



**UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE PUEBLA
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE POSGRADOS
CLÍNICA RUIZ LABORATORIOS**

**ANÁLISIS DE LAS CAUSAS DEL FENOTIPO DE
RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA
EN MÉXICO.
EXPERIENCIA EN UNA SOLA INSTITUCIÓN.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD
EN CIENCIAS DE LABORATORIO CLÍNICO**

PRESENTA:

QFB. María Fernanda Vallejo Villalobos

Puebla, Puebla.

Febrero 2017



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a toda mi familia que llevo siempre en mi corazón.

A mis amados padres Laura y Marcos por todo el amor que me dan, por celebrar siempre mis logros, por su apoyo y sus palabras de aliento en cada momento de debilidad, por inculcarme valores de responsabilidad, honestidad, respeto y compromiso. Todo lo que hago es y será siempre para ustedes.

A mis hermanos Miguel y Carmina por inspirarme a ser mejor cada día y permitirme ser un ejemplo para los dos. No hay amor que se compare con el que siento por ustedes.

A mis adorados abuelos Manuel y Francisca por ser un ejemplo para todos nosotros, porque sin ustedes no sería la persona que soy el día de hoy, por su amor incondicional desde el día en que nací.

A mis amigos por su cariño y comprender mi ausencia en mas de una ocasión.

A Ana Isabel, Rossy, Maritza y Evelyn porque este logro es compartido con ustedes que se convirtieron en hermanas y amigas para toda la vida.

A aquellas personas que encontré en el camino e hicieron mi vida aun mas feliz.

...Gracias a Dios por tenerme siempre en la palma de su mano...

"Lo que uno quiere de verdad, es lo que está hecho para uno; entonces hay que tomarlo, o intentar. En eso se te puede ir la vida, pero es una vida mucho mejor."

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al *Dr. Guillermo J. Ruiz-Argüelles* por permitirme trabajar a su lado y compartir su sabiduría conmigo, por su confianza, pero sobre todo por contagiarme esas ganas de hacer cosas trascendentes y tener la fortuna de poder llamarlo mi mentor.

Agradezco a mis actuales compañeros residentes por su paciencia, por dejarme transmitirles conocimiento y compartir el suyo conmigo, por apoyarme en todo momento, por siempre contagiarme una sonrisa. No se rindan nunca.

Agradezco a la familia Ruiz por haberme abierto las puertas de su clínica y haberme permitido ser parte de ella durante este tiempo.

Agradezco también a todos los químicos y maestros que con sus enseñanzas en estos años me dieron alas para volar.

GRACIAS.

"El éxito llega para todos aquellos que están ocupados buscándolo."

Henry Thoreau

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Trombofilia	4
2.2 Trombosis arterial	4
2.3 Trombosis venosa	5
2.4 Características generales de la trombofilia	5
2.4.1 Diagnóstico de la trombosis	5
2.5 Estados de trombofilia primaria o hereditaria	6
2.5.1 Síndrome de las plaquetas pegajosas	6
2.5.2 Resistencia a la proteína C activada	7
2.5.3 Mutaciones del gen del factor V	7
2.5.4 Mutaciones en el gen de la protrombina	8
2.5.5 Mutación C677T del gen MTHFR	10
2.5.6 Deficiencia heredada de proteína C	10
2.5.7 Deficiencia heredada de proteína S	10
2.5.8 Deficiencia heredada de antitrombina III	11
2.6 Estados de trombofilia secundaria	11
2.6.1 Periodo posparto	11
2.6.2 Neoplasias malignas	11

2.6.3 Síndrome de anticuerpos antifosfolípido	12
2.6.4 Lupus eritematoso generalizado	12
2.7 Evaluación de pacientes con riesgo trombótico alto	13
2.8 Profilaxis y tratamiento de los trastornos trombóticos	13
2.8.1 Heparinas	14
2.8.2 Anticoagulantes orales	15
2.8.3 Fibrinolíticos	15
2.8.4 Antiplaquetarios	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo General	20
4.2 Objetivos Específicos	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Pacientes	21
5.2 Métodos Analíticos	21
5.2.1 Estudio del síndrome de plaquetas pegajosas	21
5.2.2 El fenotipo de resistencia a la proteína C activada	22
5.2.3 Otros estudios de la coagulación	22
5.2.4 Mutaciones en el gen del Factor V	23
5.2.5 La mutación c.677C>T en el 5,10-metil-tetrahidrofolato-reductasa	23
5.2.6 El polimorfismo c.20210G>A de la región 3'-no traducida del gen de protrombina	24
5.3 Análisis de Datos	24

6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN	27
8. CONCLUSIÓN	29
9. TABLA 1	30
10. TABLA 2	30
11. REFERENCIAS	31

RESUMEN

ANÁLISIS DE LAS CAUSAS DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA EN MÉXICO. EXPERIENCIA EN UNA SOLA INSTITUCIÓN.

El fenotipo de la resistencia a la proteína C activada (RPCa) puede ser el resultado de condiciones tanto heredadas como adquiridas: representa el 20% de los hallazgos anormales de laboratorio hechos en mestizos Mexicanos quienes han sufrido un episodio de trombosis, teniendo además un marcador clínico de trombofilia primaria.

El objetivo de este estudio es analizar las causas de la presencia del fenotipo de RPCa en pacientes mestizos mexicanos trombofílicos.

En un grupo reunido de manera prospectiva de pacientes mestizos mexicanos con historia de trombosis, teniendo además un marcador clínico de trombofilia primaria, se analizó la presencia del fenotipo anormal de RPCa y se analizaron también sus causas.

En un período de 276 meses se identificaron de manera prospectiva en una sola institución 96 pacientes mestizos mexicanos quienes, con un marcador de trombofilia primaria, habían desarrollado un episodio de trombosis venosa o arterial. Entre ellos, se identificaron 18 pacientes con el fenotipo anormal de RPCa. En este subgrupo se encontró que el 44% tuvo la mutación tipo Leiden del gen del factor V, el 22% tuvo niveles elevados de factor VIII coagulante, 16% tuvo anticuerpos antifosfolípido y 6% anticoagulante lúpico. En el 22% restante de estos pacientes se recabó el antecedente de uso de anticoagulantes orales directos (ACODs) en las 12 a 24 horas previas a la toma de muestra para hacer los estudios de laboratorio del perfil trombofílico. Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre fenotipo anormal de RPCa y mutación Leiden del gen del factor V ($p = 0.002$), entre fenotipo anormal de RPCa y empleo de ACODs ($p = 0.006$) y entre la presencia de anticoagulante lúpico y de anticuerpos anti-fosfolípido ($p > 0.0001$).

Nuestros hallazgos sugieren que las condiciones hereditarias que causan fenotipo de RPCA en mestizos mexicanos trombofílicos son infrecuentes y que debe tenerse en cuenta el empleo de ACODs al identificar el fenotipo de RPCa en pacientes quienes se estudian con motivo de sospecha de una condición trombofílica.

1. INTRODUCCIÓN

Desde 1999 hemos estudiado y tratado pacientes con trombofilia heredada o adquirida (1-3). Con un equipo de laboratorio completo, ahora es posible identificar las condiciones trombofílicas heredadas o adquiridas en mas del 90% de individuos que han sufrido trombosis o han tenido marcadores clínicos de trombofilia. Como resultado del estudio de estas condiciones en mas de 500 mestizos mexicanos hemos podido definir las condiciones trombofílicas que prevalecen en la población mexicana, las cuales son diferentes a aquellas identificadas en otras poblaciones del mundo.

El fenotipo de la resistencia a la proteína C activada (RPCa) puede ser el resultado de condiciones tanto heredadas como adquiridas: representa el 20% de los hallazgos anormales de laboratorio hechos en mestizos mexicanos quienes han sufrido un episodio de trombosis, teniendo además un *marcador clínico* de trombofilia primaria. (2-4). En este estudio analizamos la etiología del fenotipo anormal de la RPCa identificado en un subgrupo de 18 individuos dentro de un grupo de 96 mestizos mexicanos que fueron estudiados prospectivamente con al menos un marcador clínico de trombofilia primaria.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Trombofilia

El término trombofilia fue usado por primera vez 1965 por Egeberg para designar una enfermedad asociada con trombosis venosa; se refería entonces específicamente a la deficiencia familiar de antitrombina III. Desde entonces, el concepto de trombofilia se ha usado, no muy ampliamente, para referirse a diversos trastornos, adquiridos o heredados, en los que hay riesgos de trombosis arterial o venosa. El antónimo de trombofilia es hemofilia, palabra de uso común que agrupa diversos padecimientos en los que hay riesgo de sangrado. Trombofilia es un término correcto que incluye varias entidades que se han descrito como situaciones de hipercoagulabilidad o estados pretrombóticos. Los padecimientos trombóticos son responsables de mas de la mitad de los fallecimientos de los miembros de sociedades bien desarrolladas. La enfermedad por trombosis incapacitante o fatal deriva de la formación de trombos en las arterias en sitios donde ha habido daño endotelial, o bien en las venas como consecuencia de estasis venosa e hipercoagulabilidad. Los trombos arteriales tienen un componente plaquetario importante, además de fibrina, en tanto que los trombos venosos habitualmente poseen menos plaquetas; en estos últimos, el daño endotelial no es tan marcado como en los trombos que se originan en las arterias.

2.2 Trombosis arterial.

La aterosclerosis de la pared arterial, la rotura de una placa de ateroma y daño endotelial exponen la sangre a la colágena subendotelial y a factores tisulares; esto inicia la formación de un nido de plaquetas que, por producción de tromboxano A₂, comienza la agregación plaquetaria. El agregado de plaquetas se adhiere al endotelio por medio de fibrina, y la disminución de flujo sanguíneo y el aumento de la turbulencia colaboran al crecimiento del trombo, que puede mas tarde fragmentarse y dar lugar a émbolos. Los factores de riesgo trombótico

arterial son: sexo masculino, historia familiar, hiperlipidemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus, hiperuricemia, eritrocitosis, tabaquismo, trastornos electrocardiográficos, incremento en las concentraciones de factor VIII y de fibrinógeno, entre otros.

2.3 Trombosis venosa

El principal factor de riesgo para esta entidad es la hipercoagulabilidad sanguínea. Dado que los trombos venosos son menos firmes, es más fácil que se fragmenten y originen émbolos que pueden causar daño a distancia, condición conocida como tromboembolia venosa.

2.4 Características generales de la trombofilia.

Los estados de trombofilias suponen desequilibrio entre las actividades de los mecanismos procoagulantes y anticoagulantes naturales.

Hipercoagulabilidad debido a:

- Aumento del número o función, o ambos, de las plaquetas.
- Incremento en los niveles de los factores procoagulantes.
- Disminución en la actividad de los inhibidores fisiológicos de la coagulación, ya sea por falta del inhibidor o por disminución de su activación.

Hipofibrinólisis debido a:

- Disminución de la activación del plasminógeno.
- Incremento en los iniciadores de la fibrinólisis.
- Capacidad disminuida de lisis del coágulo de fibrina.

2.4.1 Diagnóstico de la trombosis

Los métodos para diagnosticar y cuantificar la trombosis son varios. El método de referencia sigue siendo la angiografía (flebografía, venografía, arteriografía) con medios de contraste. Otros métodos son la pletismografía de impedancia, la gammagrafía con varios radioisótopos (fibrina, plasmina o plaquetas marcadas), la tomografía computarizada, la resonancia nuclear, la termografía, la ecografía,

entre otros. Una vez confirmado el diagnóstico del fenómeno vasooclusivo, debe decidirse el tratamiento, que puede incluir anticoagulantes, antiplaquetarios y agentes fibrinolíticos. Hacer caso omiso del estudio de las causas de la trombosis lleva implícita una pena que puede ser catastrófica: la repetición del episodio vasooclusivo, posiblemente mas grave, o bien que ocurra en otro miembro de la familia en situaciones de trombofilia familiar.

Cada vez queda mas claro que los estados de trombofilia se producen con frecuencia como resultado de la coexistencia de varias condiciones trombofílicas, tanto heredadas como adquiridas; este es el concepto de trombofilia multifactorial. A continuación se señalan las condiciones de trombofilia mas frecuentes, tanto hereditarias (primarias) como adquiridas (secundarias).

2.5 Estados de trombofilia primaria o hereditaria

Los estados de trombofilia primaria mas frecuentes son: el síndrome de las plaquetas "pegajosas", la resistencia a la proteína C activada, las deficiencias de proteína C, proteína S, antitrombina III y las mutaciones de los genes del factor V, de la protrombina y de la reductasa del metilen tetrahidrofolato (MTHFR). Los indicadores clínicos que sugieren un estado de trombofilia primaria son: trombosis en sujetos jóvenes, menores de 40 años; historia familiar de trombosis; trombosis recurrente sin factores precipitantes aparentes; trombosis en sitios anatómicos poco usuales y resistencia a tratamientos antitrombóticos convencionales.

2.5.1 Síndrome de las plaquetas "pegajosas"

Descrito en 1983, este síndrome no fue reconocido como una causa de trombofilia sino hasta 1995. El síndrome de las plaquetas "pegajosas" (SPP) es una causa común de trombosis arterial y venosa; en Estados Unidos, el SPP es la causa del 20% de las trombosis arteriales y del 13% de las trombosis venosas. Esta enfermedad hereditaria supone hiperagregabilidad de las plaquetas cuando se estudia la función de estas in vitro, empleando como agentes agregantes adrenalina o difosfato de adenosina (ADP). En México, el SPP parece ser mas frecuente que en otros países, y ocurre en el 50 a 60% de los mestizos mexicanos

que tienen un marcador clínico de trombofilia. La administración de agentes antiplaquetarios a los pacientes que sufren esta condición heredada revierte la hiperagregabilidad plaquetaria en la mayoría de los casos y disminuye el riesgo de trombosis.

2.5.2 Resistencia a la proteína C activada

La forma heredada de la resistencia a la proteína C activada (RPCa) supone alteraciones en la estructura del gen que codifica la síntesis de la molécula del factor V de la coagulación, el cual, conservando su función procoagulante, es resistente a su inhibición por la proteína C activada. Una mutación puntual en el residuo 506 del gen del factor V causa la forma heredada mas frecuente de la enfermedad, que ocurre en hasta el 15% de los habitantes de Suecia y en el 4 a 5% de los habitantes de México. Esta mutación se conoce como mutación tipo Leiden del factor V de la coagulación. Las formas adquiridas de esta enfermedad ocurren por incremento en las concentraciones del factor VIII, anticuerpos antifosfolípido, anticoagulantes lúpicos, hepatopatías, embarazo, empleo de anovulatorios, etcétera. En México parecen ser mas frecuentes las formas adquiridas de la enfermedad que las formas heredadas, aun cuando es posible que existan otras mutaciones de los genes de los factores V y VIII que conduzcan en México al fenotipo de RPCa. En indígenas puros mexicanos no se ha encontrado la mutación Leiden del factor V de la coagulación, que es mas frecuente en poblaciones caucásicas. El 13% de los mestizos mexicanos con trombofilia, tienen la citada mutación (3).

2.5.3 Mutaciones en el gen del factor V

El factor V de la coagulación es una proteína esencial en la hemostasis, jugando un rol crucial tanto en la vía procoagulante como anticoagulante. En su forma inactiva, sirve como un cofactor del Factor X activado (FXa) en el complejo de la protrombinasa el cual cataliza la conversión de protrombina en trombina; sin embargo también actúa como cofactor de la proteína C activada (PCa) en la regulación de la actividad del Factor VIII activo (5). El gen que codifica el factor V

es de aproximadamente 80 kilobases de tamaño, y se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q23) y consiste de 25 exones y 24 intrones. Su transcripción da origen a un mRNA maduro de 6.8 kb el cual codifica una proteína de 330 kDa que circula en la sangre en una concentración de aproximadamente 21nM (6). Antes de 1993, la evaluación de las trombofilias heredadas se limitaba a realizar ensayos funcionales para la proteína C, S o deficiencia de antitrombina; esta aproximación cambió en 1993, cuando Dahlbäck y colaboradores describieron una nueva forma familiar de trombofilia caracterizada por resistencia a la Proteína C activada. Subsecuentemente varios laboratorios reportaron el defecto genético responsable de esta resistencia: una mutación sin sentido (Guanina por Adenina) en el nucleótido 1691 del gen del Factor V. El cambio en el aminoácido resultante, *Arginina por Glutamina en la posición 506*, ocurre precisamente en uno de los tres sitios donde la PCa normalmente cliva e inactiva la forma procoagulante del Factor Va, haciéndose por tanto parcialmente resistente a la acción anticoagulante de la PCa y es inactivado aproximadamente a una velocidad diez veces menor de lo normal, resultando en un aumento de la trombina circulante y por tanto a un estado protrombótico.

Esta alteración en su forma heterocigota genera un aumento del riesgo de presentar un episodio de trombosis venosa de 3 a 7 veces, mientras que para los homocigotos aumenta de 50 a 100 veces (7-9). En 1998 se descubrieron otras dos mutaciones en el factor V: el FV Hong Kong y el FV de Cambridge los cuales fueron reportados en pacientes con trombosis. Ambas mutaciones son resultado del remplazo de la Arginina 306, en el FV de Hong Kong por una glicina y en el de Cambridge por treonina. Sin embargo, el primero no ha sido asociado a RPCa (10).

2.5.4 Mutaciones en el gen de la protrombina

Unos meses después del descubrimiento del Factor V Leiden, otro importante factor de riesgo protrombótico fue identificado. De hecho, hacia finales de 1996, un estudio mostró que 18% de los pacientes seleccionados con trombosis venosa y cerca de 1% de controles normales tenían un cambio de nucleótidos en la base

20210 del gen de la protrombina (5,11). Ésta, también denominada Factor II de la coagulación, es una proteína dependiente de vitamina K, que en el proceso de coagulación se transforma en trombina (serina proteasa) y en el mismo proceso se encarga de producir fibrina. La protrombina se encuentra codificada en el cromosoma 11 en posición 11p11-q12, el gen de la protrombina posee 14 exones separados por 13 intrones en sentido 5' y una región no traducida en sentido 3' (12). La mutación 20210 fue descubierta en 1996 por Poort et al. Se debe a un cambio de G por A en la base 20210 en la región no traducida 3' del gen. Los análisis de haplotipos sugieren que la mutación apareció de un único fundador hace 20000 o 30000 años. En Europa, la prevalencia es del 2% con un rango de 0.7-4%. La prevalencia más alta parece encontrarse en las regiones del sur (aproximadamente 1.7%). En los Estados Unidos se estima entre 1 y 2%. La mutación no es común en afroamericanos, asiáticos y nativos americanos (12). En la primera descripción de la mutación, los portadores heterocigotos presentaban una media plasmática de niveles de protrombina significativamente mayor (1.32 U/mL) comparados con individuos con genotipo silvestre (1.05 u/mL). Por su parte, los homocigotos mutados presentaban niveles de 1.70 u/mL. Un reporte reciente demuestra que la mutación G por A genera una ganancia de función debido a un incremento en el reconocimiento de la señal de clivaje en la región 3'. El resultado final es la acumulación de RNAm y por tanto un aumento en la síntesis de protrombina. Otros han mostrado que los niveles elevados pueden inhibir la proteína C activada mediada por una inactivación del Factor Va, lo cual llevaría a una intensificación en la generación de trombina después de iniciada la coagulación (12). Numerosos estudios de casos y controles han demostrado de manera más o menos consistente la asociación entre la mutación y la enfermedad tromboembólica. Poort et al reportó un aumento en el riesgo de casi 3 veces (OR 2.8; 95% IC 1.4-5.6). Desde entonces otros estudios han estimado un riesgo relativo para trombosis venosa entre 2 y 12, estando la mayoría de los estudios en un rango de 2 a 3 (9,12).

2.5.5 Mutación C677T del gen MTHFR

Esta mutación se ha encontrado en el 67 y 11% de los pacientes mestizos mexicanos con algún marcador clínico de trombofilia. Dado que la mutación ocurre también en el 80% de los mestizos mexicanos sin trombofilia, su papel en la génesis de esta condición es dudosa. Cuando se identifica esta alteración en un paciente trombofílico, es razonable administrarle suplementos de ácido fólico para evitar la hiperhomocisteinemia que puede ocurrir en la deficiencia de folatos, y que podría agravar la hiperhomocisteinemia que ocurre en algunos sujetos con esta mutación, sobre todo cuando es homocigota. Los heterocigotos para la mutación habitualmente no desarrollan hiperhomocisteinemia.

2.5.6 Deficiencia heredada de proteína C

La proteína C inactiva los factor Va y VIII y depende para su síntesis hepática de la vitamina K. La deficiencia heredada se transmite con carácter autosómico dominante; el gen que codifica su síntesis se localiza en el cromosoma 2. Algunos autores han descrito que la proporción de sujetos heterocigotos para deficiencia es tan alta como 1 en 200 a 300 individuos de la población general; las cifras de proteína C en ellos son menores del 60% del valor normal. No todos los heterocigotos para la deficiencia sufren fenómenos vasooclusivos, y se han identificado algunos factores que propician que ocurra trombosis en dichos sujetos: anovulatorios, embarazo, infecciones graves, lupus eritematoso y el uso de algunos agentes quimioterapéuticos como la L-asparaginasa, entre otros. Los homocigotos para la deficiencia sufren púrpura fulminans, condición de extrema gravedad que termina con la vida de los recién nacidos en pocos días; en ellos, la concentración de la proteína C es menor de 1% del valor normal.

2.5.7 Deficiencia heredada de proteína S

La deficiencia se transmite con carácter autosómico dominante y la proporción de sujetos heterocigotos u homocigotos para la deficiencia no se conoce a detalle. Aparentemente esta deficiencia es menos frecuente que la de la proteína C. Entre el 2 y el 5% de los pacientes con marcadores clínicos de un estado trombofílico

primario sufren deficiencia hereditaria de proteína S; en México es rara esta enfermedad. El 60% de la proteína S se encuentra unida con C4 y el 40% restante se encuentra libre; solo la fracción libre tiene actividad anticoagulante como cofactor de la proteína C. La proteína S es también dependiente de la vitamina K.

2.5.8 Deficiencia heredada de antitrombina III

La AT III es responsable del 75% de la actividad inhibidora de la trombina. La deficiencia se transmite con carácter autosómico dominante; la proporción de heterocigotos es de 1 en 2000 y sus concentraciones son menores del 50%. Aproximadamente la mitad de los sujetos heterocigotos para la deficiencia sufren un episodio vasooclusivo en la adolescencia. El estado homocigoto para la deficiencia de AT III es incompatible con la vida. En México esta enfermedad es una causa muy infrecuente de trombofilia.

2.6 Estados de trombofilia secundaria

Los estados trombofílicos secundarios más frecuentes son: posoperatorio, traumatismo, posparto, neoplasias malignas, tratamiento con estrógenos y enfermedades autoinmunitarias, como el síndrome de anticuerpos antifosfolípido y el lupus eritematoso generalizado.

2.6.1 Periodo posparto

Este período, y no el embarazo, es trombogénico y las causas son múltiples: disminución en la actividad fibrinolítica, estasis en venas profundas, dilatación de venas intraabdominales por presión uterina, hiperfibrinogenemia, deficiencia adquirida de AT III, etcétera.

2.6.2 Neoplasias malignas

En los tumores malignos del tubo digestivo puede haber trombofilia. La tromboflebitis migratoria, el llamado Síndrome de Trousseau, es una forma de trombofilia venosa que fue descrita en él mismo por el médico que le dio nombre.

2.6.3 Síndrome de anticuerpos antifosfolípido

El síndrome de anticuerpos antifosfolípido o síndrome antifosfolípido (SAF) se ha empleado en los últimos 10 años para describir a la entidad de un grupo de pacientes con anticuerpos antifosfolípido o anticoagulantes lúpicos que tienen algunas características clínicas asociadas: trombosis arterial o venosa, pérdida fetal repetida o trombocitopenia. La asociación de uno de los datos serológicos con una de las características clínicas antes señaladas permite establecer el diagnóstico de SAF. Se han identificado dos tipos de SAF: el primario, que se presenta en pacientes que no tienen suficientes criterios para establecer el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria definida, y el secundario, que ocurre en pacientes con otro trastorno autoinmunitario definido, frecuentemente lupus eritematoso generalizado (LEG). El SAF primario es una entidad nosológica bien definida e independiente en la que se han descrito algunos datos clínicos como migraña, livedo reticularis, síndrome de Evans (anemia hemolítica y púrpura trombocitopénica autoinmunitaria simultáneas), corea, hipertensión pulmonar, anomalías en las válvulas cardíacas, entre otros.

2.6.4 Lupus eritematoso generalizado (LEG)

Los pacientes con LEG sufren un estado de trombofilia adquirida; se han identificado diversos mecanismos como responsables de ella, entre los que destacan las anomalías funcionales del complejo factor VIII/factor Von Willebrand, anticoagulantes lúpicos, anticuerpos antifosfolípido, deficiencia de protaciclina y otros que el autor ha estudiado con mas detalle. En individuos con LEG se ha estudiado el funcionamiento de algunos de los mecanismos antitrombóticos naturales, como los sistemas proteína C/proteína S/trombomodulina, trombina/antitrombina III, lipoproteína (a) y fibrinólisis/antifibrinólisis. En todos estos sistemas se han encontrado alteraciones relacionadas con trombofilia y, en algunos casos, con autoanticuerpos. Al parecer, la alteración de los mecanismos antitrombóticos mas frecuentemente asociada con la trombofilia observada en estos pacientes es el fenotipo de la resistencia a la proteína C activada, alteración que además es reversible. Todos estos datos

apoyan la idea de que la trombofilia lúpica es multifactorial y que el mal funcionamiento de algunos de los mecanismos antitrombóticos naturales desempeña un papel en ésta. Se han descrito también anticuerpos anti-proteína C, anti-proteína S, anti-PAI y anti-TPA, en algunos casos asociados a diátesis trombofílica. La presencia de anticuerpos antifosfolípido se asocia con trombosis venosa recurrente, trombosis arterial, pérdida fetal repetida y trombocitopenia.

2.7 Evaluación de pacientes con riesgo trombótico alto

El que ocurra un fenómeno vasooclusivo en la vena iliofemoral de un anciano que ha sufrido fractura intertrocanterea de fémur y ha permanecido inmóvil durante algún tiempo no sorprende en forma notable. Sin embargo, hay situaciones en la que deben realizarse estudios orientados a aclarar la causa de la trombofilia; entre ellas se pueden considerar las mencionadas con anterioridad: trombosis en sujetos jóvenes, menores de 45 años, con factores predisponentes evidentes o sin estos; trombosis en sitios anatómicos poco habituales; historia familiar de trombosis; resistencia o reacciones infrecuentes a tratamientos anticoagulantes o antitrombóticos (necrosis cutánea por cumarínicos, incapacidad para lograr anticoagulación con heparina, etc.). En estos pacientes deben hacerse las investigaciones de las condiciones de trombofilia heredada mencionadas con anterioridad. Si se encuentra el fenotipo de la resistencia a la proteína C activada mediante un tiempo de tromboplastina parcial activada en presencia de cantidades conocidas de proteína C, debe investigarse si se trata de una forma heredada o adquirida del padecimiento, buscando la mutación Leiden del gen del factor V por medio de biología molecular u otras causas de las formas adquiridas de la entidad.

2.8 Profilaxis y Tratamiento de los trastornos trombóticos

Pueden utilizarse medicamentos antiplaquetarios como la aspirina y el clopidogrel; el dipiridamol debe olvidarse como antiplaquetario. También es posible usar anticoagulantes orales, cumarínicos y heparinas (convencionales o de bajo peso molecular) o heparinoides. Algunos procedimientos quirúrgicos, como la interrupción de la vena cava inferior o la instalación dentro de esta de dispositivos

como la “sombrija” de Mobin-Uddin o el filtro de Greenfield, pueden ser de utilidad para prevenir la embolia a partir de venas profundas de la pelvis o de miembros inferiores. Es posible utilizar tratamientos trombolíticos en casos de trombosis coronaria (infarto del miocardio), trombosis venosa profunda o tromboembolia pulmonar; se ha usado estreptocinasa, urocinasa, activador tisular del plasminógeno recombinante, activador del complejo plasminógeno/estreptocinasa (APSAC), entre otros.

2.8.1 Heparinas

Son mucopolisacáridos ácidos que inhiben la coagulación merced a su interacción con la antitrombina III; no se absorben en el aparato digestivo, de allí que haya que administrarlos por vía parenteral (intravenosa o subcutánea). Su vida media biológica es de aproximadamente 1 hora. Las heparinas potencian la formación de complejos entre la antitrombina III y las proteasas de serina: IXa, Xa y XIa. Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) (4000 a 8000 Da), a diferencia de las heparinas convencionales (15000 a 18000 Da), tienen mayor capacidad para inhibir el factor Xa. El uso de heparinas puede vigilarse mediante el tiempo de tromboplastina parcial activada, que conviene mantener entre 1.5 y dos veces el valor basar que tenía antes de la administración de la heparina. En el caso de las HBPM, no es necesario hacer estudios de laboratorio para vigilar su efecto. Las HBPM son fármacos antitrombóticos derivados de la heparina que tiene poco efecto anticoagulante y gran actividad antitrombótica, por lo que resultan ideales para la profilaxis y el tratamiento de la trombosis. Las HBPM son útiles en la prevención de trombosis en cirugía ortopédica y para tratar tromboflebitis e incluso tromboembolia pulmonar. A pesar de que son caras, el hecho de que se administren una sola vez al día, de que no necesiten vigilancia con pruebas de laboratorio y de que pueden emplearse en la casa del paciente, hace que la relación costo-beneficio sea mejor para estos fármacos que para la heparina no fraccionada y otros anticoagulantes. Los anticoagulantes orales deben iniciarse 2 a 7 días después de comenzar el uso terapéutico de las heparinas.

2.8.2 Anticoagulantes orales

Son derivados de la cumarina o de la indandiona, y actúan antagonizando la vitamina K. Dado que la absorción del aparato digestivo es adecuada, se administran por vía oral. El uso de los cumarínicos produce una disminución de la actividad biológica de los factores de coagulación dependientes de vitamina K: II, VII, IX, X, al desbloquearse la gama-carboxilación posribosomal de los residuos de ácido glutámico de estas proteínas. El efecto de estos cumarínicos debe vigilarse cuantificando el tiempo de protrombina; idealmente ha de mantenerse una tasa normalizada de protrombina (INR).

- 2.0 a 2.5 -> Profilaxis de trombosis venos profunda.
- 2.0 a 3.0 -> Tratamiento de trombosis venosa profunda, tromboembolia pulmonar, infarto del miocardio, estenosis mitral, fibrilación auricular e isquemia cerebral transitoria.
- 3.0 a 4.5 -> Tratamiento de recurrencias de trombosis venosa profunda, tromboembolia pulmonar, injertos vasculares y válvulas cardiacas artificiales.

Recientemente se ha introducido el uso de inhibidores directos de factor Xa (activado) administrados por vía oral, como el rivaroxabán, que luce muy promisorio como antitrombótico tanto profiláctico como terapéutico. El rivaroxabán, el apixaban, el fondaparinux (subcutáneo) y el dabigatrán (inhibidor directo de la trombina) se están usando en la actualidad como antitrombóticos orales, y en varias condiciones han mostrado ser mejores que los cumarínicos. Es probable que en el futuro los pacientes que necesiten de anticoagulación continua puedan tratarse con estos fármacos. Además de ser mas seguros, estos agentes no requieren de control por medio de pruebas de laboratorio, lo que facilita su empleo. Todos ellos son considerablemente mas costosos que los cumarínicos.

2.8.3 Fibrinolíticos

Se han usado fibrinolíticos de primera generación: estreptocinasa (SK) y urocinasa (UK); de segunda generación: activador del plasminógeno (TPA); y de tercera generación: activador del plasminógeno tipo urocinasa de una sola cadena (SCU-

PA) y complejo activador acilado del plasminógeno/estreptocinasa (APSAC). Los medicamentos trombolíticos se han utilizado con éxito en el tratamiento de infarto agudo al miocardio, tromboembolia pulmonar y trombosis venosa profunda. Idealmente deben aplicarse en las primeras 6 horas del proceso vasooclusivo. En el primer caso, la SK parece ser tan efectiva como el TPA recombinante humano, y es más barata; de manera habitual se utiliza una dosis inicial de 250000 U de SK seguida de una dosis de mantenimiento de 100000 U/h durante 12 a 48 horas. En el infarto del miocardio se pueden usar 1.5 millones de unidades en un periodo de 60 minutos.

2.8.4 Antiplaquetarios

- **Aspirina**

Sigue siendo el mejor fármaco antiplaquetario; inhibe de manera irreversible la ciclooxigenasa plaquetaria, reduciendo la producción de tromboxano A₂. Se utiliza en pacientes que han sufrido infarto del miocardio o ataques isquémicos transitorios, y también en aquellos con trombocitosis o que han sido sometidos a esplenectomía. Es el tratamiento de elección para los pacientes con síndrome de plaquetas "pegajosas". La dosis de 100mg cada 24 o 48 horas es suficiente para producir un efecto antiplaquetario adecuado (3).

- **Otros antiplaquetarios**

El clopidogrel se utiliza frecuentemente como agente antiagregante plaquetario; el ticagrelor tiene también propiedades antiplaquetarias adecuadas. Los anticuerpos monoclonales que identifican y bloquean a la glucoproteína IIb/IIIa en la superficie de las plaquetas se emplean también como agentes antiplaquetarios. El propranolol, el nifedipino y el diltiazem también tienen efecto antiagregante (3).

3. JUSTIFICACIÓN

Desde 1999 en la Clínica Ruiz de Puebla se han estudiado las principales causas de trombosis en México.

- 1999. Se estudió un grupo de 102 pacientes mestizos mexicanos de los cuales 39% tenían fenotipo de RPCa pero solo 4 pacientes tenían mutación del factor V Leiden. 5% de los pacientes estudiados tenían deficiencia de proteína C y 2% deficiencia de proteína S de la coagulación. Se concluye que la baja prevalencia de la mutación del FV Leiden en pacientes con fenotipo de RPCa puede deberse a la mezcla de razas en los pacientes mestizos mexicanos. (1).
- 2001. Se estudió la mutación del gen del factor V (Leiden), el polimorfismo de la protrombina G20210A y MTHFR en un grupo de 37 pacientes trombofílicos y 50 controles normales; 4 pacientes fueron heterocigotos para la mutación del factor V (Leiden), 5 heterocigotos para protrombina 20210, 16 heterocigotos y 6 homocigotos para MTHFR, se concluye que en pacientes trombofílicos mestizo mexicanos la prevalencia de la mutación del gen del factor V (Leiden) es bajo en comparación con la mutación del gen de la protrombina 2010 (13).
- 2002. Se estudiaron de manera prospectiva 10 pacientes trombofílicos mestizos mexicanos para determinar el fenotipo del síndrome de plaquetas pegajosas (SPP) y demás estudios trombofílicos; se identificaron 6 pacientes con fenotipo de SPP, solo uno de estos pacientes presentó el síndrome sin otra alteración trombofílica, en el resto de los pacientes además del SPP se identificaron otras alteraciones trombofílicas. (14).
- 2004. Se estudió la frecuencia de las mutaciones del gen del factor V (Leiden, Cambridge, Hong Kong, Liverpool y haplotipo HR2) en 10 pacientes con fenotipo de RPCa, solo en 4 se encontró mutación del FV Leiden, y en tres se encontró haplotipo HR2. Se concluye que las

mutaciones del gen del factor V no son las principales causas de trombofilia es estos pacientes(15).

- 2005. Se estudiaron 46 mestizos mexicanos de manera consecutiva realizando todos los estudios para identificar una alteración trombofílica. Los resultados concluyen que la mayoría de los casos de trombofilia son multifactoriales y es necesario realizar estudios completos a estos pacientes (2).
- 2006. En un periodo de 70 meses se estudiaron 100 pacientes mestizos mexicanos con un marcador de trombofilia a los que se les realizaron estudios trombofílicos. En el 94% de los casos se encontraron por lo menos una alteración, 81% tuvo dos o mas alteraciones trombofílicas asociadas. Se concluye que las alteraciones no se asocian entre sí y es necesario realizar estudios completos para identificar una alteración trombofílica (16).
- 2008. La mutación V617F del JAK2 se ha usado para identificar enfermedad mieloproliferativa como una causa de trombosis, en este estudio se realiza la determinación de la mutación a 77 pacientes mestizos mexicanos con un marcador de trombofilia, no se encontró a ningún paciente con esta mutación, por lo tanto no es una causa frecuente de trombosis en nuestro país. (17)
- 2011. Se estudiaron cinco familias con fenotipo de síndrome de plaquetas pegajosas entre sus integrantes y se concluye que el SPP puede tener un origen genético y heredarse como un rasgo autosómico dominante. (18).
- 2012. Se estudiaron 95 individuos con SPP y 127 pacientes sanos a los cuales se les determinó el polimorfismo de GP IIIa PLA1/A2, se encontró dicha mutación en 11 pacientes sanos y en 16 pacientes con SPP. No hay asociaciones significativas entre el SPP el polimorfismo de la glicoproteína IIIa PLA1/2 (19).
- 2013. Se estudiaron de manera prospectiva 55 pacientes con historia de trombosis y fenotipo de SPP antes y después de haber recibido

tratamiento con aspirina y/o clopidogrel. Se concluye que el uso de antiplaquetarios revierte la hiperreactividad plaquetaria de los pacientes con SPP y disminuye el riesgo de retrombosis (20).

Por otro lado el fenotipo de RPCa que es la cuarta causa de trombosis en mestizos mexicanos y resultado de condiciones tanto heredadas como adquiridas. Corresponde al 20% de los hallazgos anormales de laboratorio hechos en mestizos mexicanos quienes han sufrido un episodio de trombosis, teniendo un marcador clínico de trombofilia primaria.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar las causas de la presencia del fenotipo de resistencia a la proteína C activada en pacientes mestizos mexicanos trombofílicos.

4.2 Objetivos Específicos

Determinar si existe asociación entre el fenotipo de RPCa y mutaciones del gen del FV, síndrome de plaquetas pegajosas, anticuerpos antifosfolípido, anticoagulante lúpico, mutación MTHFR, mutación de protrombina y aumento en los niveles de FVIII.

Evaluar el efecto de la administración de ACODs en el estudio de un paciente trombofílico con fenotipo de RPCa.

Determinar si las causas del fenotipo de la RPCa son multifactoriales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Pacientes

En un periodo de 276 meses, todos los pacientes mestizos mexicanos referidos a nuestra clínica por médicos de diferentes partes del país fueron prospectivamente incluidos en el estudio si tenían por lo menos uno de los siguientes marcadores asociados a un estado primario hipercoagulable (1-4): a) Trombosis a una edad menor a 40 años; b) Historia familiar de trombosis (primera línea generacional); c) Trombosis recurrentes sin factores predisponentes aparentes; d) Trombosis en sitios anatómicos inusuales y e) Resistencia a terapia convencional antitrombótica. Individuos con cáncer, embarazadas, puerperio, tratamiento con anticonceptivos orales u otras condiciones asociadas con trombofilia secundaria fueron excluidos del estudio. Todos los individuos habían experimentado por lo menos un episodio de trombosis venosa confirmado por flebografía o Doppler en los 30 días previos y no recibían tratamiento con anticoagulantes orales o antiplaquetarios en las 12 horas previas; pacientes sometidos a cirugía no fueron incluidos. Se empleó la definición de mestizo descrita por Pons-Estel *et al* (21) para seleccionar a los pacientes: Individuos nacidos en Latinoamérica que tengan ancestros americanos y blancos. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los individuos estudiados. El estudio fue aprobado por el comité de protección de ética en materia de investigación humana de la Clínica Ruiz.

5.2 Métodos Analíticos

5.2.1 Estudio del Síndrome de Plaquetas Pegajosas (SPP)

Se utilizó el método descrito por Mammen (22): Se obtuvo una muestra sanguínea, usualmente entre 8:30 y 10:30 am, mediante venopunción usando una aguja mariposa de calibre 19 o 21. Después de la venopunción, el torniquete se retira y los primeros 5 ml obtenidos de sangre se desechan. Después, 18 ml de sangre se aspiran en un contenedor de 2.7mL con una solución de citrato de sodio al 3.8%. La sangre anticoagulada se centrifugó lo mas pronto posible por 10

minutos a 100g a temperatura ambiente para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Aproximadamente la mitad de este PRP es centrifugado a 200g por 20min a temperatura ambiente para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP). Para la agregación el PRP es diluido con el PPP para obtener una conteo plaquetario de $200 \times 10^9/L$. La agregación plaquetaria se midió usando un agregómetro (Model 500 CA, ChronoLog Corporation, Havertown, PA, U.S.A), empleando la técnica original descrita por Born y Cross (23). Cambios en la densidad óptica son detectados en un ChronoLog recorded (modelo 703). Mientras se mantiene la temperatura ($37^\circ C$) y en constante agitación, se induce la agregación con tres concentraciones de ADP (2.34, 1.17 y $0.58 \mu M$), y con tres concentraciones de epinefrina (11, 1.1 y $0.55 \mu M$), (concentración final en la cubeta de PRP). La agregación máxima se expresa como un 100% de transmisión de luz, calibrado para cada espécimen. Se corren controles normales en cada caso. Resultados anormales de agregación plaquetaria con tres concentraciones de ADP (2.34, 1.17, and $0.58 \mu M$) se encontraron en mas de 55, 36 y 12%, mientras que para las tres concentraciones de epinefrina (11, 1.1, and $0.55 \mu M$) fueron arriba de 80, 27 y 20% (4).

5.2.2 El fenotipo de resistencia a la proteína C activada (RPCa)

Fue medido usando el kit ProC global (Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, Germany): La RPCa se determinó midiendo la prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activado en respuesta a la Proteína C activada, empleando plasma deficiente en Factor V.

5.2.3 Otros estudios de la coagulación.

La proteína C de la coagulación funcional y antigénica, Proteína S de la coagulación, Antitrombina III, plasminógeno, Activador del plasminógeno tipo tisular, inhibidor del activador del plasminógeno, isotipos IgG e IgM de anticuerpos antifosfolípido y anticoagulante lúpico fueron investigados como se describió anteriormente (4).

5.2.4 Mutaciones en el gen del Factor V

Se realizó un análisis basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo a la técnica descrita por Zöller y Dahlbäck (24) para el estudio de la mutación del factor V p.506R>Q (Leiden). Brevemente, una región de factor V que comprende los nucleótidos 1690 a 1692 del codón 506 fue amplificada por PCR y después sometida a digestión con una endonucleasa de restricción Mnl I. El patrón de digestión fue analizado por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4.5%. Los oligonucleatidos utilizados están descritos en la referencia 3. Para ver el haplotipo del factor VHR2, el exón 13 fue amplificado con el par de primers F5 13-1 y F5 13-2 (25). El polimorfismo p.1299H>R que forma parte del alelo R2 fue detectado por análisis de restricción con Rsa I (25). Para la detección de la mutación p.306R>T (Cambridge), el exón 7 del gen del factor V fue amplificado usando los primers F5 7-1 y F5 7-2 (26). La mutación fue identificada por análisis de restricción con BstN I. Para buscar la mutación de Hong Kong en el gen del factor V el producto de la mutación de Cambridge fue digerido con Hpa II de acuerdo a lo descrito por Chan et al (27). Para identificar la mutación de Liverpool del gen del factor V (p.3591>T), el exon 8 del gen del factor V fue amplificado usando los primers F5 8-1 and F5 8-2 (25). El producto obtenido de la detección de la mutación de Liverpool es digerido con Bsr I de acuerdo a lo descrito por Mumford et al (28).

5.2.5 La mutación c.677C>T en el 5,10-metil-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR)

La detección la transición c.677C>T del gen de MTHFR fue desarrollada como lo describió Kluijtmans *et al.* (29). Se amplificó un fragmento de 108 pb del gen MTHFR que incluyen los nucleótidos 598 a 705. Para determinar el genotipo la amplificación fue sometida a digestión utilizando Hinf I.

5.2.6 El polimorfismo c.20210G>A de la región 3'-no traducida del gen de protrombina

Se realizó un análisis utilizando la técnica de PCR para identificar esta mutación, utilizando el método descrito por Poort et al. (30). Básicamente, un fragmento del gen de la protrombina que comprende los nucleótidos 19889 a 20212 se amplificó por PCR. Uno de los primers utilizados induce una mutación, la cual junto con la mutación G>A genera un sitio de restricción en HindIII. Una alícuota del producto amplificado fue sometido a digestión utilizando la endonucleasa Hind III.

5.3 Análisis de Datos

Se implementó el algoritmo C4.5 para el análisis de datos en la aplicación See5 (31,32) para el análisis de datos en este estudio. Debido a que el número de casos en nuestro estudio era pequeño, el total de datos fue dividido aleatoriamente en 10 subgrupos con aproximadamente la misma distribución de clases y número de casos. Cada caso es definido por los valores de los atributos (Síndrome de Plaquetas Pegajosas, mutaciones del gen del FV Leiden, Cambridge, Hong Kong y Liverpool, mutación c.677C>T del gen MTHFR, mutación c.20210G>A en la región 3'-no traducida del gen de protrombina, niveles de FVIII, anticuerpos antifosfolípido, niveles de proteína C, niveles de proteína S, anticoagulante lúpico, fenotipo de la resistencia a la proteína C activada y el uso de ACODs). Después de seleccionar un atributo como blanco, los atributos restantes son utilizados como predictivos. Se construyó un árbol de decisión usando 9 subgrupos, expresado como un juego de reglas fácil de interpretar y validado de forma cruzada con el subgrupo que quedó fuera. La eficacia de la clasificación fue almacenada. Este proceso fue repetido permutando los atributos hasta que cada atributo hubiera sido seleccionado como atributo blanco. Se utilizó una Kappa de Cohen para determinar la confiabilidad de las reglas (33).

6. RESULTADOS

De los 96 pacientes incluidos en el estudio, 32 (33%) eran hombres, la mediana de edad fue de 39 años (en un intervalo de 5 a 73). En 18 personas (19%) se identificó un fenotipo anormal de RPCa. De estos, 44% tienen la mutación del Factor V de Leiden, 22% niveles elevados de factor VIII, 16% anticuerpos antifosfolípido y 6% anticoagulante lúpico. Sorpresivamente, en el 22% restante de los pacientes con fenotipo anormal de RPCa, se identificó el uso de anticoagulantes orales directos en un periodo de 12-24 horas previas a la realización del estudio. Por otra parte, 39% de los pacientes con fenotipo anormal de RPCa se habían expuesto tanto a la administración de ACODs como alguna otra causa mencionada anteriormente como causa de fenotipo anormal de RPCa; de acuerdo a esto, en 61% de los pacientes con fenotipo anormal de RPCa estaban bajo administración de ACODs (ver tabla 2). Ninguno de los pacientes con mutación del factor V de Leiden estaba bajo administración de ACODs.

Utilizando la herramienta estadística χ^2 (34), se encontraron asociaciones significativas entre el fenotipo anormal de RPCa y el uso de ACODs, y la mutación del factor V de Leiden (ver tabla 1). También buscamos asociaciones entre el fenotipo anormal de la RPCa y la identificación del fenotipo del síndrome de plaquetas pegajosas, las cuales no fueron significativas ($p=0.34$). Se identificaron también causas adicionales del fenotipo anormal de RPCa: Niveles elevados de factor VIII, presencia de anticuerpos antifosfolípido (AAF), anticoagulante lúpico (AL); sin embargo, la proporción no fue diferente de la observada en individuos trombofílicos que no presentan RPCa (ver tabla 1). En el resto de las variables estudiadas no se encontraron asociaciones con el fenotipo anormal de RPCa.

Al utilizar la aplicación de análisis de datos See5, se encontraron cuatro arreglos con tablas de contingencia muy diferentes de la distribución esperada como lo determina la prueba exacta de Fisher ($p<0.05$: predicción de RPCa, anticoagulante lúpico, anticuerpos antifosfolípido y el uso de ACODs). Sin embargo, ninguno de los anteriores fueron los suficientemente precisos de acuerdo al coeficiente kappa

de Cohen (valores entre 0.25 y 0.51), la mayor parte debido a la mala sensibilidad (intervalos entre 30% y 50%), mientras que la especificidad fue bastante buena (89% a 100%). Al observar los arreglos para el fenotipo de RPCa, en todos los casos, únicamente la mutación del FV Leiden se consideró relevante para la clasificación. Igualmente, la presencia de anticuerpos antifosfolípido se predijo únicamente mediante la presencia de anticoagulante lúpico y viceversa. Finalmente, el uso de ACODs fue condicionado exclusivamente por la presencia de RPCa.

Analizando todas las variables mediante razón de momios (35), se encontraron asociaciones altamente significativas entre el fenotipo anormal de RPCa y la mutación del factor V de Leiden ($p=0.0022$), entre el fenotipo anormal de RPCa y el uso de ACODs (0.006) y también entre anticuerpos antifosfolípido y anticoagulante lúpico ($p<0.0001$), (ver tabla 2). También observamos valores elevados de factor VIII, presencia de anticuerpos antifosfolípido y anticoagulante lúpico como causa de fenotipo anormal de RPCa, pero, nuevamente, su prevalencia no fue significativamente distinta a la observada en individuos trombofílicos que no presenta fenotipo de RPCa.

7. DISCUSIÓN

La inactivación proteolítica de los factores Va (Fva) y VIIIa (FVIIIa) mediante la Proteína C activada (PCa) y sus cofactores proteína S y factor V (FV) es un proceso clave en la regulación fisiológica de la coagulación sanguínea (3). Anormalidades funcionales de esta vía, que se manifiestan in vitro como una deficiente respuesta anticoagulante al plasma adicionado con PCa (Resistencia a la PCa, RPCa) son prevalentes en la población en general y están asociados con un alto riesgo de trombosis venosa. La RPCa se descubrió originalmente en familias trombofílicas y posteriormente fue asociada con la mutación p.506R>Q (FV Leiden), lo cual elimina uno de los sitios de unión de la PCa en el FV (40). Si bien la mutación del factor V Leiden es la principal causa de RPCa hereditaria, se ha vuelto mas claro que muchos otros factores genéticos y adquiridos contribuyen a la RPCa y por lo tanto aumenta el riesgo de trombosis venosa (36-39). Las mutaciones del Factor V Cambridge, Hong Kong y Liverpool también pueden llevar al fenotipo de RPCa (2,36), como también lo hacen la presencia de anticoagulante lúpico y/o anticuerpos antifosfolípido (36,37), niveles aumentados de factor VIII (36,38), moléculas disfuncionales de proteína S, terapias hormonales orales incluyendo el uso anticonceptivos orales (39), cáncer (38) y el uso de ACODs (40-42).

El algoritmo C4.5 no reveló ninguna asociación entre los atributos además de las esperadas: La mutación del Factor V Leiden predice un fenotipo de RPCa la cual se predice mediante el uso de ACODs. Además, las enfermedades autoinmunes se predicen entre ellas, p.ej. la presencia de anticuerpos antifosfolípido predice la presencia de anticoagulante lúpico y viceversa. Cabe destacar que cada arreglo consistió de la comparación todos los casos mencionados con un solo candidato predictivo.

Se demostró anteriormente que el fenotipo anormal de RPCa se ha identificado en aproximadamente el 20% de los pacientes mestizo mexicanos con marcadores clínicos de trombofilia primaria (2-4). En este estudio hemos analizado algunas de

las causas, tanto heredadas como adquiridas del fenotipo de RPCa en un grupo de mestizos mexicanos con antecedente de un evento trombótico y al menos un marcador clínico de trombofilia primaria. Encontramos que la causa mas frecuente de la causa del fenotipo de RPCa es la presencia de la mutación del FV Leiden, seguida por un aumento en los niveles de FVIII, anticuerpos antifosfolípido y anticoagulante lúpico. Cabe destacar que en 61% de estos pacientes se identificó el uso de ACODs, en 39% de los casos se asociaron con una causa adicional del fenotipo de RPCa y en el resto de los casos como la única posible explicación del fenotipo anormal. Estos datos son consistentes con aquellos observados en otras poblaciones e identificamos que debe tenerse en cuenta el empleo de ACODs al identificar el fenotipo de RPCa en pacientes quienes se estudian con motivo de sospecha de una condición trombofílica (42). Estudios adicionales son necesarios para definir con mayor detalle la etiología del fenotipo de RPCa y su asociación con una condición pro trombofílica.

8. CONCLUSIÓN

Nuestros hallazgos sugieren que las condiciones hereditarias que causan fenotipo de RPCA en mestizos mexicanos trombofílicos son infrecuentes y que debe tenerse en cuenta el empleo de ACODs al identificar el fenotipo de RPCa en pacientes quienes se estudian con motivo de sospecha de una condición trombofílica.

9. TABLA 1

	RPCa Anormal (n = 18) %	RPCa Normal (n = 78) %	Valor p
ACODs	61	28	0.01
Factor V Leiden	44	0	0.01
Aumento F VIII	22	24	0.96
AAL	16	12	0.74
AL	6	16	0.57

Tabla 1. Resultados encontrados en pacientes con fenotipo anormal o normal de resistencia a la proteína C activada (RPCa). ACODs = Anticoagulantes orales directos, AAL = Anticuerpos antifosfolípido. AL = Anticoagulante lúpico. Los valores de p fueron obtenidos mediante el método chi cuadrada (χ^2).

10. TABLA 2

	Razón de momios	Valor p
RPCa / FV Leiden	97.8	0.0022
RPCa / ACODs	4.7	0.0065
AAF / AL	29.8	0.0001

Tabla 2. Asociaciones significativas obtenidas mediante razón de momios. RPCa = Fenotipo de resistencia a la proteína C activada. ACODs = Anticoagulantes orales directos. AAL = Anticuerpos antifosfolípido. AL = Anticoagulante lúpico.

11. REFERENCIAS

- 1) Ruiz-Argüelles GJ, González-Estrada S, Garcés-Eisele J, Ruiz-Argüelles A.: Primary thrombophilia in México: A prospective study. *Am J Hematol* 1999; 60:1-5.
- 2) Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Valdés-Tapia P, Gómez-Rangel JD, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J.: Primary thrombophilia in México V: A comprehensive prospective study indicates that most cases are multifactorial. *Am J Hematol* 2005; 78:21-26.
- 3) Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Delgado GJ.: Trombofilia. In Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Delgado GJ (editores). *Fundamentos de Hematología*. 5ª. Edition, Editorial Médica Panamericana. 2014:327-336.
- 4) Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Delgado GJ.: How we study and treat patients with suspected thrombophilia. *Med Univ* 2014; 16:143-145.
- 5) Franchini M, Veneri D, Salvagno GL, et al.: *Inherited thrombophilia*. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43(3):249-290.
- 6) Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes G.: Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. *Thromb Haemost* 2007; 98: 530-42.
- 7) Press RD, Bauer KA, Kujovich JL, et al.: Clinical Utility of Factor V Leiden (R506Q) Testing for the Diagnosis and Management of Thromboembolic Disorders. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126:1304-1318.
- 8) Rossendorf A, Dorfman DM.: Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:866-871 45.
- 9) Segal JB, Brotman DJ, Necochea AJ, et al.: Predictive value of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in Family members of those with a mutation. A systematic review. *JAMA*. 2009;301:2472-2483.
- 10) Norstrem E, Thorelli E, Dahlbäck B.: Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):524-30.
- 11) 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.

- 12) McGlennen R, Key NS.: Clinical and Laboratory Management of the Prothrombin G20210A Mutation. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:1319– 1325.
- 13) Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Ramírez-Cisneros F.: Primary thrombophilia in México II: Factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in thrombophilic Mexican mestizos. *Am J Hematol* 2001;66:28-31.
- 14) Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Cruz-Cruz D, Reyes-Aulis MB. Primary thrombophilia in México III. A prospective study of the sticky platelet syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002;8:273-277.
- 15) Ruiz-Argüelles GJ, Poblete-Naredo I, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J, López-Martínez B, Gómez-Rangel D.: Primary thrombophilia in México IV: Leiden, Cambridge, Hong Kong, Liverpool and HR2 haplotype polymorphisms in the factor V gene of a group of thrombophilic Mexican Mestizos. *Rev Invest Clín Méx* 2004; 56:600-604.
- 16) Ruiz-Argüelles GJ, González-Carrillo ML, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J, Estrada-Gómez R, Valdés-Tapia P, Parra-Ortega I, Porras-Juárez A.: Trombofilia primaria en México, parte VI: Falta de asociación estadística entre las condiciones trombofílicas heredadas. *Gac Méd Méx* 2007; 143:317-322.
- 17) Garcés-Eisele J, González-Carrillo ML, Reyes-Núñez V, Ruiz-Argüelles GJ.: Primary thrombophilia in México VII: the V617F mutation of JAK2 is not a frequent cause of thrombosis. *Hematology* 2008;13: 244-246.
- 18) Ruiz-Argüelles GJ, Alarcón-Urdaneta C, Calderón-García J, Ruiz-Delgado GJ.: Primary thrombophilia in México VIII: Description of five kindreds of familial sticky platelet syndrome phenotype. *Rev Hematol Méx* 2011; 12:73-78.
- 19) Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Camacho-Alarcón C, Reyes-Núñez V, Moncada-González B, Valdés-Tapia P, León-Montes N, Ruiz-Delgado GJ. Primary thrombophilia in Mexico IX: The glycoprotein IIIa PLA1/A2 polymorphism is not associated with the sticky platelet syndrome phenotype. *Clin Appl Thromb Hemost* 2013;19:689-692.
- 20) Velázquez-Sánchez-de-Cima S, Zamora-Ortiz G, Hernández-Reyes J, Vargas-Espinosa J, García-Chávez J, Rosales-Padrón J, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles A, Ruiz-Argüelles GJ.: Primary thrombophilia in México X: A prospective study of the treatment of the sticky platelet syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost* 2013, Sep 19.
- 21) Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, Soriano ER, Gentiletti S, Villa AR, Abadi I, Caeiro F, Alvarellos A, Alarcón-Segovia D.: The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1214 patients with systemic lupus

erythematosus. Ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine* 2004; 83: 1-17.

22) Mammen EF.: Ten years experience with the "Sticky platelet syndrome". *Clin Appl Thromb Hemost* 1995; 1:66-72.

23) Born GVR, Cross MJ.: The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 168:178-183.

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

25) Lunghi B, Castoldi E, Mingozzi F, Bernardi F. 1998. A new factor V gene polymorphism (His 1254 Arg) present in subjects of african origin mimics the R2 polymorphism (His 1299 Arg). *Blood* 1998; 91:364-365.

26) van Wijk R, Nieuwnhuis K, van der Berg M, Huizinga EG, van der Meijden BB, Kraaijenhagen RB, van Solinge WW. Five novel mutations in the gene for the human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency. *Blood* 2001; 98:358-367.

27) Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R.: A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998; 91: 1135-1139.

28) Mumford AD, McVey JH, Morse CV, Gómez K, Steen M, Norstrom EA, Tuddenham EGD, Dahlbäck B, Bolton-Maggs PHB.: Factor V I359T: A novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C. *Br J Haematol* 2003; 123:496-501.

29) Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EMB, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FMJ, Rozen R, Blom HJ: Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58:35-41.

30) 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; 88:3698-3703.

31) Quinlan, J. R. C4.5: Programs for Machine Learning. Morgan Kaufmann Publishers, San Francisco. 1993.

32) Wu X, Kumar V, Quinlan JR, Ghosh J, Yang Q, Motoda H, McLachlan GJ, Ng A, Liu B, Yu PS, Zhou ZH, Steinbach M, Hand DJ, Steinberg D. Top 10 algorithms in data mining. *Knowl Inf Syst* 2008; 14(1):1-37.

- 33) Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960; 20(1):37-46.
- 34) Arigmón-Pallás, JM, Jiménez-Villa J.: *Métodos de Investigación Clínica y epidemiológica* 3ª ed. Madrid: Elsevier, 2004.
- 35) Szklo M, Nieto J.: *Epidemiología intermedia. Conceptos y aplicaciones*. Madrid: Díaz de Santos, 2003.
- 36) Castoldi E, Rosing J.: APC resistance: Biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost* 2010; 8;445-53.
- 37) Saenz AJ, Johnson NV, Van Cott EM.: Acquired activated protein C resistance cause by lupus antithrombotics. *Am J Clin Pathol* 2011; 136:344-349.
- 38) Green D, Maliekel K, Sushko E.: Activated protein C resistance in cancer patients. *Haemostasis* 1997; 27:112-118.
- 39) Fisher M, Fernández JA, Ameriso SF, Xie D, Gruber A, Paganini-Hill A, Griffin JH.: Activated protein C resistance in ischemic stroke not due to factor V arginine⁵⁰⁶→glutamine mutation. *Stroke* 1996; 27: 1163-66.
- 40) Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg-Blixter I, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, Strandberg K, Lindahl TL.: Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *J Thromb Haemost* 2011;9:133-9.
- 41) Douxfils J, Mullier F, Loosen C, Chatelain C, Chatelain B, Dogne JN.: Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: Laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. *Thromb Res* 2012;130(6):956-66.
- 42) Lippi G, Mattiuzzi C, Favaloro EJ.: Thrombophilia testing in patients taking direct oral anticoagulants. Handle with care. *Diagnosis* 2014; 1(4): 311–312.