

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**CENTRO MÉDICO NACIONAL DE OCCIDENTE (C.M.N.O)**  
**UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD “HOSPITAL DE PEDIATRÍA”**  
**DEPARTAMENTO HEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**



**EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DEL ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA  
EN POBLACIÓN CON TROMBOFILIA EN LA UMAE PEDIATRÍA DEL C.M.N.O**

**TESIS PARA OBTENER DIPLOMA DE SUBESPECIALIDAD EN  
HEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA**

**TESISTA: ME DRA. DAMARIS GUADALUPE MARTÍNEZ CRUZ**

**DIRECTOR DE TESIS: ME DRA. JANET MARGARITA SOTO PADILLA**



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.

**Director de Tesis**

ME Dra. Janet Margarita Soto Padilla  
Médico Especialista en Hematología Pediátrica  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente  
Correo electrónico: sirenajanet@hotmail.com

**Asesores Metodológicos**

Dra. en C. Ana Rebeca Jaloma Cruz  
Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS  
Sierra Mojada #800, Colonia Independencia, C.P. 44340. Guadalajara, Jalisco  
Teléfono: 36 68 30 00 Ext. 31929  
Fax: 36 18 17 56  
Correo electrónico: arjaloma@gmail.com

Dra. Hilda Luna Záizar  
Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías/Dept. Química  
Universidad de Guadalajara  
Guadalajara, Jalisco.  
Correo electrónico: hiluna90@yahoo.com.mx

**Revisor Clínico**

ME Dr. José Luis Toro Castro  
Médico Especialista en Hematología Pediátrica  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente  
Correo electrónico: torocjl@hotmail.com

**Tesista**

ME Dra. Damaris Guadalupe Martínez Cruz  
Médico Especialista en Pediatría Médica  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente  
dradamarismartinez@gmail.com

## INDICE

1.	Resumen.....	3
2.	Antecedentes.....	8
	2.1 Introducción.....	8
	2.2 Epidemiología.....	10
	2.3 Trombofilia en edad pediátrica.....	11
	2.3.1 Trombofilia primaria.....	12
	2.3.1.1 Deficiencia de antitrombina III.....	13
	2.3.1.2 Deficiencia de proteína C.....	13
	2.3.1.3 Deficiencia de proteína S.....	14
	2.3.1.4 Mutación FVL.....	14
	2.3.1.5 Mutación FII20210A.....	15
	2.3.2 Otros genotipos/fenotipos de riesgo aditivo para desarrollo de trombosis.....	15
	2.3.2.1 Mutación en gen enzima 5,10 MTHFR.....	16
	2.3.2.2 Polimorfismos en gen PAI-1.....	17
	2.3.2.3 Polimorfismo en gen de la ECA-1.....	18
	2.3.2.4 Grupo sanguíneo ABO.....	18
	2.3.2.5 Aumento de factor VIII.....	19
	2.3.3 Trombofilia secundaria.....	19
	2.4 Ensayo de generación de trombina.....	20
3.	Justificación.....	25
4.	Planteamiento del problema.....	27
5.	Pregunta de investigación.....	28
6.	Objetivos.....	28
7.	Hipótesis.....	28
8.	Materiales y métodos.....	29
	8.1 Descripción del estudio.....	29
	8.1.1 Tipo de estudio.....	29
	8.1.2 Universo de estudio.....	29
	8.1.3 Lugar donde se desarrollará el estudio.....	29
	8.1.4 Tipo de muestreo.....	29
	8.1.5 Cálculo de tamaño de muestra.....	29
	8.1.6 Criterios de inclusión.....	29
	8.1.7 Criterios de no inclusión.....	30
	8.2 Descripción de variables.....	30
	8.3 Operacionalización de variables.....	31
	8.4 Desarrollo del estudio.....	34
	8.5 Análisis estadístico.....	36
9.	Recursos e infraestructura.....	36
10.	Aspectos éticos.....	37
11.	Resultados.....	38
12.	Discusión.....	49
13.	Conclusiones.....	51
14.	Referencias bibliográficas.....	52
15.	Anexos.....	55
16.	Cronograma.....	60

## 1. RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DEL ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA EN POBLACIÓN CON TROMBOFILIA EN LA UMAE PEDIATRÍA DEL CMNO.

### **ANTECEDENTES.**

Trombofilia, se define como la predisposición para la formación de coágulos inapropiadamente. Esto puede deberse a factores genéticos (primarios) y adquiridos (secundarios) o más comúnmente por la interacción de ambos factores. Dentro de las trombofilias hereditarias, se encuentran la deficiencia de inhibidores fisiológicos de la coagulación tales como proteína C, proteína S y antitrombina III; así como mutación de Factor V Leiden con resistencia a la proteína C activada y mutación de FII G20210A del gen de la protrombina. Existen otros genotipos/fenotipos que se asocian a riesgo aditivo para el desarrollo de trombosis tales como polimorfismos C677T y A1298C de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa, mutaciones en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno-1 causando inhibición de fibrinólisis y el gen de la enzima convertidora de angiotensina-1 predisponiendo a hipertensión arterial sistémica y enfermedades cardiovasculares; así como el grupo sanguíneo ABO y niveles aumentados de Factor VIII de la coagulación. Dentro de los factores adquiridos se encuentran fracturas en miembros pélvicos, intervenciones quirúrgicas ortopédicas, acceso venoso central, hipoxia, patologías como cardiopatías congénitas, neoplasias malignas, lupus eritematoso sistémico y síndrome antifosfolípidos; entre otras.

En población pediátrica en Estados Unidos de América, la trombosis venosa se presenta en 1 de 100,000 habitantes; y su frecuencia aumenta con la edad. Siendo la trombosis la causa más frecuente de muerte en población adulta, con aproximadamente dos millones de muertes por año. Según el Consenso Mexicano de Tromboembolismo Venoso 2007; en México, hay 160,000 casos por año. En cuanto a trombofilia hereditaria, en pacientes mexicanos con recurrencia de evento trombótico se ha reportado resistencia a la proteína C activada entre 2 y 39%. La presencia de la polimorfismo FII G20210A del gen de la protrombina en un 16%; sin embargo se estima que hay un sub registro y pobre búsqueda de las causas de trombosis en México.

El 95% de los eventos trombóticos en los niños tiene al menos un factor precipitante. Esto hace que su incidencia aumente a 5.3 por cada 10,000 niños hospitalizados y a 24 en los ingresados a unidades de cuidados intensivos.

Pese a que la incidencia de trombosis en población pediátrica es menor que en población adulta, se ha descrito el riesgo de recurrencia en pacientes con un evento de trombosis secundaria, estimándose hasta un 4.5% por año en los primeros dos años tras el evento trombótico inicial. En cuanto a las causas de trombofilia primaria; en pacientes con deficiencia de antitrombina III se reporta en la literatura un riesgo de recurrencia de 3.37%; para la deficiencia de proteína C de hasta 2.53%, deficiencia de proteína S de 3.76%, para el polimorfismo FII G20210A en gen de protrombina de 2.15% y para el Factor V Leiden de 0.77%.

En la actualidad, se carece de métodos de laboratorio adecuados para monitorización de tromboprofilaxis; es por eso que nace la necesidad de este proyecto de investigación con la finalidad de describir las características sociodemográficas y clínicas de la población a estudiar en torno a la presentación de eventos trombóticos.

Se realizó la determinación del ensayo de generación de trombina (EGT) en pacientes pediátricos con trombofilia primaria y secundaria, con la finalidad de conocer su estado hemostático. El EGT se realizó también en población pediátrica sin alteraciones hemorrágicas o trombóticas a efecto de establecer valores en nuestra población que en un futuro puedan estandarizarse y nos permitan establecer escalas de riesgos. Se evaluó la utilidad de los parámetros del EGT para monitorización de terapia farmacológica instalada, con el objetivo final de incidir en medidas de carácter preventivo y cambios en modalidad terapéutica de manera oportuna con impacto en la morbi-mortalidad, calidad de vida y costo institucional.

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Cuáles son los parámetros significativos del ensayo de generación de trombina para definir el estado hemostático en pacientes con trombofilia de la UMAE Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente?.

### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar los parámetros del ensayo de generación de trombina en pacientes con trombofilia de la UMAE Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente para determinar su estado hemostático.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar las características sociodemográficas de la población (edad, género, lugar de residencia) con trombofilia primaria y secundaria.
2. Establecer tipo de evento, edad de presentación y localización de territorio afectado, recurrencias y/o secuelas en pacientes con trombofilia primaria y secundaria.
3. Identificar las causas genéticas, fenotipos de riesgo aditivo y/o factores adquiridos asociados a evento de trombosis en pacientes con trombofilia.
4. Determinar el estado hemostático de la población con trombofilia mediante los parámetros del ensayo de generación de trombina (tiempo de inicio, potencial endógeno de trombina, pico e índice de velocidad) en relación a parámetros básicos de coagulación (tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada).
5. Comparar los parámetros del ensayo de generación de trombina en pacientes con trombofilia con ó sin tratamiento farmacológico instalado y su correlación con eventos de recurrencia documentados hasta el período que comprende el presente estudio.

### **HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.**

Los parámetros del ensayo de generación de trombina en pacientes con trombofilia primaria y secundaria reflejan su estado hemostático en relación a los parámetros básicos de coagulación (tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activado), así como respecto al tratamiento farmacológico instalado.

### **MATERIAL Y MÉTODOS.**

**Tipo de estudio:** Transversal y analítico.

**Universo de estudio:** Pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria o secundaria; todos ellos diagnosticados en el período de 01 de enero del 2010 hasta el 31 de enero del 2016 que hayan cursado con mínimo un evento previo de tromboembolismo en

territorio arterial y/o venoso y que sean atendidos en UMAE Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente (C.M.N.O).

**Lugar donde se desarrollará el estudio:** División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO); con apoyo del laboratorio así como del servicio de Hematología IMSS, UMAE Pediatría de C.M.N.O.

**Tipo de muestreo:** Muestreo no probabilístico

**Cálculo de tamaño de muestra:** No requiere, se realizará por conveniencia según censo.

**Criterios de inclusión:**

- Pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria establecido por la deficiencia de los inhibidores fisiológicos de la coagulación o la presencia de polimorfismos protrombóticos identificados en el CIBO y que se encuentren adscritos a la UMAE Pediatría del C.M.N.O., IMSS.
- Pacientes con diagnóstico de trombofilia secundaria que cuenten con adscripción a la UMAE Pediatría de C.M.N.O., IMSS.
- Pacientes con trombofilia primaria y/o secundaria que acepten la participación en el estudio previa firma de consentimiento informado por sus padres o tutores.

**Criterios de no inclusión:**

- Pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria y secundaria que no se haya podido realizar la evaluación de los parámetros del EGT por problemas técnicos con el equipo o muestra insuficiente.

## **ASPECTOS ÉTICOS.**

Los procedimientos propuestos están de acuerdo con las normas éticas, el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud y con la declaración de Helsinki de 1975 enmendada en 1989, y códigos y normas internacionales vigentes de las buenas prácticas médicas de la investigación clínica. Se cuidará con la seguridad y bienestar de las pacientes, respetándose los principios contenidos en el código de Núremberg, el informe Belmont y el código de reglamentos federales. El presente estudio requiere autorización de consentimiento informado (anexo 1) debido a que se realizará extracción sanguínea mediante venopunción con riesgos leves inherentes al procedimiento como sangrado local, dolor local, hematomas y punciones múltiples para localización de la vena.

## **DESARROLLO DEL PROYECTO.**

Una vez seleccionados los pacientes; previa firma de autorización de consentimiento informado por sus padres o tutores, se aplicó un cuestionario elaborado por el investigador para recolección de datos sociodemográficos y características clínicas en torno al evento de trombosis. Posteriormente bajo asepsia y antisepsia se realizará extracción de muestras sanguíneas mediante venopunción con recolección de tres tubos con citrato de sodio 109 mM con 4.5 ml de sangre por tubo: uno para la valoración de tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada (TP, TTPa) y FVIII:C; y dos para la obtención de plasma pobre en plaquetas para la realización de la prueba de generación de trombina. Se tomaron dos tubos más de 5 mL cada uno con anticoagulante EDTA para la realización de citometría hemática con

recuento plaquetario, determinación de grupo sanguíneo ABO y obtención de DNA para obtener el perfil de marcadores protrombóticos de no contarse con él previamente.

Se realizó el análisis de generación de trombina mediante el ensayo de trombografía calibrada automatizada. La trombina generada fue monitoreada sobre el tiempo utilizando un sustrato fluorogénico, y el trombograma producido midió varios parámetros incluyendo el tiempo de inicio (Lagtime), potencial endógeno de trombina (ETP) y pico (Peak). Para la obtención de los valores de referencia en población pediátrica se incluyeron muestras de plasma de 15 pacientes pareados por edad y género que cuenten con derechohabencia y que no cursen actualmente con condición subyacente de enfermedad (se eligieron aquellos con diagnóstico de neoplasia hematológica previa con más de 5 años de vigilancia, es decir curados). Este pool de plasmas se obtuvo cuando acudieron a realización de exámenes de escrutinio programados; con previa firma de autorización de consentimiento informado; mediante venopunción previo asepsia y antisepsia con toma de 3 tubos con citrato con aprox 4.5 ml de sangre en cada tubo, para determinación de parámetros de ensayo de generación de trombina.

Posteriormente se analizaron los resultados obtenidos mediante el ensayo con los obtenidos con el panel básico de coagulación (TP y TTPa); así mismo se compararon los valores de pacientes con o sin tratamiento farmacológico instalado.

## **RECURSOS E INFRAESTRUCTURA.**

**Recursos físicos:** Laboratorio de Hemostasia y Trombosis de la División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) y Laboratorio de Hematología en IMSS U.M.A.E. Hospital de Pediatría, C.M.N.O. **Recursos materiales:** Computadora, hojas, bolígrafos, impresora, fotocopias. Equipo para realización de prueba de generación de trombina (centrífuga, congelador, incubadora, fluorómetro, software para análisis de datos, kits de reactivos para plasma pobre en plaquetas).

**Recursos financieros:** Se llevará a cabo con recursos del Laboratorio de Hemostasia y Trombosis de la División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente. **Recursos humanos:** Médico residente de 2do año Subespecialidad en Hematología Pediátrica en IMSS U.M.A.E. Pediatría, C.M.N.O y Dra. en Ciencias adscrita al Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

## **RESULTADOS Y ANALISIS.**

Se documentó trombofilia primaria en el 18.1% de los pacientes, de los cuales dos tuvieron mutación heterocigota para FVL y dos para FII20210A. En el 50.2% de la población no se identificó ningún factor genético o primario. El resto 31.7% mostró genotipo de "riesgo" tales como homocigoto mutante para ECA-1 en cinco pacientes y dos pacientes con mutación doble heterocigoto para MTHFR C677T y A1298C. En cuanto a la localización la mayor parte fueron eventos arteriales con predominio de afección cerebral en un 54.5%, seguidos de la trombosis en miembros pélvicos en un 27.3%. No hubo asociación estadísticamente significativa en pacientes con hemotipo no "O" y niveles de factor VIII por arriba del percentil 90 (>150% de actividad) con un valor de 0.417 con prueba exacta de Fisher.

Los factores adquiridos se encontraron presentes en el 54.5%, siendo el principal la cardiopatía congénita en un 40.9%.



En relación a grupos de tratamiento, un 45.5% no contaba con medicación, el 31.8% en manejo con anticoagulantes tipo antagonista de vitamina K (AVK) y heparina de bajo peso molecular. Se aplicó análisis de regresión lineal para comparar valores de media de ETP en dos grupos específicos: pacientes con manejo con AVK con pacientes en manejo con antiagregantes plaquetarios; así como el grupo sin tratamiento con AVK obteniendo significancia estadística con un valor de  $p=0.001$  y  $p=0.016$ , respectivamente

### **CONCLUSIONES.**

Los parámetros del ensayo de generación de trombina: ETP y lagtime tuvieron un valor de  $p$  con significancia estadística ( $p=0.0001$  y  $p=0.009$ ) por lo que resultan útiles para la evaluación de la capacidad hemostática del paciente. El valor de ETP en base a 100% de plasma normal para pacientes pediátricos, ofrece diferencias significativas en el análisis intergrupos en cuanto a distintos tipos de tratamiento; por lo que el ensayo de generación de trombina ofrece ser una herramienta potencialmente útil para la monitorización de tromboprolifaxis.

**EXPERIENCIA DEL GRUPO.** Las doctoras en ciencias, Ana Rebeca Jaloma Cruz e Hilda Luna Záizar, (Asesoras en Metodología) con amplia experiencia en el diagnóstico de trastornos genéticos y pruebas funcionales de la hemostasia y trombosis, cuentan con publicaciones recientes en torno a Ensayo de Generación de Trombina. Departamento Hematología, UMAE Pediatría, C.M.N.O, IMSS con Profesor Titular en Subespecialidad Hematología Pediátrica, Dra. Janet Soto Padilla con amplia experiencia por más de 15 años en rubro de trombofilias. Médico residente de 2do año Hematología Pediátrica, Dra. Damaris Gpe. Martínez Cruz, Tesista.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 INTRODUCCIÓN.

El término trombosis hace referencia al proceso de formación o la presencia de un coágulo que afecta la circulación sanguínea, arterial o venosa. De este trombo pueden desprenderse fragmentos (émbolos) que pueden viajar a la circulación y ocluir vasos sanguíneos a distancia.<sup>1</sup>

Trombofilia, se define como la predisposición para la formación de coágulos inapropiadamente. La predisposición para la formación de coágulos puede deberse a factores genéticos (hereditarios ó primarios), adquiridos (secundarios) o más comúnmente por la interacción de ambos factores.<sup>2</sup> Los individuos afectados pueden presentar eventos de manera recurrente.<sup>1</sup>

Dentro de las trombofilias hereditarias, se encuentran la deficiencia de inhibidores fisiológicos de la coagulación tales como proteína C, proteína S y antitrombina III; así como mutación Factor V Leiden con resistencia a la proteína C activada y mutación FII G20210A del gen de la protrombina.<sup>3</sup>

Los factores de riesgo para el desarrollo de trombosis (generalmente en territorio venoso) están asociados a daño tisular y estasis como por ejemplo en traumatismo vascular, obesidad mórbida, intervenciones quirúrgicas ortopédicas, inmovilización prolongada, sedentarismo, fracturas en miembros pélvicos, fármacos (L-asparaginasa, talidomida, anticonceptivos orales), acceso venoso central, eventos de hipoxia, cardiopatías congénitas, enfermedades sistémicas tales como neoplasias malignas hematológicas o no hematológicas, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome nefrótico, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso generalizado, síndrome antifosfolípidos, así como condiciones fisiológicas tales como el embarazo y puerperio.<sup>3, 4</sup>

La trombosis en territorio arterial usualmente ocurre asociada con enfermedad vascular preexistente, principalmente aterosclerosis, en donde la lesión endotelial y la activación plaquetaria son los factores más importantes en su fisiopatología. Esta afección es más frecuente en población adulta.<sup>5</sup>

A pesar del impacto sobre los sistemas de salud, la enfermedad tromboembólica venosa es una entidad mal reconocida, ya que la percepción acerca de este problema es muy baja entre la sociedad, los médicos y las instituciones de salud tanto pública como privada de casi todos los países. Ésta patología puede llegar a ser silente en un 70% de los casos lo que hace más difícil su sospecha diagnóstica; por ello la necesidad de aplicación de pruebas sensibles que determinen el estado hemostático del paciente que nos orienten al riesgo de presentar eventos trombóticos de primera vez ante un paciente con factores de riesgo o que nos sugieran un riesgo de recurrencia en aquellos que previamente hayan cursado con algún evento trombótico asociado a alguna alteración genética identificada ó a factores adquiridos; con la finalidad de incidir en medidas profilácticas oportunas con impacto en la morbi-mortalidad, calidad de vida y costo institucional.<sup>6</sup>

## **2.2 EPIDEMIOLOGÍA.**

La trombosis ha tenido un incremento notable como causa de morbi-mortalidad en el mundo moderno debido a la adquisición de factores de riesgo que se consideran condiciones de la vida moderna. Ésta puede afectar a todos los grupos etarios. Siendo más común la trombosis venosa en personas menores de 40 años.<sup>1</sup>

Existen diferencias en la incidencia de algunos tipos de trombofilia hereditaria en cuanto a características geográficas y socioculturales de la población; por ejemplo la población aborígen tiene más baja incidencia que la población mestiza o caucásica.<sup>1</sup>

En población pediátrica en Estados Unidos de América, la trombosis venosa se presenta en 1 de 100 000 habitantes; y su frecuencia aumenta con la edad.<sup>2</sup> Siendo la trombosis la causa más frecuente de muerte en población adulta con aproximadamente dos millones de muertes por año.<sup>1</sup>

En España, la incidencia de eventos trombóticos en la población infantil es menor que en la población adulta, de 0.07 vs 10 eventos por cada 10,000 mil individuos.<sup>7</sup>

En Argentina, la tasa anual de trombosis en pediatría va de 0.07-0.14/10mil hasta 21.9 por cada 10,000 individuos, con un aumento de 3 a 10 veces su frecuencia en los últimos 15 años. La mortalidad pediátrica atribuible a trombosis se describe en un 2.2% y la recurrencia se ha estimado en 3% de los neonatos y en un 8.1% de los niños.<sup>7</sup>

Según el Consenso Mexicano de Tromboembolismo Venoso 2007; en México, hay 160, 000 casos por año; 43% se complican con tromboembolia pulmonar y éstos tienen una mortalidad de hasta 28%.

En cuanto a trombofilia hereditaria, en pacientes mexicanos con recurrencia de evento trombótico se ha reportado resistencia a la proteína C activada entre 2 y 39%. La presencia del polimorfismo FII G20210A del gen de la protrombina en un 16%; sin embargo se estima que hay un sub registro y pobre búsqueda de las causas de trombosis en México.<sup>8</sup>

### **2.3 TROMBOFILIA EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA.**

El 95% de los eventos trombóticos en los niños tiene al menos un factor precipitante.<sup>7</sup> Esto hace que la incidencia de eventos trombóticos en niños aumente a 5.3 por cada 10 000 niños hospitalizados y 24 de los ingresados en unidades de cuidados intensivos.<sup>9</sup>

La afección puede ser tanto venosa como en territorio arterial; el trombo venoso se presenta en condiciones de flujo lento o estancamiento; está compuesto por fibrina y eritrocitos, constituye una masa friable "trombo rojo" que ocasiona oclusión venosa; pero su principal problema es la embolización.<sup>8</sup> Las localizaciones más frecuentes son la trombosis de la vena renal y la vena cava. Otras localizaciones son trombosis de senos cavernosos, trombosis portal y mesentérica.<sup>9</sup>

Los embolismos arteriales como su nombre lo dice ocurren en arterias, por las que la sangre circula a gran velocidad y a una gran presión. El trombo arterial está formado principalmente por plaquetas agregadas reforzadas por hilos de fibrina, lo que le da el aspecto típico de "trombo blanco". Ésta afección es menos frecuente y generalmente se encuentra asociada a condiciones de turbulencia e hiperviscosidad secundarias al uso de catéteres, cardiopatías congénitas ó fenómenos de aterosclerosis. Los sitios más afectados en población pediátrica, son las arterias intracraneales, que se manifiestan como accidentes isquémicos transitorios o accidentes vasculares cerebrales establecidos, así como las que afectan las extremidades periféricas y las arterias coronarias.<sup>5,9</sup>

Las causas de trombofilia pueden ser primarias (hereditarias) las cuales están asociadas a un factor genético predisponente, ó secundarias (adquiridas) las cuales corresponden a una serie de trastornos en los que existe mayor riesgo de trombosis por otros mecanismos en los que no hay un defecto genético identificado de origen, es decir se deben a factores de riesgo adquiridos.<sup>5</sup>

### **2.3.1 Trombofilia Primaria.**

La prevalencia de trombofilia primaria en niños con trombosis varía de hasta un 10% a un 78%; y hasta en un 60% en adolescentes.<sup>7</sup> Dentro de éstas, la deficiencia de antitrombina III (AT III) fue la primera causa de trombofilia primaria descrita, en 1965. Para la décadas de los 80's, se identificaron además la deficiencia de proteína C y proteína S.<sup>10</sup> Otros marcadores genéticos ampliamente estudiados e identificados como claros causantes de trombofilia primaria, son la mutación G1691A del gen del factor V denominada Factor V Leiden ó FV Leiden y el polimorfismo G20210A del gen de la protrombina, identificada como FII G20210A.<sup>10, 11</sup>

Se han descrito otros factores fisiológicos asociados con un incremento en la coagulación como el grupo sanguíneo ABO y los niveles elevados de Factor VIII. Existen diversas investigaciones de otros polimorfismos que pudiesen tener efecto protrombótico y ser considerados también como factores de riesgo como lo son los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa) condicionantes de homocisteinemia y con ello formación del ateroma y riesgo de trombosis arterial, el gen del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) que causa inhibición de la fibrinólisis y el gen de la enzima convertidora de angiotensina-1 (ECA-1) que predispone a hipertensión arterial sistémica y enfermedades cardiovasculares.<sup>11, 12</sup>

La mutación C677T del gen de la enzima 5,10 Metilentetrahidrofolato Reductasa, así como la coexistencia con la mutación A1298C en el mismo gen previamente indicada son consideradas como factores predisponentes a trombofilia.<sup>12</sup> Sin embargo en otros estudios recientes no se ha demostrado como claro causante de trombofilia y se ha generado controversia.<sup>1</sup>

### **2.3.1.1 Deficiencia de antitrombina III (AT III).**

La antitrombina es un importante anticoagulante natural de síntesis hepática y actúa como inhibidor fisiológico de proteinasas que participan en la coagulación sanguínea; principalmente de la trombina y los factores Xa, IXa y XIa.<sup>14</sup>

El déficit de AT III presenta una herencia autosómica dominante; prevalece en  $\leq 2\%$  de la población general.<sup>8</sup> Clínicamente, produce trombosis en edades tempranas de la vida; a los 25-35 años, el 50% de los afectados han presentado algún episodio de trombosis.<sup>2</sup>

Los pacientes en su mayoría son heterocigotos y presentan valores de AT III entre 40 y 70 % de la cifra normal; pueden ser tipo I, con disminución de la actividad y del valor antigénico; o tipo II, donde únicamente tienen disminución de la actividad. La prevalencia en pacientes que han presentado enfermedad tromboembólica venosa es de 1 a 7 %. Se reporta en la literatura en estos pacientes un riesgo de cinco a ocho veces mayor de presentar evento trombótico comparado con la población general y un riesgo de recurrencia de eventos de hasta un 3.37%.<sup>8,9,13</sup>

### **2.3.1.2 Deficiencia de proteína C.**

La proteína C es una serinproteasa vitamina K dependiente con propiedades anticoagulantes que circula en forma de zimógeno; es activada en la superficie endotelial de la microcirculación por el complejo trombina/trombomodulina. La proteína C activada junto con su cofactor, la proteína S, inhiben a los factores procoagulantes: FVa y FVIIIa, con impacto en la producción de trombina. Además, de la supresión de la generación de trombina, la proteína C activa el sistema de fibrinólisis; por lo tanto la deficiencia de proteína C está asociada al desarrollo de eventos trombóticos.<sup>14,15</sup> Su frecuencia en población general corresponde a menos de 0.5% y en pacientes con evento trombótico a un 3%. El riesgo de trombosis es dos a cinco veces mayor sobre la población general y el riesgo de recurrencia en estos pacientes es de 2.53%.<sup>8,9,13</sup>

Esta patología se hereda de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta y se han descrito más de 150 mutaciones. Los pacientes heterocigotos presentan un 50% del valor normal y desarrollan complicaciones en la etapa de adultez joven o cursan asintomáticos. Pacientes homocigotos, son extremadamente raros y

ponen en riesgo la vida con inicio en la etapa neonatal con clínica de púrpura fulminante y coagulación intravascular diseminada.<sup>16</sup>

### **2.3.1.3 Deficiencia de proteína S.**

La proteína S, es una glucoproteína plasmática sintetizada en el hígado, endotelio, megacariocitos y células de Leydig testiculares. La vitamina K también es necesaria para su síntesis. Es cofactor de la proteína C activa para la degradación de los factores Va y VIIIa. Se cree que también podría producir una inhibición directa del complejo Xasa (IXa-VIIIa) y protrombinasa (Xa-Va), independiente de la unión al C4bBP.<sup>17,18</sup>

Su prevalencia es de 0.03% en la población general y del 2% en los pacientes con trombosis; representa un riesgo de trombosis de dos a cinco veces mayor que la población general y con un riesgo de recurrencia de 3.76%.<sup>8,9</sup>

Existen distintos tipos de acuerdo a su deficiencia cuantitativa y cualitativa, de tal manera que en la tipo I existe una disminución de proteína S total, libre y funcional siendo la edad de 30-35 años en la que se suele presentar el primer evento de trombosis; en la tipo II existe una alteración funcional con edad de presentación habitual entre los 50 a 55 años; y en la tipo III con una proteína S total normal y una proteína S libre y funcional disminuidas. El déficit tipo II, en realidad, no corresponde a alteraciones en la proteína S sino al fenómeno plasmático denominado resistencia a la proteína C activada, causado mayoritariamente por la mutación FV Leiden, o por la presencia de anticoagulante lúpico.<sup>17,18</sup>

### **2.3.1.4 Mutación de FV Leiden.**

La prevalencia de mutación de factor V Leiden (FV Leiden) es de 3-7% y éstos pacientes presentan un riesgo de recurrencia de 0.77%.<sup>9</sup> La mutación FV Leiden ocurre en el exón 10 del gen del factor V (1691 G>A), con la sustitución en la proteína de arginina 506 por glutamina, lo cual ocasiona una resistencia a la acción de la proteína C activada. El factor V es el cofactor del factor Xa que actúa sobre la protrombina para transformarla en trombina (fase exponencial de la producción de trombina) Preferentemente, esta mutación se encuentra en población caucásica (15 %) y su

frecuencia es más baja en el sur de Europa (2 a 3 %). En pacientes con un evento trombótico se encuentra en 15 a 18 %. El riesgo trombótico en pacientes heterocigotos es 6.4 veces mayor que en la población general. Hay una incidencia elevada de trombosis de 40 a 80 % en pacientes homocigotos.<sup>8,14,19</sup>

En general, las deficiencias de AT III, deficiencias en proteína C y S así como la deficiencia de FV Leiden, parecen no estar fuertemente asociados a la aparición de tromboembolismo en territorio arterial.<sup>14</sup>

### **2.3.1.5 Mutación FII G20210A.**

La mutación G20210A de protrombina (FII G20210A) tiene una prevalencia que varía del 0.5 al 4%; siendo más frecuente en el sur de Europa. Se reporta un riesgo de recurrencia en estos pacientes de 2.15%.<sup>8,9</sup> El gen de la protrombina está localizado en el cromosoma 11 en la posición 11p11-q12. Tiene una longitud de 21 Kb e incluye 14 exones y secuencias reguladoras no codificantes.<sup>20</sup> La mutación FII 20210A es una variante del gen de la protrombina asociada con un aumento del riesgo de trombosis, se localiza en la región 3'-no codificante (3'UTR) de este gen y consiste en la sustitución del nucleótido G por el nucleótido A en la posición 20210.<sup>22</sup> El alelo 20210A está asociado a niveles de protrombina elevados en plasma, como resultado final de la acumulación del RNAm atribuible a su mayor vida media por efecto de este cambio genético. Una elevada concentración de protrombina en plasma es por sí misma un riesgo de factor de trombosis venosa.<sup>22</sup>

En pacientes con evento trombótico previo, la prevalencia es de 5 a 18% y el riesgo trombótico es 3.1 veces mayor que en la población general. Esta mutación se ha descrito acompañada de la mutación del FV Leiden; estos pacientes tienen un riesgo 20 veces mayor que los pacientes sin esta combinación.<sup>8</sup>

### **2.3.2 Otros genotipos/fenotipos de riesgo aditivo para desarrollo de trombosis.**

Existen en la literatura otros genotipos descritos que se consideran como factores de riesgo aditivo para el desarrollo de eventos de trombosis, tales como mutaciones en el gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), mutaciones en gen del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y en el gen de



la enzima convertidora de angiotensina-1 (ECA-1); así como condiciones fisiológicas tales como grupo sanguíneo ABO y niveles elevados de Factor VIII de la coagulación.

### **2.3.2.1 Mutaciones del gen de la enzima 5,10 Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR).**

La enzima MTHFR participa en el metabolismo de la homocisteína. Se han descrito dos mutaciones (C677T y A1298C) a nivel del gen que codifica esta enzima con predisposición a eventos de trombosis.<sup>13</sup>

En la población caucásica, la incidencia de la mutación C677T en MTHFR es de aproximadamente 40% para estados heterocigotos, y de 10% para homocigotos. Esta mutación se origina en el exón 4 del gen de la MTHFR con la sustitución de una citosina por timina en el nucleótido 677 que resulta en una variante termolábil con disminución de su actividad enzimática, causando la inhibición de la remetilación de la homocisteína a metionina con un subsecuente estado de hiperhomocisteinemia en plasma y una disminución de folatos.<sup>23,24</sup>

Estudios diversos han demostrado que la homocisteína puede ejercer una variedad de efectos para promover la trombosis y enfermedad cardiovascular, incluyendo el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, citocinas, factor tisular e inhibición de fibrinólisis así como interrupción del metabolismo del óxido nítrico con aumento en la agregación plaquetaria.<sup>25</sup>

Existen informes de que los pacientes trombofílicos mexicanos que son portadores de estados hetero u homocigotos para la mutación C677T en MTHFR, no expresan un aumento de homocisteína plasmática; y en los casos que las concentraciones de homocisteína fueran elevadas (principalmente en personas homocigotas) éstas pudieran ser resultado de la coexistencia de la deficiencia de vitaminas, tales como la B12 y ácido fólico también implicados en su metabolismo; sin embargo esta información no descarta la participación primaria de la mutación C677T en MTHFR en la patogenia de la trombosis.<sup>13,26,27</sup>

La segunda mutación es la A1298C; variante genética que corresponde a un cambio de adenosina por citosina en el exón 7 nucleótido 1298 de la MTHFR. Esta se presenta hasta en un 10% estado homocigoto en población canadiense; sin embargo

en México existen pocos reportes de investigación en cuanto a esta mutación.<sup>13</sup> Este polimorfismo se asocia también a una disminución en la actividad enzimática de MTHFR con aumento de homocisteína en plasma pero sin disminución en los niveles de folatos.<sup>23, 24</sup>

El estado heterocigoto para las mutaciones C677T y A1298C, se presenta aproximadamente en un 15% de los individuos; asociados también a aumentos de niveles plasmáticos de homocisteína y eventos de trombofilia.<sup>13,27</sup>

### **2.3.2.2 Polimorfismo en gen del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1 5G/4G).**

El inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) es una glicoproteína compuesta de 379 aminoácidos con un peso molecular de 48 kDa, y es considerada como el principal inhibidor de la fibrinólisis. Es producido por las células endoteliales y además cuando las plaquetas son estimuladas por trombina, PAI-1 es liberado sobre su superficie, protegiendo el coágulo de una lisis prematura. Este mecanismo causa un rápido incremento local de la concentración de PAI-1 en circulación, el cual se une rápidamente al activador tisular del plasminógeno (tPA) y al activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA), evitando que el plasminógeno se convierta en plasmina, condicionando así a un estado hipofibrinolítico.<sup>28,29</sup>

El gen humano de PAI-1 se encuentra en el cromosoma siete (7q21.3-q22). El polimorfismo (5G/4G) está definido por la inserción/delección de un nucleótido “guanina” (G) localizado en la región promotora (PAI-1 5G/4G), 675 pares de base “río arriba” del sitio de transcripción teniendo una secuencia de 4 o 5 nucleótidos de guanina el cual muestra una importante funcionalidad, ya que en los casos donde está presente el alelo 4G o el genotipo 4G/4G se ha observado un aumento en la actividad sérica de PAI-1.<sup>29</sup>

Los individuos homocigotos para el alelo 4G presentan un 25% más de concentración del PAI-1 al compararlos con los que poseen el genotipo 5G5G, lo cual favorece una disminución en la actividad del sistema fibrinolítico con tendencia a eventos trombóticos.<sup>29</sup>

### **2.3.2.3 Polimorfismo en gen de la enzima convertidora de angiotensina-1 (ECA-1)**

La enzima convertidora de angiotensina-1, es una metalopeptidasa dependiente de zinc y cloro como cofactores que se encuentra predominantemente en las células del endotelio vascular, juega un rol importante en la homeostasis circulatoria ya que cataliza la conversión de angiotensina I a angiotensina II con inactivación de bradiquinina. La angiotensina II, es un potente vasopresor que se relaciona directamente con el control de retención del sodio y agua, además de actuar como mediador de efectos proinflamatorios vasculares, al estimular la expresión de moléculas de adhesión como la E-Selectina, la VCAM-1 e ICAM-1 y de otras moléculas proinflamatorias.<sup>30</sup>

El gen de la ECA humana se localiza en el cromosoma 17. En 1990, Rigat y colaboradores describieron un polimorfismo en dicho gen que consistía en inserción (I) o delección (D) de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 (ECA-1 I/D int16), con la particularidad de que dicho polimorfismo explicaba un 47% de la variabilidad fenotípica de ECA plasmática. Concretamente, se vio que el alelo D se asociaba a niveles plasmáticos de ECA aumentados lo que predispone a problemas de hipertensión y enfermedad coronaria. El genotipo DD ha demostrado generar niveles más elevados que el I/D o el I/I, estudios recientes sugieren que el genotipo DD puede estar asociado con un mayor riesgo de enfermedad coronaria. Una elevada producción del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y un incremento en la agregabilidad de las plaquetas puede explicar el alto riesgo de trombosis coronaria en sujetos con altos niveles de ECA.<sup>30,31</sup>

### **2.3.2.4 Grupo sanguíneo ABO.**

Se conoce desde finales de los años sesenta que los portadores del grupo sanguíneo distinto de O presentan un riesgo entre 2 a 4 veces superior de padecer eventos tromboticos. Esta relación se ha establecido a través de la asociación observada entre el grupo ABO y los niveles de factor VIII así como los niveles de factor de von Willebrand.<sup>32,33</sup>

Según Mendéz-Santillan, E; 2004 la frecuencia de grupos sanguíneos ABO en México es de 63% hemotipo O y de 37% para hemotipo distinto a O.

### **2.3.2.5 Aumento de factor VIII.**

El factor VIII es un importante cofactor en la activación del factor X. Su deficiencia produce la hemofilia A, una grave enfermedad hemorrágica. Los niveles elevados de factor VIII se han asociado con el incremento del riesgo de trombosis venosa y a eventos de recurrencia. Los pacientes con niveles por encima del percentil 90 de la población normal (>150% de FVIII:C) muestran un incremento del riesgo de trombosis entre 3-5 veces. Existen algunas condiciones fisiológicas o patológicas que se relacionan con un aumento de factor VIII de manera adquirida tales como en enfermedades inflamatorias, hepatopatías, y embarazo.<sup>34</sup>

### **2.3.3 Trombofilia Secundaria.**

Como se describió previamente; en este rubro entran las condiciones predisponentes a eventos trombóticos que salen fuera de una causa genéticamente identificada. La importancia de éstos casos radica en el riesgo de recurrencia que se estima de 4.5% por año en los primeros dos años tras el evento inicial.<sup>14</sup>

La mayoría de los casos de enfermedad tromboembólica venosa que ocurren en pacientes mayores de 50 años de edad se encuentran asociadas a factores de riesgo adquiridos tales como obesidad mórbida, intervenciones quirúrgicas ortopédicas, inmovilización prolongada, traumatismo vascular, sedentarismo, fracturas en miembros pélvicos, fármacos (L-asparaginasa, talidomida, anticonceptivos orales), acceso venoso central, eventos de hipoxia, cardiopatías congénitas, enfermedades sistémicas tales como neoplasias malignas hematológicas o no hematológicas, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome nefrótico, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso generalizado, síndrome antifosfolípidos, así como condiciones fisiológicas tales como el embarazo y puerperio.<sup>3,4</sup>

Dentro de las causas más comunes en población pediátrica se encuentra la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (anticoagulante lúpico y anticuerpos anticardiolipinas). De los pacientes portadores del síndrome antifosfolípido, 20 a 30% tienen trombosis arterial o venosa y 14 a 29%, recurrencia en menos de cuatro años. La presencia de anticuerpos antifosfolípidos confiere un riesgo relativo de 10.5 veces para

evento trombótico. Se ha identificado una prevalencia de anticuerpos antifosfolípidos en pacientes con trombosis de 4 a 21%.<sup>8</sup>

## 2.4 ENSAYOS DE GENERACIÓN DE TROMBINA

Como se describió previamente, la deficiencia de las proteínas anticoagulantes naturales tales como la AT-III, proteína C y S dan como resultado un desequilibrio en la cascada de coagulación con predisposición de estados pro-trombóticos por incremento en la generación de trombina.<sup>14</sup>

La trombina, es una molécula central en el mecanismo hemostático que incluye actividades pro y anticoagulantes y efectos pro-inflamatorios. La generación de trombina, es una prueba de la capacidad hemostática de la sangre como órgano aislado (plasma); por lo que se considera una herramienta potencialmente útil que puede ser aplicada para el diagnóstico y monitoreo de anomalías hemostáticas.<sup>35,36</sup> A diferencia de los tiempos de coagulación tradicionales ó panel básico de coagulación (tiempo de protrombina “TP” y tiempo de tromboplastina parcial activada “TTPa”), los cuales sólo valoran menos del 5% de total del potencial de trombina, los ensayos de generación de trombina pueden ser útiles en la detección de tendencia trombótica debido a que mayor generación de trombina (más del 95%) ocurre posterior a la formación inicial de fibrina.<sup>37,38</sup>

La generación de trombina puede ser medida por diferentes técnicas de laboratorio, éstas incluyen la medición de productos que son consecuencia de la generación de trombina, como lo son los productos de degradación de fibrina (dímero-D). Aunque el dímero D ha mostrado ser una prueba altamente sensible, con un buen valor predictivo negativo para enfermedad tromboembólica venosa, su especificidad es baja. La utilidad del dímero D como marcador pronóstico de hipercoagulabilidad no ha sido bien definida.<sup>35,36</sup>

Con el paso de los años; se han desarrollado distintas pruebas para medir generación de trombina; las versiones iniciales datan desde los años 50's con técnicas laboriosas y pobremente estandarizadas. La generación de trombina en plasma rico en plaquetas (PRP) o plasma pobre en plaquetas (PPP) se realizaba manualmente con un método sumamente laborioso de submuestreo con un primer tubo de la muestra del

plasma contra otro que tuviera además fibrinógeno. La generación de trombina entonces fue determinada por el tiempo de formación del coágulo en el tubo que contenía fibrinógeno y se comparaba con un estándar conocido.<sup>39,40</sup> En los años 80's y 90's; los ensayos para determinar generación de trombina tuvieron modificaciones tales como la desfibrinación de la muestra de plasma y la incorporación de un sustrato cromogénico, eliminando la necesidad de una submuestra y con ello se incremento su precisión. Posteriormente se utilizaron sustratos fluorogénicos que permitieron la continua medición de la actividad de la trombina, eliminando la necesidad de desfibrinación de las muestras de plasma y permitiendo la medición del plasma que contuviera plaquetas.<sup>38,41</sup>

La capacidad del plasma para generar trombina se refleja en la curva de generación de trombina (trombograma) y particularmente en el potencial endógeno de trombina que corresponde al área bajo la curva de generación de trombina y medida directa de su "trabajo enzimático". El ensayo actualmente disponible, la trombografía calibrada automatizada (CAT; por sus siglas en inglés), permite una prueba rutinaria cuantitativamente correcta de la medición de la curva de generación de trombina a bajo costo y alto rendimiento.<sup>35</sup>

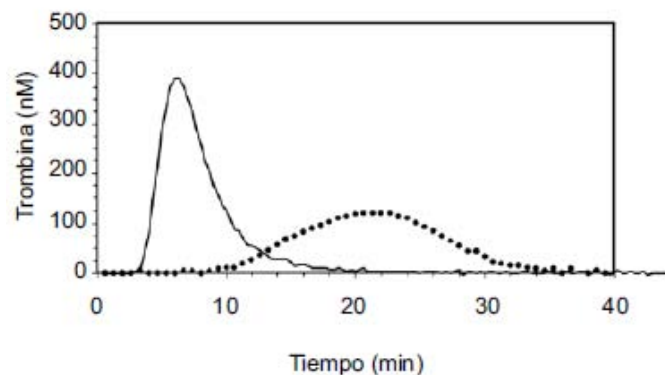
Los ensayos CAT se ejecutan en microplacas de 96 pocillos, en un fluorómetro comercial equipado con el software necesario; estos son detonados por la adición de factor tisular al plasma pobre en plaquetas o plasma rico en plaquetas. La trombina generada es monitoreada sobre el tiempo utilizando un sustrato fluorogénico, que se añade al plasma, al ser escindido por la trombina, libera un producto fluorescente; este se ha reportado como un ensayo más sensible para determinar el incremento de la generación de trombina en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa.<sup>35</sup> Estos ensayos proporcionan un trombograma (Figura 1) el cual mide varios parámetros incluyendo: 1) el tiempo de inicio ("Lagtime", tiempo para la formación inicial de la trombina), 2) pico de trombina ("Peak", concentración más alta de trombina alcanzada durante el curso de la generación e inhibición de trombina y se expresa como el grado máximo de incremento en la señal fluorescente (Unidades de Fluorescencia por minuto, UF/min), 3) el potencial endógeno de trombina ("ETP= endogenous thrombin potential, total de trombina formada dentro de un cierto periodo conocida como área bajo la curva

expresada en  $\text{nM}\cdot\text{min}$ ), 4) el tiempo al pico es el tiempo cuando se observa la más alta actividad de trombina y 5) el índice de velocidad de formación de trombina (Velocity index, expresado en  $\text{nM}\cdot\text{min}$ ) se puede calcular al dividir el pico de trombina entre la diferencia del tiempo al pico y el tiempo de inicio (Figura 2).

El ensayo de generación de trombina tiene una imprecisión de 2.5-4%. La variabilidad individual en sujetos normales es de 5%.<sup>42</sup>

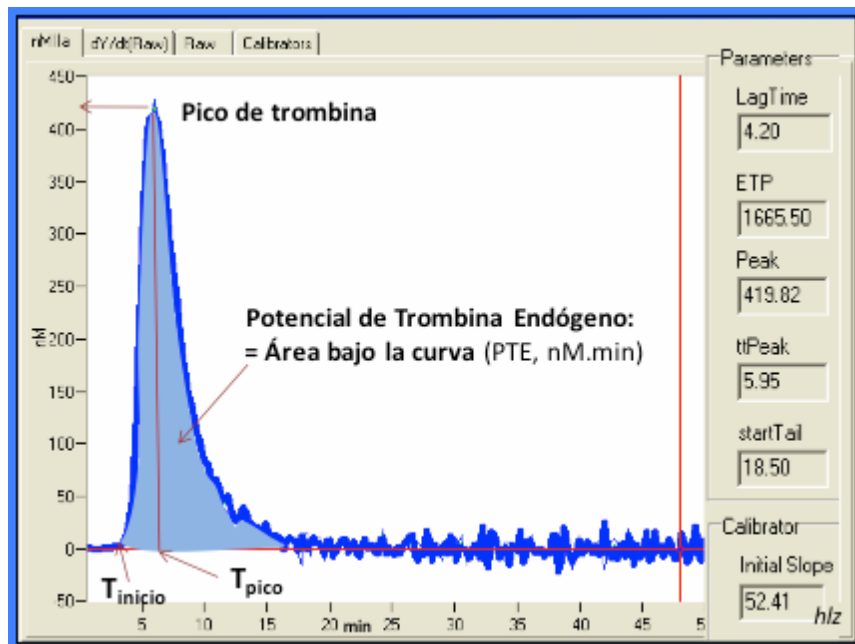
Los valores de los componentes del trombograma varían según el uso de PPP o PRP. En un estudio en población adulta por Hemker y cols en el 2003 se arrojó un valor para potencial endógeno de trombina de  $1,870 \text{ nM}\cdot\text{min}$  (con desviación estándar de 284), tiempo de inicio de 3.1 min (desviación estándar de 1.4 min) y pico máximo de  $458 \text{ nM}$  (con desviación estándar de  $60 \text{ nM}$ ) con el uso de plasma pobre en plaquetas; y los valores para potencial endógeno de trombina de  $1,648 \text{ nM}\cdot\text{min}$  (con desviación estándar de 315), tiempo de inicio de 8.1 min (desviación estándar de 1.9 min) y pico máximo de  $118 \text{ nM}$  (con desviación estándar de  $41 \text{ nM}$ ) con el uso de plasma rico en plaquetas.<sup>43</sup>

El monitoreo del trombograma permite detectar un evento de trombosis en curso, detectar riesgo incrementado de trombosis, monitorear el tratamiento antitrombótico, detectar trastornos hemorrágicos y monitorear su tratamiento y profilaxis.<sup>35</sup>



**Figura 1.- Trombogramas.** Línea continua: plasma pobre en plaquetas (PPP) al que se le ha añadido factor tisular y fosfolípidos, tiempo de coagulación 3.5 min. Línea punteada: plasma rico en plaquetas (PRP) al que sólo se le ha añadido factor tisular; tiempo de coagulación 9.5 min. Tomado de Hemker y Jaloma, 2012 (35).

Existe evidencia en la literatura que sugiere que la medición de la generación de trombina puede ser de utilidad para identificar pacientes en riesgo de su primer evento de trombosis y/o eventos recurrentes. En un estudio prospectivo de 861 pacientes con su primer evento espontáneo de enfermedad tromboembólica venosa, fueron determinados el dímero D y el potencial endógeno de trombina después de suspender la terapia anticoagulante. De éstos, 130 pacientes (15.1%) tuvo recurrencia, con un alto ETP solo, y un incremento de 1.6 veces más de riesgo de recurrencia. El dímero D elevado solo fue asociado a 1.8 veces más de riesgo de recurrencia, y combinados (ETP y dímero D elevados) se asoció a un incremento de 2.8 veces más de riesgo de recurrencia.<sup>44,45</sup>



**Figura 2.- Componentes del trombograma.** Tiempo de inicio (**Tinicio**), Pico de Trombina (**Pico**), Tiempo al pico (**Tpico**) y Potencial Endógeno de Trombina (**PTE**). Tomada de Tesis Doctoral de Hilda Luna Záizar.

Existe otro estudio en población mexicana publicado en Septiembre 2015 por la Dra. Hilda Luna Záizar y colaboradores, en el cual se incluyeron 43 pacientes de 20-64 años con diagnóstico de trombofilia primaria (estado heterocigoto para mutación FV de Leyden ó para polimorfismo FII G20210A así como deficiencia de proteína C, proteína S y antitrombina III) en donde 29 de los pacientes se encontraban con manejo con



antagonistas de la vitamina K (warfarina o acenocumarol), 1 paciente bajo el uso de heparina de bajo peso molecular y 5 pacientes con uso de terapia antiagregante plaquetarios (aspirina o clopidogrel); el resto de los pacientes habían suspendido su tratamiento al menos un mes previo al estudio. Se obtuvieron características clínicas en torno al evento de trombosis (tipo de evento, factores de riesgo adquiridos, etc) antecedentes familiares de interés, tratamiento empleado y evolución clínica. Se obtuvieron muestras de sangre periférica para determinación de TP con INR (International Normalized Ratio), TTPa y grupo sanguíneo ABO. Además se obtuvo una muestra de plasma pobre en plaquetas para la realización de ensayo de generación de trombina con la determinación de tiempo de inicio (lagtime), pico (peak), potencial endógeno de trombina (ETP) e índice de velocidad; arrojando como resultados diferencia significativa en ETP y Peak entre los pacientes que recibieron tromboprolifaxis con antagonistas de vitamina K (AVK) o heparina de bajo peso molecular (HBPM) y pacientes que no reciben tratamiento ( $p=0.0001$ ). No evidenció significancia en pacientes que reciben tratamiento antiagregante. Lagtime si discrimina entre pacientes sin tratamiento y pacientes que reciben tromboprolifaxis pero muestran gran variabilidad interindividual en los pacientes que se encuentran bajo anticoagulación óptima con antagonistas de vitamina K (rangos de INR de 2-3). Se encontró una relación inversa no lineal entre ETP, peak y velocity index vs valores de INR; y una relación positiva entre lagtime e INR ( $p=0.002$ ). Utilizando la curva de ROC reveló que el 96.6% y el 96.4% de los pacientes que tenían una ETP o pico más alto que los valores de corte, respectivamente, tuvieron elevada generación de trombina que indica una alteración de la coagulación y, posiblemente, un aumento en riesgo de tromboembolismo recurrente.<sup>46</sup>

Aunque aún no esté aceptado como una herramienta de rutina para la detección de trastornos hemorrágicos y/o trombóticos, o para monitoreo de terapia anticoagulante; el ensayo de generación de trombina por su excelente sensibilidad y especificidad potencialmente pudiera ser aplicado como una prueba diagnóstica de rutina para evaluar el estado hemostático del paciente y determinar el riesgo trombótico o hemorrágico, evaluando el tratamiento en el paciente para control hemostático.<sup>46, 47</sup>

### **3. JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1 Magnitud.**

La trombosis ha tenido un incremento notable como causa de morbi-mortalidad en el mundo moderno debido a la adquisición de factores de riesgo que se consideran condiciones de la vida moderna. Ésta puede afectar a todos los grupos etarios. Siendo más común la trombosis venosa en personas menores de 40 años.<sup>1</sup>

En población pediátrica en Estados Unidos de América, la trombosis venosa se presenta en 1 de 100 000 habitantes; y su frecuencia aumenta con la edad.<sup>2</sup> Siendo la trombosis la causa más frecuente de muertes en población adulta con aproximadamente dos millones de muertes por año.<sup>1</sup>

Según el Consenso Mexicano de Tromboembolismo Venoso 2007; en México, hay 160, 000 casos por año; 43% se complican con tromboembolia pulmonar y éstos tienen una mortalidad de hasta 28%.

En cuanto a trombofilia hereditaria, en pacientes mexicanos con recurrencia de evento trombótico se ha reportado resistencia de proteína C activada entre 2 y 39%.<sup>8</sup> El riesgo de recurrencia en los casos adquiridos o secundarios se estima de 4.5% por año en los primeros dos años tras el evento inicial.<sup>14</sup>

Se estima que hay un subregistro y pobre búsqueda de las causas de trombosis en México.<sup>8</sup>

De acuerdo al registro anual de pacientes en IMSS mediante el sistema de Expediente Clínico Electrónico (ECE), en el año 2014 se obtuvieron un total de 218 pacientes con un diagnóstico de trombosis en territorio venoso y de 23 pacientes con trombosis en territorio arterial en la UMAE Pediatría de CMNO. En cuanto al registro de nuestro Centro de Investigación Biomédica de Occidente se cuenta con 43 pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria y con 55 pacientes atribuidos a una causa secundaria en los últimos 5 años.

#### **3.2 Trascendencia.**

Pese a que la incidencia de trombosis en población pediátrica es menor que en población adulta; se ha descrito el riesgo de recurrencia; estimándose hasta un 4.5%

por año en los primeros dos años tras el evento inicial en pacientes con un evento de trombosis secundaria. En cuanto a las causas de trombofilia primaria; pacientes con deficiencia de antitrombina III se reporta en la literatura un riesgo de recurrencia de 3.37%; para la deficiencia de proteína C de hasta 2.53%, deficiencia de proteína S de 3.76%, mutación de la Protrombina 20210A de 2.15% y Factor V Leiden de 0.77%.<sup>8,9</sup> Ante los datos previamente señalados, se plantea la aplicación del ensayo de generación de trombina como una herramienta para evaluar el estado hemostático de estos pacientes con la finalidad de establecer valores que puedan asociarse en un futuro con escalas estandarizadas para determinar el riesgo de recurrencia de eventos trombóticos así como para monitorización de la terapia farmacológica instaurada con impacto secundario en la morbi-mortalidad.

### **3.3 Factibilidad.**

La UMAE Pediatría de CMNO es un hospital de alta concentración al ser un centro de referencia; se cuenta con la infraestructura, número de pacientes, capacitación profesional; además que cuenta con el apoyo del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) con el equipo técnico y el personal especializado con amplia experiencia para la realización del diagnóstico de marcadores genéticos de predisposición de trombosis así como contar con los recursos técnicos y humanos para la realización de ensayos de generación de trombina mediante trombografía calibrada automatizada.

### **3.4 Vulnerabilidad.**

No existen escalas estandarizadas para valores de trombina en pacientes pediátricos.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La trombosis ha tenido un incremento notable como causa de morbi-mortalidad en el mundo moderno debido a la adquisición de factores de riesgo que se consideran condiciones de la vida moderna.<sup>1</sup> Las trombofilias tanto hereditarias como adquiridas se asocian a riesgo de recurrencia; reportándose en la literatura la detección de 2 hasta 39% la alteración resistencia a la proteína C activada en pacientes mexicanos que han tenido recurrencia de eventos trombóticos.<sup>8</sup> En cuanto a causas secundarias; el riesgo de recurrencia de nuevos eventos se estima de 4.5% por año en los primeros dos años tras el evento inicial.<sup>14</sup>

En la actualidad, se carece de métodos de laboratorio adecuados para monitorización de trombopprofilaxis; por lo que la determinación del ensayo de generación de trombina mediante el estudio de trombografía calibrada automatizada (CAT, por sus siglas en inglés) pudiera ser aplicado como una herramienta de rutina para evaluar el estado hemostático del paciente con detección de desórdenes hemorrágicos y/o trombóticos, o para monitoreo de terapia anticoagulante ó antiagregante.<sup>38</sup> Es por eso que nace la necesidad de este proyecto de investigación con la finalidad de describir de manera inicial las características sociodemográficas de la población a estudiar; así como características clínicas en torno a la presentación de eventos trombóticos; y secundariamente, realizar la determinación de los parámetros del ensayo de generación de trombina en pacientes pediátricos con trombofilia primaria y secundaria. Así mismo, se establecerán valores en población pediátrica sin alteraciones hemorrágicas o trombóticas que en un futuro puedan estandarizarse y nos permitan establecer escalas de riesgos. Además se evaluará la utilidad de los parámetros analizados para monitorización de terapia farmacológica instalada con el objetivo final de incidir en medidas de carácter preventivo y cambios en modalidad terapéutica de manera oportuna con impacto en la morbi-mortalidad, calidad de vida y costo institucional.

## **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los parámetros significativos del ensayo de generación de trombina para definir el estado hemostático en población de pacientes con trombofilia de la UMAE Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente?

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General.**

Evaluar los parámetros del ensayo de generación de trombina en pacientes con trombofilia de la UMAE Pediatría Centro Médico Nacional de Occidente para determinar su estado hemostático.

### **6.2 Objetivos Específicos.**

1. Determinar las características sociodemográficas de la población (edad, género, lugar de residencia) con trombofilia primaria y secundaria.
2. Establecer tipo de evento, edad de presentación, localización de territorio afectado, recurrencias y/o secuelas en pacientes con trombofilia primaria y secundaria.
3. Identificar las causas genéticas, fenotipo de riesgo aditivo y/o factores adquiridos asociados a evento de trombosis en pacientes con trombofilia.
4. Determinar el estado hemostático de la población con trombofilia mediante los parámetros del ensayo de generación de trombina (tiempo de inicio, potencial endógeno de trombina y pico) en relación a parámetros básicos de coagulación (tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada).
5. Comparar los parámetros del ensayo de generación de trombina en pacientes con trombofilia con ó sin tratamiento farmacológico instalado y su correlación con eventos de recurrencia documentados hasta el período que comprende el presente estudio.

## **7. HIPÓTESIS.**

### **7.1 Hipótesis investigación:**

Los parámetros del ensayo de generación de trombina en pacientes con trombofilia primaria y secundaria reflejan su estado hemostático en relación a los parámetros

básicos de coagulación (tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activado), así como respecto al tratamiento farmacológico instalado.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1 Descripción del estudio.**

**8.1.1 Tipo de estudio:** Transversal y analítico.

**8.1.2 Universo de estudio:** Pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria por deficiencia de antitrombina III, deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, mutación Factor V Leiden, resistencia a proteína C activada y mutación FII G20210A del gen de la protrombina así como con diagnóstico de trombofilia secundaria (adquirida); todos ellos diagnosticados en el período de 01 de enero del 2010 hasta el 31 de enero del 2016 que hayan cursado con mínimo un evento previo de tromboembolismo en territorio arterial y/o venoso y que sean atendidos en UMAE Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente (C.M.N.O).

**8.1.3 Lugar donde se desarrollará el estudio:** Se desarrollará en la División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO); con apoyo del laboratorio así como del servicio de Hematología IMSS UMAE Pediatría de C.M.N.O.

**8.1.4 Tipo de muestreo:** Muestreo no probabilístico

**8.1.5 Cálculo de tamaño de muestra:** No requiere, se realizará por conveniencia según censo.

### **8.1.6 Criterios de inclusión:**

- Pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria establecido por la deficiencia de los inhibidores fisiológicos de la coagulación (proteína C, proteína S y antitrombina III) o la presencia de polimorfismos protrombóticos identificados en el CIBO y que se encuentren adscritos a la UMAE Pediatría del C.M.N.O., IMSS.
- Pacientes con diagnóstico de trombofilia secundaria con afección a territorio venoso y/o arterial que cuenten con adscripción a la UMAE Pediatría de C.M.N.O., IMSS.
- Pacientes con trombofilia primaria y/ó secundaria que acepten la participación en el estudio previa firma de consentimiento informado por sus padres o tutores.

### 8.1.7 Criterios de no inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria y secundaria que no se haya podido realizar la evaluación de parámetros del EGT trombina debido a problemas técnicos con el equipo o muestra insuficiente.

### 8.2 Descripción de las variables:

- Variables independientes: Trombofilia primaria y secundaria.
- Variables dependientes: Tiempos de coagulación (TP y TTPa) y parámetros de generación de trombina.

<b>Variables</b>	<b>Definición Operacional</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Parámetros de Medición</b>	
<b>Sexo</b>	Femenino/Masculino	Cualitativa nominal	Chi cuadrada	
<b>Edad</b>	Años	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central	
<b>Tipo de evento</b>	Arterial/Venoso	Cualitativa nominal	Chi cuadrada	
<b>Edad de presentación del evento</b>	Años	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central	
<b>Trombofilia primaria</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada	
<b>Otros genotipos/fenotipos de riesgo para trombosis:</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada	
	<b>Mutación gen MTHFR</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Mutación gen PAI-1</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Mutación gen ECA-1</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Grupo sanguíneo no "O"</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Niveles aumentados de Factor VIII:C (&gt; percentil 90 del rango)</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada

	de edad)			
<b>Trombofilia secundaria</b>		Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Fractura miembro pélvico</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Acceso vascular central</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Hipoxia neonatal</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Cardiopatía congénita</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Neoplasia maligna</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Lupus eritematoso sistémico</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
	<b>Síndrome antifosfolípidos</b>	Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
<b>Panel básico de coagulación</b>				
	<b>Tiempo de protrombina</b>	Segundos	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central
	<b>Tiempo de tromboplastina parcial activada</b>	Segundos	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central
	<b>INR</b>	Segundos	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central
<b>Ensayo de generación de trombina con plasma pobre en plaquetas</b>				
	<b>Tiempo de inicio (Lagtime)</b>	Minutos	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central
	<b>Potencial endógeno de trombina (ETP)</b>	Nanomolar por minuto	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central
	<b>Pico (Peak)</b>	Nanomolar	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central
	<b>Índice de velocidad (Velocity index)</b>	Nanomolar por minuto	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central
<b>Recurrencia de eventos</b>		Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada
<b>Secuelas o complicaciones</b>		Si/No	Cualitativa nominal	Chi cuadrada



### 8.3 Operacionalización de las variables:

- **Edad.** Referida al tiempo existencia de una persona, medida en años.
- **Sexo.** De acuerdo a género, masculino o femenino.
- **Tipo de evento.** Haciendo alusión a presencia de tromboembolismo en cuanto a afección de territorio venoso o arterial.
- **Localización del evento.** Alusión a territorio anatómico afectado por el evento de trombosis.
- **Edad de presentación del evento.** Edad medida en años en la que se presentó el primer evento trombótico.
- **Trombofilia.** Predisposición para la formación de coágulos inapropiadamente.
  - **Trombofilia primaria:** Asociadas a un factor genético demostrable tales como deficiencia de antitrombina III, deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, mutación FV Leiden con resistencia a proteína C activada, mutación FII G20210A.
  - **Otros genotipos/fenotipos de riesgo aditivo para trombosis:** Detección mediante estudios genéticos de la mutación A1298C y/o C677T en el gen de MTHFR, mutaciones en el gen del Inhibidor del Activador del Plasminógeno 1 (PAI-1) y mutaciones en el gen de la Enzima Convertidora de Angiotensina 1 (ECA-1). Grupo sanguíneo ABO “no O” y aumento de los niveles de Factor VIII:C por arriba de percentil 90 para la edad.
  - **Trombofilia secundaria:** Serie de trastornos en los que existe mayor riesgo de trombosis por otros mecanismos en los que no hay un defecto genético identificado de origen, es decir se deben a factores de riesgo adquiridos tales como:
    - **Fracturas en miembros pélvicos.** Pérdida de continuidad ósea en huesos tales como fémur, tibia y peroné que requieran intervención quirúrgica ortopédica.
    - **Acceso venoso central.** Inserción de catéter en espacio intravascular central con el fin de medidas terapéuticas.

- **Hipoxia neonatal.** Mediante valoración Apgar, prueba de evaluación del recién nacido, se determina al minuto de nacer, a los 5 minutos y a los 10 minutos. Se examina el ritmo cardiaco, respiración, tono muscular, reflejos y coloración de piel. Se considerará baja puntuación menor de 7 a los 5 minutos.
- **Cardiopatías congénitas.** Grupo de enfermedades caracterizado por la presencia de alteraciones estructurales del corazón producidas por defectos en la formación del mismo durante el periodo embrionario.
- **Neoplasias malignas.** Proceso maligno originado por la interacción en la mutación de genes supresores de tumores y activación de oncogenes que llevan a una proliferación celular desordenada con mecanismos de evasión de muerte celular programada; pueden ser clasificadas como sólidas o hematológicas.
- **Lupus eritematoso generalizado.** Enfermedad inflamatoria crónica con afección multisistémica y de origen autoinmune.
- **Síndrome antifosfolípidos.** Definido por la combinación de manifestaciones clínicas trombóticas y/o obstétricas y un título persistente y significativo de anticuerpos antifosfolípidos.
- **Panel básico de coagulación.** Incluye citometría hemática con recuento plaquetario así como la determinación de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) e International Normalized Ratio (INR).
  - **Tiempo de protrombina.** También llamado Índice de Quick; valora la integridad de la vía extrínseca y común (factores VII, X, V, II y I de la coagulación). Normal entre 10 a 15 segundos. Aumenta por la acción de anticoagulantes orales.
  - **Tiempo de tromboplastina parcial activada.** Método de laboratorio que evalúa la integridad de la vía intrínseca y vía común (factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II y I). Normal entre 25 a 35 segundos. Se altera por la acción de la heparina.

- **INR ó International Normalized Ratio.** Unidad de medición que se utiliza para estandarizar los valores obtenidos a través del tiempo de protrombina. Se usa principalmente para el seguimiento de pacientes bajo tratamiento anticoagulante; con rangos terapéuticos entre 2-3 en pacientes con trombofilia.
- **Ensayo de generación de trombina.** Se realizará mediante trombografía calibrada automatizada (CAT); ensayo que permite la medición de la curva de generación de trombina. Estos ensayos proporcionan un trombograma (Figura 1) el cual mide varios parámetros incluyendo: 1) el tiempo de inicio (“Lagtime”, tiempo para la formación inicial de la trombina), 2) pico de trombina (“Peak”, concentración más alta de trombina alcanzada durante el curso de la generación e inhibición de trombina y se expresa como el grado máximo de incremento en la señal fluorescente (Unidades de Fluorescencia por minuto, UF/min) y 3) el potencial endógeno de trombina (“ETP= endogenous thrombin potential, total de trombina formada dentro de un cierto periodo conocida como área bajo la curva expresada en nM•min) y 4) el índice de velocidad de formación de trombina (Velocity index, expresado en nM•min) se puede calcular al dividir el pico de trombina entre la diferencia del tiempo al pico y el tiempo de inicio.
- **Recurrencia del evento.** Presencia de segundo evento tromboembólico en pacientes con trombofilia primaria o secundaria documentado hasta el momento del período estudiado.
- **Secuelas o complicaciones.** Alteración física persistente tras una lesión o consecuencia de una enfermedad.

#### **8.4 Desarrollo del proyecto:**

Se incluyeron aquellos pacientes que se hayan diagnosticado con alguna alteración primaria de trombofilia y aquellos con diagnóstico de trombofilia secundaria que cumplen los criterios de inclusión previamente indicados en el periodo comprendido del 01 de enero del 2010 al 31 de enero del 2016; previa firma de autorización de consentimiento informado (anexo 1) se realizó un cuestionario (anexo 2) elaborado por

el investigador para recolección de datos sociodemográficos y características clínicas en torno al evento de trombosis.

Posteriormente bajo asepsia y antisepsia se realizó extracción de muestras sanguíneas mediante venopunción con recolección de tres tubos con citrato de sodio 109 mM con 4.5 ml de sangre por tubo: uno para la valoración de tiempos de coagulación (TP, TTPa) y FVIII:C; y dos para la obtención de plasma pobre en plaquetas para la realización de la prueba de generación de trombina. Se tomarán dos tubos de 5 mL cada uno con anticoagulante EDTA para la realización de citometría hemática con recuento plaquetario, determinación de grupo sanguíneo ABO y obtención de DNA para obtener el perfil de marcadores protrombóticos de no contarse con él previamente.

Se realizó el análisis de generación de trombina mediante el ensayo Trombografía Calibrada Automatizada en micro-placas con 96 pocillos, detonados por la adición de factor tisular al plasma pobre en plaquetas. La trombina generada fue monitoreada sobre el tiempo utilizando un sustrato fluorogénico, y el trombograma producido midió varios parámetros incluyendo el tiempo de inicio (Lagtime), potencial endógeno de trombina (ETP) y pico (Peak).

Para la obtención de los valores de referencia en población pediátrica se incluyeron muestras de plasma de 15 pacientes pareados por edad y género que cuenten con derechohabiencia y que no cursaran con condición subyacente actual de enfermedad (se eligieron aquellos con diagnóstico de neoplasia hematológica previa con más de 5 años de vigilancia, es decir curados). Este pool de plasmas se obtuvo cuando acudieron a realización de exámenes de escrutinio programados; con previa firma de autorización de consentimiento informado; mediante venopunción previo asepsia y antisepsia con toma de 3 tubos con citrato con aprox 4.5 ml de sangre en cada tubo, para determinación de parámetros de ensayo de generación de trombina.

Posteriormente se analizaron los resultados obtenidos mediante el ensayo con los obtenidos con el panel básico de coagulación (TP y TTPa); así mismo se compararon los valores de pacientes con o sin tratamiento farmacológico instalado.

### **8.5 Análisis estadístico:**

Se capturarán los datos en programa Microsoft Office Excel 2010, posteriormente para estadística descriptiva se utilizará medidas de tendencia central y dispersión. Se empleará ANOVA para analizar las diferencias en el estado de coagulación y T-student para comparar valores de ETP con o sin tratamiento. Además se utilizará Chi-cuadrada de Pearson o prueba exacta de Fisher para tablas de contingencia mediante el programa IBM SPSS versión 20.

## **9. RECURSOS E INFRAESTRUCTURA**

**9.1 Recursos físicos:** Laboratorio de Hemostasia y Trombosis del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) y Laboratorio de Hematología en IMSS U.M.A.E. Hospital de Pediatría, C.M.N.O.

**9.2 Recursos materiales:** Computadora, hojas, bolígrafos, impresora, fotocopias. Equipo para realización de prueba de generación de trombina (centrífuga, congelador, incubadora, fluorómetro, software para análisis de datos, kits de reactivos para plasma pobre en plaquetas).

**9.3 Recursos financieros:** Se llevará a cabo con recursos del Laboratorio de Hemostasia y Trombosis del Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

**9.4 Recursos humanos:** Médico residente de 2do año Subespecialidad en Hematología Pediátrica en IMSS U.M.A.E. Pediatría, C.M.N.O y Dra. en Ciencias adscrita al Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

## **10. ASPECTOS ÉTICOS**

Los procedimientos propuestos están de acuerdo con las normas éticas, el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud y con la declaración de Helsinki de 1975 enmendada en 1989, y códigos y normas internacionales vigentes de las buenas prácticas médicas de la investigación clínica. Se cuidará con la seguridad y bienestar de las pacientes, respetándose los principios contenidos en el código de Núremberg, el informe Belmont y el código de reglamentos federales. El presente estudio requiere autorización de consentimiento informado (anexo 1) debido a que se realizará extracción sanguínea mediante venopunción con riesgos leves inherentes al procedimiento como sangrado local, dolor local, hematomas y punciones múltiples para localización de la vena.

## 11. RESULTADOS

Se realizó un estudio transversal y analítico para evaluar los parámetros de ensayo de generación de trombina en pacientes con trombofilia en el Hospital de Pediatría C.M.N.O; se incluyeron 22 pacientes que previamente hayan cursado con al menos un evento trombótico y que cumplieron con el resto de criterios de inclusión.

La distribución en cuanto a diagnóstico de trombofilia, en 36.6% de la población (8 pacientes) no se identificó ningún factor genético o primario. Se documentó trombofilia primaria en el 18.1% de los pacientes, de los cuales dos tuvieron mutación heterocigota para FVL y dos para FII20210A. El resto 45.3% mostró genotipo de “riesgo” tales como homocigoto mutante para ECA-1 en cinco pacientes (dos combinados estado homocigoto mutante 677TT), dos pacientes con mutación doble heterocigoto para MTHFR C677T/A1298C y dos pacientes homocigoto 677TT (ver cuadro 1).

<b>Cuadro 1. Trombofilia</b>		
	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>PRIMARIA</b>		
Heterocigoto FVL + Homocigoto mutante PAI-1 (4G/4G)	1	4.5%
Heterocigoto FVL + Homocigoto mutante 677TT	1	4.5%
Heterocigoto FII20210A	2	9.1%
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>18.1%</b>
<b>FACTORES GENÉTICOS ADITIVOS</b>		
Homocigoto mutante ECA-1 (D/D) (Dos con homocigoto mutante 677TT)	5	22.6%
Doble heterocigoto MTHFR C677T y A1298C	2	9.1%
Homocigoto mutante 677TT	3	13.6%
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>45.3%</b>
<b>SECUNDARIA</b>	8	36.6%
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>100%</b>

El 55% de los pacientes fueron de género masculino y 45% femenino. En torno a los grupos de edad el 50% correspondió al de 11 a 16 años; un 27% a los menores de 5 años y 23% a los de 6 a 10 años con 11, 6 y 5 pacientes, respectivamente (figura 1 y 2). La edad de presentación media del evento fue de 6.65 años.

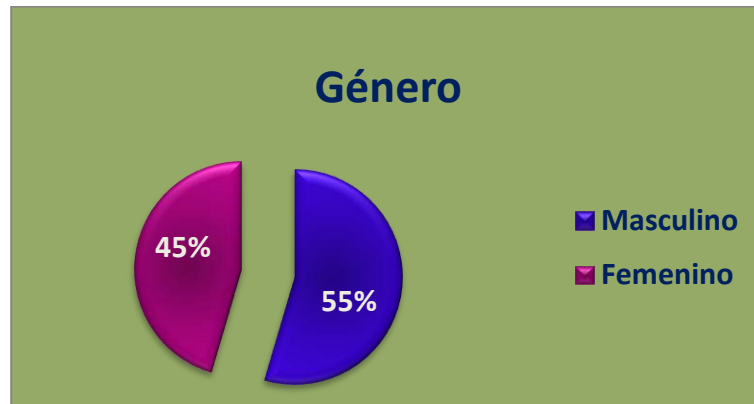


Figura 1. Distribución género.

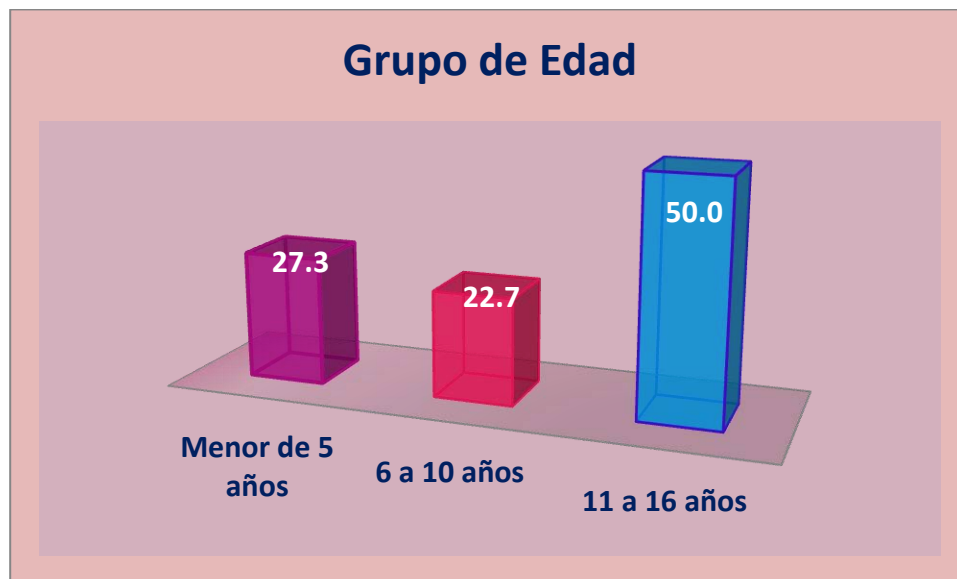


Figura 2. Grupos por edad.

Los eventos que más se reportaron fueron de afección territorio arterial con un 81.8% y 18.2% venoso (figura 3).





Figura 3. Tipo de evento.

En cuanto a la localización la mayor parte fueron eventos vasculares cerebrales (EVC) con un 54.5%, seguidos de la trombosis en miembros pélvicos con un 27.3%, miembros superiores 9.1%, tromboembolia pulmonar en 4.5% y EVC aunado a trombosis en ortejos en un 4.5% (figura 4).

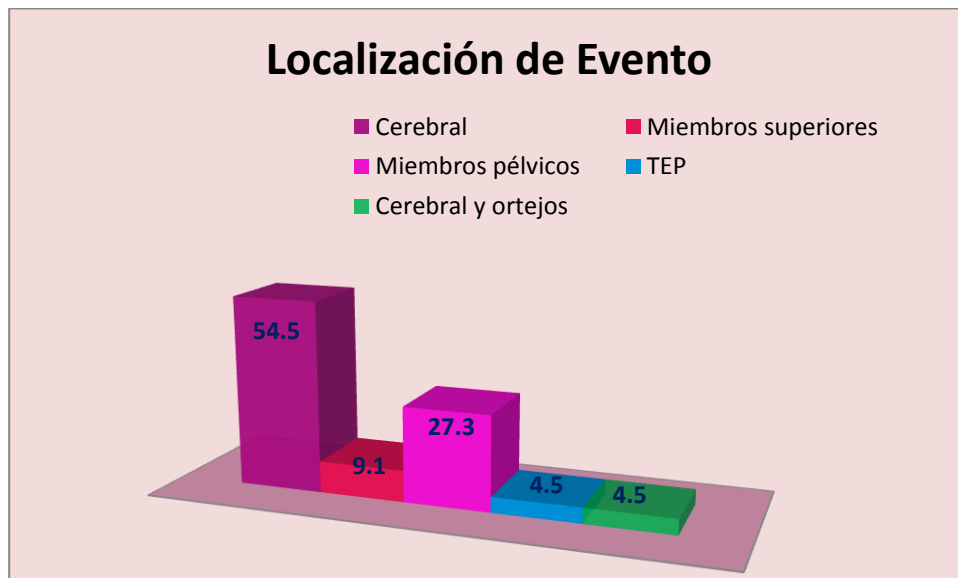


Figura 4. Localización del evento.

Se documentó eventos de recurrencias en tres pacientes siendo un 13.6% y la secuela más común fue hemiparesia hasta un 36.4% (figura 5 y 6). No se demostró asociación significativa entre recurrencia y secuelas con una prueba de Chi-cuadrada de Pearson de 0.80.



Figura 5. Recurrencia del evento.

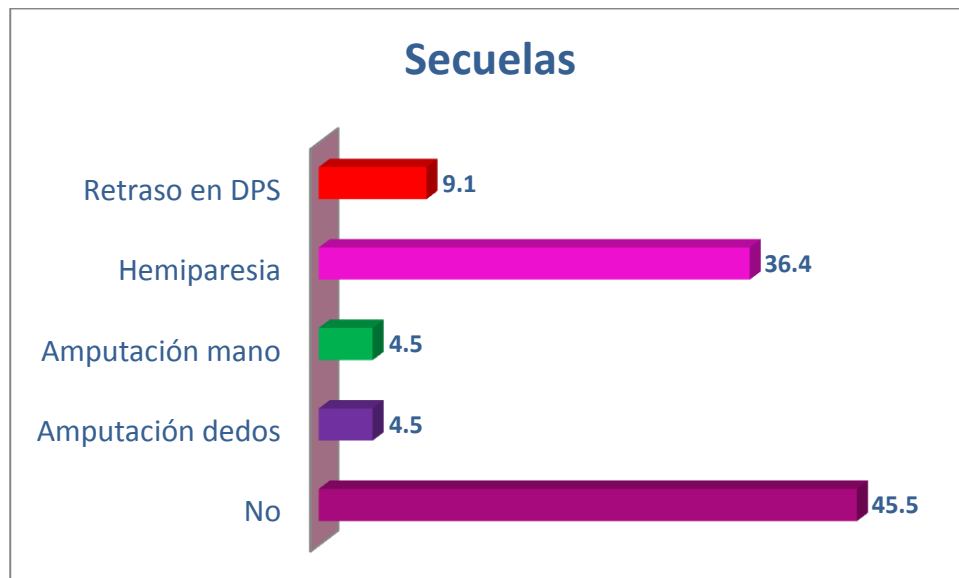


Figura 6. Secuelas o complicaciones.

La mayor parte de la población tuvieron hemotipo sanguíneo distinto a O en un 54.5% con doce pacientes (figura 7). Los valores de porcentaje de actividad de factor VIII fueron menores a 150% en el 72.7% de la población (figura 8).

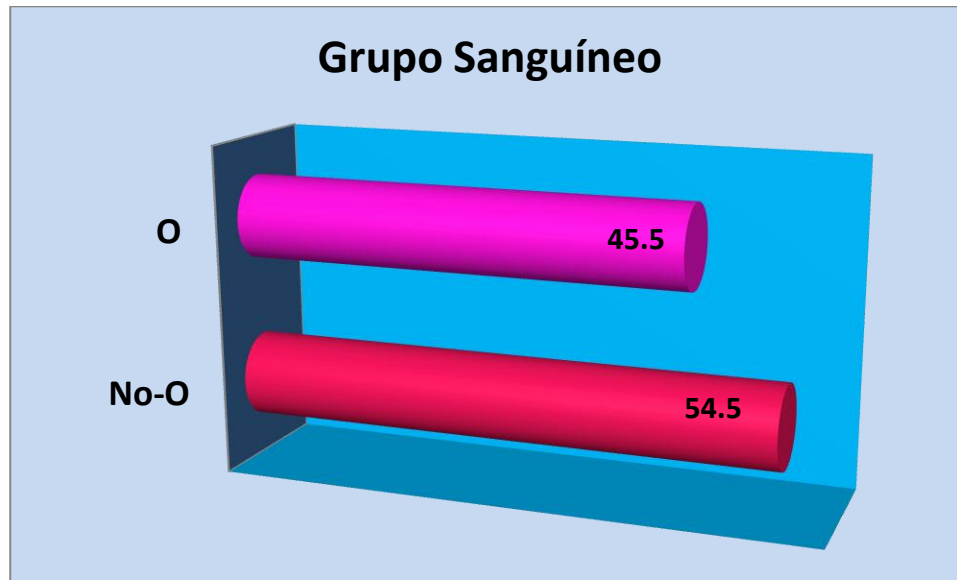


Figura 7. Grupo sanguíneo.

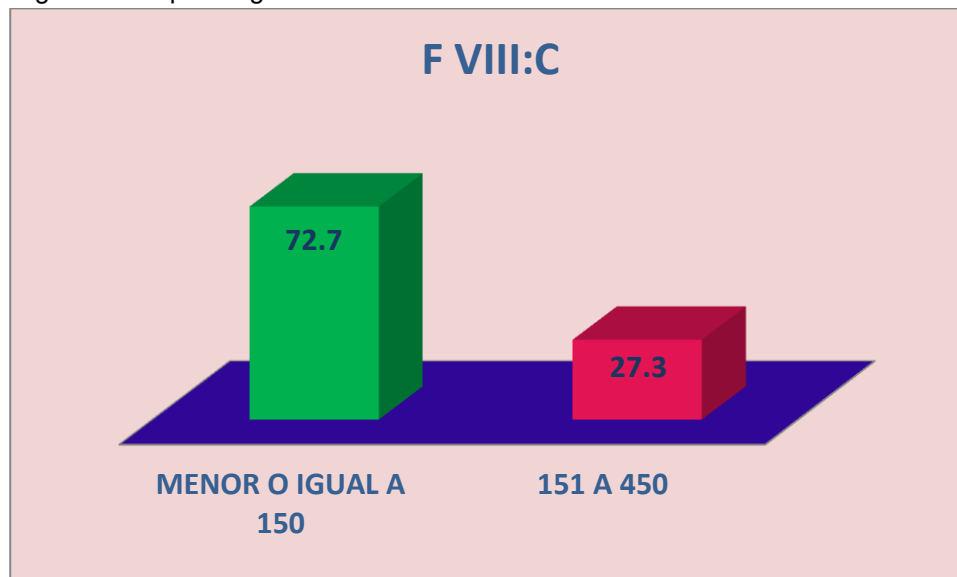


Figura 8. Porcentaje actividad factor VIII:C.

No hubo asociación estadísticamente significativa en pacientes con hemotipo no "O" y niveles de factor VIII por arriba del percentil 90 (>150% de actividad) con un valor de 0.417 con prueba exacta de Fisher (cuadro 2). Tampoco se observó significancia estadística al realizar Chi-cuadrada para análisis entre grupos sanguíneos ABO de

pacientes con trombofilia comparado con grupo sanguíneo de población general mexicana.

**Cuadro 2. Grupo sanguíneo y porcentaje actividad factor VIII:C**

Grupo	FVIII:C <150%	FVIII:C >150%	Total	Prueba exacta de Fisher
No "O"	8	4	12	0.417
O	8	2	10	
Total (#pacientes)	16	6	22	

Los factores adquiridos se encontraron presentes en el 54.5%, siendo el principal la cardiopatía congénita en un 40.9%; otros reportados fueron acceso venoso central y periférico así como dislipidemia (cuadro 3).

**Cuadro 3. Factores adquiridos**

Tipo de factor	Frecuencia	Porcentaje
Ninguno	10	45.5%
Foramen oval permeable (FOP)	8	36.45%
Ventrículo único hipoplásico	1	4.5%
Accesos venosos	2	9%
Dislipidemia	1	4.5%
Total	22	100%

En relación a grupos de tratamiento, un 45.5% no contaba con medicación, el 31.8% en manejo con anticoagulantes tipo antagonista de vitamina K (AVK) y heparina de bajo peso molecular, ver cuadro

**Cuadro 4. Tratamiento**

	Frecuencia	Porcentaje
No	10	45.5%
AVK (Acenocumarina)	5	22.7%
HBPM (Enoxaparina)	2	9.1%
Ácido acetil salicílico (AAS)/Clopidogrel	5	22.7%
Total	22	100%

En cuanto a la evaluación de los parámetros del ensayo de generación de trombina, solo pudieron determinarse en 19/22 pacientes debido a problemas técnicos del equipo, los resultados para pacientes con trombofilia primaria y factores aditivos son los que se muestran en el cuadro 5; los detalles de los parámetros de EGT en pacientes con trombofilia adquirida se recolectan en cuadro 6.

<b>Cuadro 5. Valores de EGT en trombofilia primaria y factores de riesgo aditivo</b>						
	<b>Tratamiento</b>	<b>TTPa/INR</b>	<b>Lagtime</b>	<b>ETP%</b>	<b>Peak%</b>	<b>IV%</b>
<b>PRIMARIA</b>						
Heterocigoto FVL + Homocigoto mutante PAI-1 (4G/4G)	Acenocumarina	37.9 / 1.7	0.7	65.9	64.7	64.7
Heterocigoto FVL + Homocigoto mutante 677TT	Ninguno	25.6	-	-	-	-
Heterocigoto FII20210A + FOP	Clopidogrel	39.1	.8	109.1	106.1	109.7
Heterocigoto FII20210A	AAS	35.8	4.3	81.7	48.3	22.8
<b>FACTORES GENÉTICOS ADITIVOS</b>						
Homocigoto para ECA-1 (D/D) + FOP	Ninguno	36.9	1.2	109.8	97.7	80.2
Homocigoto para ECA-1 (D/D) + Acceso venoso	AAS	30.8	0.4	71.6	67.5	70.6
Homocigoto para ECA-1 (D/D) + Cardiopatía	Enoxaparina	52.6	-	-	-	-
Homocigoto para ECA-1 (D/D) + Homocigoto mutante 677TT	Acenocumarina	76.0 / 3.1	4.7	24.5	18.9	13.7
Homocigoto para ECA-1 (D/D) + Homocigoto mutante 677TT	Ninguno	29.3	1.0	85.9	80.5	64.7
Doble heterocigoto MTHFR C677T y A1298C	Acenocumarina	35.9 / 1.46	1.4	41.2	31.6	24.6
Doble heterocigoto MTHFR C677T y A1298C	Ninguno	20.6	-	-	-	-
Homocigoto mutante 677TT + Dislipidemia	Enoxaparina	27	14	27.3	10.6	3.3
Homocigoto mutante 677TT + Acceso venoso	Ninguno	38	0.9	16.3	8.4	4.58
Homocigoto mutante 677TT + FOP	AAS	39.1	1.1	79.3	61.0	44.2

**Cuadro 6. Valores de EGT en trombofilia secundaria**

	Tratamiento	TTPa/INR	Lagtime	ETP%	Peak%	IV%
<b>SECUNDARIA</b>						
FOP	Acenocumarina	50 / 2.12	1.6	27.7	29.1	32.6
FOP	ASS	32.2	1.0	87.8	71.4	51.7
FOP	Ninguno	30.1	1.1	101.8	98.0	95.3
FOP	Acenocumarina	56.2 / 2.3	3.3	23.1	19.2	15.1
FOP	Ninguno	39.2	2.1	74.8	33.7	11.4
-	Ninguno	36	5.3	87.5	49.6	22.4
-	AAS	39.1	1.1	79.3	61.0	44.2
-	Ninguno	42.5	.5	80.0	85.9	126.0

Los valores de ETP para el grupo de pacientes con fármacos antagonistas de vitamina K, antiagregantes plaquetarios y el grupo sin tratamiento en comparación con el valor de ETP arrojado del plasma normal (100%) para pacientes pediátricos se visualiza en el figura 9 (A,B y C, respectivamente).

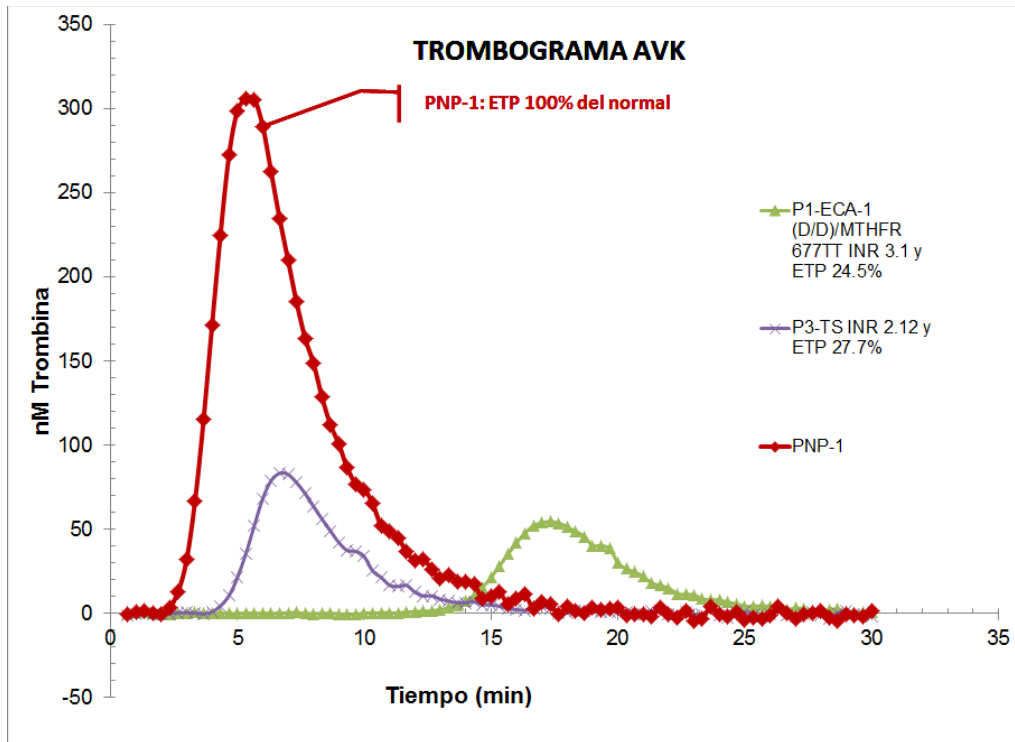


Figura 9. A) Trombograma AVK (acenocumarina) comparada con PNP (plasma normal pediátrico).

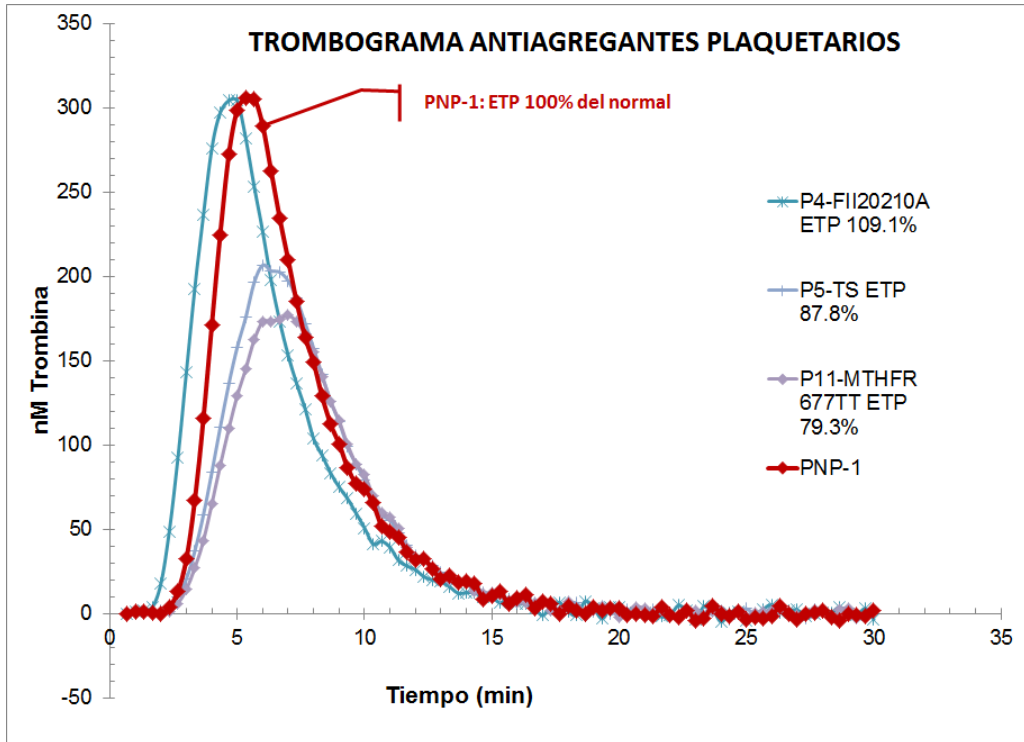


Figura 9. B) Trombograma antiagregantes plaquetarios (AAS/Clopidogrel) comparada con PNP (plasma normal pediátrico).

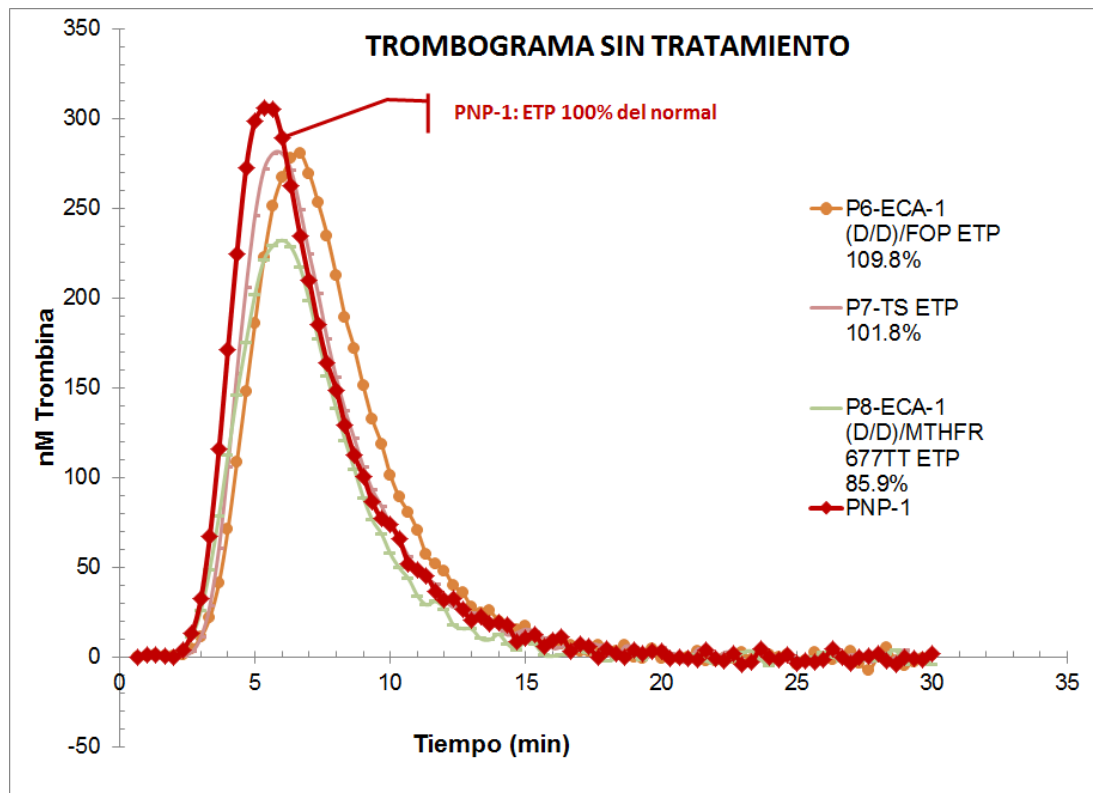


Figura 9. C) Trombograma pacientes sin tratamiento comparado con PNP (plasma normal pediátrico).

Se aplicó prueba estadística de ANOVA para comparar medias de los parámetros de ensayo de generación en relación con los distintos grupos de tratamiento; los cuales se pueden ver reflejados en cuadro 7.

**Cuadro 7. Parámetros de EGT.**

Parámetro	Grupo	N	Media	Intervalo de confianza para la		Sig. Intergrupos
				Límite Inferior	Límite Superior	
<b>Lagtime</b>	No	8	1.68	0.395	2.977	0.0001
	AVK	5	2.33	0.291	4.377	
	HBPM	1	14.0	-	-	
	Antiagregantes plaquetarios	5	1.52	-0.449	3.501	
	Total	19	2.46	0.938	3.987	
<b>ETP</b>	No	8	77.4	53.396	101.404	0.009
	AVK	5	36.48	14.204	58.756	
	HBPM	1	27.3	-	-	
	Antiagregantes plaquetarios	5	85.9	68.258	103.542	
	Total	19	66.32	51.533	80.930	
<b>Peak</b>	No	8	62.1	34.422	89.778	0.077
	AVK	5	32.7	9.381	56.019	
	HBPM	1	10.6	-	-	
	Antiagregantes plaquetarios	5	70.86	44.088	97.632	
	Total	19	59.95	39.128	68.788	
<b>Velocity Index</b>	No	8	53.24	15.862	90.625	0.375
	AVK	5	30.14	4.335	55.945	
	HBPM	1	3.3	-	-	
	Antiagregantes plaquetarios	5	59.8	19.162	100.438	
	Total	19	46.26	28.492	64.028	

Se aplicó además análisis de regresión lineal para comparar valores de media de ETP en dos grupos específicos: pacientes con manejo con AVK con pacientes en manejo con antiagregantes plaquetarios; así como el grupo sin tratamiento con AVK



obteniendo significancia estadística con un valor de  $p=0.001$  y  $p=0.016$ , respectivamente (figura 10).

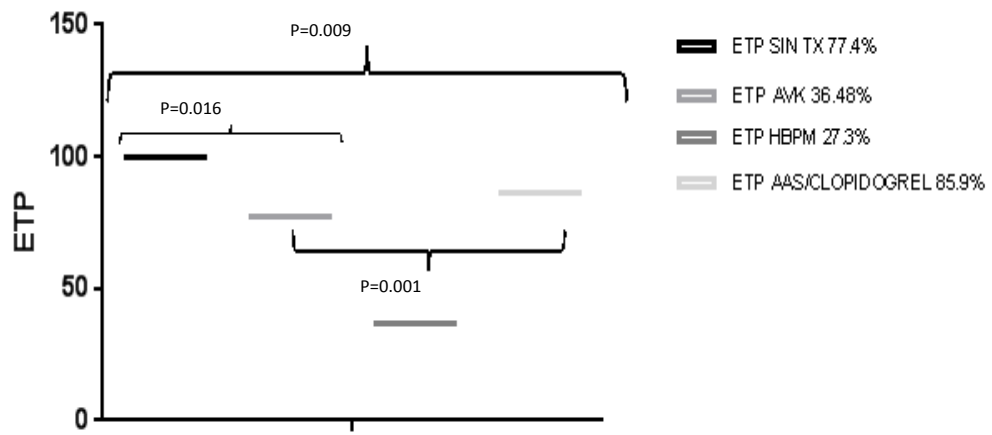


Figura 10. Valor de ETP acorde a grupos de tratamiento.

## 12. DISCUSION

La prevalencia de eventos de trombosis reportada en nuestro estudio fue similar en ambos sexos; que es equiparable con las incidencias reportadas a nivel mundial.

Los tipos de eventos que mayormente se presentaron fueron de afección arterial y con localización cerebral, manifestados como eventos vasculares cerebrales o ataques isquémicos transitorios; esto difiere en relación a los pacientes con trombofilia primaria; en los que la afección en territorio venoso es la más típica; sin embargo estos hallazgos pueden ser explicado debido a que la muestra seleccionada no es representativa ya que en el último año la relación en cuanto a prevalencia de eventos venosos en nuestro hospital comparada con eventos arteriales fue de 10:1.

La trombofilia primaria de mayor prevalencia en el mundo es la mutación heterocigota para FVL seguido de FII20210A; en nuestro estudio aunque la muestra es pequeña se reporta un 18.1% de trombofilia primaria coincidiendo con la referencia previa.

Según Wu O, Bayoumi y cols, 2007; el grupo sanguíneo distinto a "O" presentan un riesgo entre 2 a 4 veces superior de padecer eventos trombóticos y ésta relación se ha establecido a través de la asociación observada entre el grupo ABO y los niveles de factor VIII:C; sin embargo en nuestra muestra de estudio si bien la mayor parte de los pacientes tuvieron hemotipo sanguíneo distinto a "O" (doce pacientes) esto no se correlacionaba con actividad de factor VIII:C en plasma mayor a 150%. En la revisión de Mendéz-Santillan, E; 2004 la frecuencia de grupos sanguíneos ABO en México es de 63% hemotipo O y de 37% para hemotipo distinto a O, por lo que se realizó prueba de Chi-cuadrada para análisis entre grupos sanguíneos ABO de pacientes con trombofilia comparado con grupo sanguíneo de población general mexicana sin observarse significancia estadística.

En relación a los parámetros del ensayo de generación de trombina; no hay estudios en población pediátrica por lo que se utilizó como referencia la publicación de H. Luna-Záizar, et al 2015, en donde se estudiaron 43 pacientes adultos (20-64 años) con diagnóstico de trombofilia hereditaria, se establecieron grupos de tratamiento (AVK,

HBPM, antiagregantes plaquetarios y sin tratamiento). Se evaluaron los parámetros del EGT y el INR; arrojando resultados con diferencia significativa en ETP y Peak entre los pacientes que recibieron tromboprofilaxis con antagonistas de vitamina K (AVK) o heparina de bajo peso molecular (HBPM) y pacientes que no reciben tratamiento ( $p=0.0001$ ). No se evidenció significancia en pacientes que reciben tratamiento antiagregante. Lagtime si discriminó entre pacientes sin tratamiento y pacientes que reciben tromboprofilaxis pero mostraron gran variabilidad interindividual en los pacientes que se encontraban bajo anticoagulación óptima con antagonistas de vitamina K (rangos de INR de 2-3).

En nuestro estudio se encontró significancia estadística para el valor de lagtime y ETP al compararse las medias en los distintos grupos de tratamiento con  $p=0.0001$  y  $p=0.009$ , respectivamente.

Se analizó el valor de ETP en los pacientes con tromboprofilaxis con AVK con el grupo sin tratamiento obteniendo un valor de  $p$  con significancia estadística ( $p=0.016$ ) y un valor de  $p=0.001$  en el grupo de pacientes con manejo con AVK y antiagregantes plaquetarios.

Además es interesante la observación intragrupo con tromboprofilaxis a base de AVK, en donde la media de ETP para valores de INR subóptimo ( $<1.5$  a  $1.9$ ) fue de  $53.45\%$ ; para rangos óptimo ( $2.0-3.0$ ) de  $25.4\%$  y para rango de INR mayor a  $3.0$  fue de  $24.5\%$ .

En cuanto a evento de recurrencia solo se presentó en un paciente adolescente de género femenino con foramen oval permeable como factor secundario que se encontraba en manejo con anticoagulación con AVK (acenocumarina) con un INR óptimo de  $2.98$  al momento de la trombosis; su valor de ETP fue de  $27.7\%$  en relación a valor de ETP de plasma normal para paciente pediátrico; por lo que por ser caso único no pudo someterse a análisis de ROC para evaluar riesgo de recurrencia de evento trombótico.

### **13. CONCLUSIONES**

La trombosis tanto en niños como adultos es consecuencia de una etiología multifactorial, en donde las causas adquiridas generalmente serán el factor desencadenante de una condición genética de base.

Los parámetros del ensayo de generación de trombina: ETP y lagtime tuvieron un valor de p con significancia estadística por lo que resultan útiles para la evaluación de la capacidad hemostática del paciente.

El valor de ETP en base a 100% de plasma normal para pacientes pediátricos, ofrece diferencias significativas en el análisis intergrupos en cuanto a distintos tipos de tratamiento; por lo que el ensayo de generación de trombina ofrece ser una herramienta potencialmente útil para la monitorización de tromboprolaxis.

Las diferencias entre el análisis de distintos valores de INR en relación con el porcentaje de ETP no mostraron significancia estadística probablemente por ser una muestra pequeña de población pediátrica.

Los eventos de recurrencia en pacientes sin trombofilia primaria parecen no estar asociados a anticoagulación subóptima y a niveles por encima de ETP del valor de plasma normal; por lo que habrá que reforzar medidas de prevención o corrección de factores secundarios.

No se cuenta con estudios previos de ensayo de generación de trombina en población pediátrica con trombofilia, por lo que este estudio puede ser el precedente para el desarrollo de mayor campo de investigación en este rubro.

#### 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez-Murillo C. Hacia un consenso nacional en tromboembolismo venoso. Comité Mexicano de Hemostasia y Trombosis, AMEH. Gac Méd Méx. 2000; 136(2): 133-36.
2. Khan S, Dickerman J. Hereditary thrombophilia. Thrombosis Journal. 2006; 4:15.
3. Altuna D, Cereseto J, Fassi D, Ferro H, Fondevila C. Trombofilias. Sociedad Argentina de Hematología. 2012. Pp 473-481.
4. Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Tromboembólica Venosa. México, Secretaria de Salud, 2010. Pp 2-3.
5. Martínez-Murillo C, Quintana-González S. Factores de riesgo para trombosis. Hematología. 2005; (6): 1-8.
6. Majluf-Cruz A. La Enfermedad Tromboembólica Venosa en el IMSS y en México. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2011; 49(4): 349-352.
7. Altuna D. Estudios de trombofilia hereditaria en población pediátrica. Hematología. 2013; 17(3): 285-92.
8. Rubio-Jurado B, Salazar-Páramo M, Medrano-Muñoz F, González-Ojeda A. Trombofilia, autoinmunidad y tromboprolifaxis perioperatoria. Cir Ciruj. 2007; 75: 313-21.
9. Mingot-Castellano ME. ¿Cómo se estudian los problemas de hemostasia en los niños?. Unidad de Gestión Clínica de Hematología. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. 2012. Pp 88-93.
10. De Stefano V, Finazzi G, Mannuccio-Mannucci P. Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, Clinical Syndromes and Management. The Journal of American Society of Hematology. Blood. 1996; 87(9): 3531-44.
11. Lane AD, Mannuccio-Mannucci P, Bauer KA; et al. Inherited thrombophilia: Part 1. Throm Haemost. 1996; 76: 651-662.
12. Llobet D, Falkon L, Mateo J. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in two out of three members of a family with thrombophilia. Thromb Res. 1995; 80: 413-18.
13. Parra-Ortega I, López-Martínez B, González-Ávila I, Rodríguez-Castillejos C, Jonguitud-Díaz V, Luna-Gaspar A, Sánchez-Huerta JL, Vilchis-Ordoñez A.

- Coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en la enzima 5-10 metilentetrahidrofolato reductasa en pacientes pediátricos con trombosis. *Medigraphic*. 2009; 66: 229-32.
14. Middeldorp S, Marcel L. Thrombophilia: An Update. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2007; 33(6):162-64.
  15. Gu Y, Shen W, Zhang L, Ying C. Deficiency of antithrombin and protein C gene in 202 Chinese venous thromboembolism patients. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014; 36: 573–78.
  16. Tcheng WY, Dovat S, Gurel S, Donkin J, Wong W. Severe Congenital Protein C Deficiency: Description of a New Mutation and Prophylactic Protein C Therapy and In Vivo Pharmacokinetics. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008; 30: 166-71.
  17. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest*. 1984; 74: 2082-88.
  18. Engesser L, Broekmans AW, Briet E, Brommer EJP, Bertina RM. Hereditary protein S protein deficiency: clinical manifestations. *Ann Intern Med*. 1987; 106: 677-82.
  19. García-De Frutos P. Mechanisms of thrombophilia. *Thromb Haemost*. 2007; 98: 485-87.
  20. Degen Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*. 1987; 26: 6165-77.
  21. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2001; 44: 1222-31.
  22. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996; 88: 3698-703.
  23. Weisberg I, Tran P, Christensen B. A second genetic polymorphism in MTHFR associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998; 64: 169-72.
  24. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jakobs C, Blom HJ, Camilo ME. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T and 1298A-C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *QJ Med*. 2003; 96: 297-303.

25. Fay W. Homocysteine and thrombosis: guilty by association?. *Thrombosis and Hemostasis. Blood*. 2012; 119(13): 2-3.
26. Parra-Ortega I, Estrada-Gómez R, Guzmán-García MO. La mutación 677C>T en la 5, 10 metilentetrahidrofolato reductasa y el aumento de homocisteína en pacientes mexicanos con un estado de trombofilia. *Med Int Mex*. 2007; 23: 15-18.
27. Brown NM, Pratt VM, Buller A, Pike-Buchanan L, Redman J. Detection of 677CT/1298AC "double variant" chromosomes: implications for interpretation of MTHFR genotyping results. *Brief report*. 2005; 7(4): 1.
28. Páramo JA, Rocha E. Fibrinólisis y trombosis venosa. *Sangre*. 1992; 37(3): 88-94.
29. Isordia-Salas I, Leños-Miranda A, Sainz I, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sánchez G. Asociación entre el polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y el infarto agudo de miocardio con elevación del ST en pacientes jóvenes. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(4): 365-72.
30. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol O y Soubrier FI. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990; 86: 1343-46.
31. Poch-López E. Enzima de conversión de la angiotensina (ECA): polimorfismo I/D en hipertensión arterial y nefropatía. IDIBAPS. 2000.
32. Soria JM. El componente genético de las alteraciones de la coagulación y de la trombosis. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2009; 9:58B-65B.
33. Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007; 6: 62-69.
34. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M. High plasma levels of factor VIII and the Risk of Recurrent Venous Thromboembolism. *N Engl J Med*. 2000; 343:457-462.
35. Hemker HC, Jaloma-Cruz AR. Tromboscopia calibrada automatizada en el estudio de los trastornos de la hemostasia. *Rev Hematol Mex*. 2012;13(1):25-31.
36. Brummel-Ziedins K. Models for thrombin generation and risk of disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013; 11(1): 212-23.

37. Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost.* 1995; 74:134-38.
38. Lippi G, Favarolo E. Activated partial thromboplastin time: new tricks for an old dogma. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34:604-11.
39. Macfarlane R, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* 1953; 6:3-8.
40. Pitney W, Dacie J. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol.* 1953; 6:9-14.
41. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Throm Haemost.* 1993; 70:617-624.
42. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic thrombotic system. *Thromb Haemost.* 2006; 96: 553–6.
43. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, De Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33: 4-15.
44. Tappenden K, Gallimore M, Evans G. Thrombin generation: a comparison of assays using platelet-poor and rich plasma and whole blood samples from healthy controls and patients with a history of venous thromboembolism. *Br J Lab Hematol.* 2007; 139: 106-12.
45. Eichinger S, Hron G, Kollars M. Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. *Clin Chem.* 2008; 54: 2042-48.
46. Luna-Záizar H, González-Moncada AI, Padilla-López EL, Ramírez-Anguiano AC, Pacheco-Moisés FP, Velasco-Ramírez SF, Zavelia-Romo MGZ, Borjas-Gutiérrez C, Jaloma-Cruz AR. Thrombin generation and international normalized ratio in inherited thrombophilia patients receiving thromboprophylactic therapy. *Thromb Res.* 2015; 1-8.
47. Stief TW. Influence of the surface on thrombin generation. *Int J Lab Hematol.* 2008; 30: 269-77.



## 15. ANEXOS

### Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.



Guadalajara, Jalisco a \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

No. Registro: \_\_\_\_\_.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto hago constar que acepto que mi hijo (a) participase de manera voluntaria y libre en el proyecto de investigación titulado **“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DEL ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA EN POBLACIÓN CON TROMBOFILIA EN LA UMAE PEDIATRÍA DEL C.M.N.O”** que se realizará con el fin de establecer los parámetros en cuanto a generación de trombina que pueden ser una herramienta para evaluar el riesgo trombótico así como para monitorización de terapia farmacológica. Este estudio se realiza con fines de investigación no lucrativos.

Se me ha informado que la participación de mi hijo (a) consistirá en donar una muestra de 25 ml de sangre periférica mediante venopunción para la obtención de plasma que se utilizará en el estudio con el fin de determinar los parámetros de generación de trombina que permitirán conocer el estado hemostático y establecer en un futuro escalas de riesgos para el desarrollo de eventos de trombosis.

Puedo solicitar la eliminación de las muestras biológicas después del estudio o dar mi consentimiento para que sean integradas a un banco de plasma de población mexicana con trombofilia, que se utilizará con fines de investigación en proyectos relacionados con esta línea de estudio que aportarán datos básicos sobre el padecimiento, los cuales, eventualmente podrán aplicarse al diagnóstico y tratamiento de la misma. Cada proyecto se someterá a una evaluación previa a su ejecución por un comité de investigación y de ética que velará porque los procedimientos y fines de la investigación correspondiente cumplan con los lineamientos de calidad científica y se apeguen a la normatividad que marca el Reglamento General de Salud en materia de Investigación para la Salud.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, asimismo, estoy enterado sobre los posibles riesgos e inconvenientes derivados de mi participación en el estudio, que implican las molestias y posible hematoma por la punción venosa.

El investigador principal me ha garantizado la confidencialidad de mis datos personales y se ha comprometido a mantener el anonimato de manera que no se le identificará en las presentaciones o publicaciones científicas que se generen de este estudio. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a la permanencia en el mismo.

Como derechohabiente del IMSS, la atención médica de mi hijo (a) no será afectada por la decisión de participar en el estudio. Recibiré una copia de este documento para conservar constancia de los compromisos del investigador para conmigo y contar con sus datos donde pueda contactarlo en caso de cualquier aclaración sobre el estudio.

Favor de marcar con una “X” en el cuadro correspondiente en cuanto a la decisión de colecta de muestra biológica:

- |                          |   |
|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | No autorizo que se tome la muestra                                      |
| <input type="checkbox"/> | Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio               |
| <input type="checkbox"/> | Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros |

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de ambos padres o tutores o representante legal

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del investigador

\_\_\_\_\_  
Testigo (nombre, dirección, relación y firma)

\_\_\_\_\_  
Testigo (nombre, dirección, relación y firma)

**SI ( ) NO ( )**

Acepto que la muestra biológica de mi hijo (a) sea almacenada para su utilización en otros estudios relacionados con trombofilia debidamente avalados por los comités de investigación y ética correspondientes.

**DATOS DE LOS INVESTIGADORES RESPONSABLES.**

ME Dra. Janet Margarita Soto Padilla  
Médico Especialista en Hematología Pediátrica  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente  
sirenan Janet@hotmail.com

Dra. en C. Ana Rebeca Jaloma Cruz  
Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS  
Sierra Mojada #800, Colonia Independencia, C.P. 44340. Guadalajara, Jalisco  
Teléfono: 36 68 30 00 Ext. 31929  
Fax: 36 18 17 56  
Correo electrónico: arjaloma@gmail.com

Dra. Hilda Luna Záizar  
Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías/Dept. Química  
Universidad de Guadalajara  
Guadalajara, Jalisco.  
Correo electrónico: hiluna90@yahoo.com.

ME Dra. Damaris Guadalupe Martínez Cruz  
Médico Especialista en Pediatría Médica  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente  
dradarismartinez@gmail.com

## Anexo 2. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DEL ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA EN POBLACIÓN CON TROMBOFILIA EN LA UMAE PEDIATRÍA DEL C.M.N.O

#### FICHA DE IDENTIFICACIÓN Y DATOS PERSONALES

Nombre paciente \_\_\_\_\_  
No. Seguridad Social \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_  
Edad (años): \_\_\_\_\_ Fecha de nacimiento y lugar de nacimiento \_\_\_\_\_  
Domicilio Calle y Número \_\_\_\_\_ Colonia \_\_\_\_\_  
Ciudad \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ C.P. \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

¿Hay alguna historia previa de trombosis en su familia? \_\_\_\_\_  
Si su respuesta fue SI, ¿qué tipo de trombosis? \_\_\_\_\_  
¿Existe alguien en la familiar con algún diagnóstico de trombofilia primaria? \_\_\_\_\_  
Si su respuesta fue SI, ¿qué tipo de mutación/polimorfismo? \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Fractura miembro pélvico \_\_\_\_\_ Cirugía ortopédica \_\_\_\_\_ Acceso vascular central \_\_\_\_\_  
Hipoxia neonatal (Apgar a los 5 minutos) \_\_\_\_\_ Cardiopatías congénitas \_\_\_\_\_  
Cáncer \_\_\_\_\_ Lupus Eritematoso Generalizado \_\_\_\_\_ Síndrome antifosfolípidos \_\_\_\_\_

#### DATOS EN RELACIÓN A EVENTO TROMBÓTICO

Edad de presentación (años) \_\_\_\_\_ Fecha de presentación \_\_\_\_\_ Tipo de evento (arterial ó venoso) \_\_\_\_\_  
Localización anatómica \_\_\_\_\_

¿Se instauró tratamiento farmacológico? (SI ó No) \_\_\_\_\_ Si la respuesta es SI, favor de indicar lo siguiente:

\*\*\* ¿Cuál fármaco? \_\_\_\_\_ Especificar dosis, frecuencia y duración del tratamiento: \_\_\_\_\_

Si el fármaco es un anticoagulante; ¿cuánto tiempo el valor de INR se encontró en rangos de 2-3? \_\_\_\_\_

Ha tenido recurrencia (s) de evento (s) (SI ó No) \_\_\_\_\_ Si la respuesta es SI, favor de indicar lo siguiente:

\*\*\* Número de eventos \_\_\_\_\_ Fecha (s) de presentación \_\_\_\_\_ Tratamiento utilizado \_\_\_\_\_

Duración del tratamiento \_\_\_\_\_

¿Cuenta con alguna complicación o secuela? \_\_\_\_\_ (SI ó No); Si la respuesta es SI, ¿de qué tipo? \_\_\_\_\_

¿Se estableció diagnóstico de TROMBOFILIA PRIMARIA O SECUNDARIA? \_\_\_\_\_

Si, la respuesta fue primaria, favor de especificar mutación/polimorfismo \_\_\_\_\_

**PARACLÍNICOS**

Grupo sanguíneo \_\_\_\_\_ Rh \_\_\_\_\_ Factor VIII:C \_\_\_\_\_ Recuento plaquetario \_\_\_\_\_

Proteína C \_\_\_\_\_ Proteína S \_\_\_\_\_ Antitrombina III \_\_\_\_\_

TP/Testigo \_\_\_\_\_ TTPa/Testigo \_\_\_\_\_ INR \_\_\_\_\_

**FECHA ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA** \_\_\_\_\_

Tiempo de inicio (Lagtime) \_\_\_\_\_ min

Potencial endógeno de trombina (ETP) \_\_\_\_\_ nM.min

Pico (Peak) \_\_\_\_\_ nM

Índice de velocidad \_\_\_\_\_ nM.min

## 16. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Año 2015-2016	Lluvia de ideas	Recabar artículos	Estructura de protocolo de Investigación	Subir plataforma	Recolección de datos	Análisis de datos	Resultados y discusión	Presentación final de tesis
Junio 2015								
Julio 2015								
Agosto 2015								
Septiembre 15								
Octubre 2015								
Noviembre 15								
Diciembre 15								
Enero 2016								
Febrero 2016								