnico del cual procede la muestra.

Expresado nominalmente: grupo étnico.

- \* FVLei: presencia de fragmentos del gen del FV de 67 y 200 pb.

Expresado en una escala cualitativa nominal: si, no.

- \* RPCA hereditaria: presencia de un cociente estandarizado para RPCA mayor de 0.85 (el valor puede variar dependiendo de la estandarización final de la prueba en nuestro laboratorio), en sujetos con la mutación FVLei.

Expresado en una escala cualitativa nominal: si, no.

\* RPCA adquirida: presencia de un cociente estandarizado para RPCA mayor de 0.85 (el valor puede variar dependiendo de la estandarización final de la prueba en nuestro laboratorio), en sujetos sin la mutación FVLei y que en un segundo escrutinio no presenten la prueba positiva.

Expresado en una escala cualitativa nominal: si, no.

\* Grupo sanguíneo ABO y Rh: presencia de cualquiera de los grupos sanguíneos, positivos o negativos, que se obtienen con los grupos sanguíneos ABO y Rh.

Expresado en una escala nominal: A, B, AB, O, positivos o negativos.

## **E. Selección de la muestra.**

### **E.1. Tamaño.**

Para detectar frecuencias de 2% con un 95% de intervalo de confianza (IC95%) y considerando que la población mexicana era de 100 millones de habitantes, se obtuvo una muestra de 4,200 sujetos. Se consideró un 10% extra para reposición de pérdidas. Debido a que 85% del mestizaje en México es español, muestreamos a la población mestiza manteniendo esta proporción. Ya que, aproximadamente, 12% de la población mexicana es indígena (48), intentamos estudiar un total de 504 indígenas.

### **E.2. Grupos de estudio.**

#### **E.2.1. Población indígena.**

Para participar en el estudio, los sujetos indígenas debían pertenecer a uno de los múltiples grupos étnicos que habitan la República Mexicana. Se consideraron indígenas cuando cumplieron todos los siguientes criterios: a) hablar una lengua nativa como primer lenguaje (español como segunda lengua); b) vivir en una población indígena; c) considerarse a sí mismo como indígena y; d) ser portador de grupo sanguíneo O

Rh(o)D-positivo (49). Si se sospechaba una mezcla interétnica el sujeto continuaba siendo elegible.

Ya que se sabe que los grupos indígenas de nuestro país son portadores en el 100% de los casos del grupo sanguíneo O Rh+ (49), se determinó el grupo sanguíneo en todas las muestras provenientes de estos grupos para apoyar la evidencia de no mestizaje que se obtuvo con el cuestionario que se muestra en el Apartado 1. Para esto, la determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh se realizó conforme a las técnicas mundialmente aceptadas para tal efecto utilizando equipos comerciales.

#### E.2.2. Población mexicana mestiza.

Por otra parte, todo sujeto mestizo radicando en la República Mexicana fue elegible para ingresar en el estudio. Excluimos a los sujetos sin evidencia de mestizaje en al menos uno de los padres. Además, excluimos a los sujetos con antecedentes de enfermedad trombótica o hemofilia; a aquéllos con historia familiar de trombosis o enfermedades hemorrágicas; a los pacientes con enfermedad hepática; a aquéllos con alcoholismo moderado a grave y a los portadores de desnutrición moderada o grave. Finalmente, excluimos a toda mujer ingiriendo anticonceptivos orales.

- a. Individuos de mestizaje español.
- b. Individuos de mestizaje italiano.
- c. Individuos de mestizaje libanés.
- d. Individuos de mestizaje negro.
- e. Individuos de mestizaje oriental.
- f. Individuos de mestizaje francés.
- g. Individuos de mestizaje europeo en general.

#### **E.3. Criterios de inclusión.**

\* Pertener al grupo étnico al cual se está estudiando (Apartado 1).

\* Mayores de 18 años.

\* Sanos (sin enfermedad conocida).

#### **E.4. Criterios de no inclusión.**

\* Muestro previo de un familiar directo.

\* Antecedente de hemorragia repetitiva.

\* Antecedente de alteración hemostática.

\* Antecedente de hepatopatía o alcoholismo.

\* Desnutrición moderada a grave.

#### **E.5. Criterios de exclusión.**

\* Evidencia de mestizaje en el caso de poblaciones indígenas.

\* Evidencia de no mestizaje en el caso de poblaciones mestizas.

\* Grupo sanguíneo ABO diferente del O+ en poblaciones indígenas (49).

#### **F. Procedimiento.**

Con la intención de coleccionar el número total de muestras sanguíneas de acuerdo al tamaño de la muestra calculada, reclutamos individuos a partir de tres fuentes mayores, a saber: bancos de sangre gubernamentales (BS), universidades (Us) y organizaciones no gubernamentales (ONGs). En cada caso, se estableció un contacto directo con la organización fuente de individuos desde varias semanas antes de la toma de las muestras. En el caso de los BS, a cada individuo se le dio información cuidadosamente acerca de la naturaleza del estudio el mismo día de la toma de la muestra y hasta entonces se le solicitó participar en el estudio. La muestra, en estos casos, siempre se obtuvo inmediatamente antes de la donación. Para las Us y las ONGs se envió la información adecuada para ser distribuida entre los candidatos a participar varias

semanas antes de la toma de las muestras. El día del muestreo, los participantes fueron nuevamente informados acerca de la naturaleza del estudio. Un total de 136 ONGs nos ayudaron en la colección de muestras incluyendo sindicatos y asociaciones asociadas con la salud, ambientalistas, culturales, deportivas, médicas, profesionales, religiosas y sociales. Estas organizaciones fueron trascendentales especialmente para lograr la recolección de muestras en las comunidades indígenas.

El punto más importante en el desarrollo de este proyecto fue la toma de muestras. Como se describe en los grupos de estudio, el tamaño de la muestra era suficiente para tener una representatividad verdadera de la mayoría de las poblaciones indígenas y mestizas del país y con ello, sugerir la frecuencia del FVLei y de la RPCA en nuestra población. Para tal efecto, las consideraciones tácticas fueron las siguientes:

- a. Primero las poblaciones indígenas.
- b. Primero las poblaciones más alejadas.
- c. Primero las poblaciones de acceso más difícil.
- d. Plan de muestreo de 48 horas preferentemente (fines de semana).
- e. Plan para la movilización a cada uno de los muestreos: automóvil, avión, etc.
- f. Plan para el alojamiento del equipo en cada una de las tomas.
- g. Plan para la alimentación del equipo en cada una de las tomas.

La colección de las muestras de la población indígena fue, sin duda, el punto más complejo del estudio por las características sociales y culturales de estas poblaciones y por la dificultad que representó el arribo a la zona de muestreo. El grupo de trabajo se dirigió a la zona previamente establecida en días no hábiles con el propósito de facilitar el escrutinio. En los lugares escogidos, los cuales fueron previamente sensibilizados para la muestra por los organismos cooperadores previamente señalados, se procedió

a la búsqueda de voluntarios que reúnan las condiciones requeridas en la hoja de datos anexo (Apartado 1). Como se asentó, nunca se tomó más de una muestra por familia.

De los casos que reunían los criterios de inclusión, se obtuvieron 4 muestras sanguíneas mediante venopunción en el brazo utilizando tubos de vidrio al vacío siliconizados (Vacutainer, Beckton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). Una de las muestras se colectó en EDTA para obtener el concentrado leucocitario. Las tres muestras restantes se colectaron en citrato de sodio 0.109 M (9:1, sangre: anticoagulante, vol/vol) para obtener el plasma. La obtención del plasma y de la capa leucocitaria se logró mediante la centrifugación de los tubos de colección a 2,000g por 15min. Una vez centrifugada, de la muestra con EDTA se obtuvo la capa leucocitaria mediante aspiración cuidadosa del plasma localizado encima del botón celular con una pipeta Pasteur de plástico desechable. La capa leucocitaria obtenida se colocó inmediatamente en tubos Eppendorf de 1.5mL para su congelamiento rápido y conservación en hielo seco hasta su procesamiento. El plasma pobre en plaquetas se obtuvo mediante centrifugación de la muestra con citrato de sodio y aspirando el plasma utilizando una pipeta Pasteur desechable de plástico, poniendo especial cuidado en no contaminar la muestra con plaquetas. Luego de aspirar el plasma, las muestras se guardaron inmediatamente en hielo. Tanto los plasmas como los concentrados leucocitarios se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  ya que así se pueden almacenar indefinidamente. El grupo sanguíneo se estableció mediante el uso de los glóbulos rojos de uno de los tubos.

Para llevar a cabo esta parte del proyecto ágilmente, se requirió del equipo de trabajo, 5,000 agujas desechables, 4,800 tubos al vacío con EDTA y 14,900 con citrato de

sodio, 2 centrifugas portátiles, hielo seco y los contenedores de muestras congeladas para transporte.

### **F.1. Determinación de la resistencia a la proteína C activada.**

Se llevó a cabo mediante una técnica descrita y validada ampliamente en la literatura (20,23,50,51), utilizando un equipo comercial disponible en el mercado (Stago APC-R<sup>®</sup>, Diagnostica Stago, Ansnieres, France) que cuantifica el tiempo de coagulación luego de la activación por medio de un veneno de víbora a nivel del FX en presencia de la PCA. El plasma problema se diluyó 1:20 en plasma deficiente en FV. Utilizamos para esto un equipo STA-Compaq (Diagnostica Stago, Ansnieres, France). Para realizar la prueba de la RPCA, los plasmas se descongelaron el mismo día de su procesamiento y se mantuvieron en baño de hielo hasta la realización de la prueba. Ésta se realizó en dos tubos (control y problema) incubando en cada uno 100  $\mu$ L del plasma en presencia de la tromboplastina parcialmente activada. Se estableció el tiempo en que tardó en aparecer el coágulo. Para la prueba inicial los resultados se expresan en tiempo de coagulación sin referencia al basal sin PCA. Consideramos positiva la muestra para RPCA cuando el tiempo de coagulación fue <120seg.

En todo caso en el que la primera prueba de RPCA era positiva, se realizó una segunda prueba en la cual utilizamos otro equipo comercial y en el que también se realiza una dilución 1:4 de la muestra problema con plasma deficiente de FV (Coatest<sup>®</sup>, APC Resistance V, Instrumentation Laboratory, Milán, Italia). Utilizando esta prueba, la RPCA se consideró positiva cuando el cociente estandarizado de los tiempos de coagulación fue  $\leq 0.84$ . Esta estandarización permite evitar variaciones del

procedimiento mismo o en la concentración de la PCA (52). Primero se calculó la sensibilidad del cociente a la PCA en el control y en el problema:

$$\text{Sensibilidad estandarizada} = \frac{\text{tiempo de coagulación tubo control}}{\text{tiempo de coagulación tubo problema}}$$

una vez obtenidas ambas sensibilidades, se procedió a estandarizar la prueba en el plasma problema:

$$\text{Cociente estandarizado} = \frac{\text{sensibilidad estándar plasma problema}}{\text{sensibilidad estándar plasma control}}$$

Aunque se ha descrito que el valor normal mínimo para los tiempos de coagulación y para los rangos estandarizados, se sugiere que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia (52,53).

Siempre que una muestra resultaba positiva para RPCA con ambas pruebas, se excluyó la posibilidad de que se tratara de un anticoagulante lúpico utilizando también un equipo comercial comercialmente disponible (Staclot LA<sup>®</sup>, Diagnostica Stago, Ansnieres, France). En todos los sujetos que tuvieron RPCA, una nueva muestra se obtuvo al menos 3 meses después de la primera para confirmar el resultado y para poder identificar a aquéllos individuos que eran posibles portadores de la variante adquirida de la RPCA. Durante esta segunda fase del estudio, la RPCA fue nuevamente investigada utilizando los dos equipos comerciales mencionados líneas arriba. En base a los criterios previamente publicados, consideramos que la RPCA era adquirida en base a la presencia de RPCA en ausencia de FVLei (28,52).

## **F.2. Búsqueda del FV Leiden.**

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del HGR Gabriel Mancera de

acuerdo a la tesis ampliamente descrita y validada en la literatura (35). Para llevar a cabo el estudio, utilizamos el botón leucocitario obtenido del tubo conteniendo EDTA. El DNA genómico se extrajo con un equipo QIAamp blood kit (QIAGEN, Germany) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Perkin-Elmer. Para amplificar el fragmento deseado del gen del FV se utilizó como oligonucleótido 5' PR-6967;nt 1581 a 1602 y como oligonucleótido 3' PR-990;nt 127 a 146 en el intrón 10. Se utilizaron 0.5µg de DNA en una reacción que contenía 2mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer), 0.4mg/mL de albúmina de suero bovino (New England Biolabs), 0.8mM de dNTP's (Promega), 400ng de cada oligonucleótido, 8% DMSO y 1U de Taq polimerasa en un volumen total de 125µL. El fragmento obtenido fue de 267 pb. El procedimiento consistió en 30 ciclos a 91°C por 40seg, 58°C por 40sec y 71°C por 2min; este ciclo se repitió 35 veces. Luego se procedió a la restricción enzimática alelo-específica del DNA amplificado con la enzima Mnl-I durante 6h a 37°C. El genotipo del FVLei se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Cada gel fue teñido con 1µg/mL de bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. Los individuos sin el FVLei se identificaron por la presencia de las siguientes bandas de acuerdo a su peso molecular: 163pb, 67pb y 37pb. Si el FVLei estaba presente, sólo dos bandas se visualizaron de acuerdo a su peso molecular: una de 200pb y otra de 67pb.

### **F.3. Sede del estudio.**

Fue el Hospital General Regional Gabriel Mancera del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el cual se encuentra la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis. Esta unidad cuenta con todos los requerimientos con los

que se llevó a cabo el almacenamiento de muestras y la realización de las pruebas de RPCA y FVLei. Se contó con dos químicos farmacobiólogos y dos técnicos laboratoristas de la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis durante el tiempo que duró el estudio.

### **G. Análisis estadístico.**

Los datos se expresan como frecuencias, promedios y medianas. Ya que este fue un estudio no aleatorio, llevamos a cabo un análisis de la distribución de los individuos participantes para establecer si existían diferencias entre las poblaciones analizadas que pudieran afectar los resultados del estudio. Por esta razón, analizamos los resultados de acuerdo a las tres fuentes principales de reclutamiento de los individuos participantes: Us, ONGS y BS; los analizamos en términos de edad y sexo y prevalencia de RPCA adquirida y FVLei. Empleamos una prueba de chi cuadrada para identificar diferencias entre estas tres fuentes de individuos. Para demostrar diferencias entre los tres grupos en términos de edad, empleamos una prueba de ANOVA. Los resultados fueron significativos cuando  $p < 0.05$ .

**CONSIDERACIONES ETICAS.**

Aunque el presente proyecto requirió de seres humanos para su realización, únicamente se trabajó con muestras sanguíneas de donadores voluntarios previamente informados acerca del objetivo de la toma de la muestra y bajo su pleno consentimiento, por lo que no se requirieron consideraciones especiales en este punto.

Antes de la venopunción, todos los sujetos recibieron información oral y escrita en relación a las características del estudio. Si aceptaban participar, se les pidió que firmaran un consentimiento informado (si sabían leer y escribir). Les aseguramos siempre acerca de la confidencialidad de los resultados así como del uso de las muestras biológicas de acuerdo a lo establecido en los principios de la Declaración de Helsinki. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética y el Comité Local de Investigación del HGR Gabriel Mancera y por la Comisión Nacional de Investigación Científica de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS.

## **RESULTADOS.**

Luego de que 5,026 individuos mexicanos sanos fueron invitados a participar en el estudio, se obtuvieron las muestras sanguíneas de 4,345 sujetos de toda la República Mexicana. Las características generales se muestran en la Tabla 3. Se cubrieron todos los estados colectándose muestras de 647 ciudades, pueblos y rancherías.

Los porcentajes para las mujeres y los hombres participantes fueron 51.4% y 48.6%, respectivamente. La mediana de edad para las mujeres fue de 38.5 años (rango 18 a 68 años), mientras que la mediana de edad para los hombres fue de 40.0 años (rango 18 a 69 años). Se obtuvieron 600 muestras sanguíneas de indígenas mexicanos que residen en 11 estados de la República Mexicana así como 3,745 muestras sanguíneas de sujetos mestizos. Obtuvimos 380 muestras de mujeres indígenas y 220 de hombres indígenas con una mediana de edad de 35.5 años (rango 18 a 56 años) y de 39 años (rango 19 a 57 años), respectivamente. La mediana de edad para las mujeres mestizas fue de 40 años (rango 18 a 68 años) y de 41 años (rango 18 a 69 años) para los hombres mestizos. Los números absolutos y porcentajes de los individuos participantes en el estudio de acuerdo a cada grupo mestizo se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 3. Características demográficas de 4,345 individuos mexicanos sanos**

Estado	<i>n</i>	%	Población mestiza		Población indígena	
			Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Aguascalientes	72	1.65	42	30	0	0
Baja California Norte	86	1.97	46	40	0	0
Baja California Sur	20	0.46	5	15	0	0
Campeche	60	1.38	36	24	0	0
Chihuahua	100	2.29	47	53	0	0
Chiapas	180	4.14	110	70	95	55
Coahuila	84	1.93	52	32	0	0
Colima	60	1.38	22	38	0	0
Distrito Federal	774	17.81	368	406	21	19
Durango	110	2.53	24	86	0	0
Estado de México	200	4.61	90	110	21	19
Guerrero	100	2.29	59	41	0	0
Guanajuato	62	1.42	49	13	0	0
Hidalgo	65	1.49	45	20	13	7
Jalisco	205	4.71	107	98	0	0
Michoacán	100	2.29	60	40	17	13
Morelos	100	2.3	93	7	0	0
Nayarit	96	2.2	50	46	0	0
Nuevo León	287	6.61	135	152	0	0
Oaxaca	184	4.23	80	104	61	39
Puebla	175	4.02	97	78	71	9
Querétaro	130	2.99	106	24	0	0
Quintana Roo	20	0.46	3	17	0	0
San Luis Potosí	140	3.22	59	81	13	7
Sinaloa	80	1.84	40	40	0	0
Sonora	142	3.26	68	74	0	0
Tabasco	160	3.68	72	88	0	0
Tamaulipas	105	2.41	50	55	0	0
Tlaxcala	70	1.61	43	27	18	12
Veracruz	188	4.32	105	83	30	20
Yucatán	110	2.53	37	73	20	20
Zacatecas	80	1.84	35	45	0	0
Total <i>n</i> (%)	4,345	100	1,855 (42.7%)	1,890 (43.5%)	380 (8.7%)	220 (5.1%)

**Tabla 4. Frecuencia de los grupos mestizos**

Grupo mestizo	<i>n</i>	%
Español	3,363	89.8
Negro	157	4.2
Otros europeos	86	2.3
Italiano	42	1.1
Francés	41	1.1
Libanés	34	0.9
Oriental	22	0.6
Total	3,745	100

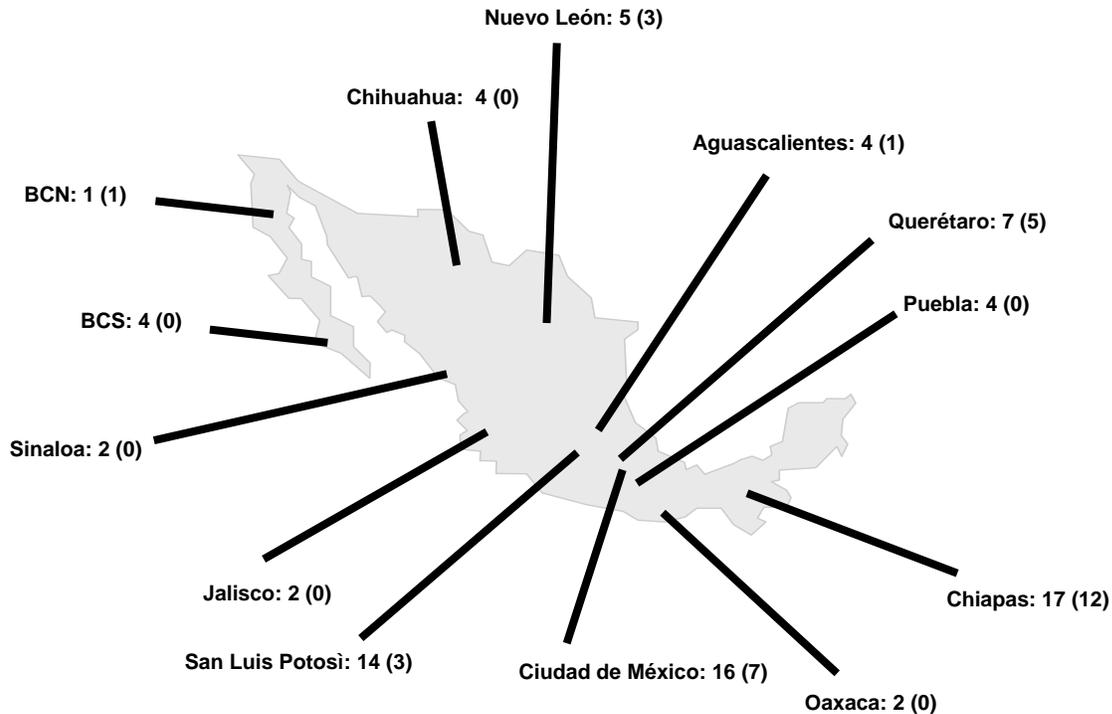
Los datos demográficos generales para las poblaciones indígenas se muestran en la Tabla 5. Se obtuvieron muestras de 19 grupos étnicos. Como se puede apreciar el número de muestras provenientes de mujeres fue mayor que el de hombres siendo esto debido, principalmente, a que las primeras fueron más accesibles para el muestreo por cuestiones laborales, esencialmente. El 100% de los sujetos indígenas participantes en este estudio tuvo el grupo sanguíneo O positivo.

**Tabla 5. Características de 600 individuos mexicanos indígenas de acuerdo a su origen étnico**

Grupo étnico	<i>N</i>	%	Mujeres	%	Hombres	%
Náhuatl	90	15	70	11.66	20	3.33
Maya	40	6.66	22	3.66	18	3.0
Zapoteco	50	8.33	35	5.83	15	2.5
Suave	25	4.16	18	3.0	7	1.16
Mixteco	50	8.33	29	4.83	21	3.5
Tzotzil	40	6.66	24	4.83	16	2.66
Tocolobal	30	5.0	22	3.66	8	1.33
Tzetzal	45	7.5	40	6.66	5	0.83
Chanal	10	1.66	10	1.66	0	0
Mame	30	5.0	15	2.5	15	2.5
Lacandón	15	2.5	10	1.66	5	0.83
Popoloca	35	5.83	32	5.33	3	0.5
Zacapoaxtla	10	1.66	8	1.33	2	0.33
Mazahua	20	3.33	18	3.0	2	0.33
Otomí	15	2.5	5	0.83	10	1.66
Huachil	40	6.66	25	4.16	15	2.5
Huasteco	15	2.5	4	0.66	11	1.83
Chinanteco	30	5.0	23	3.83	7	1.16
Mazatecos	10	1.66	10	1.66	0	0
<b>Total</b>	<b>600</b>	<b>100</b>	<b>420</b>	<b>70.75</b>	<b>180</b>	<b>29.25</b>

La prevalencia de la RPCA fue 0% en la población indígena estudiada. Entre 3,745 mestizos mexicanos estudiados, la RPCA se encontró en sólo 82 individuos (2.18%) utilizando las dos pruebas antes descritas para RPCA. La Figura 6 muestra la distribución de la RPCA a lo largo de todo el territorio nacional. Considerando los casos con RPCA positiva, estos fueron 51 mujeres y 31 hombres con una mediana de edad de 37 años (rangos 18 a 60 años). En estos sujetos, la prueba de RPCA se llevó a cabo otra vez utilizando los dos equipos comerciales, de acuerdo a como se describió anteriormente. En esta segunda muestra, 50 sujetos (1.33%) tuvieron una prueba negativa (35 mujeres y 15 hombres). Ninguna de estas mujeres tomaba anticonceptivos orales al momento de hacer la toma de la muestra y ninguno de los 50 sujetos era portador de FVLei. Treinta y dos sujetos (16 hombres y 16 mujeres), permanecieron con la prueba positiva después de que se les hizo el análisis con el segundo equipo comercial y todos ellos fueron positivos para el estado heterocigoto del FVLei. Por lo tanto la relación entre las prevalencias de RPCA adquirida:hereditaria en nuestro estudio fue de 1.5:1.

La distribución geográfica de los casos con FVLei se muestra en la Figura 6. En base a los datos antes expuestos, la prevalencia del FVLei en la población mestiza mexicana es apenas de 0.85%.



**Figura 6. Distribución de la RPCA en México. Los números representan el total de casos de RPCA asociados o no con FVLei. Los números entre paréntesis representan el total de casos de RPCA asociados a FVLei.**

El análisis de la distribución de los individuos evaluados en este estudio de acuerdo a la fuente de reclutamiento reveló que la asignación de los sujetos no fue significativamente diferente en términos de edad y sexo (Tabla 6).

**Tabla 6. Distribución por edad de hombres y mujeres de acuerdo a la fuente de origen**

<b>Edad (años)</b>	<b>18-20</b>	<b>21-30</b>	<b>31-40</b>	<b>41-50</b>	<b>51-60</b>	<b>61-69</b>
	<b>n (%)</b>					
<b>Todos (n=3,745)</b>	291 (7.8)	763 (20.4)	1,062 (28.4)	1,066 (28.4)	425 (11.3)	138 (3.7)
ONGs (n=2,197)	167 (7.6)	445 (20.2)	635 (28.9)	632 (28.7)	239 (10.8)	79 (3.6)
BS (n=881)	68 (7.7)	174 (19.7)	256 (29.0)	249 (28.2)	102 (11.5)	32 (3.6)
Us (n=667)	51 (7.6)	138 (20.6)	191 (28.6)	191 (28.6)	73 (10.9)	23 (3.4)
ONGs vs. BS vs. Us	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Mujeres (n=1,855)</b>	143 (7.7)	377 (20.3)	533 (28.7)	528 (28.4)	208 (11.2)	66 (3.6)
ONGs (n=1,098)	83 (7.5)	220 (20.0)	318 (28.9)	316 (28.7)	121 (11.0)	40 (3.6)
BS (n=432)	33 (7.6)	86 (19.9)	126 (29.1)	123 (28.4)	49 (11.3)	15 (3.5)
Us (n=325)	25 (7.7)	68 (20.9)	92 (28.3)	93 (28.6)	36 (11.0)	11 (3.4)
<b>Hombres (n=1,890)</b>	148 (7.8)	386 (20.4)	529 (28.0)	538 (28.4)	217 (11.5)	72 (3.8)
ONGs (n=1,099)	84 (7.6)	225 (20.4)	317 (28.8)	316 (28.7)	118 (10.7)	39 (3.5)
BS (n=449)	35 (7.7)	88 (19.5)	130 (28.9)	126 (28.0)	53 (11.8)	17 (3.7)
Us (n=342)	26 (7.6)	70 (20.4)	99 (28.9)	98 (28.6)	37 (10.8)	12 (3.5)
♀ vs. ♂ (p =)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ONGs ♀ vs. ♂ (p =)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BS ♀ vs. ♂ (p =)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Us ♀ vs. ♂ (p =)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Us = universidades; ns = no significativo

Por otra parte, el análisis de la distribución de los casos de RPCA adquirida o asociada al FVLei de acuerdo a las tres fuentes de reclutamiento de los participantes en el estudio no mostró tampoco diferencias en términos de edad o prevalencia de FVLei. Tal y como se esperaba para el número de casos de RPCA adquirida encontrados en mujeres, la prevalencia de este fenómeno fue significativamente mayor que en las mujeres que en los hombres en los tres grupos de reclutamiento (Tabla 7).

**Tabla 7. Número y edad de mujeres y hombres y sus prevalencias relacionadas de RPCA adquirida y FVLei de acuerdo al origen de la muestra.**

	<b>Todos</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>	<b>p*</b>
n (%)	3,745 (100)	1,855 (49.5)	1,890 (50.5)	ns
Edad**	40.5 (18-69)	40 (18-68)	41 (18-69)	ns
<b>ONGs</b>				
n (%)	2,197 (58.7)	1,098 (59.2)	1,099 (58.1)	ns
Edad**	40.5 (18-69)	40.5 (18-68)	40.5 (18-69)	ns
RPCA adquirida***	30 (1.36)	21 (1.91)	8 (0.72)	0.01
FVLei***	18 (0.81)	9 (0.82)	9 (0.81)	ns
<b>BS</b>				
n (%)	881 (23.5)	n = 432 (23.2)	449 (23.7)	ns
Edad**	40.5 (18-65)	40 (18-65)	40.5 (18-65)	ns
RPCA adquirida***	11 (1.24)	8 (1.85)	4 (0.89)	0.001
FVLei***	8 (0.90)	4 (0.92)	4 (0.89)	ns
<b>Us</b>				
n (%)	667 (17.8)	325 (17.5)	342 (18.0)	ns
Edad**	40 (18-69)	40 (18-66)	41 (18-69)	ns
RPCA adquirida***	9 (1.35)	6 (1.84)	3 (0.87)	0.01
FVLei***	6 (0.89)	3 (0.92)	3 (0.87)	ns
RPCA adquirida: ONGs vs. BS vs. Us	ns	ns	ns	
FVLei: ONGs vs. BS vs. Us (p =)	ns	ns	ns	
Edad: ONGs vs. BS vs. Us (p =)	ns	ns	ns	

Us = universidades; \* = mujeres vs. hombres; \*\* = mediana (rangos); \*\*\*: promedio (%);

\*\* = mediana (rangos); ns = no significativo

Sin embargo, cuando se analizaron separadamente mujeres y hombres, no encontramos diferencias entre las tres fuentes principales de reclutamiento (Tabla 7).

Finalmente, se hizo el análisis de la distribución de los casos de RPCA adquirida o de FVLei de acuerdo a la edad de los participantes (Tabla 8). Excepto para el grupo de individuos mayores de 61 años, la distribución de los casos con RPCA adquirida fue muy similar en todo el análisis para ambas variables estudiadas.

**Tabla 8. Distribución de los casos con RPCA adquirida y FVLei de acuerdo a la edad de los individuos participantes**

Edad (años)	18-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-69
Mujeres (n = )	143	377	533	528	208	66
Hombres (n =)	148	386	529	538	217	72
	<b>n (%)</b>					
RPCA adquirida ♀ (n = 35)	3 (2.0)	7 (1.8)	11 (2.0)	10 (1.8)	4 (1.9)	0
RPCA adquirida ♂ (n = 15)	1 (0.7)	3 (0.8)	5 (0.9)	4 (0.7)	2 (0.9)	0
FVLei ♀ (n = 16)	1 (0.7)	2 (0.5)	6 (1.1)	5 (0.9)	2 (0.9)	0
FVLei ♂ (n = 16)	1 (0.7)	3 (0.7)	6 (1.1)	4 (0.7)	2 (0.9)	0

## **DISCUSIÓN.**

La trombosis arterial y venosa es una de las causas directas líderes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Por lo tanto, la investigación clínica, básica y epidemiológica que lleve a la identificación de nuevas vías protrombóticas es una prioridad en la medicina actual. Ya que el FVLeI está presente en hasta 50% de los pacientes con historia de trombosis, la RPCA y el FVLeI continúan siendo campos atractivos para ser explorados en una gran cantidad de países que todavía no conocen el comportamiento de estos fenómenos en su población (27,46,54-57). Los análisis de haplotipos utilizando seis sitios dimórficos en el gen del FV en sujetos caucásicos de origen judío, árabe, austriaco y francés son la base para afirmar que existe un origen único para esta mutación (54). Sin embargo, conforme uno se mueve de Europa hacia el Este, es evidente que la prevalencia del FVLeI disminuye gradualmente. Por lo tanto, la distribución geográfica de esta mutación es bastante desigual ya que, mientras que es relativamente común en Europa (prevalencia en la población general, 0.8% a 13.3%), es rara en Asia y en el Medio Oriente (2,16,44,58). Se sugiere que esta mutación quizá ocurrió hace 21,000 a 34,000 años, luego de la separación de los progenitores no-africanos de los africanos (100,000 años antes de nuestra era) y de la separación de los progenitores asiáticos de los caucásicos (60,000 a 40,000 años antes de nuestra era) (59,60). Por lo tanto, la mutación debió aparecer en algún lugar de Europa (quizá en el Líbano actual) luego de que la migración a América terminó. Nuestros resultados sugieren fuertemente que esta teoría es cierta ya que no encontramos FVLeI en ninguna de los análisis de sujetos indígenas provenientes de esta muestra de la población nativa de México. Sin embargo, no es posible desechar la

posibilidad de que el FVLei haya estado presente antes de la migración pero que haya desaparecido lentamente en el curso de este fenómeno poblacional humano.

La distribución mundial original del FVLei fue alterada otra vez por las migraciones humanas modernas. Como consecuencia, el mestizaje cambió los perfiles trombofílicos característicos de la mayoría de las poblaciones actuales. Por ejemplo, el FVLei es casi inexistente en África; sin embargo, aumenta significativamente en las poblaciones afro-americanas. Por supuesto, la migración de europeos a América y el mestizaje generado en la mayoría de los países americanos actuales, determinó una nueva distribución del FVLei en nuestro continente. Aunque informes previos describieron que el FVLei era muy bajo o ausente en nativos americanos (44,61), ninguno de estos informes incluyó ni un número tan grande de grupos étnicos ni el número de sujetos que fueron estudiados en este trabajo. Los datos de esta investigación confirman que el FVLei está ausente en las poblaciones indígenas mexicanas. En mestizos latinoamericanos, la prevalencia del FVLei difiere ampliamente. En Argentina y Brasil llega hasta 2.5% y 2.0%, respectivamente, datos muy cercanos al de la mayoría de las poblaciones europeas modernas (46). Ya que la prevalencia general del FVLei en España va de 3.3% a 3.7% (55,56) y ya que la mayoría de la población mexicana tiene mestizaje español (85%), en este estudio se esperó, inicialmente, una prevalencia similar en nuestro país. Sorprendentemente, la prevalencia fue muy baja (0.85%). Ya que el FVLei está ausente en la población mexicana indígena, la baja frecuencia del FVLei en la población mexicana mestiza sugiere fuertemente que aunque la mutación fue importada durante la colonización de América, su frecuencia actual (baja) se debe a un gran mestizaje con las poblaciones indígenas. De acuerdo con esto, parece ser que, al

menos para este aspecto específico de la genética mexicana, el aporte indígena al mestizaje es muy grande.

En este estudio, la distribución de la RPCA y del FVLei mostró un patrón altamente localizado geográficamente. Se pueden hacer algunas conjeturas para explicar esta distribución de acuerdo a los patrones de mestizaje local. Por ejemplo, la mayoría de los estados de la República Mexicana en los que se encontró el FVLei tienen un número bajo de grupos étnicos o bien un índice de mestizaje bajo. Aunque Chiapas es el estado más rico en número de etnias, también es cierto que, debido a las condiciones socioculturales y de marginación racial imperantes, el mestizaje ha sido siempre mínimo, especialmente en la región de Los Altos, donde la mayoría de las muestras de ese estado fue obtenida. El tercer grupo grande de muestras positivas fue en la Ciudad de México. Esto parece, aparentemente, más fácil de explicar ya que esta es la ciudad con la mayor concentración demográfica en el país, un mosaico gigante de mestizos e indígenas.

Debido a que este no fue un estudio aleatorio, cabía la posibilidad de que los resultados no fueran lo suficientemente sólidos para elaborar conclusiones. En un intento por disminuir los sesgos atribuibles a la selección de los sujetos, una consecuencia del tipo de estudio, realizamos un análisis más amplio de la distribución de los individuos participantes. Observamos que, en general, había tres fuentes de reclutamiento por lo que hicimos diferentes análisis desde la perspectiva de estos grupos. Considerando estas tres fuentes de reclutamiento, la distribución de los individuos de acuerdo a su edad y género no fue significativamente diferente y, por otra parte, no existieron diferencias significativas en términos de la prevalencia del FVLei. Así mismo, la frecuencia de la RPCA fue similar entre las tres fuentes de reclutamiento cuando se

analizaron por separado mujeres y hombres. Se puede suponer que todos estos datos permiten asegurar que el diseño del estudio no afectó los resultados de la investigación. Sin embargo, debe mencionarse que encontramos una mayor prevalencia de RPCA adquirida en mujeres en comparación con los hombres. Este hallazgo no se asoció a un incremento similar en la frecuencia del FVLei, un hecho que sugiere fuertemente que el o los mecanismos responsables de la aparición del fenómeno de la RPCA adquirida están presentes con mayor frecuencia en las mujeres que en los hombres.

El significado de la RPCA que aparece en ausencia del FVLei o de otras mutaciones en el gen del FV, también llamada RPCA adquirida, está bien reconocido aunque la información acerca de él es aún escasa. Debido al número alto de variables de confusión presentes, sólo unos pocos estudios han analizado a la RPCA como un factor de riesgo trombótico independiente. Existe un aumento en el riesgo de infarto cerebral en sujetos en el quintil más alto del valor de RPCA en comparación con aquéllos en el quintil más bajo, sin cambios significativos luego de la corrección para el estado de portador del FVLei (57). En un estudio poblacional, se observó una relación entre los quintiles de RPCA y la aparición de enfermedad arterial periférica, sin embargo, no se observó ninguna diferencia luego de que se hizo el ajuste para el estado de portador de FVLei (62). Este hallazgo no fue inesperado debido a la asociación entre RPCA y trombosis en poblaciones no blancas en las que las mutaciones del FV son casi nulas (63). Dos análisis adicionales observaron un aumento en el riesgo de trombosis venosa entre sujetos portadores de RPCA adquirida (64). Aunque la frecuencia de la RPCA adquirida ha sido subestimada, en un estudio representativo de la población de Europa Central, la prevalencia de este fenómeno fue al menos tan frecuente como el del FVLei (62). En el estudio poblacional Vicenza Thrombophilia and Arteriosclerosis Project, el

FVLei y los cocientes de RPCA  $\leq 0.84$  ocurrieron en una relación 1:4 (65). Por lo tanto, parece que la RPCA por si misma es un fenotipo protrombótico independiente y que el estado trombofílico que induce debe ser atendido con mayor énfasis en la práctica clínica futura.

Se han propuesto múltiples mecanismos para explicar el fenómeno de la RPCA adquirida asociada a diferentes condiciones clínicas, sin embargo, no existe aún una explicación satisfactoria. Estados como el anticoagulante lúpico y los anticuerpos anticardiolipinas y anti- $\beta 2$ -glicoproteína I (66,67), el mismo lupus eritematoso sistémico (68), el embarazo (69-72), la pre-eclampsia (73), el SIDA (74), la hipertensión arterial (75), el infarto agudo de miocardio (76), la ingesta de anticonceptivos orales (77-79), la terapia de reemplazo hormonal (80), el mieloma múltiple (81) y el cáncer (82-84) pueden inducir RPCA adquirida. Así, la prueba plasmática ofrece un resultado adicional en ausencia del FVLei (85,86). Ya que la prueba originalmente descrita basada en el TTPA no es específica para el FVLei, se han escudriñado múltiples estrategias para hacer a las pruebas coagulométricas para RPCA más específicas para el FVLei (87). Debido a la naturaleza de esta investigación, decidimos utilizar una prueba específica para el FVLei como escrutinio global y en los casos con positividad para la prueba, un segundo ensayo fue utilizado el cual emplea una técnica con un principio diferente. La frecuencia encontrada en la población mestiza fue muy similar entre hombres y mujeres. Ninguna mujer con RPCA positiva estaba tomando hormonales. Llama la atención el que sólo 31% de los portadores de RPCA también tuvieran FVLei. Se ha sugerido que un número elevado de individuos sanos sin historia familiar de trombosis pueden ser portadores de este fenotipo. Por supuesto, el fenotipo de EPCA no asociado

al FVLei puede ser debido a otras mutaciones raras en el gen del FV o debidas a una condición realmente adquirida. Sin embargo, la frecuencia de las otras mutaciones en el gen del FV responsables de inducir también RPCA es tan baja que pueden considerarse irrelevantes (52). En este análisis transversal la frecuencia de la RPCA adquirida alcanzó el 1.33%. Consideramos que estos son casos reales de RPCA adquirida por las siguientes razones: 1) los sujetos tenían una prueba inicial positiva tal y como lo demostraron dos diferentes pruebas; 2) estos sujetos tuvieron la prueba negativa 3 meses después de la prueba inicial otra vez, utilizando las dos técnicas coagulométricas (indiscutiblemente, estos dos hechos sugieren fuertemente la naturaleza transitoria y no hereditaria del fenómeno); 3) como se esperaba, todos los casos con RPCA en las fases 1 y 2 fueron portadores del FVLei; y 4) todos los pacientes con RPCA transitoria tuvieron la prueba del FVLei negativa. La ausencia de enfermedades conocidas cuando la RPC fue positiva confirma que este fenómeno puede estar presente con una prevalencia moderada durante periodos breves en sujetos sanos.

## **CONCLUSIONES.**

Los datos de este estudio sugieren fuertemente que en México la frecuencia de RPCA y FVLei es muy baja. En base al número de sujetos mexicanos indígenas provenientes de diferentes grupos étnicos, confirmamos que ni la RPCA ni el FVLei afectan a los nativos americanos. Este hecho refuerza sólidamente la hipótesis de que la aparición del FVLei sucedió en Europa luego de que comenzó la migración desde Europa a América. En esta muestra de la población mexicana se demostró que no existen mutaciones diferentes del FVLei que induzcan RPCA. El FVLei es responsable de sólo el 31% de los casos de RPCA lo que significa que la RPCA de tipo adquirido es casi dos veces más frecuente que la variante hereditaria. Por supuesto, la importancia clínica de estos datos requiere la clarificación en estudios prospectivos diseñados para evaluar su impacto sobre la aparición de fenómenos trombóticos. En base a los resultados de este estudio es posible sugerir que, al menos para la RPCA y el FVLei, existe un profundo efecto indígena sobre la población mestiza mexicana.

**BIBLIOGRAFIA.**

1. Goldhaber SZ. Epidemiology of pulmonary embolism and deep vein thrombosis. In: Bloom AL, Forber CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (Eds): Haemostasis and Thrombosis. Churchill Livingstone. 1994.
2. Dahlback B. Inherited thrombophilia: Resistance to activated protein as a pathogenic factor for venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607-614.
3. Nemerson Y. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin Hematol* 1992;29:170-176.
4. Furie B, Furie BC. Molecular and cell biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992;326:800-806.
5. Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* 1988;71:539-555.
6. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 1993;70:29-35.
7. Esmon CT. Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:1.
8. Walker FJ, Fay PJ. Regulation of blood coagulation by the protein C system. *FASEB J* 1992;6:2561-2567.
9. Shen L, Dahlback B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994;269:18735-18738.
10. Marlar RA, Kressin DC, Madden RM. Contribution of plasma proteinase inhibitors to the regulation of activated protein C in plasma. *Thromb Haemost* 1993;69:16.
11. Fay PJ. Factor VIII structure and function. *Thromb Haemost* 1993;70:63-67.
12. Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH, Davie EW. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *J Biol Chem* 1977;16:5824.
13. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984;74:2082-2088.
14. Malm J, Laurell M, Nilsson IM, Dahlback B. Thromboembolic disease: Critical evaluation of laboratory investigation. *Thromb Haemost* 1992;68:7-13.
15. Miletich JP, Prescott SM, White R, Majerus PW, Bovill EG. Inherited predisposition to thrombosis. *Cell* 1993;72:477-480.
16. Tabernero MD, Tomas JF, Alberca I, Orfao A, Borrascas AL, Vicente V. Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. *Am J Hematol* 1991;36:249-254.
17. Gladson CL, Scharrer I, Hach V, Beck KH, Griffin JH. The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1988;59:18-22.
18. Bovill EG, Bauer KA, Dickerman JD, Callas P, West B. The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England kindred. *Blood* 1989;73:712-717.
19. Engesser L, Broekmans AW, Briet E, Brommer EJP, Bertina RM. Hereditary protein S deficiency: Clinical manifestations. *Ann Intern Med* 1987;106:677-682.
20. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated

protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1004-1008.

21. Faioni EM, Franchi F, Asti D, Sacchi E, Bernardi F, Mannucci PM. Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families: Interference in a protein S functional assay. *Thromb Haemost* 1993;70:1067-1071.

22. Dahlback B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995;74:139-148.

23. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Buller H, Berends F, ten Cate JW, Mertens K, van Mourik JA. Association of idiopathic thromboembolism with single point mutation at Arg506 of factor V. *Lancet* 1994;343:1535-1536.

24. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde F, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 1993;342:1503-1506.

25. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in a majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993;82:1989-1993.

26. Halbmayer WM, Haushofer A, Schon R, Fisher M. The prevalence of poor anticoagulant response to activated protein C (APC resistance) among patients suffering from stroke or venous thrombosis and among healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinol* 1994;5:51-57.

27. Dahlbäck B. Factor V gene mutation causing inherited resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism. *J Intern Med* 1995;237:221-227.

28. Clark P, Walker ID. The phenomenon known as acquired activated protein C resistance. *Br J Haematol* 2001;115:767-773.

29. Proudfoot NJ, Brownlee GG. 3'noncoding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 1976;263:211.

30 Wang H, Riddell DC, Guinto ER, MacGillivray RT, Hamerton JL. Localization of the gene encoding human Factor V to chromosome 1q21:25. *Genomics* 1988;2:324-328.

31. Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation Factor V. *Biochemistry* 1992;31:3777-3785.

32. Gewirtz AM, Keefer M, Doshi K, Annamalai AE, Chiu HC, Colman RW. Biology of human megakaryocyte Factor V. *Blood* 1986;67:1639-1648.

33. Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ, Mann KG. Radioimmunoassay of Factor V in human plasma and platelets. *Blood* 1982;60:59-63.

34. Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, Kriz RW, Aldape RA, Hewick RM, Kaufman RJ, Mann KG. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human Factor V. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4846-4850.

35. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, van der Valden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.

36. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994;343:1362-1363.

37. Zoller B, Dahlback B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994;343:1536-1538.

38. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991;30:10363-10370.

39. Dahlback B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;81:1396-1400.
40. Montiel-Manzano G, de la Peña-Díaz A, Majluf-Cruz A. Evaluación nacional de la resistencia a la proteína C activada. *Rev Invest Clin* 2003;55:358-369.
41. Sun X, Evatt B, Griffin JH. Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood* 1994;83:3120-3125.
42. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994;330:517-521.
43. Hellgren M, Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as the basis for venous thromboembolism associated with pregnancy and oral contraceptives. *Am J Obstet Gyn* 1995;173:210-213.
44. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995;346:1133-1134.
45. Cesarman G, Villazon S, Zuniga J, Rosillo C, Vahedian M, Stopcken A. Ausencia de mutación Leiden en el gen del factor V mazatecos: un gen de importación reciente. *Memorias de la XXXII Jornada Anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología*. 1996:137.
46. Hepner M, Roldan A, Pieroni G, Frontroth J, Serviddio RM, Feliu T, Sciuccati G, Bonduel M. Frequency of factor V Arg506 to Gln mutation (FV Leiden) and activated protein C resistance in blood donors in Argentina. A preliminary study. *Thromb Haemost* 1997;78:226.
47. Dirección de Prestaciones Médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social. Reporte anual de morbimortalidad 1994.
48. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. XII Censo Nacional de Población y Vivienda 2000. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).
49. Lisker R, Ramírez E, Babinsky V. Genetic structure of autochthonous populations of Meso-America: Mexico. *Hum Biol* 1996;68:395-404.
50. de Ronde H, Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC-resistance: A critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thromb Haemost* 1994;72:880-886.
51. Greengard JS, Eichinger S, Griffin J, Bauer KA. Brief report: variability of thrombosis among homozygous siblings with resistance to activated protein C due to an Arg-Gln mutation in the gene for factor V. *N Engl J Med* 1994;331:1559-1562.
52. Cushman M, Brushan F, Bovill E, Tracy R. Plasma resistance to activated protein C in venous and arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 1994;72:647.
53. Elice F, Fink L, Tricot G, Barlogie B, Zangari M. Acquired resistance to activated protein C (aAPCR) in multiple myeloma is a transitory abnormality associated with an increased risk of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2006;134:399-405.
54. Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conard J, Brenner B, Eldor A, Seigsohn U. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997;89:397-402.
55. Martínez E, Tirado I, Vallve C, Murillo J, Felices R, Urrutia T, Mateo J, Borrel M, Fontcuberta J. Prevalence of resistance to activated protein C in patients with thrombosis in Spanish population. *Thromb Haemost* 1997;78(Supp 1):223.
56. García-Gala JM, Álvarez V, Pinto CR, Soto I, Urgelles MF, Menéndez MJ, Carracedo C, López-Larrea C, Coto E. Factor V Leiden (R506Q) and risk of venous

thromboembolism: a case-control study based on the Spanish population. *Clin Genet* 1997;52:206-210.

57. van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, Slagboom PE, Meijer P, de Jong PT, Hofman A, Grobbee DE, Kluit C. Reduced response to activated protein C is associated with increased risk for cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* 1996;125:265-269.

58. Hallam PJ, Millar DS, Krawczak M, Kakkar VV, Cooper DN. Population differences in the frequency of the factor V Leiden variant among people with clinically symptomatic protein C deficiency. *J Med Genet* 1995;32:543-545.

59. Cox MJ, Rees DC, Martinson JJ, Clegg JB. Evidence for a single origin of factor V Leiden. *Br J Haematol* 1996;92:1022-1025.

60. Castoldi E, Lunghi B, Mingozi F, Ioannou P, Marchetti G, Bernardi F. New coagulation factor V gene polymorphisms define a single and infrequent haplotype underlying the factor V Leiden mutation in Mediterranean populations and Indians. *Thromb Haemost* 1997;78:1037-1041.

61. Pepe G, Rickards O, Camacho Vanegas O, Brunelli T, Gori AM, Giusti B, Atanasio M, Prisco D, Gensini GF, Abbate R. Prevalence of factor V Leiden mutation in non-European populations. *Thromb Haemost* 1997;77:329-331.

62. Kielch S, Muigg A, Senter P, Mitterer M, Egger G, Oberhollenzer M, Oberhollenzer F, Mayr A, Gasperi A, Poewe W, Willeit J. Poor response to activated protein C as a prominent risk predictor of advanced atherosclerosis and arterial disease. *Circulation* 1999;99:614-619.

63. Sakata T, Kario K, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T. Clinical significance of activated protein C resistance as a potential marker for hypercoagulable state. *Thromb Res* 1996;82:235-244.

64. Rodeghiero F, Tositto A. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 1999;130:643-650.

65. Tositto A, Castaman G, Cappellari A, Rodeghiero F. The VITA Project: Heritability of resistance to activated protein C. *Thromb Haemost* 2000;84:811-814.

66. Gennari L, Blanco A, Alberto MF, Grosso S, Lazzari MA. The concomitant presence of lupus anticoagulant, anticardiolipin and anti-[beta]2-glycoprotein 1 antibodies could be associated with acquired activated protein C resistance in non-systemic lupus erythematosus patients. *Br J Haematol*.2003;121:527-529.

67. Male C, Mitchel L, Julian J, Vegh P, Joshua P, Adams M, David M, Andrew ME. Acquired activated protein C resistance is associated with lupus anticoagulants and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 2001;97:844-849.

68. Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Kawasaki T, Machii T, Kitani T, Iwatani Y, Kanakura Y. Acquired activated protein C resistance is associated with the co-existence of anti-prothrombin antibodies and lupus anticoagulant activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Brit J Haematol* 2002;118:577-583.

69. Cumming AM, Tait RC, Fildes S, Yoong A, Kenney S, Hay CRM. Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Brit J Haematol* 1995;90:725-727.

70. Chiara B, Luca M, Anna Maria T, Vincenza M, Daniela C, Antonella C. Response to activated protein C decreases throughout pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002;81:1028-1032.

71. Barcat D, Guerin V, Ryman A, Constans J, Vernhes JP, Vergnes C, Bonnet F, Delbrel X, Morlat P, Longy-Boursier M, Conri C. Thrombophilia and thrombosis in systemic lupus erythematosus: A case-control study. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1016-1017
72. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, Walker ID, Greaves M, Brenkel I, Regan L, Greer IA; The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132:171-196.
73. Rigo J, Nagy B, Lou MA. Factor V Leiden mutation and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:853.
74. Majluf-Cruz A, Silva-Estrada M, Sanchez-Barboza R, Montiel-Manzano G, Treviño-Perez S, Santoscoy-Gomez M, Ruiz de Chavez-Ochoa A, Corona-de la Peña N, Nieto-Cisneros L. Venous thrombosis among patients with AIDS. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:19-25.
75. Makris TK, Krespi PG, Hatzizacharias AN, Gialeraki AE, Anastasiadis G, Triposkiadis FK, Mandalaki T, Kyriakidis MK. Resistance to activated protein C and FV Leiden mutation in patients with a history of acute myocardial infarction or primary hypertension. *Am J Hypertens* 2000;13:61-65.
76. Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors. Increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998;97:1037-1041.
77. Gardiner C, Mackie IJ, Furs SA, Piegsa K, Guillebaud J, Machin SJ. Acquired resistance to activated protein C is more pronounced in women receiving combined oral contraceptives containing desogestrel than levonorgestrel and is associated with low protein S levels. *Br J Haematol* 2003;123(Suppl 1):62-63.
78. Olivieri O, Friso S, Manzato F, Guella A, Bernardi F, Lunghi B, Girelli D, Azzini M, Brocco G, Russo C, Corrocher R. Resistance to activated protein C in healthy women taking oral contraceptives. *Br J Haematol* 1995;91:465-470.
79. van Vliet HM, Frolich M, Christella M, Thomassen LG, Doggen CJ, Rosendaal FR, Rosing J, Helmerhorst FM. Association between sex hormone-binding globulin levels and activated protein C resistance in explaining the risk of thrombosis in users of oral contraceptives containing different progestogens. *Human Reproduction* 2005;20:563-568.
80. Post MS, Rosing J, van der Mooren MJ, Zweegman S, Van Baal WM, Kenemans P, Stehouwer CD. Increased resistance to activated protein C after short-term oral hormone replacement therapy in healthy post-menopausal women. *Br J Haematol* 2002;119:1017-1023.
81. Zangari M, Saghafifar F, Anaissie E, Badros A, Desikan R, Fassas A, Mehta P, Morris C, Toor A, Whitfield D, Siegel E, Barlogie B, Fink L, Tricot G. Activated protein C resistance in the absence of FV Leiden mutation is a common finding in multiple myeloma and is associated with an increased risk of thrombotic complications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:187-192.
82. De Lucia D, de Vita F, Orditura M. Hypercoagulable state in patients with advanced gastrointestinal cancer: evidence for an acquired resistance to activated protein C. *Tumori* 1997;83:948-957.
83. Green D, Maliekel K, Sushko E, Akhtar R, Soff GA. Activated protein C resistance in cancer patients. *Haemostasis* 1997;27:112-118.

84. Haim N, Lanir N, Hoffman R, Haim A, Tsalik M, Brenner B. Acquired protein C resistance is common in cancer patients and is associated with venous thromboembolism. *Am J Med* 2001;110:91-96.
85. De Stefano V, Leone G. Resistance to activated protein C due to mutated factor V as a novel cause of inherited thrombophilia. *Haematologica* 1995;80:344-356.
86. Dahlback B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 1991;66:49-61.
87. Guerrero F, Arnaud C, Nguyen F, Boneu B, Pierre S. Comparison of three activated protein C resistance tests in the risk assessment of venous thrombosis in non-carriers of the factor V Leiden mutation. *Thromb Haemost* 2006;95:728-734.

**HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.**  
**FRECUENCIA DE LA MUTACION LEIDEN DEL FACTOR V DE LA COAGULACION Y DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA EN LA POBLACION MEXICANA.**

No. Progresivo: \_\_\_\_\_ Idioma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre (s): \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Apellido paterno: \_\_\_\_\_

Apellido materno: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Grupo étnico: \_\_\_\_\_

Evidencia de segundo mestizaje: si no

Antecedentes hemorrágicos: \_\_\_\_\_

Ingesta de alcohol: \_\_\_\_\_ Antecedentes de hepatitis: \_\_\_\_\_

Enfermedades crónicas: si no

Medicación utilizada en los últimos 15 días: \_\_\_\_\_

Antecedente de trombosis: \_\_\_\_\_

Datos de desnutrición clínica, moderada a grave \_\_\_\_\_

Antecedentes de: Diabetes mellitus Hipertensión arterial Hipercolesterolemia

Grupo sanguíneo ABO/Rh: \_\_\_\_\_

No. de muestras con citrato: \_\_\_\_\_ No. de muestras con EDTA \_\_\_\_\_

Tabaquismo SI NO

RESULTADO TP: \_\_\_\_\_ seg. TTPa: \_\_\_\_\_ seg.

RESULTADO FV Leiden: \_\_\_\_\_

RESULTADO RPCA: \_\_\_\_\_

Comentarios: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **HOJA DE INFORMACION.**

#### **FRECUENCIA DE LA MUTACION LEIDEN DEL FACTOR V DE LA COAGULACION Y DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA EN LA POBLACION MEXICANA.**

Estimado Sr. o Sra.

Esta carta es para informarle porque le estamos solicitando su ayuda en la elaboración del trabajo de investigación **“FRECUENCIA DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA Y DE LAS MUTACIONES RESPONSABLES DE ELLA EN EL FACTOR V DE LA COAGULACION EN LAS POBLACIONES MEXICANAS INDIGENA Y MESTIZA”**. Lo que estamos buscando en su sangre es si tiene o no una alteración genética o de la coagulación. Esta alteración es la causa más importante para que una persona tenga una trombosis (es decir que se le tape una vena o una arteria), en cualquier parte del cuerpo. Con la sangre que Ud. nos donará haremos dos pruebas especiales. En una de ellas vamos a evaluar como funciona una sustancia que evita que la sangre se coagule y que se llama proteína C. En la segunda prueba, lo que intentaremos buscar en sus glóbulos blancos es si tiene o no una alteración en sus genes (en la herencia de sus papás), que es la causante de la alteración en el anticoagulante que antes le mencioné. Como en algunas ocasiones la alteración en la coagulación no siempre es secundaria a una alteración en su información hereditaria, entonces existe la posibilidad de que tenga alguna otra alteración (mutación) en el mismo factor que antes le mencioné y la cual vamos a tratar de determinar. La sangre que Ud. donará se obtendrá con material completamente nuevo por lo que Ud. no corre ningún riesgo de contraer alguna enfermedad. Asimismo, la cantidad de sangre que se extraerá es mínima y no debe causarle otra molestia más que el de la aguja. Los datos que le solicitamos son únicamente con propósitos de investigación y también nos servirán para que en caso de que Ud. tenga alguna alteración, sea informado inmediatamente para que reciba consejo médico. Ninguna de las muestras que le tomemos será utilizada para obtener ganancias de ninguna clase, ya que la información que se obtenga de su sangre sólo será utilizada para fines científicos.

Le agradezco de antemano su colaboración.

A T E N T A M E N T E.

Dr. Abraham Majluf Cruz.

**HOJA DE ACEPTACION PARA DONAR UNA MUESTRA SANGUINEA.**  
FRECUENCIA DE LA MUTACION LEIDEN DEL FACTOR V DE LA COAGULACION Y  
DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA EN LA POBLACION MEXICANA.

Por medio de este conducto, yo \_\_\_\_\_  
certifico que estoy enterado del estudio denominado ""FRECUENCIA DE LA  
RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA Y DE LAS MUTACIONES  
RESPONSABLES DE ELLA EN EL FACTOR V DE LA COAGULACION EN LAS  
POBLACIONES MEXICANAS INDIGENA Y MESTIZA". Para este estudio se me ha  
pedido que done 15 mL de sangre, en el conocimiento de que el material con que se  
me extraiga la sangre es nuevo. Asimismo, se me informó fue mi sangre y los  
resultados que se obtengan de ella, sólo serán utilizados con fines científicos y no se  
les dará ningún uso comercial. Asimismo se me informó que, en caso de que yo  
presente alguna alteración en mi sangre, se me dará aviso inmediatamente de ella.

ATENTAMENTE.

Sr., Sra.: \_\_\_\_\_

Padre o tutor: \_\_\_\_\_

Lugar: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_