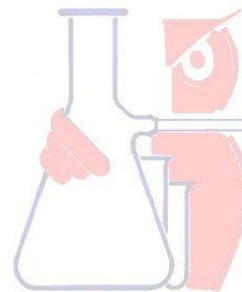




**Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
ÁREA DE INMUNOLOGÍA**



**“Alteraciones del fibrinógeno en las últimas semanas de
gestación en la población mexicana”**

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA

p.QFB. Víctor Manuel Domínguez Reyes

Director:

DC. Jesús Hernández Juárez.

Asesor:

MC. María Susana Pérez Fernández

Diciembre 2015

Esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis (UIMTHA) del Hospital General Regional No. 1 Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro del IMSS y en la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández Juárez y la M. en C. María Susana Pérez Fernández.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá: por todo su apoyo, cariño y tiempo que invirtió en mi formación académica, por esas noches que pasamos juntos, apoyándome en las buenas y en las malas. Gracias por tu confianza. Mamita te amo.

A mi papá: todo lo que soy te lo debo a ti, gracias por todo el esfuerzo extraordinario que hiciste para que no me faltara nada, por esos consejos y enseñanzas que me volvieron en un hombre honesto y responsable, no tengo como pagártelo. Te amo papito.

A mis hermanos: Sergio, Pedro y Bryan por creer en mí, por verme con ojos de esperanza, gracias por compartir esos momentos tan importantes en mi vida. Los quiero mucho.

A mi gran amor: por compartir gran parte de su vida a mi lado, por consentirme, por ser mi consejera, por brindarme toda su confianza, por creer siempre en mí y por apoyarme en los momentos más difíciles. Te amo Margarita

Al D.C. Jesús Hernández Juárez: por darme la oportunidad de conocer nuevos horizontes, por dedicar su valioso tiempo en orientar la etapa final de mi carrera, por brindarme su casa, por aceptar ser mi director de tesis y más que nada por ser un gran amigo. Gracias amigo Chucho.

Al Dr. Abraham S. Majluf Cruz, por darme la oportunidad de realizar mi tesis en la unidad de investigación.

A la Maestra Susana, por aceptar hacer mi servicio social en el HUP, por aceptar ser mi directora de tesis, por esas palabras tan agradables cuando me decía que yo podía, en general por ser muy buena persona. La quiero maestra.

A la familia Rojas islas: gracias por brindarme techo, comida y un ambiente familiar, por compartir esas historias que hacían las noches muy agradables. Sin ustedes las cosas serían muy difíciles.

A la Dra. América, por abrirme las puertas en su trabajo, y así agilizar la toma de muestra, por poner a mi disposición el material necesario del laboratorio clínico.

Al Dr. Antonio Marín, sin duda un gran maestro, por esa enseñanza que hizo cambiar la perspectiva de mi vida, por compartir sus experiencias, y por sus excelentes consejos, un gran ejemplo a seguir. Lo quiere mucho su apache.

Al laboratorio de hematología del HUP, por transmitir su conocimiento, por enseñarme que la responsabilidad es un factor indispensable para el éxito, por orientarme y por sus buenos deseos. Gracias químicos.

A mis compañeros de la unidad de investigación, Memo y Alicia, por esos momentos tan agradables dentro del laboratorio.

A Julieta, por ayudarme a subsistir en el Distrito Federal, por compartir hogar y amistad, por apoyarme dentro y fuera del laboratorio, nada de esto sería posible sin tu ayuda. Gracias amiga July.

A mis amigos de la universidad, por compartir su amistad durante un largo trayecto, por su sinceridad y por todos los momentos tan felices que pasamos juntos. Gracias

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este fue un estudio de riesgo mayor al mínimo por incluir un procedimiento que no se efectúa habitualmente en mujeres embarazadas. Las pacientes voluntarias fueron informadas de manera oral y escrita antes de la obtención de las muestras sanguíneas. Al aceptar participar en el estudio, se les solicitó a todas las mujeres dieran su consentimiento informado.

Para asegurar la confidencialidad de la información, sólo los investigadores responsables tuvieron los datos completos de los resultados obtenidos de las muestras de las mujeres embarazadas, por lo menos hasta que se analicen los datos con la intención de ser publicados. En ningún momento, se hizo público el nombre de la mujer de la cual provenía la muestra problema a menos que fuera una solicitud de la usuaria.

Se siguieron las leyes y normas tanto nacionales como internacionales para investigación clínica y aplicada en humanos: Ley de General de Salud, artículos 20, 100, 103 y pertinentes; declaración de Helsinki revisada, código de Nuremberg.

RESUMEN

Antecedentes. La hemorragia periparto (HP) es un problema de salud pública en el mundo y en México, es una de las principales causas de muerte materna. Es bien conocido que en el embarazo persiste un estado procoagulante; sin embargo, la concentración plasmática baja del fibrinógeno (Fg) o su consumo en la hiperfibrinolisis pueden conducir a eventos hemorrágicos. **Objetivos.** Evaluar la concentración plasmática del Fg en las últimas semanas del embarazo en mujeres mexicanas. **Métodos.** Se evaluaron 70 mujeres embarazadas, 40 con ≥ 37 semanas de gestación (SDG) y 30 < 37 SDG. También se incluyó un grupo control (mujeres no embarazadas). Todas las mujeres dieron su consentimiento informado. Determinamos la concentración antigénica (AgFg, ELISA) y funcional del Fg (Fg, Clauss), D-dímero (DD), productos de degradación-fibrinógeno fibrina (PDF), tiempo de trombina (TT) y tiempo de lisis de euglobulinas (TLE). **Resultados.** Ninguna mujer tuvo TT prolongados. La concentración plasmática del Fg fué más alta ($p = 0.05$) en mujeres < 37 SDG (AgFg = 373,9 y Fg = 375,2 mg / dl) que en las mujeres ≥ 37 SDG (AgFg = 296,4 y Fg = 304,3 mg / dl) y controles (AgFg = 362,6 y Fg = 305.2 mg/dL). No se encontraron diferencias significativas en la concentración del Fg entre las mujeres con ≥ 37 SDG y el grupo control ($p \geq 0,05$). El DD y los PDF fueron positivos ($\geq 0.5\mu\text{g/dl}$) para las mujeres con ≥ 37 SDG y < 37 SDG. Por último, el TLE fue normal en todos los grupos (≥ 120 min). **Conclusión.** Los resultados muestran un sistema fibrinolítico activado en las mujeres embarazadas, pero no un estado hiperfibrinolítico ya que los resultados del TLE fueron negativos. El aumento del Fg sugiere un estado procoagulante, principalmente en las mujeres < 37 SDG. Curiosamente, la concentración del Fg en mujeres ≥ 37 SDG no aumentó como se esperaba. Estos resultados deben ser estudiados más a fondo con el fin de establecer si la concentración de Fg durante la última etapa del embarazo contribuye al desarrollo de HP.

ABSTRACT

Background. Peripartum hemorrhage (PH) is a public health problem worldwide and in Mexico it is a leading cause of maternal death. A procoagulant state has been described during pregnancy however abnormal fibrinogen (Fg) levels or a hyperfibrinolytic state with Fg consumption may lead to hemorrhagic events. **Aims.** To assay Fg levels and fibrinolytic activity during the last weeks of pregnancy in Mexican women. **Methods.** We evaluated 70 women, 40 ≥ 37 weeks of gestation (WG) and 30 < 37 WG. All women gave their informed consent. We assayed antigenic (AgFg, ELISA) and functional Fg (Fg, Clauss), D-dimer (D-D), fibrinogen-fibrin degradation products (FDPs), thrombin time (TT), and euglobulin lysis time (ELT). **Results.** None women had prolonged TT. Fg levels were higher ($p \leq 0.05$) in women with < 37 SDG (AgFg=373.9 and Fg=375.2 mg/dl) than in women with ≥ 37 WG (AgFg=296.4 and Fg=304.3 mg/dl) and controls (AgFg=362.6 and Fg=305.2 mg/dl). No significant difference in Fg levels were found between women with ≥ 37 WG and control group (≥ 0.05). D-D and FDPs were positive ($\geq 0.5 \mu\text{g/dl}$) for pregnant women. Finally, ELT was always normal in all groups (≥ 120 min). **Conclusion.** Results show an activated fibrinolytic system in pregnant women but not a hyperfibrinolytic state since ELT results were negative. Increase in Fg levels suggest a procoagulant state, mainly in women with < 37 WG. Interestingly, Fg levels in women with ≥ 37 WG did not increase as expected. These findings should be studied further in order to establish whether Fg levels during the last stage of pregnancy contribute to the development of PH.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, ESQUEMAS Y GRÁFICAS	iii
1. INTRODUCCIÓN	
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Antecedentes generales	
2.1.1 Sistema de la coagulación	2
2.1.2 Fase plasmática de la hemostasia	2
2.1.3 Fibrinólisis	4
2.1.4 Fibrinógeno	5
2.2 Antecedentes particulares	
2.2.1 Embarazo	7
2.2.2 Hemostasia y fibrinólisis en el embarazo normal	7
3. MARCO DE REFERENCIA	9
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
5. JUSTIFICACIÓN	14
6. HIPÓTESIS	15
7. OBJETIVOS	
7.1 Objetivo general	16
7.2 Objetivos particulares	16
8. DISEÑO DEL ESTUDIO	
8.1 Sede	17
8.2 Universo	
8.3 Tipo de estudio	17
8.4 Tamaño de la muestra	17
8.5 Criterios de selección	18
8.6 Criterios de inclusión	18
8.7 Criterios de exclusión	18
8.8 Análisis estadístico	18
9. MATERIAL Y MÉTODOS	
9.1 Muestra biológica	
9.1.1 Recolección de las muestras	19
9.1.2 Obtención de la muestra	19
9.2 Metodología	
9.2.1 Esquema general de trabajo	20
9.2.2 Grupo sanguíneo y factor Rh	21
9.2.3 Fibrinógeno antigénico	21
9.2.4 Fibrinógeno de Clauss	22
9.2.5 Tiempo de trombina	23
9.2.6 Tiempo de lisis de euglobulinas	23
9.2.7 Productos de degradación del fibrinógeno-fibrina	24

9.2.8	Dímero D	25
10.	RESULTADOS	
10.1	Mujeres embarazadas	33
10.2	Mujeres no embarazadas	33
10.3	Grupo sanguíneo y factor Rh	33
10.4	TT	34
10.5	Fibrinógeno antigénico	35
10.6	Fibrinógeno de Clauss	36
10.7	TLE y PDF's	37
10.8	Dímero D	38
11.	Discusión	39
12.	Conclusiones	45
13.	Perspectivas	45
14.	Bibliografía	46
15.	Anexos	51

INDICE DE ABREVIATURAS.

1. **α 2-AP:** Alfa 2 antiplasmina
2. **u-PA:** Activador del plasminógeno tipo urocinasa
3. **AT:** Antitrombina
4. **t-PA:** Activador tisular del plasminógeno
5. **HMWK:** Cininógeno de alto peso molecular
6. **CID: Coagulación intravascular diseminada**
7. **FI: Factor I**
8. **Fg:** Fibrinógeno
9. **HO:** Hemorragia Obstétrica
10. **PAI-1:** Inhibidor del activador tisular del plasminógeno
11. **TAFI:** Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
12. **TFPI:** inhibidor de la vía del factor tisular.
13. **PPP: Plasma pobre en plaquetas**
14. **Pg:** Plasminógeno
15. **FPD: Productos de degradación del fibrinógeno**
16. **fPD: Productos de degradación de la fibrina**
17. **PK:** Precalicroína
18. **PS:** proteína S
19. **PUK:** pro-urocinasa

20. **SDG:** semanas de gestación

21. **TLE:** Tiempo de lisis de euglobulinas

22. **TM:** Trombomodulina

23. **Tr:** Trombina

24. **UMF: Unidad de Medicina Familiar.**

25. **UIMTHA:** Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, ESQUEMAS Y GRÁFICAS.

Figura 1.	Esquema simplificado de la fibrinólisis.	5
Figura 2.	Estructura del fibrinógeno	6
Figura 3.	Microplato de ELISA para cuantificación de Fibrinógeno.	22
Tabla 1.	Características generales de los principales factores hemostáticos, fibrinolíticos y anticoagulantes naturales.	3
Tabla 2.	Concentración plasmática de Fg (mg/dl) durante el embarazo y el puerperio.	8
Tabla 3.	Interpretación del grupo sanguíneo.	21
Tabla 4.	Concentración de fibrinógeno de un plasma estándar.	23
Tabla 5.	Patrón de resultados de la prueba cualitativa y semi-cuantitativa de los PDF's.	25
Tabla 6.	Edad de los tres grupos de estudio.	33
Tabla 7.	Porcentaje del grupo sanguíneo de cada uno de los grupos de estudio.	33
Tabla 8.	TT de los tres grupos de estudio.	34
Tabla 9.	Concentración de fibrinógeno antigénico.	35
Tabla 10.	Concentración de Fg por el método de Clauss.	36
Tabla 11.	Determinación de TLE y PDF's	37
Tabla 12.	Determinación cualitativa y semicuantitativa del DD.	38
Esquema 1.	Diagrama general de trabajo	20
Esquema 2.	Determinación del grupo sanguíneo y factor Rh.	26
Esquema 3.	Cuantificación del fibrinógeno antigénico.	27
Esquema 4.	Fibrinógeno de Clauss	28
Esquema 5.	Tiempo de trombina	29
Esquema 6.	Tiempo de lisis de euglobulinas	30
Esquema 7.	Productos de degradación del fibrinógeno-fibrina	31
Esquema 8.	Dímero D	32
Grafica 1.	Medidas de tendencia central de los resultados de Tiempo de Trombina.	34
Grafica 2.	Concentración de Fg antigénico para los tres grupos de estudio.	35
Grafica 3.	Concentración de Fg antigénico para los tres grupos de estudio.	36

INTRODUCCIÓN.

La hemostasia detiene la hemorragia a través de la formación de un coagulo. En el embarazo se presenta un estado fisiológico procoagulante en el cual la hemostasia sobrepasa los mecanismos de anticoagulación natural. Sin embargo, la hemorragia periparto (HP) continúa siendo un problema de salud pública en el mundo.

En la actualidad existe poca información respecto a las coagulopatías asociadas con la HP. La enfermedad de von Willebrand, síndrome de Bernard Soulier, la trombastenia de Glanzmann y la deficiencia de algunos factores hemostáticos son las coagulopatías más frecuentes en la hemorragia obstétrica (HO), sin embargo, la mayoría de los resultados se han obtenido de reportes de casos clínicos y no de estudios epidemiológicos.

Se ha propuesto que los niveles plasmáticos de Fg en las últimas semanas del embarazo son trascendentales para el desarrollo de la HP. El empleo de concentrados plasmáticos de Fg durante la HP evita en muchos casos que las mujeres embarazadas mueran de hemorragia. En México, no hay evidencia de estudios enfocados al conocimiento de las coagulopatías en mujeres embarazadas, a pesar de que la frecuencia de HO (incluyendo la HP) es muy superior a la reportada por la OMS.

Marco teórico.

El sistema de la coagulación. Sistema homeostático que esencialmente, mantiene la sangre líquida, se compone de dos subsistemas, la hemostasia y la fibrinólisis. Los cuales funcionan de manera equilibrada y dependen de la función de diversos componentes: vascular (endotelio), plasmático, celular y de regulación natural (Majluf, 2006). El endotelio es la base del sistema de la coagulación. En condiciones normales, el endotelio tiene un fenotipo anticoagulante que mantiene la sangre líquida debido a su función anti-plaquetaria, anticoagulante y pro-fibrinolítica.

Ante un daño endotelial, su fenotipo cambia a procoagulante y detiene la hemorragia al formar un coágulo (Majluf, 2003; Majluf, 2006) por lo tanto, la hemostasia evita la pérdida hemática. La hemostasia consta de tres etapas: vasoconstricción, activación plaquetaria y fase fluida. La vasoconstricción disminuye el flujo en la zona dañada controlando inmediatamente la pérdida hemática y facilita la siguiente fase de la hemostasia, la activación plaquetaria. Esta última consta de diferentes etapas que permiten la formación del coágulo plaquetario. Aunque la vasoconstricción y la formación del coágulo plaquetario son importantes, se requiere de la formación de una malla de fibrina insoluble durante la fase fluida que consolide el coágulo plaquetario, evitando así la posible reaparición de la hemorragia. (Majluf, 2003)

Fase plasmática de la hemostasia. Es una compleja serie de reacciones bioquímicas de los factores hemostáticos, a través del cual se detiene la hemorragia después de la formación de fibrina, proviene de la activación de una proteína sanguínea soluble denominada fibrinógeno (Martínez y Quintana, 2008). La fibrina se polimeriza y forma una malla que engloba en su interior los elementos formes del coágulo sanguíneo. La trombina es la enzima clave de la fase fluida y es responsable de la formación de la fibrina (Otero, 2006; Majluf y Lobato, 2008).

Actualmente se conocen 10 factores (I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII y XIII), estos factores se agrupan de acuerdo a su función. Los factores XII, XI, X, IX, VII, II y la precalicreina (PK) son zimógenos de proteasa de serina (**tabla 1**). Los factores V y VIII son cofactores. Los factores II, VII, IX, y X son vitamina K dependientes y un

sustrato final que es el factor I. (Quintana, 2001). En la tabla 1 se muestran las principales características de los factores hemostáticos.

En la actualidad se acepta que la principal función del sistema de la coagulación es mantener la sangre líquida, por lo que fisiológicamente existe un predominio del fenotipo anticoagulante sobre el fenotipo procoagulante, y solo en ciertas circunstancias se favorece la formación de un coágulo sanguíneo. De acuerdo con lo anterior, la generación de trombina y por consiguiente la formación de fibrina, ocurre únicamente cuando se requiere, y se genera exclusivamente en el sitio de daño vascular.

Tabla 1. Características generales de los principales factores hemostáticos, fibrinolíticos y anticoagulantes naturales. (Majluf, 2010)

Factor	PM (kDa)	Vida media (h)	Concentración (mg/dL)	Síntesis	Características
Fg	340	72-120	200-400	Hígado	Sustrato de la Trombina
FII	71	50-80	1-2	Hígado	Activa a FV, FVIII, FX y FXI
FV	330	12-15	0.4-1.4	Hígado	Cofactor de FX y PC
FVII	48	6	0.05	Hígado	Activa a FX, FIX y FXI
FVIII	330	12	0.02	Hígado/endotelio	Cofactor del FIX
FIX	56	24	0.5	Hígado	Activa a FX
FX	58	25-60	1	Hígado	Activa a FII
FXI	160	40-80	5	Hígado	Activa a FIX
FXII	76	50-70	3	Hígado	Activa a FXI y fibrinólisis
PC	62	10	0.04	Hígado	Inhibe a FV y FVIII
PS	77	-	0.2	Hígado/endotelio	Cofactor de PC
AT	58	-	14	Hígado/endotelio	Inhibe proteasas de Ser
Atp	72	0.08	0.002	Endotelio	Activador de fibrinólisis
Pg	88	50	2.1	Hígado	Sustrato del t-PA
laTP-1	50	-	0.025	Endotelio	Inhibe a t-PA
α 2-AP	68	58	6.9	Hígado	Inhibe a la plasmina

Fibrinólisis.

La fibrinólisis es el sistema que previene el depósito de fibrina en la vasculatura, e impide la obstrucción del flujo sanguíneo. Sin embargo, la lisis prematura del coágulo se traduce clínicamente en hemorragia. La fibrinólisis depende en gran parte de la enzima denominada plasmina (Majluf A. 2003). Esta enzima se encuentra en el plasma como su precursor enzimático, el plasminógeno (Pg), el cual se convierte en plasmina mediante los activadores del Pg. Existen dos grupos de activadores del sistema fibrinolítico: **a) intrínsecos:** factor XII (FXII), precalicreína (PK), cininógeno de alto peso molecular (CAPM) y pro-urocinasa (PUC) y **b) extrínsecos:** activador tisular del plasminógeno (aTP) y el activador del plasminógeno tipo urocinasa (APUC). (Rijken y cols. 2009).

La plasmina puede ejercer su acción sobre los factores V y VIII de la fase fluida (Kunamneni y cols. 2007; Collen 1999), hidrolizar al Fg (fibrinogenolisis) y a la fibrina (fibrinolisis) originando PDF y PDf respectivamente (**Fig. 1**).

Al igual que la trombina, la generación de plasmina se encuentra estrictamente regulada. Sus principales inhibidores son: el inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) y la alfa 2 antiplasmina (α 2-AP). El PAI-1 inhibe la activación del plasminógeno, mientras que la α 2-AP inhibe directamente a la plasmina y evita la unión del Pg a la fibrina limitando su contenido en el coágulo formado. (Banerjee y cols. 2004; Diebold y cols. 2008). Además, mediante el FXIII, la α 2-AP se entrecruza entre la malla de fibrina evitando la degradación prematura de la fibrina por efecto de la plasmina. (Ajzner E. y cols, 2009).

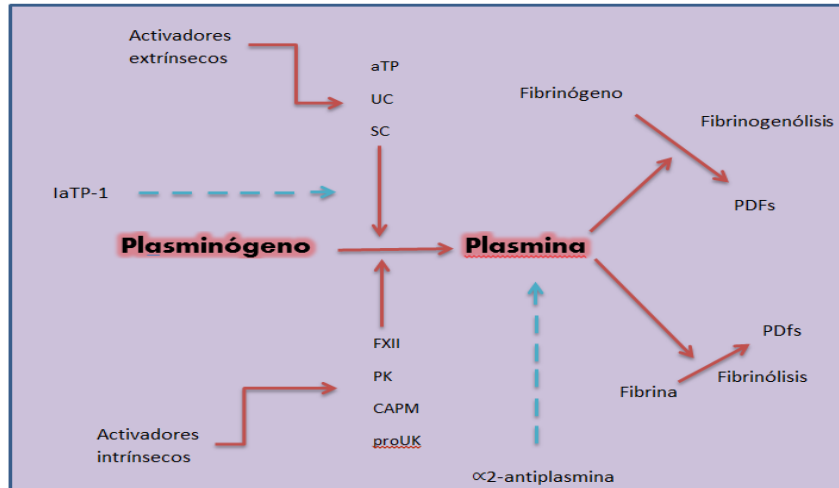


Figura 1. Esquema simplificado de la fibrinólisis. Se muestran las vías principales del sistema. En líneas continuas aparecen las reacciones activadoras y en líneas punteadas, las inhibitoras. (Majluf A, 2003)

Fibrinógeno (Fg).

El Fg representa el sustrato final de la fase fluida de la hemostasia, tiene una concentración plasmática aproximada de 200 – 400 mg/dL y una vida media de 72-120h. Su PM= 340kDa, glicoproteína dimérica que se encuentra formado por 3 pares de cadenas polipeptídicas homologas denominadas $A\alpha$, $B\beta$ y γ , que en conjunto forman la estructura hexamérica de la proteína. (Figura 2.) Finalmente, la organización de las cadenas $A\alpha$, $B\beta$ y γ forman la estructura trinodular del fibrinógeno (Blombäck B. 1996). Los extremos amino terminales forman el nódulo central E y a sus lados se localizan los nódulos D. El nódulo E está formado por los fibrinopéptidos A y B de las cadenas alfa y beta respectivamente, los cuales al ser hidrolizados por la trombina permiten que los monómeros de fibrina resultantes polimericen y además, queden expuestos los sitios de unión para el activador tisular del Pg, componentes esenciales del sistema de la fibrinólisis (Hoffman M, 2008).

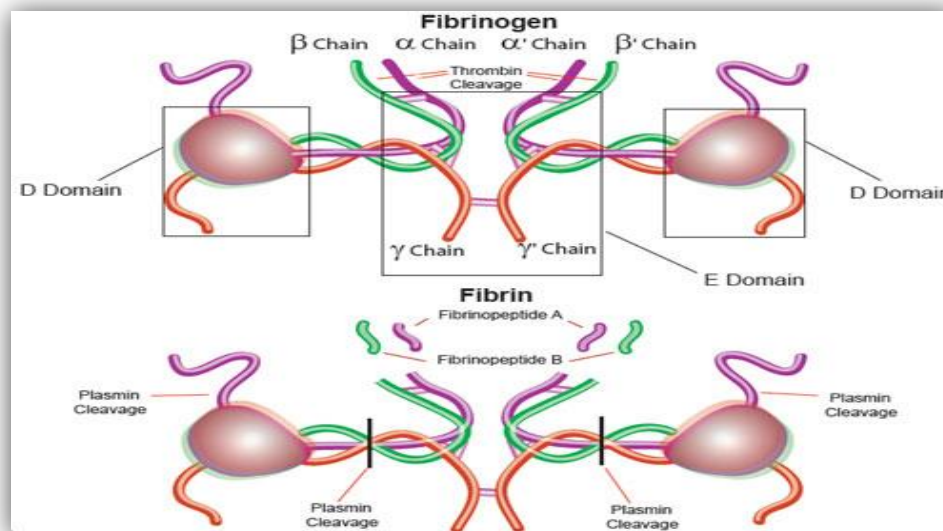


Figura 2. Muestra la proteína homodimérica, compuesta por 3 pares de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, dando como resultado tres dominios, un dominio central E y dos dominios homologos D.

El Fg participa en la hemostasia primaria formando un puente fisiológico entre las plaquetas activadas, fenómeno conocido como agregación plaquetaria.

Las anomalías congénitas del Fg son muy raras entre la población y pueden clasificarse como cuantitativas o cualitativas. Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que alteraciones adquiridas de esta proteína sean las responsables de los resultados alterados observados en los laboratorios clínicos.

Los desórdenes congénitos del Fg afectan tanto en cantidad, (hipofibrinogenemia, caracterizada por niveles plasmáticos inferiores a 150mg/dl, y afibrinogenemia, por la deficiencia total del fibrinógeno en el plasma), calidad del fibrinógeno circulante (disfibrinogenemia) o ambos (hipodisfibrinogenemia). De acuerdo con la causalidad de las mutaciones, éstas se clasifican en dos clases principales: **mutaciones nulas**, en donde no existe producción de la proteína y **mutaciones sin sentido o puntual** en el cual aparece un codón de terminación prematuro que producen cadenas proteicas anormales que son retenidas en el interior de la célula, además, por un inadecuado ensamblaje de los hexámeros y durante su secreción (Undas y cols, 2011; Neerman-Arbez M, y cols, 2013).

Frecuentemente, los pacientes con desordenes congénitos del fibrinógeno sufren hemorragias, pero, paradójicamente, también de eventos trombóticos. (Undas y cols, 2011).

EMBARAZO.

Estado fisiológico del organismo en el cual se producen modificaciones anatómicas y funcionales que permiten crear un ambiente adecuado para la implantación del feto y prepararse para el momento del parto (O'Riordan y cols. 2003).

Las modificaciones que se presentan a raíz del embarazo son diversas, tanto anatómicas, fisiológicas, psicológicas, etc. Entre estos cambios tenemos las modificaciones que sufre el sistema circulatorio, la tensión arterial y la frecuencia cardiaca permanecen dentro de los límites normales, aumentando en todo caso ligeramente la frecuencia en el último trimestre de gestación. El volumen sanguíneo incrementa hasta un 30% en la etapa final del embarazo (García y cols. 2003). Existen modificaciones hematológicas como el aumento del volumen globular causado por el aumento de plasma lo que genera una situación de hemodilución. Cambios secundarios que afectan a otros sistemas como el respiratorio, gastrointestinal y muy frecuente el sistema urinario. Es importante mencionar que la mayoría de los cambios se producen por cambios hormonales. (García y cols. 2003).

Hemostasia y fibrinólisis en el embarazo normoevolutivo.

En el embarazo se producen cambios en la expresión de las proteínas del sistema de la coagulación. El aumento en la activación de la fase fluida de la hemostasia, contribuye a la reducción del riesgo hemorrágico que podría ser perjudicial para la salud fetal y materna (Uchikova 2005). De hecho hoy se sabe que la actividad procoagulante aumenta al doble al final del embarazo (Prisco 2005). Los factores II, VII, VIII, IX, X, XII von Willebrand incrementan su actividad progresivamente a lo largo del embarazo (O'Riordan MN, y cols. 2003; Matsouka 2005; Holmes 2005;

Walker 1994), mientras que los niveles plasmáticos de PC y PS, y de los factores XIII y XI disminuyen (Matsouka 2005, O’Riordan 2003, Holmes 2005; Walker 1994). También, la agregación plaquetaria y el fibrinógeno incrementan durante el embarazo (O’Riordan MN. y cols. 2003, Stirling Y. y cols. 1984). En la siguiente tabla, se puede apreciar el incremento gradual de los niveles plasmáticos del Fg a medida que avanzan las SDG, sin embargo ocurre lo contrario en el puerperio.

Tabla 2. Concentración plasmática de Fg (mg/dl) durante el embarazo y el puerperio. (Condie, 1976)

	10-15 Semanas	23-25 Semanas	32-34 semanas	38-40 semanas	1er día puerperio	8° día puerperio
Media	330	350	410	450	460	260
Rango	210-450	230-470	290-530	350-550	320-600	180-340

La fibrinólisis también sufre cambios, entre ellos el aumento de los niveles plasmáticos de Pg (Holmes 2005), disminución o incremento de la actividad del t-PA (Uchikova 2005, Holmes 2005; O’Riordan 2003), aumento del PAI-1 de hasta 5 veces el valor usual al final del embarazo (Almagro 2000). Los valores de PAI-2 aumentan con el incremento del peso fetal y la masa placentaria (Prisco 2005). Por el contrario, el TAFI permanece sin cambios o incrementa discretamente (Matsouka, 2005; Chabloz, 2001).

Marco de referencia.

1. En abril del presente año Wikkels AJ, Edwards HM y cols., realizaron un trabajo de investigación titulado ***“Tratamiento preventivo con concentrado de fibrinógeno para la hemorragia postparto: ensayo controlado aleatorio”***.

En este estudio se evaluó si la administración preventiva de Fg (2g/kg de peso) disminuía el número de transfusiones sanguíneas durante el parto. Como resultado del estudio se encontró que en 20% de las mujeres fue necesario el uso de la transfusión sanguínea a pesar de que los niveles de Fg eran altos después de la administración del concentrado plasmático. Por lo tanto, los autores concluyen que la administración preventiva de Fg no disminuye el riesgo de hemorragia durante el parto.

2. En 2014 se presentaron los resultados del estudio denominado: ***“Association between fibrinogen levels and severity of postpartum hemorrhage in singleton vaginal deliveries at a Japanese perinatal center”***. (J Nippon Med Sch. 2014;81(2):94-6).

Este estudio examinó la relación entre los niveles bajos de Fg (<200 mg/dl) y la gravedad de la hemorragia postparto en los partos vaginales después de 22 semanas de gestación. Durante un período de 10 años, 61 mujeres (0,38%) recibieron transfusiones debido a la hemorragia postparto en las primeras 24 h después del parto. De estas mujeres, 13 (21%) tenían niveles bajos de Fg (media, 123 ± 68 mg/dl) al momento de la hemorragia posparto, y otras 48 mujeres (79%) con niveles de Fg normales (media, 305 ± 50 mg/dl). Las mujeres con niveles bajos de Fg requirieron transfusión sanguínea significativamente antes (98 ± 58 minutos después de la entrega) que las mujeres con niveles de Fg normales (142 ± 75 minutos después de la entrega, p = 0,03); además necesitaron más unidades de plasma fresco congelado (p = 0,03). El estudio concluyó que la transfusión temprana de plasma fresco congelado en mujeres con hemorragia posparto y niveles bajos de Fg disminuye el uso de la transfusión sanguínea y el riesgo que esto contrae.

3. En febrero del 2015, el Department of Obstetrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Hokkaido, Japan, realizó un estudio, titulado ***“niveles de fibrinógeno en la etapa final del embarazo gemelar”***.

Se analizaron 2 grupos de mujeres, ambos con ≥ 32 semanas de gestación. El primer grupo fue de 84 mujeres con embarazo gemelar y el segundo de 902 mujeres con embarazo de un solo producto. Los niveles de Fg disminuyeron de 403 ± 63 y 403 ± 77 mg/dl en semanas gestacionales 32-33, y 34-35, respectivamente, a 366 ± 57 mg / dl en la semana gestacional 36-37 en las mujeres con embarazo gemelar. Sin embargo, en las mujeres con embarazo de único producto, no se observaron cambios en la concentración de Fg incluso después de la semana 38 (408 ± 60 mg / dl). Los niveles de Fg determinados en las últimas 3 semanas antes del parto fueron significativamente más bajos en las mujeres con embarazo gemelar con respecto al otro grupo de estudio. Los autores concluyen que los niveles de Fg en las últimas semanas de gestación disminuyen significativamente y son más bajos que en un embarazo de un solo producto, por lo que quizá esto explique el riesgo mayor de hemorragia posparto en el embarazo gemelar.

4. En noviembre del 2014 el departamento de obstetricia, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Hokkaido, Japón., Yamada T, Akaishi R y cols., realizaron un trabajo de investigación denominado ***“Concentraciones de fibrinógeno prenatales y hemorragia posparto”***.

En este estudio se evaluó si la concentración de Fg prenatal se asocia con hemorragia posparto. El estudio fue retrospectivo y se incluyeron 871 mujeres con un embarazo único, pero sin factores de riesgo conocidos para la hemorragia posparto. La concentración de Fg se midió dentro de los 21 días antes del parto. Se analizó la correlación entre la concentración de Fg prenatal y la pérdida de sangre estimada. El estudio concluyó que la concentración de Fg prenatal < 330 mg /dl es un factor de riesgo para la hemorragia posparto.

5. En 1959, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Natal de Durban Sudáfrica Naidoo, Hathorn y Gillman realizaron el estudio **“Fibrinolytic and antifibrinolytic activity in pergnancy”** con 9 mujeres embarazadas. Las mujeres fueron seleccionadas en las salas de parto del Hospital King Edward VIII. Todas las mujeres eran aparentemente sanas. Se recolectaron dos muestras por paciente, la primera fue durante el trabajo de parto y la segunda a las 9 horas después del parto. Se realizó el tiempo de lisis de euglobulinas (TLE) por el método de Von Kaulla y Schultz. Los resultados demostraron que el TLE fue estadísticamente diferente ($p=0.010$) durante y después del parto. El TLE de 360 min durante el parto, y de 165 min post-parto. Por lo tanto, estos resultados sugieren que durante el parto, o inmediatamente después de éste, la actividad fibrinolítica esta aumentada o que los niveles de Fg están disminuidos.

6. En 1980 Masahiro Maki, Kenji Soga y Haruo Seki del departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Akita publicaron **“Fibrinolytic activity during pregnancy”**. Un estudio que involucra mujeres embarazadas con diferentes edades gestacionales y mujeres no embarazadas.

Se cuantificaron los niveles plasmáticos de los PDF, Pg y el TLE. Como resultados, se observó que la actividad fibrinolítica disminuyó en las mujeres embarazadas ya que el TLE fue más prolongado para este grupo de estudio. Sin embargo, la concentración plasmática de Pg y de los PDF aumento con respecto al grupo control (Maki y cols. 1980).

7. En la Universidad de Vermont, Sarah A y cols., publicaron **“Coagulation and fibrinolytic system protein profiles in women with normal pregnancies and pregnancies complicated by hypertension”**. Este estudio determinó las concentraciones plasmáticas de Fg, DD, PAI-1 y t-PA antes del embarazo, y en el primer y tercer trimestre del embarazo en 20 mujeres aparentemente sanas, de 29.8 ± 3 años y ciclos menstruales normales. No se incluyeron a mujeres fumadoras y multíparas, 17 mujeres no presentaron complicaciones durante el

embarazo pero 3 mujeres desarrollaron hipertensión durante el tercer trimestre. El Fg incrementó significativamente en el primer trimestre del embarazo. La concentración plasmática de DD, PAI-1 y t-PA incrementó en el primer y tercer trimestre. El incremento de DD y PAI-1 fue más pronunciado durante el tercer trimestre del embarazo y sólo durante este periodo se pudo observar el incremento en los niveles plasmáticos de t-PA. Estos resultados sugirieron que durante el embarazo y principalmente durante la etapa final de éste, la disfunción endotelial se hace presente, la cual además se ve acompañada de un incremento en la formación de fibrina ya que la concentración plasmática del DD incrementó durante el embarazo (Hale y cols. 2012).

8. En Gloucestershire Inglaterra (1968), Chakrabarth y cols., publicaron **“Methodological study and a recommended technique for determining the euglobulin lysis time”**. La actividad fibrinolítica fue medida por el TLE en plasma diluido. El estudio se realizó con en plasma de 10 personas aparentemente sanas. Una parte de plasma se mezcló con 19 partes de agua destilada acidificada con ácido acético. El plasma diluido se refrigeró y minutos más tarde se centrifugó para obtener un precipitado. Se desechó el sobrenadante (inhibidores de la fibrinólisis) y se secaron las paredes del tubo usando papel filtro. El precipitado se solubilizó en buffer de Owreen Koller. El coágulo de fibrina se hizo presente luego de la adición de trombina a la muestra. Para esto, la muestra se incubó 30 minutos a 37°C. A partir de este momento se midió el tiempo requerido para la disolución del coágulo, considerando 2 horas como el tiempo crítico para establecer un veredicto.

Una prueba positiva es aquella en la que el coágulo se degrada en las primeras dos horas de incubación, un hecho que determina que el TLE tenga utilidad clínica sólo para evaluar el estado hiperfibrinolítico. De hecho, el TLE es probablemente el método funcional más específico para medir la actividad fibrinolítica, y para estimar la actividad del t-PA en la ausencia de los inhibidores de la fibrinólisis (Chakrabarti y cols. 1968).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La HO es un problema de salud pública en México y en el mundo. De acuerdo con la OMS, su frecuencia oscila de 5 a 10 % de todos los embarazos, lo que representa el 25% de las causas de muerte materna (140,000 muertes/año). En cambio, en México la HO ocurre en 25% de las mujeres embarazadas, es decir, más del doble de la cifra estimada por la OMS. Tan solo entre 1990 y 2011 fallecieron más de 30,000 mujeres mexicanas de 20 a 35 años de edad.

En países desarrollados, se ha observado que la OH puede ser explicada por la presencia de coagulopatías. Sin embargo, en su mayoría los resultados se han obtenido de informes de casos clínicos lo que evidencia la necesidad de realizar investigación epidemiológica al respecto. En México, desafortunadamente, desconocemos por completo si existe alguna relación entre las alteraciones del sistema de la coagulación y la HO. En gran medida los esfuerzos por reducir este problema se han dirigido a conocer más acerca de los problemas ginecológicos de la mujer y no al estudio del sistema de la coagulación. Quizá esto explique el por qué no se han obtenido resultados fructíferos. De acuerdo con lo anterior, se ha iniciado una línea de investigación que intente conocer cuáles son las principales coagulopatías asociadas a la HO en la mujer mexicana. En un primer estudio se evaluará si la concentración de Fg se modifica en las últimas semanas del embarazo, ya que los resultados obtenidos de estudios previos sugieren a esta proteína como un factor de riesgo de hemorragia periparto (HP). Considerando que en México el número de mujeres con HO es alarmantemente más alto que las cifras mostradas por la OMS, es factible pensar que la magnitud de los cambios inducidos durante el embarazo, específicamente en la concentración de Fg sean más pronunciados en la mujer mexicana. Por lo tanto, me he planteado la siguiente pregunta de investigación

¿La concentración plasmática del Fg disminuye en las últimas semanas del embarazo en las mujeres mexicanas?

JUSTIFICACIÓN.

Considerando que la HO continúa siendo la principal causa de muerte materna en el mundo (**OMS**), los resultados que se obtengan del presente estudio aportaran información relevante que permitirá tomar mejores decisiones para intentar disminuir las cifras alarmantes de este grave problema de salud.

Evidentemente, el presente estudio tendrá una aplicación inmediata, ya que en toda mujer en la cual se detecte alteraciones en la concentración plasmática del Fg antes y durante el parto se deberán tomar las medidas preventivas necesarias para disminuir el riesgo hemorrágico.

Por otro lado, estos resultados formaran parte de los escasos estudios que informan sobre los mecanismos fisiológicos no pro-coagulantes que induce el embarazo en el sistema de la coagulación, ya que los antecedentes que se tienen al respecto se obtuvieron de estudios realizados hace muchos años para conocer cuáles eran los efectos del embarazo sobre la hemostasia y la fibrinólisis que inducían un incremento en el riesgo trombótico.

HIPOTESIS

Ho. La concentración plasmática del Fg no disminuye en las últimas semanas del embarazo en las mujeres mexicanas.

H1. La concentración plasmática del Fg disminuye en las últimas semanas del embarazo en las mujeres mexicanas.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar si la concentración plasmática del Fibrinógeno disminuye en las últimas semanas del embarazo.

Objetivos particulares:

1. Determinar la concentración de Fg (Ag-Fg), mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), en las últimas semanas del embarazo.
2. Determinar la concentración de Fg mediante una técnica coagulométrica (Método de Clauss), en las últimas semanas del embarazo.
3. Determinar el tiempo de trombina (TT), mediante una prueba coagulométrica, en las últimas semanas del embarazo.
4. Determinar la presencia de los productos de degradación del fibrinógeno-fibrina (PDF's), en las últimas semanas del embarazo.
5. Determinar la actividad fibrinolítica mediante la prueba de tiempo de lisis de eoglobulinas, en las últimas semanas del embarazo.
6. Establecer si la concentración plasmática del Fg disminuye en las mujeres con edad gestacional ≥ 37 semanas vs. mujeres no embarazadas y con embarazo con edad gestacional < 36 semanas.

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Sede.

Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis (UIMTHA) del Hospital General Regional No. 1 Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro del IMSS, México, DF, y Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Universo.

- Mujeres mexicanas, embarazadas y no embarazadas, de 18 a 35 años de edad, derechohabientes del IMSS y SSA.

Tipo de estudio.

Prospectivo, transversal, controlado, pareado por edad, no aleatorizado.

Tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra se determinó utilizando el programa estadístico Sigma Stat, versión 3.5. El cálculo del tamaño de muestra se hizo con base a una comparación de medias. La media y desviación estándar de la concentración del Fg del grupo control fueron utilizados para determinar el tamaño de muestra. Además considerando que el incremento de Fg oscila de 50 a 70 mg/dL durante el embarazo, usamos la concentración de 60 mg/dL para el cálculo del tamaño de la muestra. Con base en lo anterior y considerando una media = 305 mg/dL y una desviación estándar = 36 mg/dL, así como un valor de $\alpha = 0.05$ y $1 - \beta = 90\%$, el tamaño estimado de la muestra fue de 10 mujeres por grupo; sin embargo, para este estudio se incluyeron a 35 mujeres por grupo para tener una muestra más representativa e incrementar el nivel de confianza de la prueba estadística.

Criterios de selección.

Criterios de inclusión

- Mujeres embarazadas de 18 a 35 años de edad, ≥ 37 semanas de gestación (SDG).
- Mujeres embarazadas de 18 a 35 años de edad, ≥ 30 SDG y ≤ 36 SDG.
- Mujeres no embarazadas de 18 a 35 años de edad aparentemente sanas.

Criterios de exclusión

- Antecedentes hemostáticos (coagulopatias)
- Tratamiento antitrombótico
- Enfermedad hepática
- Problemas de alcoholismo
- Fumadoras
- Diabetes.
- Uso de anticonceptivos hormonales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La descripción de las características generales de las mujeres embarazadas y no embarazadas, se hizo mediante el uso de medidas de tendencia central y dispersión.

Se usó la prueba estadística análisis de varianza para establecer diferencias entre los resultados de los grupos de estudio, y entre los resultados de las pruebas antigénicas y las funcionales. Además se usó cuadros de contingencia para analizar los resultados de las variables cualitativas. Los resultados fueron significativos si $p < 0.05$.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Recolección de las muestras

Las muestras de mujeres embarazadas se obtuvieron de las siguientes sedes: Hospital General de Zona #32 "Dr. Mario Madrazo Navarro" del IMSS, D.F; Unidad de Medicina Médico Familiar No. 46 del IMSS, D.F; Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; Comunidad de Tepatlaxco de Hgo. Puebla; Hospital General Regional No. 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro del IMSS, D.F. Por otro lado, las muestras de las mujeres no embarazadas se obtuvieron en Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en la comunidad de Tepatlaxco de Hgo. Puebla.

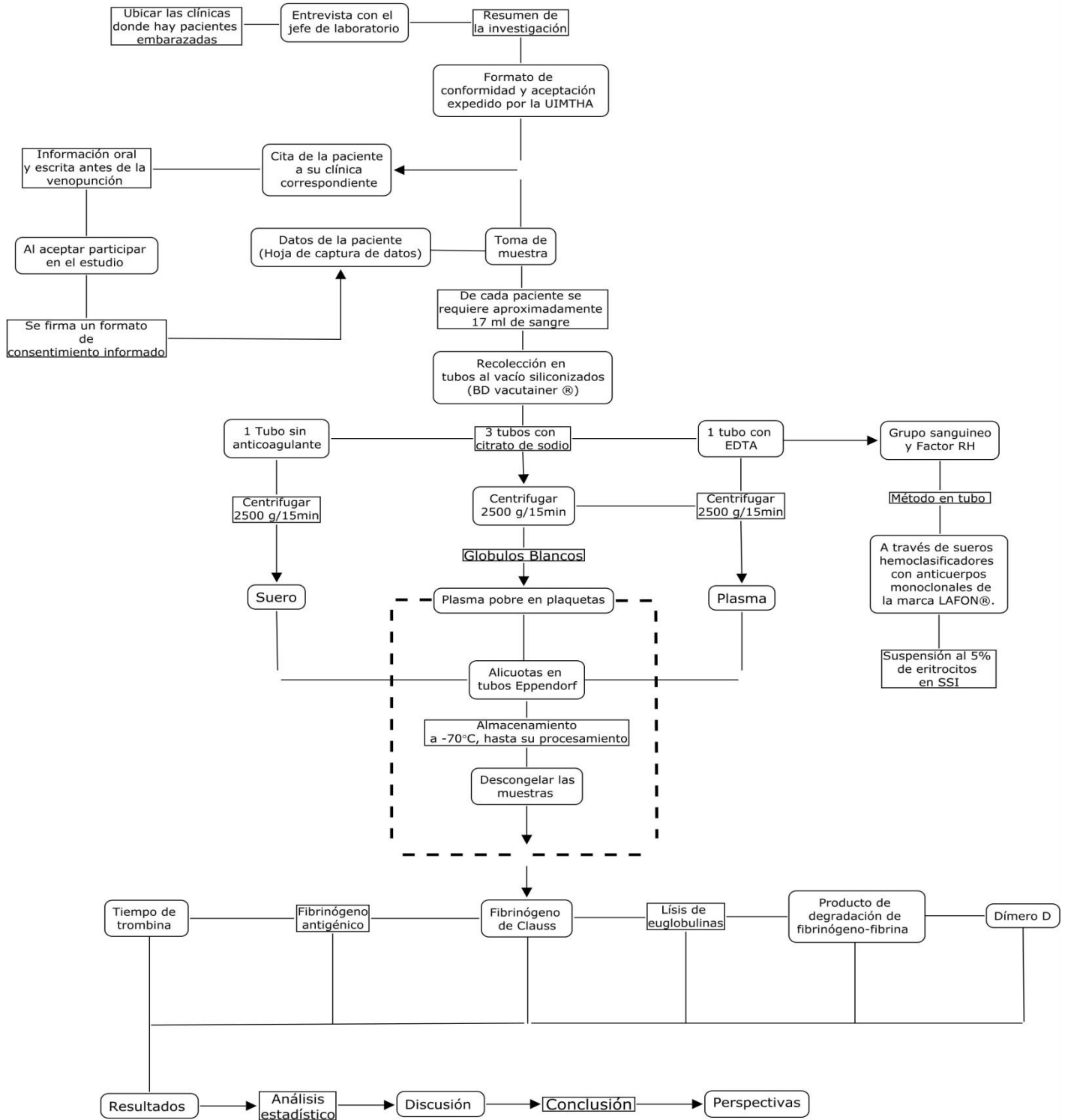
Una vez que las pacientes voluntarias decidieron participar en el estudio (por la información proporcionada por parte del investigador), se les hizo la invitación de firmar su consentimiento informado (anexo) para después obtener la muestra por venopunción.

Obtención de la muestra.

De cada mujer se requirió un total de 17.1mL de sangre colectada en tubos al vacío en 1 tubo sin anticoagulante, 1 con EDTA y 3 más con citrato de sodio 3.2%. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 g por 15 min para después separar el suero, plasma pobre en plaquetas (PPP) y glóbulos blancos mediante una pipeta Pasteur desechable. El grupo sanguíneo se determinó en sangre total colectada en el tubo con EDTA. Se hicieron alícuotas con el suero y PPP en micro-viales de plástico de 0.5 y 1.5 mL y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

Metodología.

Esquema 1. Diagrama general de trabajo



Grupo sanguíneo y factor Rh.

El grupo sanguíneo se determinó en tubos de vidrio usando anticuerpos monoclonales contra los antígenos A, B y D de la superficie de los eritrocitos (LAFON ®.) La interpretación del grupo sanguíneo y factor Rh se realizó como se muestra en la siguiente tabla.

TABLA 3. Interpretación del grupo sanguíneo.

ANTI – A	ANTI – B	ANTI - AB	GRUPO	Anti D
-	-	-	0	+/-
+	-	+	A	+/-
-	+	+	B	+/-
+	+	+	AB	+/-

Aquí se muestran los resultados característicos de cada grupo sanguíneo y del factor Rh. Los signos + o -, indican la presencia o ausencia de aglutinación eritrocitaria al adicionar los anticuerpos específicos.

Fibrinógeno antigénico (Ag-Fg).

Para la cuantificación del Fg se utilizó un Kit de ELISA (DRG®Fibrinogen-EIA-5414). La prueba se fundamenta en un inmunoensayo altamente sensible, ligado a dos sitios enzimáticos (doble anticuerpo). El método inmunológico proporciona la concentración plasmática antigénica del Fg expresado en ng/ml. La prueba se realiza sobre una placa de 96 pozos, cada uno sensibilizado con anticuerpos monoclonales anti- Fg humano (**Fig 3**). Brevemente, el PPP de prueba se diluyó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El Fg del plasma fue reconocido por el anticuerpo específico que se encuentra en la superficie del pozo formando un complejo antígeno-anticuerpo. Después, se eliminó el exceso de Fg no libre mediante diferentes lavados. Posteriormente se agregó un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) para formar el complejo Fg-anticuerpo primario-anticuerpo secundario. Nuevamente se hizo un par de

lavados para remover el exceso del anticuerpo secundario libre, inmediatamente después se adicionó el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB) disuelto en peróxido de hidrógeno, el cual al ser oxidado produce un compuesto colorido. La reacción se detuvo con una solución ácida. La intensidad de color fue directamente proporcional a la concentración de Fg. La lectura de la absorbancia se realizó en el equipo **Sinergy microplate reader** a 450nm. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se interpolaron en una curva de calibración.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco										
B	Std 1	Std.1										
C	Std 2	Std 2										
D	Std 3	Std 3										
E	Std 4	Std 4										
F	Std 5	Std 5										
G	Std 6	Std 6										
H	CA	CB										

Figura 3. Microplato de ELISA para cuantificación de Fibrinógeno. Std: plasma estándar; CA: control alto; CB: control bajo.

Fibrinógeno funcional (Método de Clauss).

Método coagulométrico que informa sobre la concentración del Fg. Se fundamenta en la conversión de Fg a fibrina en presencia de un exceso de trombina. De esta manera, el tiempo de trombina resultante de cada muestra se interpola en una curva de calibración realizada previamente con un plasma estándar o de calibración (Tabla 4).

La curva de calibración se construyó diluyendo el plasma de calibración 1/5, 1/10, 1/15, 1/20. Para cada punto de la curva se adicionó 200 μ l del plasma, se incubó 120 segundos a 37°C. La reacción inicio luego de la adición de la trombina (STA Thrombin de Diagnostica Stago®) y finalizó con la formación del coágulo de fibrina (Jennings y cols. 2003).

Tabla 4. Ejemplo de una curva de calibración de Fg.

Dilución del estándar	Concentración de Fg (mg/dl)
1/5	420
1/10	210
1/15	140
1/20	105

Tiempo de trombina (TT).

Prueba coagulométrica que informa sobre la calidad y concentración del Fg, se basa en la conversión de Fg a fibrina tras la adición de trombina al plasma. Para esta prueba se usó trombina de la marca STAGO (STA Thrombin de Diagnostica Stago®).

Para la prueba se adicionó 100 μ l de PPP a un tubo de vidrio, se incubó 180s /37°C, e inmediatamente después se adicionaron 100 μ l de trombina previamente incubada (37°C) la cual desencadenó la reacción. El tiempo resultante entre la adición de la trombina al PPP y la formación de la fibrina corresponde al TT. El TT fue normal cuando la diferencia en segundos entre los resultados del plasma problema y el plasma testigo fue entre ≤ 2 s.

Tiempo de lisis de euglobulinas (TLE).

El tiempo de lisis de euglobulinas es un método útil para evaluar la actividad de la fibrinólisis en ausencia de sus inhibidores (PAI-1, α 2-antiplasmina). El método fue descrito por Von Kaulla y Schultz en 1958. La temperatura, pH, anticoagulante y solución buffer son factores que pueden modificar el estudio, sin embargo se describe un método estandarizado el cual controla estas variables y así encontrar datos reproducibles. Actualmente, la actividad fibrinolítica se evalúa midiendo el tiempo requerido para lisar un coágulo de fibrina de un plasma diluido (Biggs, MacFarlane y Pilling, 1947; Fearnley y Tweed, 1953). La técnica se fundamenta en la precipitación isoeléctrica de las proteínas después de diluir el plasma y

acidificarlo a un pH de 5.3 para que las euglobulinas precipiten. A continuación se describe brevemente la técnica usada en el presente estudio.

El PPP se diluyó 1:20 con agua destilada y se acidificó con aproximadamente 200 µl de ácido acético al 1% para obtener un pH entre de 5.3 y 6.0 (Milestone 1941). La dilución del plasma disminuye la solubilidad de las proteínas, mientras que la adición del ácido acético favorece que el medio tenga un pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas de interés (plasminógeno, activadores del plasminógeno, plasmina, Fg, factor V, factor VIII), lo que propicia su precipitación. En cambio, los inhibidores de la fibrinólisis permanecen en el sobrenadante (Kowalski, Kopec, and Niewiarowski, 1959). El sedimento se resuspende en una solución buffer, que proporciona los iones y el pH requerido para que las proteínas puedan solubilizarse nuevamente, posteriormente se añade trombina con la finalidad de formar el coágulo de fibrina. Una vez formado el coágulo, se incubó durante 120 min a 37°C. El tiempo que transcurre entre la adición de trombina hasta la lisis total del coágulo, se le conoce como tiempo de lisis de euglobulinas. La prueba es negativa cuando el tiempo lisis del coágulo \geq 120 min. Al contrario, cuando el coágulo se lisó antes del tiempo mencionado, la prueba se consideró positiva. Una prueba positiva sugiere un estado de hiperfibrinólisis.

Productos de degradación del fibrinógeno-fibrina (PDF's).

Esta prueba evalúa la activación de la fibrinólisis. Los PDF's se producen por acción de la plasmina, la cual en exceso degrada al Fg, monómeros y polímeros de fibrina. Los fragmentos X e Y constituyen los productos tempranos de degradación del Fg, mientras que los fragmentos D y E son los productos de degradación de los monómeros de fibrina. La degradación de la malla de fibrina implica la formación de los complejos o oligómeros YXD/DXY, YY/DXD, DY/YD, y finalmente, de su producto terminal, el dímero D. Cuando existe hiperfibrinólisis, los productos de degradación del Fg tienen un efecto anticoagulante ya que interfieren con la polimerización de la fibrina, ocasionando coágulos inestables.

Los PDF's se pueden evaluar cualitativa y/o semi-cuantitativamente en el PPP mediante una prueba de aglutinación en látex. En este estudio usamos el reactivo

FDP Plasma Diagnostica Stago®, el cual consiste de partículas de latex recubiertas con anticuerpos anti-PDF's. La presencia de aglutinaciones visibles indica la presencia de PDF's en el plasma.

Tabla 5. Interpretación de resultados de la prueba cualitativa y semi-cuantitativa de los PDF's.

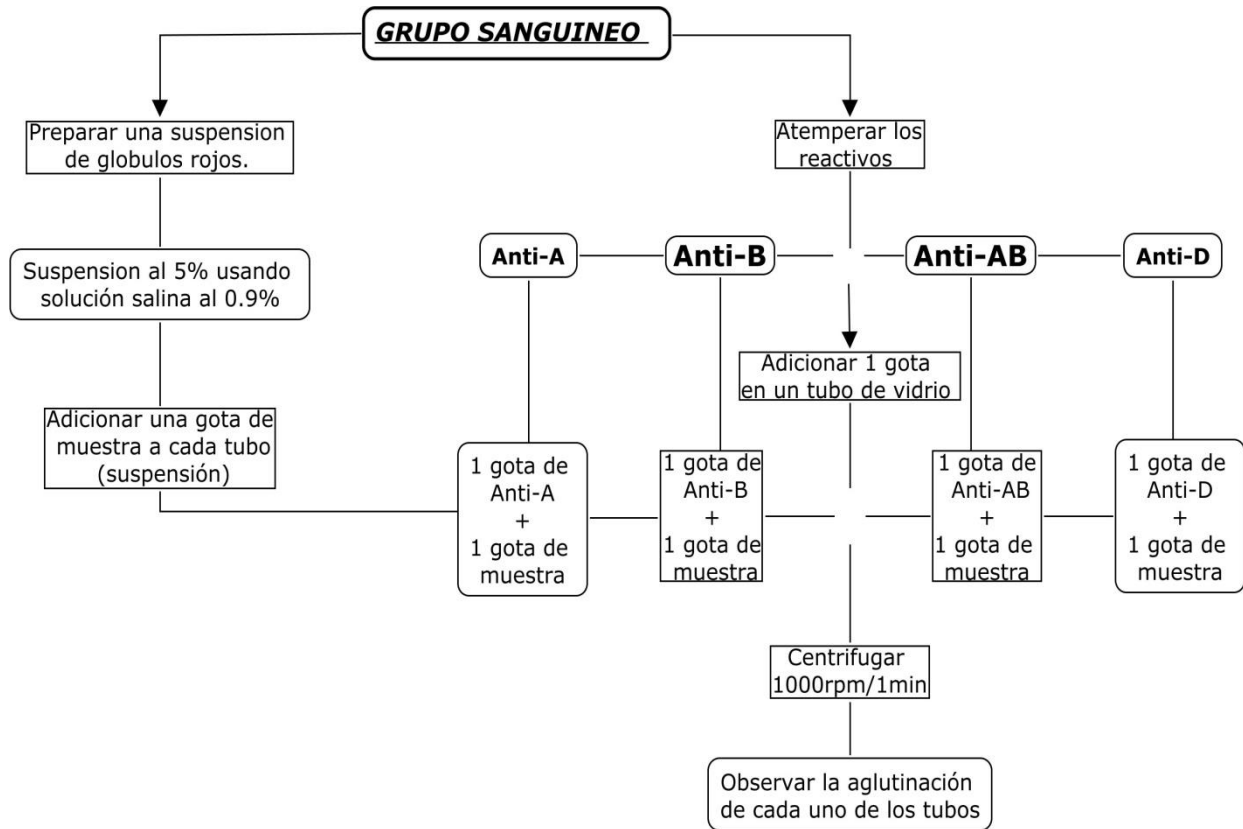
DILUCIÓN DEL PPP	1:2	1:8	PDF's (µg/ml)
NEGATIVO	–	–	< 5
POSITIVO	+	–	≥ 5–< 20
POSITIVO	+	+	≥ 20

DÍMERO D

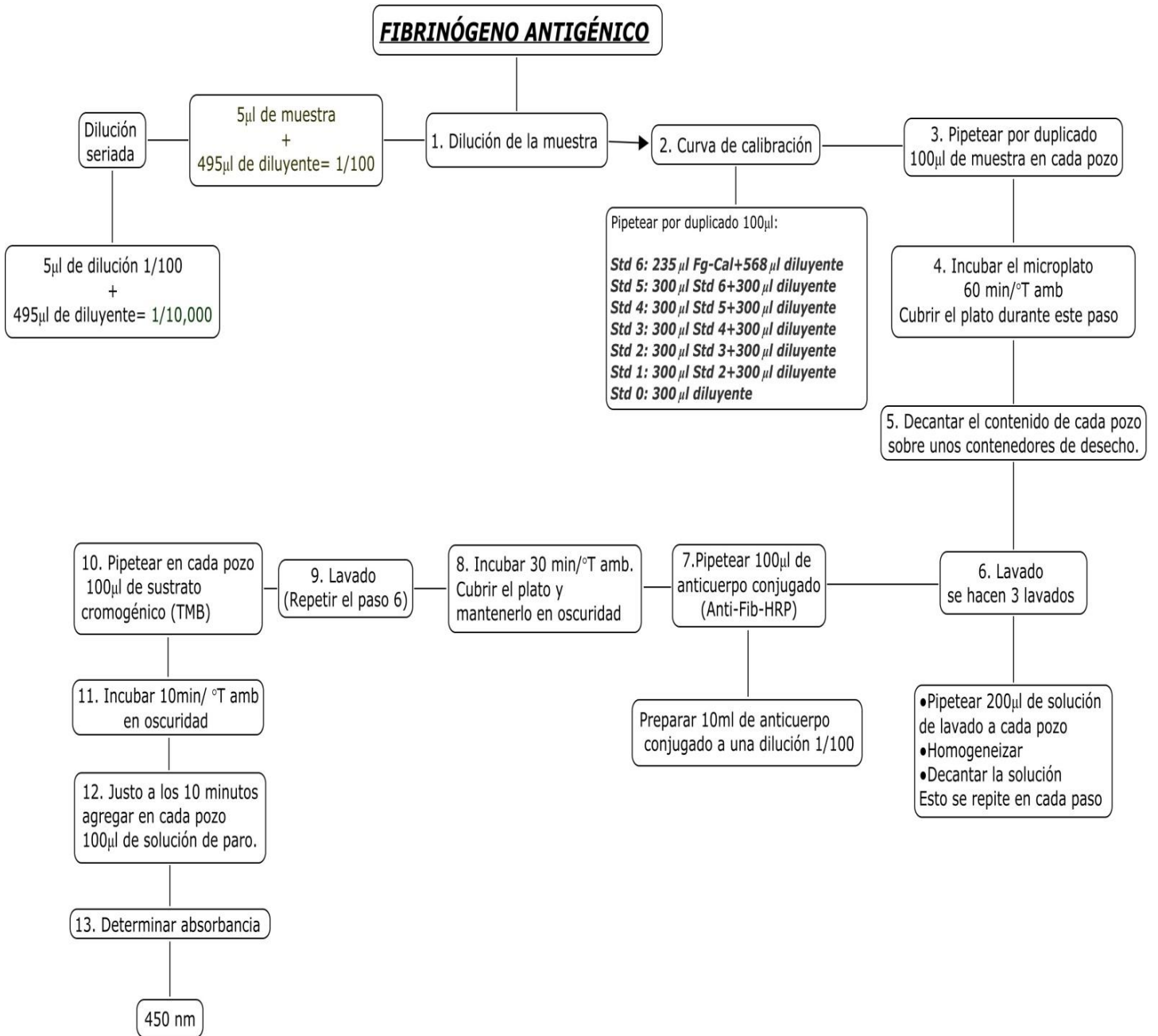
El dímero-D (DD) es el principal producto de la degradación de la fibrina por la plasmina y es generado en el paso final de la formación de trombos. Se forma por dos monómeros adyacentes unidos por un enlace de cadena cruzada y por medio de la acción secuencial de tres enzimas, trombina, F XIIIa y plasmina. Los valores de DD plasmáticos, por lo tanto, son un índice de activación de fibrina en la circulación. Se han demostrado niveles circulantes elevados de DD en casos, condiciones clínicas que pueden cursar con trombosis y fibrinólisis, tales como tromboembolismo venoso agudo, embarazo, traumatismo, neoplasias, sepsis, coagulación intravascular diseminada y eventos coronarios agudos.(Chalmers JD y cols. 2009)

El DD se determina en PPP, mediante una prueba de aglutinación en látex, el reactivo que se ocupa para esta prueba es D-Dimer Test de diagnostica Stago®, el cual determina de manera cualitativa y semicuantitativa. Las partículas de látex están cubiertas de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el producto de degradación de la fibrina, el DD. La muestra se mezcla con la suspensión de látex. En presencia de una concentración de $DD > 0.5 \mu g/ml$ de unidades de equivalentes de Fg (UEF), las partículas de látex recubiertas de anticuerpos monoclonales dan lugar a una aglutinación claramente visible. La exactitud y reproducibilidad de los resultados se confirma mediante los controles. El valor esperado de DD en adultos es $< 0.5 \mu g/ml$ de UEF.

Esquema 2. Determinación del grupo sanguíneo y factor Rh.

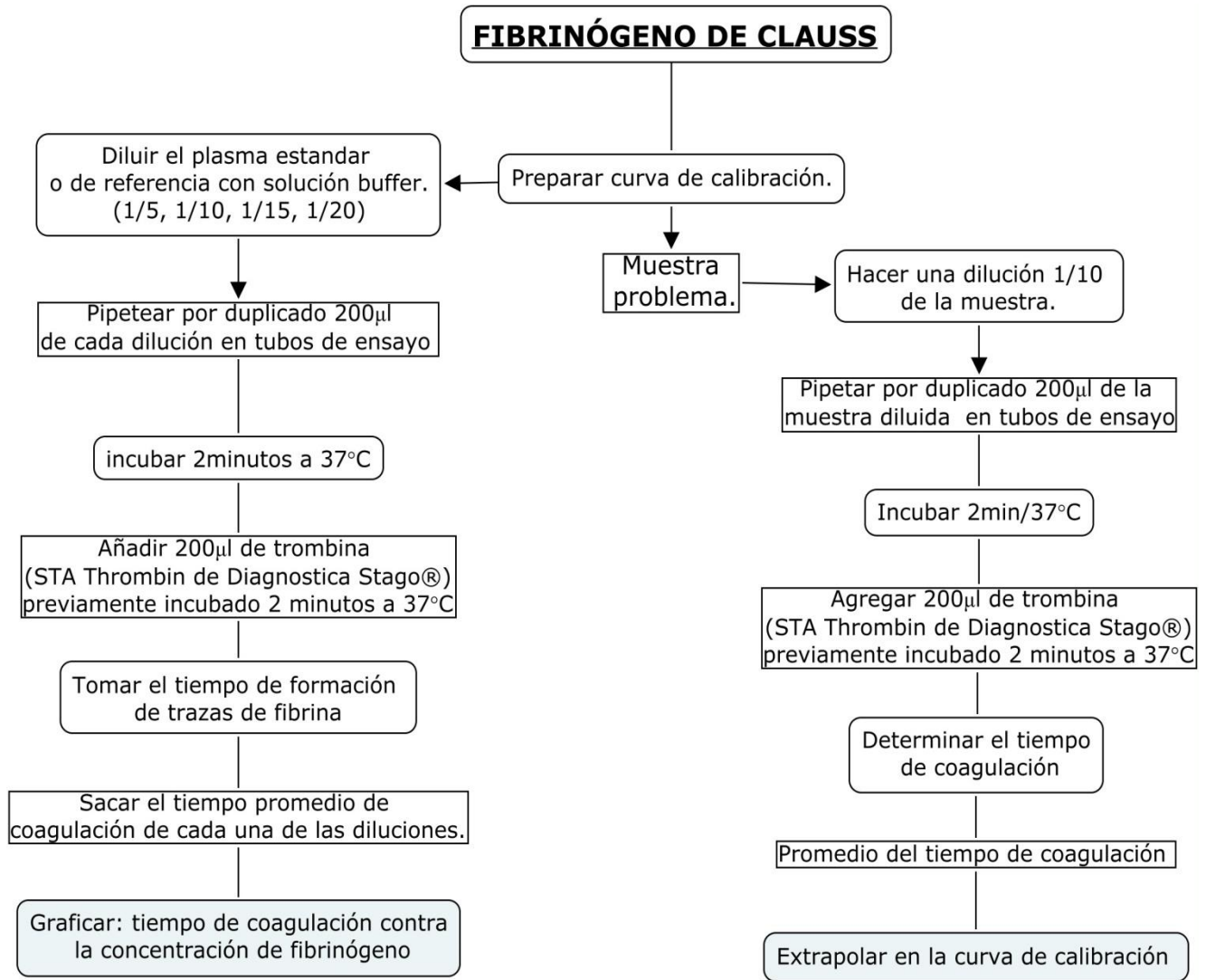


Esquema 3. Cuantificación del Ag-Fg.



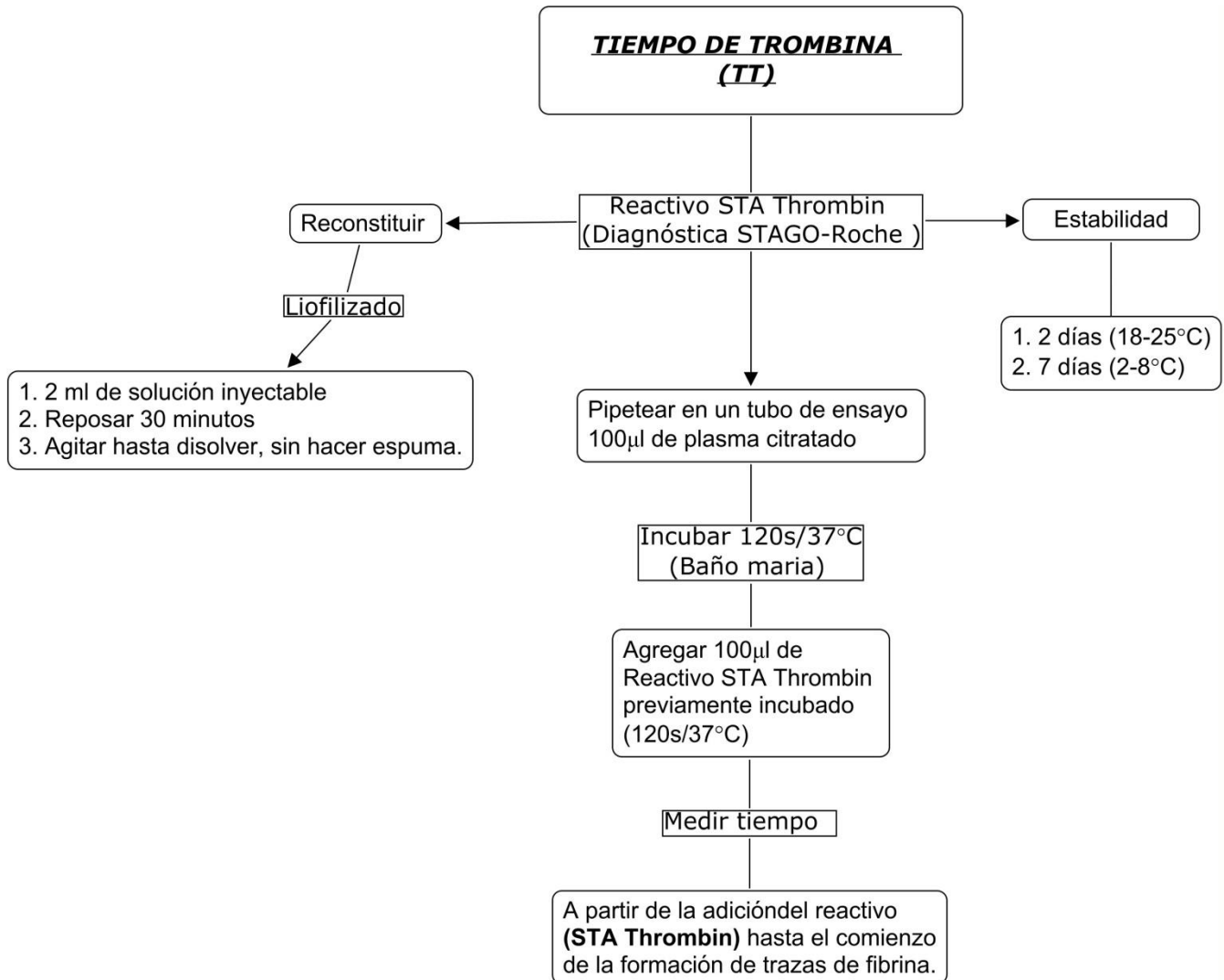
Fuente: DRG®Fibrinogen-EIA-5414.

Esquema 4. Determinación de Fg por el método de Clauss



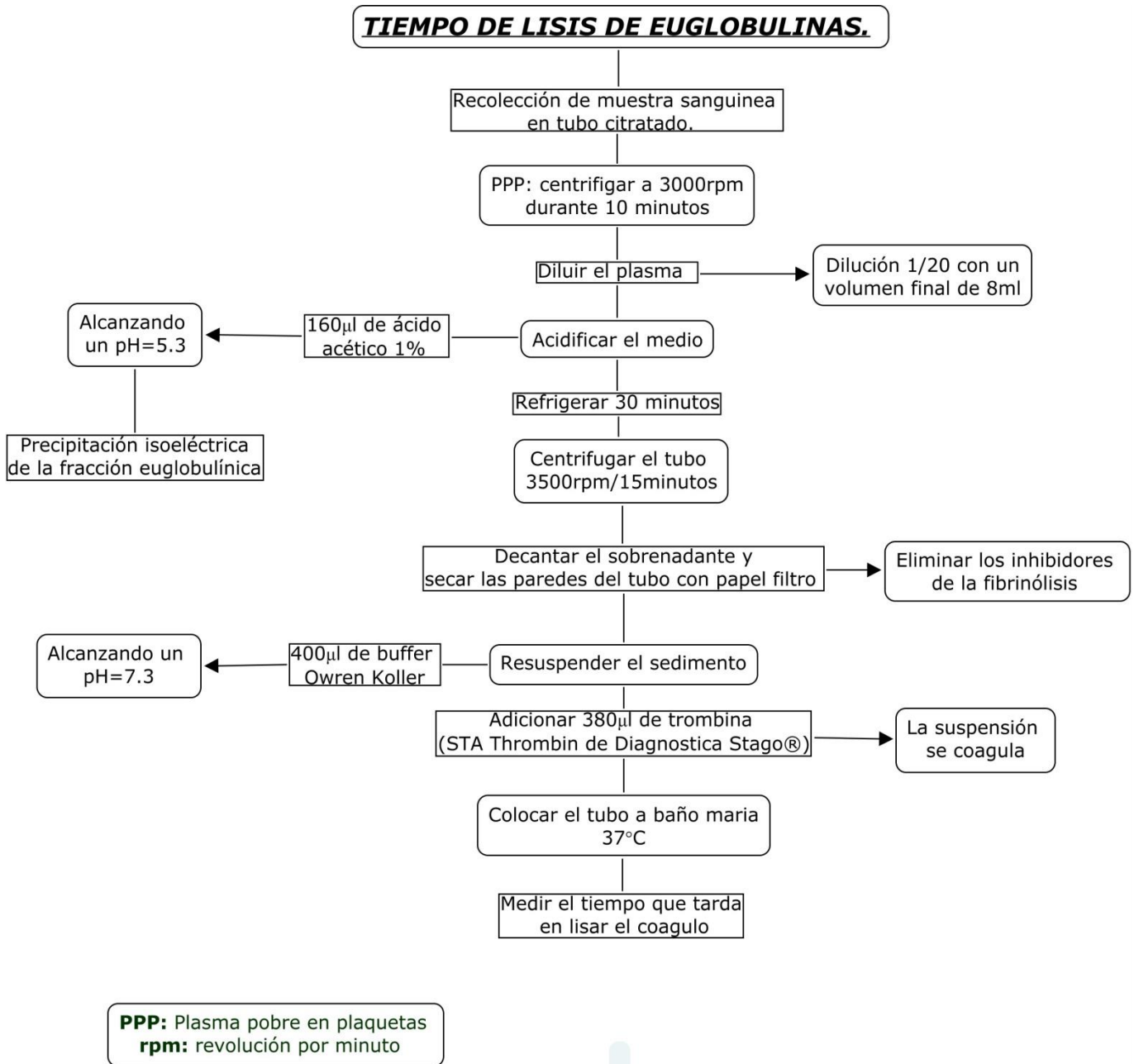
Fuente: *Jennings y cols. 2003*

Esquema 5. Tiempo de trombina (TT)



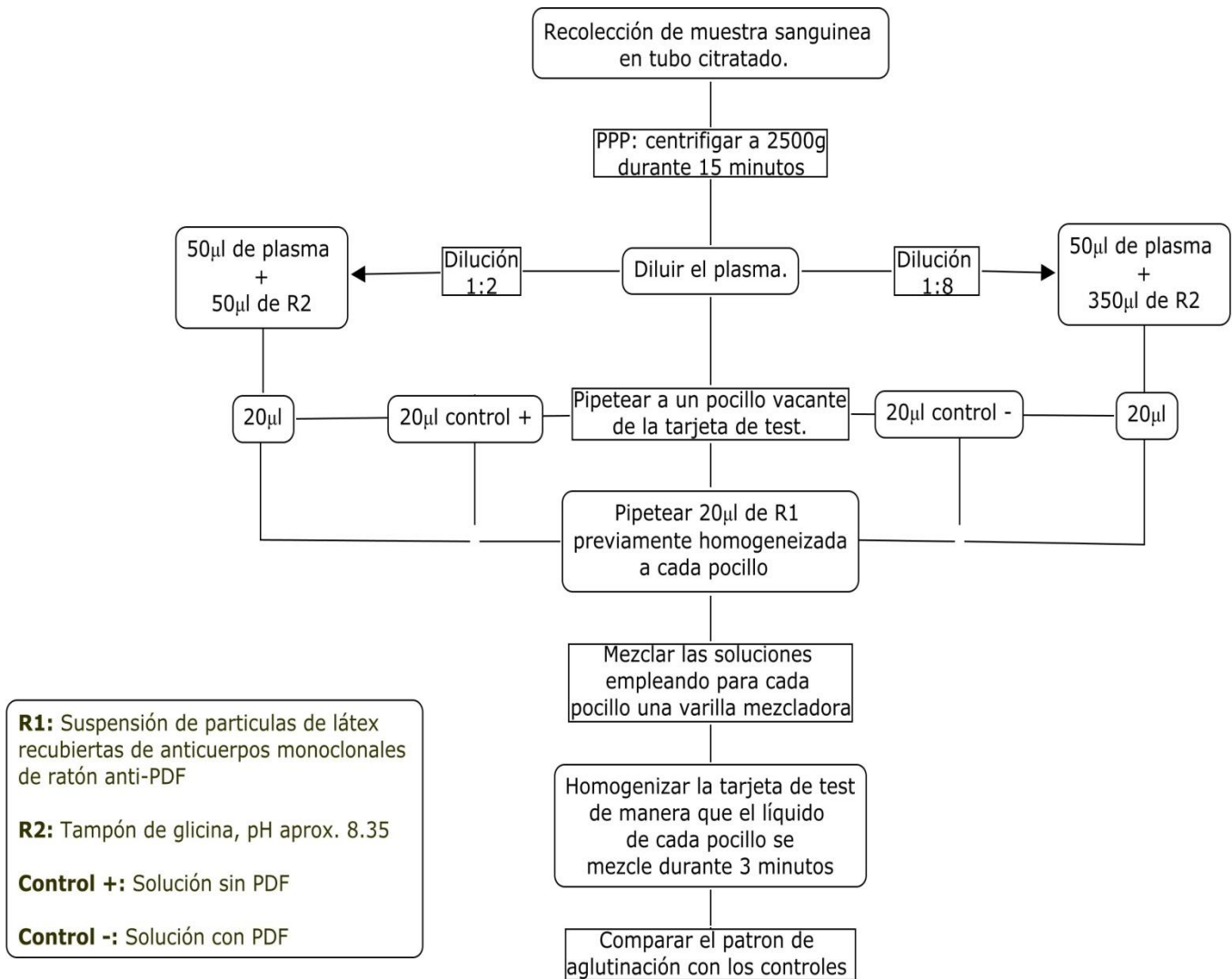
Fuente: STA Thrombin de Diagnostica Stago®

Esquema 6. Tiempo de lisis de euglobulinas



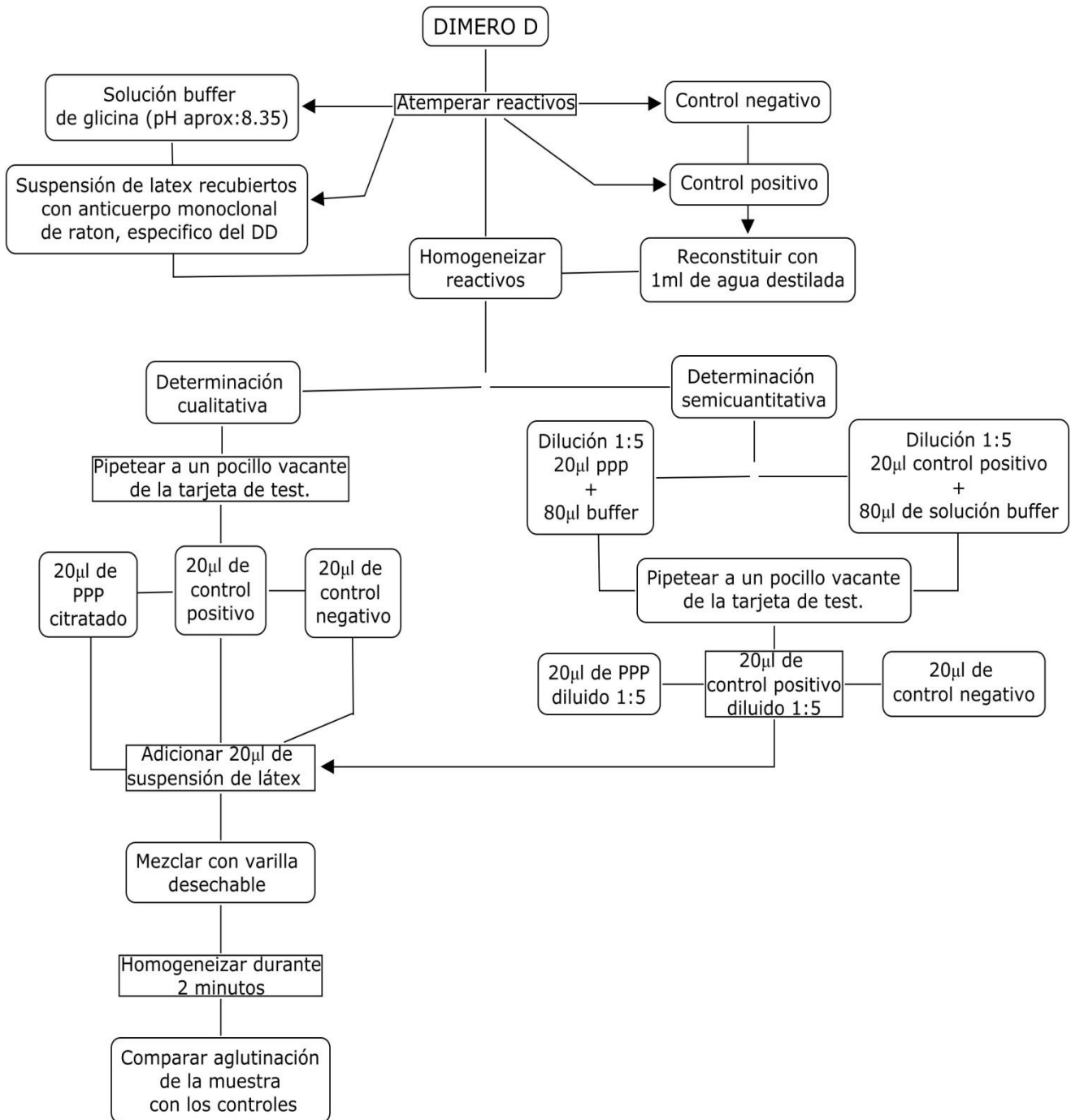
Fuente: Biggs, MacFarlane y Pilling, 1947; Fearnley y Tweed, 1953

Esquema 7. Productos de degradación del fibrinógeno-fibrina (PDF's).



Fuente: FDP Plasma Diagnostica Stago®

Esquema 8. Dímero D



Fuente: *D-Dimer Test de diagnostica Stago®*

RESULTADOS

Mujeres embarazadas.

Se analizaron 70 muestras de mujeres embarazadas, 40 tenían ≥ 37 SDG y 30 de ellas < 36 SDG.

Mujeres no embarazadas.

Se analizaron 44 muestras de mujeres no embarazadas. Treinta y tres muestras fueron obtenidas de estudiantes voluntarias de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y 11 muestras del municipio de Tepatlaxco de Hgo. Puebla.

Tabla 6. Edad de los tres grupos de estudio.

	≥ 37 SDG N=40	< 36 SDG N=30	Control N=44
Rango de edad (años)	18-35	18-35	18-35
Edad media (años)	28	30	23

Resultados del grupo sanguíneo y factor Rh.

La distribución de los grupos sanguíneos y factor Rh se muestran en la tabla 7. El grupo sanguíneo O+ fue el más frecuente entre las mujeres embarazadas y no embarazadas.

Tabla 7. Porcentaje del grupo sanguíneo de cada uno de los grupos de estudio.

Grupo Sanguíneo	≥ 37 SDG N=40	< 36 SDG N=30	Control N=44
O+ (%)	77.3	75	77.3
A+ (%)	11.4	13.8	13.6
B+ (%)	6.8	11.2	6.8
A- (%)	2.3		
AB+ (%)	2.3		2.3

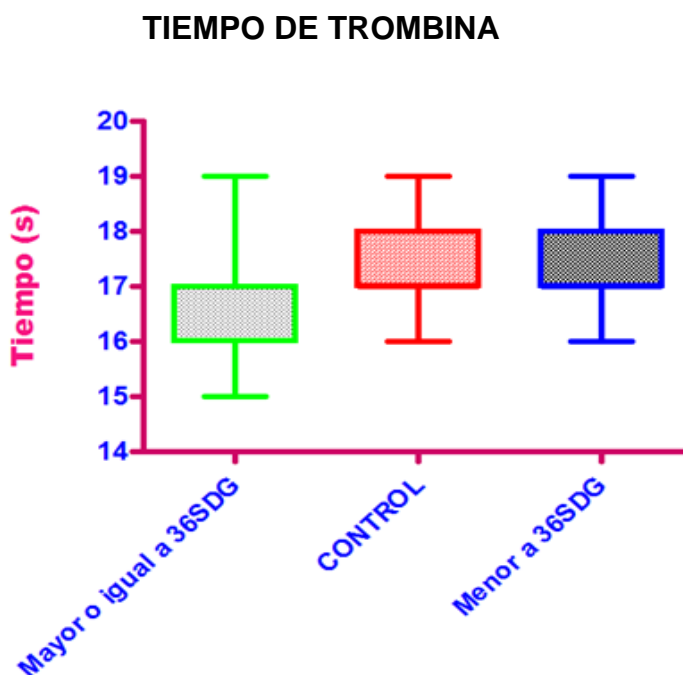
Resultados del TT.

Para los tres grupos de estudio, los resultados del TT fueron normales con respecto al plasma testigo. En la tabla 8, se muestran los resultados del análisis descriptivo del TT para los tres grupos de estudio. No se realizó análisis inferencial de estos resultados considerando que el 100% de las muestras tuvieron resultados normales de esta prueba.

Tabla 8. Resultados TT de los tres grupos de estudio.

	≥ 37 SDG N=40	Control N=44	< 36 SDG N=30
Mediana	17	17	17
Per 25	16	17	17
Per 75	17	18	18
V.m	15	16	16
V.M	19	19	19

Per 25: Percentil 25, Per 75: Percentil 75, V.m: Valor mínimo, V.M: Valor Máximo.



Gráfica 1. Medidas de tendencia central de los resultados de Tiempo de Trombina.

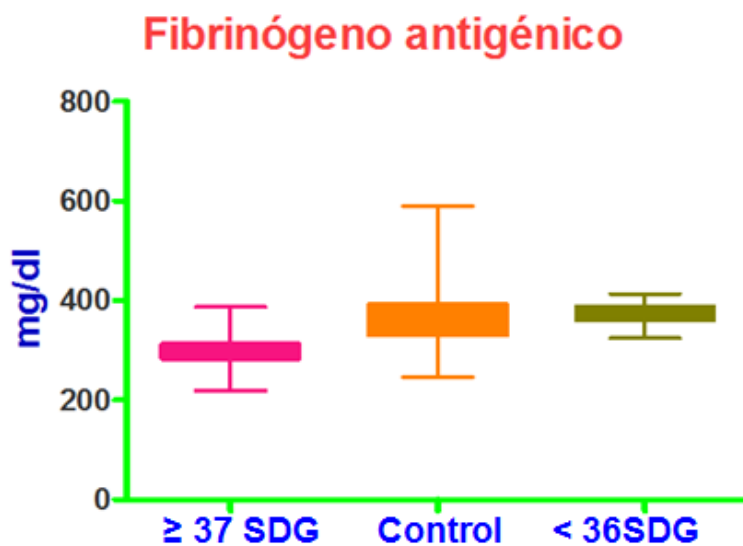
Resultados de la determinación de Ag-Fg.

Los resultados obtenidos de la concentración de fibrinógeno antigénico se muestran en la tabla 9 y gráfica 2. La concentración del Fg fue superior en las mujeres embarazadas con < 36 SDG con respecto a las mujeres con ≥ 37 SDG ($p \leq 0.05$). Por otro lado, no se observó diferencia significativa en la concentración de Fg entre el grupo control y el grupo de < 36 SDG ($p \geq 0.05$), pero si entre el grupo control con el grupo de ≥ 37 SDG ($p \leq 0.05$).

Tabla 9. Concentración de Ag-Fg.

	≥ 37 SDG N=40	Control N=44	< 36 SDG N=30
Mediana	297.5	348.265	375.5
Per 25	282	330.0825	361.75
Per 75	313	387.2925	386.5
V.m	218	246.33	324
V.M	387	589.71	413

Per 25: Percentil 25, Per 75: Percentil 75, V.m: Valor mínimo, V.M: Valor Máximo..



Grafica 2. Concentración de Ag-Fg para los tres grupos de estudio. Las gráficas de cajas muestran a la mediana y a los percentiles 10 y 90 (líneas inferior y superior, respectivamente), así como el valor de los percentiles 25 y 50 (líneas inferior y superior de la caja, respectivamente).

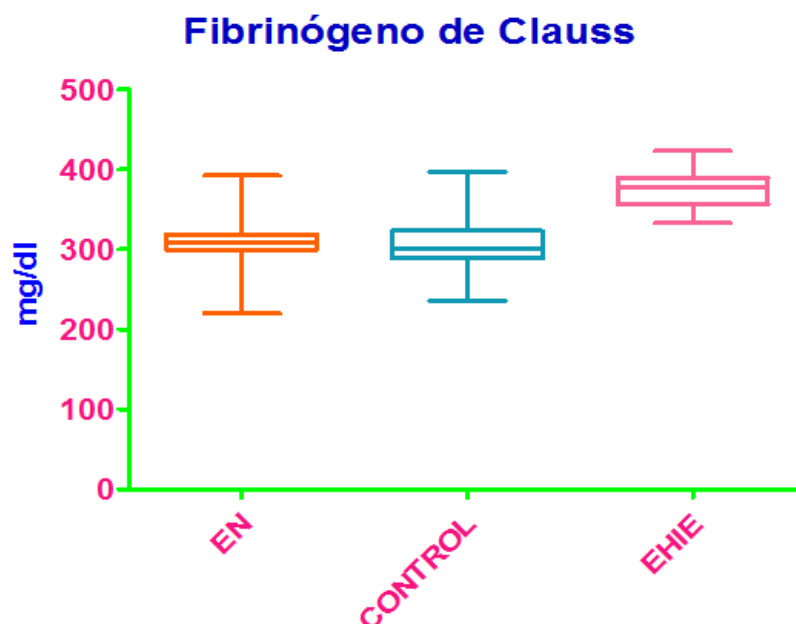
Resultados de la determinación de Fg por el método de Clauss.

En la tabla 10 y gráfica 3, se muestran los resultados obtenidos para la concentración de Fg determinada con el método de Clauss. El análisis estadístico reveló que la concentración de Fg es estadísticamente superior ($p \leq 0.05$) en el grupo de < 36 SDG con respecto a las mujeres con ≥ 37 SDG y el grupo control. Sin embargo, la concentración del Fg fue similar entre el grupo control y las mujeres embarazadas con ≥ 37 SDG ($p \geq 0.05$).

TABLA 10. Concentración de Fg por el método de Clauss.

	≥ 37 SDG N=40	Control N=44	< 36 SDG N=30
Media	306.39	305.17	375.17
Per 25	299.75	289	356.75
Per 75	318.25	323	389
D.E	26.04	35.56	23.45
V.m	220	235	333
V.M	392	397	423

Per 25: Percentil 25, Per 75: Percentil 75, V.m: Valor mínimo, V.M: Valor Máximo.



Grafica 3. Concentración de Fg antigénico para los tres grupos de estudio. Las gráficas de cajas muestran a la mediana y a los percentiles 10 y 90 (líneas inferior y superior, respectivamente), así como el valor de los percentiles 25 y 50 (líneas inferior y superior de la caja, respectivamente).

Resultados del TLE y PDF's.

Ambas pruebas se realizaron para evaluar los posibles efectos del sistema de la fibrinólisis en la concentración plasmática del Fg. Para el caso particular de los PDF's, consideramos un resultado positivo cuando se apreció aglutinación del PPP diluido 1:8 con buffer específico. Los resultados para estas pruebas se muestran en la tabla 11. El TLE fue negativo para los tres grupos de estudio, ya que la degradación de los coágulos de fibrina ocurrió después de 7 h de incubar el PPP a 37 C. En cambio, los PDF's fueron positivas aproximadamente en el 40% de las mujeres embarazadas, y negativas en las mujeres no embarazadas.

Tabla 11. Resultados del TLE y PDF's

	TLE <i>< 120 min</i> Prueba cualitativa		PDF's <i>≥ 20μg/ml</i> Prueba semicuantitativa	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
≥ 37 SDG (n=40)	0 %	100 %	37%	63 %
Control (n=30)	0 %	100 %	0%	100%
< 36 SDG (n=30)	0 %	100 %	43%	57%

Resultados del dímero D.

Esta prueba se agregó con el objetivo de evaluar la fibrinólisis. Con respecto al ensayo de DD, el 100% de las muestras del grupo ≥ 36 SDG obtuvo una concentración $\geq 3\mu\text{g/mL}$. Con respecto al grupo control y el grupo < 36 SDG, se obtuvo un 41 y 72 % respectivamente con una concentración de $0.5-3\mu\text{g/mL}$ en la prueba cualitativa. En la prueba semicuantitativa, el 100% del grupo control fue negativo y el 62% del grupo < 36 SDG volvieron a ser positivos, lo que asegura que los niveles de DD superaron los $3\mu\text{g/mL}$

Tabla 12. Resultados de la determinación cualitativa y semicuantitativa del DD.

	DD $0.5 - 3\mu\text{g/ml}$ Prueba cualitativa		DD 1:5 $\geq 3\mu\text{g/ml}$ Prueba semicuantitativa	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
≥ 36 SDG	100%	0%	100%	0%
CONTROL	41%	59%	0%	100%
< 36 SDG	72%	28%	62%	38%

DISCUSIÓN

Después de una hemorragia, el organismo inicia una serie de reacciones que culminan en la formación de un coágulo sanguíneo justo en el sitio de la lesión. El coágulo está compuesto básicamente por dos elementos fundamentales, las plaquetas y la fibrina. Las plaquetas, además de participar en la hemostasia son consideradas en la actualidad como elementos del sistema inmunológico debido a la gran cantidad de sustancias que transportan en sus gránulos las cuales contribuyen en procesos biológicos como la inflamación, apoptosis, proliferación celular entre otros. Por otro lado, la fibrina y principalmente su precursor el Fg, no han recibido de la ciencia la importancia que se merecen. De hecho, si consideramos la posición que ocupa el Fg durante la formación del coágulo, es quizás, junto con la trombina, la proteína más importante de la fase plasmática de la hemostasia, incluso más importante que factores tan renombrados como lo son los factores VIII y IX. El Fg es una proteína poco estudiada por los laboratorios clínicos que realizan diagnóstico de alteraciones hemofílicas. En parte, esto se explica por la frecuencia tan baja con la que se presenta la deficiencia del Fg; es tan rara su deficiencia que las pruebas que determinan su concentración y/o función han quedado en desuso en muchos hospitales del país y sólo en ciertas ocasiones se solicita determinar al laboratorio el TT para monitorizar la terapia antitrombótica con heparina, pero rara vez para conocer la concentración plasmática del Fg. En algunos laboratorios basta con derivar la concentración del Fg a partir del resultado del TP, lo que evidencia una vez más la importancia mínima que se le da a esta proteína, ya que la derivación de la concentración del Fg del TP sólo es de utilidad en los pacientes que no presenten datos clínicos de hemofilia o trombofilia; en otras palabras, esta prueba no debería ser usada con fines diagnósticos.

Al igual que en la trombosis, los eventos hemorrágicos tiene su origen en factores hereditarios y adquiridos. Los más conocidos son las deficiencias de los factores que inducen a la hemofilia clásica y a la enfermedad de Christmas, y con menos trascendencia, la enfermedad de von Willebrand y los desórdenes plaquetarios. El

embarazo pudiera ser otro factor de riesgo hemorrágico; sin embargo, durante muchos años se le ha relacionado directamente con el incremento del riesgo trombótico debido a los cambios que induce en diversas proteínas de la hemostasia y la fibrinólisis que hacen casi imposible suponer que la hemorragia pudiera ser inducida por el propio embarazo. El incremento de los factores hemostáticos, la disminución de las proteínas anticoagulantes naturales así como una fibrinólisis aparentemente inhibida o deficiente son algunos de los cambios que acompañan al fenotipo pro-coagulante del embarazo (O'Riordan MN, y cols. 2003; Matsouka 2005; Holmes 2005; Walker 1994). Sin embargo, a pesar de la tendencia del embarazo hacia la formación de coágulos, la principal complicación del embarazo continúa siendo la hemorragia.

La HO es un tema de salud pública en el mundo, en México, la cifra de HO supera en más de 100% la establecida por la OMS. Aun cuando en México se emplean diferentes lineamientos para disminuir esta situación, su frecuencia sigue siendo alta comparada con los países desarrollados (Arce-Herrera RM y cols. 2012). La OH y sus complicaciones son las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad al momento del parto (Malvino E. y cols. 2000). El término HO incluye a las hemorragias periparto y posparto, es decir, la pérdida hemática se puede presentar en cualquier momento (embarazo, parto, cesárea o puerperio) e indica una urgencia obstétrica grave (Briones-Garduño JC. y cols. 2014).

En este estudio se enfocó la atención en los efectos hipotéticos que podrían ocurrir al final del embarazo en la concentración plasmática del Fg. Estudios recientes han demostrado una correlación inversa entre la concentración plasmática del Fg y el riesgo hemorrágico. Por otro lado, otros estudios han demostrado que la administración de concentrados plasmáticos de Fg en mujeres embarazadas con HO no garantiza el cese de la misma (Wikkels AJ, Edwards HM y cols. 2015). Con base en estos estudios se ha sugerido que en muchos de los casos que la deficiencia del Fg no es el origen de la hemorragia, sin embargo, considerando su posición en el proceso hemostático, hay una probabilidad alta que dentro de la fisiología del embarazo se requieran ciertos niveles plasmáticos de Fg para que el fenotipo procoagulante en las mujeres embarazadas sea

suficiente para disminuir el riesgo hemorrágico, principalmente durante el alumbramiento. De esta manera, en las mujeres embarazadas portadoras de hemofilias primarias moderadas o graves el riesgo hemorrágico sería mayor que en las mujeres sin alteraciones hemostáticas. En el caso de las mujeres con hemofilias leves como suele suceder en la enfermedad de von Willebrand o en las deficiencias de los factores XI, X, V, los niveles plasmáticos del Fg al final del embarazo serán trascendentales para mantener o incrementar el riesgo hemorrágico. Es decir, quizá en una mujer no embarazada con niveles plasmáticos limítrofes o ligeramente bajos del factor de von Willebrand, y con valores normales de Fg la sintomatología clínica rara vez se manifieste. Por el contrario, si la misma mujer estuviera embarazada el riesgo hemorrágico sería mayor debido a los requerimientos de Fg al final del embarazo quizá no sean los suficientes.

De acuerdo con los resultados, las mujeres mexicanas al final del embarazo muestran niveles plasmáticos de Fg normales, sin diferencia con los observados en las mujeres no embarazadas. En cambio, si se observaron diferencias en la concentración plasmática del Fg entre las mujeres ≥ 37 SDG y las mujeres < 37 SDG; estas últimas mostraron niveles significativamente más altos de Fg, aunque los niveles plasmáticos de la proteína se mantuvieron dentro de valores normales de referencia. Esta observación, sugiere que durante el embarazo los niveles de Fg tienden a incrementar como se ha descrito en estudios previos (Prisco 2005), y que al final del embarazo por mecanismos aun no descritos los niveles plasmáticos de esta proteína tienden a disminuir hasta alcanzar niveles fisiológicos de una mujer no embarazada.

Tratando de explicar la disminución del Fg, en el presente estudio se evaluó de manera global si el embarazo inducía cambios que afectaban la síntesis o secreción de la proteína a través de la determinación de la concentración antigénica del Fg mediante una técnica de ELISA. Por otro lado, se evaluó si al final del embarazo ocurrían cambios en la función de la proteína, para lo cual hicimos uso de dos pruebas de laboratorio que evalúan la función del Fg, el TT y la concentración del Fg determinada por el método de Clauss. Como resultado se

encontró que la concentración del Fg fue similar al determinarla con la técnica de ELISA y el método de Clauss en las mujeres ≥ 37 SDG, lo que sugiere la ausencia de alteraciones en la función de la proteína. Aunque se demostró que la función del Fg no está alterada al final del embarazo, se desconoce el origen de la disminución en sus niveles plasmáticos. Estudios de expresión génica mediante RT-PCR permitirían establecer si la concentración del Fg es más baja al final del embarazo por alteraciones en la transcripción del gen del Fg, de lo contrario existe la posibilidad de que un estado de hiperfibrinólisis pudiera ser el responsable de los cambios en los niveles plasmáticos del Fg. Evidentemente, no se puede descartar que otros mecanismos relacionados con la secreción de la proteína en las células hepáticas pudieran estar involucrados. El supuesto estado de hiperfibrinólisis pudiera ser un mecanismo fisiológico que intenta compensar el estado procoagulante del embarazo y así evitar la formación de trombos. Sin embargo, en un estudio previo realizado en la UIMTHA se demostró que al final de embarazo, la fibrinólisis está activada pero no en tal magnitud para que se piense en un estado de hiperfibrinólisis (Nidia Espinoza y cols. 2014). En el presente estudio como en el previamente citado, se observó que la concentración de los PDF's y DD estaba aumentada al final de embarazo, pero con resultados negativos en el TLE. Como se describió en la introducción de esta tesis los PDF's se originan por efecto de la plasmina sobre el Fg o los monómeros de fibrina, este fenómeno biológico se desarrolla solo en aquellas situaciones en las cuales la plasmina sobrepasa los mecanismos de regulación natural condicionando que esta enzima reconozca otros sustratos no fisiológicos. El DD por su parte, se origina por efecto de la plasmina sobre los polímeros de fibrina, por lo que su presencia en el plasma es de gran utilidad clínica ya que un resultado positivo de esta prueba es indicativo de la formación de un coágulo de fibrina, el cual está siendo degradado fisiológicamente por el sistema de la fibrinólisis. De acuerdo con la anterior, los PDF's y el DD son considerados marcadores de activación del sistema de la fibrinólisis. Por otro lado, el TLE es una prueba que evalúa globalmente la presencia o ausencia de hiperfibrinólisis. Se basa en la eliminación de los inhibidores del plasminógeno para evaluar libremente el efecto de la

plasmina sobre la malla de fibrina. Por lo tanto, una prueba positiva es indicativa de un incremento en la concentración o actividad de la plasmina que se traduce en un menor tiempo necesario para que el sistema de la fibrinólisis degrade a la malla de fibrina.

Con base en todo lo anterior, de manera inicial se plantea la hipótesis de que el Fg al final del embarazo está siendo consumido por el sistema de la fibrinólisis debido al aumento en los PDF's. Sin embargo, la degradación del Fg por la plasmina no es el producto de un estado hiperfibrinolítico ya que el TLE fue negativo. Por otro lado, el aumento en la concentración del DD es el reflejo del estado procoagulante de la mujer embarazada en el cual existe una mayor producción de fibrina la cual está siendo degradada por la plasmina. Aunque la hipótesis anterior es bastante lógica, no explica el mecanismo por el cual la plasmina está degradando al Fg cuando no hay evidencia de una activación exacerbada del sistema de la fibrinólisis. Una posible explicación a lo anterior es que al final del embarazo se induzcan cambios en la proteína inhibidora activable por trombina (TAFI) la cual actúa durante la fase plasmática de la hemostasia evitando la degradación prematura del Fg por efecto de la plasmina. De esta manera, si los niveles plasmáticos del TAFI estuvieran disminuidos explicarían el por qué en el grupo de las mujeres embarazadas ≥ 37 SDG los niveles de Fg disminuyen, y por qué los PDF's se encuentran presentes en el plasma. Desafortunadamente, la hipótesis anterior sobre los niveles plasmáticos del TAFI y la supuesta contribución del sistema de la fibrinólisis en la concentración plasmática del Fg al final del embarazo quedó en desuso ya que al comparar estos resultados contra los obtenidos de mujeres embarazadas < 36 SDG encontramos que no existían diferencias en el patrón de resultados. Por consiguiente, la hipótesis de que el embarazo induce cambios que afectan la síntesis o secreción del Fg en las últimas SDG pareciera ser hasta ahora la mejor explicación para los resultados encontrados en el presente estudio.

En resumen, este estudio evidencia por primera vez que, la concentración de Fg en las últimas SDG en población mexicana disminuye hasta niveles plasmáticos basales observados en mujeres no embarazadas. De acuerdo con estudios

previos, en la mujer mexicana la concentración de Fg observada al final del embarazo pudiera explicar en parte la frecuencia alta de HO en esta población específica. Por otro lado, la disminución de la concentración del Fg en las últimas SDG pudiera ser el resultado de cambios en la síntesis o secreción del Fg y no al efecto del sistema de la fibrinólisis.

CONCLUSIONES.

1. No se detectaron alteraciones cuantitativas ni cualitativas del Fg.
2. La concentración plasmática del Fg en las últimas SDG del embarazo en la población mexicana disminuye hasta niveles plasmáticos basales.
3. El incremento en la concentración plasmática del Fg sugiere un estado procoagulante, principalmente en el grupo <36 SDG.
4. La concentración plasmática del Fg en mujeres con ≥ 36 SDG no incrementó como se esperaba.
5. El sistema fibrinolítico se encuentra activado en las mujeres embarazadas pero no en un estado de hiperfibrinólisis.

PERSPECTIVAS

1. Evaluar la concentración plasmática del Fg en los diferentes trimestres del embarazo y puerperio.
2. Esclarecer el papel de la fibrinólisis en la HO mediante técnicas más sensibles y específicas como los son la determinación de la actividad del plasminógeno, activador tisular del plasminógeno, inhibidor del activador tisular del plasminógeno, alfa 2 antiplasmina y cuantificación de los complejos plasmina-antiplasmina.

BIBLIOGRAFÍA

Ajzner E, Schlamadinger A, Kerényi A, Bereczky Z, Katona E, Haramura G, Boda Z & Muszbek L. (2009). Severe bleeding complications caused by an autoantibody against the B subunit of plasma factor XIII: a novel form of acquired factor XIII deficiency. *Blood.* , 113, pp. 723-725.

Almagro D. (2000). La hemostasia en el embarazo. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* , 16, pp. 90-98

Arce RM, Calderón E, Cruz PR, Díaz MF, Medécigo AC & Torres LP. (2012). Hemorragia obstétrica en la segunda mitad del embarazo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* ; 50(6): pp. 673-682.

Banerjee A, Chisti Y, Banerjee UC. Streptokinase-a clinically useful thrombolytic agent. *Biotechnol Adv* 2004;22:287-307.

Blombäck B. Fibrinogen and fibrin- proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* 1996; 83: 1-75.

Briones-Garduño JC, García-Ochoa ED, Díaz de León-Ponce M, Guerrero-Hernández A, Sandoval-Anaya O. Hemodinamia en hemorragia obstétrica aguda. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int* 2014;28(2):100-105.

Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *J Thromb Haemost* 1999;82:259-270.

Condie R, Ogston D. Sequential studies on components of the haemostatic mechanism in pregnancy with particular reference to the development of preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1976;83:938

Chabloz P, Reber G, Bohelen F, Hohlfeld P, Moerloose P. TAFI antigen and D-dimer levels during normal pregnancy and at delivery. *Br J Haematology* 2001;115:150-152

Chakrabarti R, Bielawiec M, Evans JF, Fearnley GR. Methodological study and a recommended technique for determining the euglobulin lysis time. *J clin Path* 1968;21:698-701.

García S, Ramírez O, Martínez M, Duración del embarazo, modificaciones de los órganos genitales y de las mamas. Molestias comunes del embarazo normal. En: Cabero L (editor). *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. Tomo I. Madrid: Editorial Panamericana. 2003:232-48.

Hale SA, Sobel B, Benvenuto A, Schonberg A, Badger GJ, Bernstein IM. Coagulation and fibrinolytic system protein profiles in women with normal pregnancies and pregnancies complicated by hypertension. *Pregnancy Hypertens* 2012;1(2):152-157.

Hoffman M. Alterations of fibrinogen structure in human disease. *Cardiovasc Hematol Agents Medicinal Chem* 2008; 6: 161-180.

Holmes V, Wallace J. Haemostasis in normal pregnancy: a balancing act? *Bioch Soc Trans* 2005;33:428-432

Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE; UK NEQAS. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: a UK NEQAS study. *JThrombHaemost*.2003; 1: 2603-8.

Kunamneni A, Abdelghani TTA, Ellaiah P. Streptokinase-the drug of choice for thrombolytic therapy. *J Thromb Thrombolysis* 2007;23:9-23.

Majluf A. Fisiología del sistema de la coagulación. Capítulo IV en Hematología Básica. 2006. Editado por Majluf A, Pérez O. Editorial Garmarte. DF, México. Pag: 163-164.

Majluf A, Lobato E. Pruebas hemostáticas. Capítulo 7 en Tópicos selectos de patología clínica. 2008. Editado por en Pérez E, Majluf A, Pérez O E. 1ra edición. Editorial Garmarte. DF, México. Pag: 121-141.

Majluf A. Mecanismos hemostáticos. Capítulo 18 en Fundamentos de hematología. 2003. Editado por Ruiz G. 3ra edición. Editorial Panamericana. DF, México. Pag: 342-344.

Majluf A. Pruebas de escrutinio hemostático. Capítulo 18 en Fundamentos de hematología. 2003. Editado por Ruiz G. 3ra edición. Editorial Panamericana. DF, México. Pag: 369-375.

Maki M, Soga K, Seki H. Fibrinolytic activity during pregnancy. Department of Obstetrics and Gynecology. *Exp Med* 1980;132:349-354.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121: 396–404.

Malvino E, Curone M, Lowenstein R, Ferro H, Korin J, Bruno C, Lantos J. Hemorragias obstétricas graves en el periodo periparto. *Med Intensiva* 2000;17(1):21-29.

Martínez C, Quintana S, Collazo J. Hemofilia. Capítulo 13 en Hemostasia y Trombosis. 2008. Editado por Martínez C, Quintana S. 2da Edición. Editorial Prado. DF, México. Pag: 307-310.

Matsouka C. Haemostatic changes during pregnancy. *Haema* 2005;8(suppl 1):S68-S71

Naidoo SS, Hathorn M, Gillman T. Fibrinolytic and antifibrinolytic activity in pregnancy. *J clin Path* 1960;13:224-225.

Neerman-Arbez M, de Moerloose P, Casini A, Congenital fibrinogen disorders: an update. Division of Angiology and Haemostasis, University Hospital, Geneva, Switzerland. 2013 Sep; 39(6):585-95

Majluf A, Nidia E, Jesús H, Evaluación de la actividad fibrinolítica en mujeres mexicanas embarazadas en las últimas semanas de gestación. UIMTHA, México D.F, 2014.

Otero A. Conceptos generales de la hemostasis. Capítulo 2 en Hemostasia y Trombosis. 2006. Editado por Otero A. 2da edición. Editorial ARENA. Montevideo, Uruguay. Pag: 37-40.

O'Riordan MN, Higgins JR. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003 Jun; 17(3):385–396. [PubMed: 12787533]

Prisco D, Ciuti G, Falciani M. Hemostatic changes in normal pregnancy. *Haematologica Reports* 2005;1(10):1-5

Quintana S, Martínez C, Ambríz Raúl. Fisiología de la coagulación. Capítulo 2 en Hemofilia. 2001. Editado por en Martínez C, Quintana S, Ambriz R. Kasper C. Editorial Prado. DF, México. Pag: 19-26.

Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 2009;7:4-13.

Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 1984 Oct 31; 52(2):176–182. [PubMed: 6084322]

Uchikova E, Ledjev I. Changes in haemostasis during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;119:185-188

Undas A, Zabczyk M, Iwaniec T. Dysfibrinogenemia: from bleeding tendency to thromboembolic disorders. *Boletim da SPHM.* 2011; 26: 5-17.

Walker I, Walker J, Colvin B, Letsky E, Rivers R, Stevens R. Investigation and management of haemorrhagic disorders in pregnancy. *J Clin Path* 1994;47:100-108

Wikkels AJ, Edwards HM y cols., “*Tratamiento preventivo con concentrado de fibrinógeno para la hemorragia postparto: ensayo controlado aleatorio*”. 2015.



IMSS

UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN TROMBOSIS, HEMOSTASIA Y ATEROGENESIS

HOSPITAL GENERAL REGIONAL CARLOS MAC GREGOR SÁNCHEZ NAVARRO

Gabriel Mancera 222, Col. Del Valle, CP 03100, Delegación Benito Juárez, México, D. F.

INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

“Evaluación de la concentración plasmática del fibrinógeno en las últimas semanas del embarazo”

La estamos invitando a participar en este estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del HGR Carlos MacGrégor Sánchez Navarro en colaboración con su Unidad de Medicina Familiar del IMSS.

La siguiente información es importante para que usted tenga un conocimiento más amplio del porqué estamos haciendo esta investigación para que pueda tomar una decisión antes de ingresar al estudio.

Usted puede hacer las preguntas que quiera acerca de este documento en el momento que así lo desee. Las alteraciones del sistema de la coagulación son complicaciones muy importantes porque pueden producir infartos, discapacidad, falla de algunos órganos, hemorragia entre otras cosas.

Por esta razón, la estamos invitando a ingresar a este estudio colaborando con muestras sanguíneas las cuales se tomaran en este preciso momento si Usted lo autoriza.

Debe Usted saber que su participación en este estudio es completamente voluntaria. Sólo le estamos solicitando nos done 17 ml aproximadamente de su sangre. Este es un procedimiento que se practica todos los días y es extraordinariamente seguro. Debe saber que no recibirá ningún pago por su participación en este estudio. Sin embargo, su beneficio es que los resultados de las pruebas que realicemos con sus muestras, nos proporcionarán datos sobre su estado de salud además del avance del conocimiento acerca de los problemas en el sistema de coagulación de las mujeres mexicanas en el embarazo, y así brindar una mejor atención a las pacientes en este estado.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

“Evaluación de la concentración plasmática del fibrinógeno en las últimas semanas del embarazo”

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio. Además, he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma de la participante

Fecha



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN TROMBOSIS, HEMOSTASIA Y ATEROGENESIS

HOSPITAL GENERAL REGIONAL CARLOS MAC GREGOR SÁNCHEZ NAVARRO

Gabriel Mancera 222, Col. Del Valle, CP 03100, Delegación Benito Juárez, México, D. F.

HOJA DE CAPTURA DE DATOS

“Evaluación de la concentración plasmática del fibrinógeno en las últimas semanas del embarazo”

Número	
Fecha	
Nombre	
Filiación	
Dirección	
Teléfono	
Caja	
Peso (Kg)	
Talla (cm)	
Presión	
Grupo Sanguíneo	
Edad (años)	
Glucosa	
Creatinina	
Proteína C reactiva	
No. Embarazos	
No. Partos	
No. De Cesáreas	
No. Abortos	
Edad gestacional (semanas)	
Hipertensión arterial	
Edema	
Convulsiones	
Diabetes	
Enfermedades antes del embarazo	
¿Usa anticoagulantes tomados (acenocumarina o wararina) o inyectado (enoxaparina o nadroparina)?	
¿Usa ácido acetil salicílico o clopidogrel?	
¿Tiene pre-eclampsia?	
¿Tiene eclampsia?	
¿Ha tenido alguna de estas dos?	
¿Le han puesto sangre o plasma?	
¿Ha tenido hemorragia en este u otros embarazos?	
¿Ha tenido hemorragia importante sin estar embarazada?	
Otros datos importantes:	

INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO.

“Evaluación de la concentración plasmática del fibrinógeno en las últimas semanas del embarazo”

Esta carta es para informarle porque le estamos solicitando su ayuda en la elaboración del trabajo de investigación **“Evaluación de la concentración plasmática del fibrinógeno en las últimas semanas del embarazo”**. Con la sangre que Usted nos done haremos las pruebas necesarias para obtener un control referencial a tal estudio. La sangre que Usted donará se obtendrá con material completamente nuevo por lo que no corre ningún riesgo de contraer alguna enfermedad. Asimismo, la cantidad de sangre que se extraerá es mínima (17 ml aproximadamente) y no debe causarle otra molestia más que el de la aguja. Los datos que le solicitamos son únicamente con propósitos de investigación y también nos servirán para que en caso de que Usted tenga alguna alteración, sea informado inmediatamente para que reciba consejo médico. Ninguna de las muestras que le tomemos será utilizada para obtener ganancias de ninguna clase, ya que la información que se obtenga de su sangre sólo será utilizada para fines científicos.

Le agradezco de antemano su colaboración.

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

pQFB Víctor Manuel Domínguez Reyes.

Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis.

HGR 1 Carlos MacGregor, IMSS, Distrito Federal

HOJA DE ACEPTACIÓN PARA DONAR UNA MUESTRA SANGUINEA.

“Evaluación de la concentración plasmática del fibrinógeno en las últimas semanas del embarazo”

Por medio de este conducto, yo _____

Certifico que estoy enterado del estudio denominado **“Evaluación de la concentración plasmática del fibrinógeno en las últimas semanas del embarazo”**. Para este estudio se me ha pedido que done 17 ml aproximadamente de sangre, en el conocimiento de que el material con que se me extraiga la sangre es nuevo. Asimismo, se me informó que mi sangre y los resultados que se obtengan de ella, sólo serán utilizados con fines científicos y no se les dará ningún uso comercial. Asimismo se me informó que, en caso de que yo presente alguna alteración en mi sangre, se me dará aviso inmediatamente de ella.

Lugar _____

Fecha _____

firma

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN TROMBOSIS, HEMOSTASIA Y
ATEROGÉNESIS**

LABORATORIO DE COAGULACIÓN

Donador número

Nombre

Teléfono

Edad

Grupo sanguíneo ¿lo conoce?

¿lo NO SI

SI

¿Cuál es?

¿Utiliza

anticonceptivos?

NO SI

¿Ingiere hormonas?

NO SI

¿Ha

embarazada?

estado NO SI

¿Ha tenido abortos?

NO SI

¿Es hipertensa?

NO SI

Enfermedad importante

¿Fuma?

NO SI

¿Toma alguna bebida alcohólica?

NO SI

¿Tiene antecedente de haber tenido coágulos (Trombosis, Embolia)?

NO SI

¿Toma algún anticoagulante?

¿Le han transfundido sangre o plasma?

¿Alguna hemorragia importante?