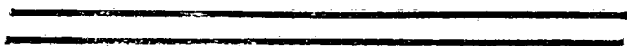


Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



INHIBIDORES ADQUIRIDOS AL FACTOR VIII

EN NIÑOS CON HEMOFILIA CLASICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

J. AMPARO MAGAÑA PEREZ

MEXICO, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
GENERALIDADES	5
MATERIAL Y METODOS	31
RESULTADOS	49
DISCUSION	59
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	62

INTRODUCCION

Los inhibidores adquiridos a los factores de la coagulación son una causa bien definida de la enfermedad hemorrágica. Han sido descritos inhibidores de los factores I, V, VIII, IX y XIII siendo el más común y el de mayor trascendencia el inhibidor del factor VIII, el cual tiene la capacidad de inactivar la función procoagulante del citado factor, dificultándose en gran parte el tratamiento del paciente hemofílico.

El inhibidor del factor VIII ha sido encontrado en cuatro situaciones clínicas: (1,2) .

1.- En pacientes hemofílicos sometidos a transfusiones de concentrados de factor VIII.

2.- En pacientes con trastornos autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y en personas que presentan reacción a la penicilina.

3.- En mujeres jóvenes después de un año de postpartum.

4.- En individuos aparentemente sanos pero de edad avanzada.

Desde el punto de vista clínico y de diagnóstico es muy importante la detección oportuna del inhibidor, pues facilitará en gran parte el pronóstico y las medidas terapéuticas a emplear durante los episodios de sangrado y antes de practicar-

cualquier procedimiento quirúrgico.

Durante muchos años la detección del inhibidor representó una gran problemática, ya que no se contaba con los métodos apropiados para la purificación del inhibidor surgiendo la necesidad de investigar ensayos más adecuados y prácticos que permitieran su cuantificación.

Los métodos utilizados para poner de manifiesto la presencia del inhibidor son muy variados, pero todos se basan en la utilización de una mezcla de incubación del plasma del paciente con plasma normal, teniendo sus variantes principales en el empleo de soluciones amortiguadoras, tiempo de incubación de la mezcla de plasmas y el tipo de prueba de coagulación utilizada.

Los primeros ensayos para cuantificar el inhibidor se iniciaron en 1959 con Biggs y Bidwell quienes utilizaron muestras de incubación con factor VIII bovino y plasma humano con inhibidor, Una vez implantadas las primeras bases para la cuantificación del inhibidor, durante la década de los sesentas surgieron más metodologías con la misma finalidad, pero no fue sino hasta 1975 en que la Dra. Kasper estandarizó un método, hoy conocido como método de las unidades Bethesda.(3).

El presente trabajo es un estudio de 50 niños con hemofilia tipo A en sus distintos grados, clínicos, donde la ma-

yoría de los cuales habían sido expuestos en una o más ocasiones a transfusiones con concentrados de factor VIII.

El estudio fué realizado en el laboratorio de coagulación del servicio de análisis clínicos del Hospital General del Centro Médico la Raza, (I.M.S.S.) en un período comprendido entre junio de 1981 y septiembre de 1982.

Los análisis de laboratorio incluyeron:

- a) Tiempo de tromboplastina parcial activado.
- b) Actividad del factor VIII.
- c) Detección y cuantificación de inhibidores del fac
tor VIII.

OBJETIVOS

- 1.- Investigar la presencia de inhibidores al factor VIII en pacientes con hemofilia tipo A en sus distintos grados clínicos.
- 2.- Obtener a "grosso modo" una incidencia del inhibidor en la población pediátrica de la zona norte del D.F.
- 3.- Dar a conocer una de las técnicas más apropiada y rápida para la detección del inhibidor al factor VIII.
- 4.- Hacer una revisión lo más actualizada posible del tema.

GENERALIDADES

Los trastornos hemorrágicos que representan una u --- otra forma de hemofilia son conocidos desde hace siglos. La -- primera información de éstos apareció alrededor de 500 años -- a.c. en el Talmud y escritos rabínicos. La ley hebrea excusaba al niño del rito de la circuncisión si sus hermanos habían san grado copiosamente después de la misma(4).

Hacia el siglo XII, Maimonides reconoció que la enfer medad era transmitida por la madre asintomática y, no fué sino hasta 1828 en que a este trastorno se le aplicó el nombre de - hemofilia, diagnóstico basado exclusivamente en la historia fa miliar, ya para 1893, mediante un nuevo estudio se determinó - el tiempo de coagulación prolongado.

En los siguientes 50 años se realizaron otras impor tantes observaciones, tales como acortamiento del tiempo de -- coagulación al adicionar plasma normal al plasma hemofílico. - El defecto de coagulación en la hemofilia estaba condicionado por el retraso en la conversión de protrombina a trombina y la corrección del tiempo de coagulación con transfusión de sangre normal.

En 1937 Patek y Taylor designaron a la fracción del - plasma normal que corregía las alteraciones de la coagulación de la sangre de los hemofílicos, como globulina antihemofíli--

ca.

En 1947 Pavlosky señaló que la adición in vitro de -- sangre de un hemofílico a la sangre de otro, a veces lograba -- tiempos de coagulación normales. Aggeler y colaboradores, así -- como Biggs y colaboradores, comprobaron más tarde que era ne -- cesario admitir la existencia de un factor hasta entonces des -- conocido. La ausencia de tal factor producía un síndrome que -- clínicamente no podría distinguirse de la hemofilia.

En 1952, se hizo un nuevo ensayo para la cuantifica -- ción de la globulina antihemofílica, hoy conocida como prueba -- de generación de la tromboplastina encontrándose por medio de -- ésta, que había una deficiencia de globulina antihemofílica, -- actualmente conocida como factor VIII.

En este mismo año se reconoció a la hemofilia como un padecimiento transmitido recesivamente ligado al cromosoma X.

La hemofilia A o hemofilia clásica es una enfermedad -- hemorrágica hereditaria, producida por un trastorno genético -- resultante de la mutación ocasional de un gen del cromosoma -- sexual X, esta mutación da lugar a la ausencia de un elemento -- importante en el proceso de la coagulación sanguínea motivando que las hemorragias provocadas o espontáneas se prolongen y en ocasiones sean incontenibles.

La enfermedad se presenta casi exclusivamente en el -- hombre y menos frecuente en las mujeres, se caracteriza por --

una disminución en la actividad biológica del factor VIII. Es transmitida a través de las mujeres portadoras del gen afectado por la hemofilia el cual está localizado en el cromosoma sexual X. Las mujeres portadoras frecuentemente no muestran efectos clínicos y transmiten la enfermedad al 50% de sus hijos varones siendo portadoras el 50% de sus hijas. (5,6)

Figura No. 1

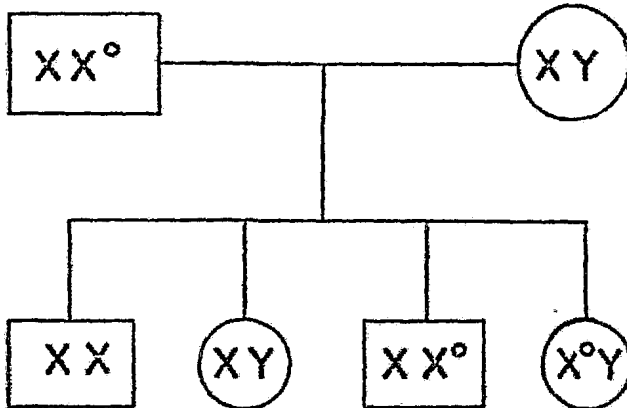
Las características de transmisión están dadas por -- la fracción procoagulante de la globulina antihemofílica la cual está unida al cromosoma sexual X. Se presenta en varios grados clasificandose usualmente como: severa, moderada y -- leve dependiendo de la cantidad de factor VIII biológicamente activo que esté presente. Los hemofílicos severos tienen menos del 1% de actividad de factor VIII y están expuestos a -- sangrados espontáneos en musculos, articulaciones y membranas mucosas.

La forma moderada aparece con niveles de factor VIII del 2 al 5% y ocupa una posición intermedia con respecto a -- los síntomas . Los hemofílicos leves alcanzan niveles de factor VIII del 5 al 30% y no sufren de sangrados espontáneos ni hemartrosis; únicamente tienen dificultades cuando los mecanismos hemostáticos son alterados por extracciones dentarias o procedimientos quirúrgicos (7,8,9)

TRANSMISION GENETICA DE LA HEMOFILIA

MUJER
PORTADORA

HOMBRE
NORMAL

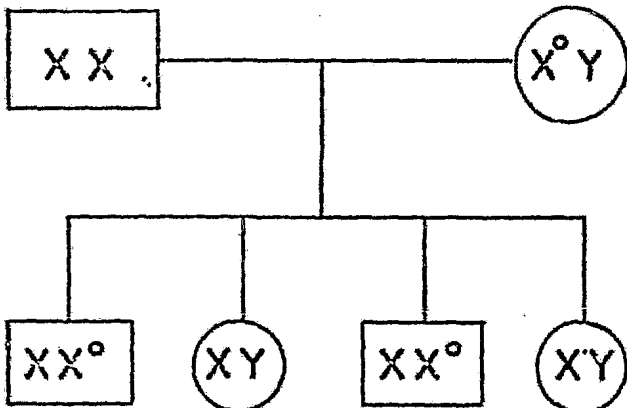


1.-EL 50% DE LAS HIJAS
SON PORTADORAS

2.-EL 50% DE LOS HIJOS
SON HEMOFILICOS

MUJER
NORMAL

HOMBRE
HEMOFILICO



1.-TODAS LAS HIJAS SON
PORTADORAS

2.-TODOS LOS HIJOS SON
NORMALES

Figura No. 1

SINTESIS DE FACTOR VIII

El sitio de síntesis de la globulina antihemofílica continúa siendo en la actualidad un enigma pese a las numerosas investigaciones que se han realizado tratando de aclarar su sitio exacto de producción. Los resultados obtenidos de los diversos estudios efectuados, han llevado a pensar que dicho factor es producido por algún tejido que está diseminado en el organismo y en este sentido se ha implicado al tejido linfóide y al endotelio vascular. Estudios de perfusión y trasplante de tejidos apoyan la hipótesis de que el factor VIII procoagulante (FVIII:C) es liberado por el hígado (10).

El factor VIII o globulina antihemofílica es una glicoproteína compleja, presente en el plasma, tiene un alto peso molecular de aproximadamente dos millones de daltons y participa en la vía intrínseca de la coagulación. Esta disminuida o ausente en los trastornos hemorrágicos de la hemofilia clásica.

Generalmente es aceptado el hecho de que el factor VIII acelera la coagulación de la sangre por su papel de cofactor en la activación enzimática del factor X por el factor IX activado; en presencia de fosfolípidos y calcio iónico el factor VIII aumenta en forma marcada la reacción. En ausencia de factor IX activado no tiene ninguna capacidad intrínseca -

para activar al factor X, parece ser que la activación por la trombina es esencial para la activación del factor VIII (11).

Dos funciones importantes del factor VIII purificado se han encontrado:

1.- Una actividad procoagulante que tiene la propiedad de corregir el tiempo de tromboplastina parcial activado del plasma hemofílico A.

2.- Una actividad von Willebrand que tiene la habilidad de corregir in vitro la retención plaquetaria anormal - en una columna de perlas de vidrio y la agregación plaquetaria anormal con ristocetina que se encuentran en el Von Willebrand (5,12).

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

El factor VIII humano emigra electroforéticamente entre las alfa 2 y las beta globulinas, ha sido descrito por varios autores como una alfa 2 lenta, una prebeta e incluso como una beta globulina. Su coeficiente de sedimentación se ha estimado que oscila entre 7S y 21S, tiene un espectro de absorción en el campo ultravioleta distinto a la mayoría de las proteínas con valores que van entre los 255 y 278 nm, esto puede ser debido a dos factores; al efecto de dispersión de la luz de una gran molécula o bien a su contenido relativamente bajo en tirosina (13).

Su actividad no se presenta en el suero, ni puede ser adsorbido por adsorbentes inorgánicos, es precipitado del plasma por sulfato de amonio, también precipita junto con el fibrinógeno en alcohol o por procedimientos de fraccionamiento con eter, puede ser precipitado del plasma junto con otras crioproteínas a bajas temperaturas.

COMPOSICION QUIMICA.

El análisis químico realizado por varios autores demostró que la globulina antihemofílica contiene, aproximadamente un 75% de aminoácidos, un 11% de carbohidratos y un 11% de lípidos de los cuales el 7% son fosfolípidos y el resto lípidos neutros (14).

Los carbohidratos que la constituyen son principalmente hexosas hexosaminas y ácido neuroamínico.

Entre los aminoácidos que la constituyen se encuentran, lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, tirosina y fenil alanina.

ESTRUCTURA MOLECULAR.

Hasta hace pocos años eran escasos los conocimientos sobre la estructura molecular del factor VIII, pero actualmente basándose en hallazgos genéticos, clínicos y de laboratorio de las distintas enfermedades en las que resulta afectada su síntesis fundamentalmente la enfermedad de von Willebrand y la hemofilia A. Se ha aceptado que el factor VIII es un complejo de dos componentes que tienen distintas funciones, bioquímicas, inmunológicas y de control genético (15) Figura No. 2

El primer componente es la fracción procoagulante de la molécula y es conocida como factor VIII: C o factor antihemofílico, contiene la propiedad coagulante y es inactivada por anticuerpos humanos a la globulina antihemofílica, puede ser medida por métodos inmunológicos como antigéno del factor VIII, procoagulante (FVIII: CAg) cuando estos reactantes son empleados para inmunoensayos.

La otra fracción constituye la mayor parte de la masa

protéica, la cual interactúa con las plaquetas de tal manera que promueve la hemostasis primaria y, puede ser inmunoprecipitada por antisueros heterólogos. Usualmente es designada -- como proteína relacionada al factor VIII (FVIII: RP) o factor Von Willebrand pues está reducido en cantidad o es cualitativamente anormal en la enfermedad de Von Willebrand (15).

EL COMPLEJO F VIII DEL PLASMA

CROMOSOMA X

? SITIO DE SINTESIS



AUTOSOMA

SITIO DE SINTESIS
a) células del endotelio
b) megacariocitos



VIII: C

SUBUNIDAD VIII R

POLIMERO VIII R

(VIII: C) (POLIMERO VIII R)

ESTA INTERPRETACION ESQUEMATICA INDICA LA INTERACCION DE LOS DOS COMPONENTES Y SU CONTROL GENETICO.

Figura No. 2

INMUNOLOGIA DE LOS INHIBIDORES DEL FACTOR

VIII.

El desarrollo de anticuerpos anti-factor VIII (Inhibidores), son reconocidos en un pequeño porcentaje de pacientes hemofílicos politransfundidos, quienes se vuelven resistentes a la terapia. Anticuerpos similares son identificados como anticoagulantes espontáneos, en sujetos que no tienen -- historia familiar o personal de un trastorno de sangrado; sino más bien en mujeres jóvenes durante su primer año de postpartum, desordenes de la piel en enfermedades linfoproliferativas, en enfermedades con características autoinmunes tales como; artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enteritis regional, reacción a la penicilina y en personas aparentemente sanas de edad avanzada. (16)

Los inhibidores del factor VIII son inmunoglobulinas que actúan sobre la fracción procoagulante de la globulina -- antihemofílica, inactivando su función coagulante. (17)

Su existencia es aproximadamente de un 7% a un 20% -- de los pacientes con hemofilia A (18). No esta bien entendido porque este porcentaje de hemofílicos tiene tales inhibidores pero estan claramente relacionados a la exposición del factor VIII transfundido. Algunos pacientes desarrollan inhibidores -- después de una simple transfusión; sin embargo, en niños, la-

incidencia acumulativa parece aumentar con incremento a la exposición de productos sanguíneos. (19, 20).

La formación de inhibidores también parece estar causada en personas que recibieron cantidades muy grandes de concentrados de factor VIII, algunos pacientes presentan títulos bajos del inhibidor y pueden ser tratados apropiadamente con concentrados de factor VIII aunque ellos requieran grandes cantidades a intervalos más frecuentes.

Cuando un paciente no es expuesto a productos sanguíneos por periodos prolongados, el título del inhibidor puede llegar a niveles bajos sin embargo cada nueva transfusión puede causar la formación de un anticuerpo sin que los inmunosupresores a grandes dosis puedan evitar la respuesta anamnésica. (21)

Una vez que los pacientes son inmunizados, las transfusiones posteriores causan una respuesta típica después de una fase lenta de cinco a siete días incrementando el título del anticuerpo hasta llegar a su máximo entre la primera y la segunda semana de postranfusión, declinando progresivamente cuando la estimulación antigénica es descontinuada (22).

Se sabe que una vez inmunizados cada paciente presenta una reacción diferente ante sucesivas exposiciones al antígeno, en algunos casos ante un nuevo estímulo antigénico responden según respuesta anamnésica secundaria con grandes ele --

vaciones del anticuerpo, mientras que en otros esta respuesta es mínima o está ausente. En base a ésta se han distinguido dos tipos de pacientes; los de alta respuesta y los de baja respuesta, adoptándose como de alta respuesta aquellos cuyo título del inhibidor es mayor de cinco unidades y, como de baja respuesta aquellos con un título menor de cinco unidades, sin embargo los factores que disparan la respuesta inmune permanece aún desconocida (23)

Los niveles del inhibidor pueden ser muy variables, -- algunos pacientes responden a la exposición de factor VIII con una actividad considerablemente elevada y, otros solo moderadamente, esta tendencia a presentar niveles altos o bajos no parece ser un rasgo hereditario ya que han sido observados ambos tipos de respuesta en hermanos (18).

Cuando títulos altos del inhibidor están presentes en el paciente hemofílico, el tratamiento convencional es poco satisfactorio pues el factor VIII transfundido es rápidamente -- inactivado. Se han efectuado ensayos combinando transfusiones -- masivas de factor VIII con plasmaféresis para disminuir el anticuerpo circulante pero estos han sido inútiles. Varias drogas inmunosupresoras también han sido utilizadas para tratar de prevenir una respuesta anamnésica o disminuir el título del anticuerpo pero tampoco han sido del todo eficaces (18, 21, 24).

Desde el punto de vista terapéutico es muy importante

conocer el tipo de respuesta de cada paciente, aquellos en que ésta es nula o baja pueden ser tratados en sus complicaciones o accidentes como los hemofílicos sin inhibidores, mientras que los de alta respuesta plantean una problemática diferente.

Con respecto a las propiedades y características de -- estos anticuerpos anti factor VIII se sabe poco, debido a que -- es un tema que esta aún en estudio. Sin embargo se conocen de -- manera definitiva algunas características de ellos.

Su naturaleza y propiedades han sido estudiadas por un conjunto de técnicas inmunológicas que van desde inmunoprecipitación con antisueros específicos, electrofóresis, inmunoneutralización entre otras.

Mediante técnicas immunoquímicas se ha demostrado que contienen una composición inmunoglobulínica altamente restringida, aunque ninguno ha sido todavía comprobado que tenga una composición perfectamente homogénea como la proteína del mieloma por ejemplo, sino más bien diferente a la población de anticuerpos que aparecen después de la inyección con proteínas extrañas (25).

Sus propiedades inhibitorias se han estudiado por técnicas de inmunoneutralización mediante antisueros específicos -- para clases de inmunoglobulinas humanas (Ig) de cadena pesada y tipos de cadena ligera, encontrando que los inhibidores descubiertos en los pacientes hemofílicos estan confinados a las clases IgG y raramente a la clase IgM; usualmente a una cadena de tipo ligera, que en la mayoría de los casos es del tipo Kappa. (26,27).

En investigaciones inmunológicas con subclases de cada una de las gamas se demostró que el inhibidor al factor VIII es una inmunoglobulina de la clase IgG4 en la mayoría de los casos y no fijan complemento. En algunas ocasiones también se ha encontrado subclase IgG3. (27, 28, 29).

Estudios realizados por S. Straus y cols, mostraron -- que el inhibidor es una gamaglobulina capaz de soportar temperaturas hasta de 65°C durante 30 min. y que cuando el inhibidor reacciona con el factor VIII su interacción es óptima a un p.H. de 7.5 incrementando con la temperatura, donde la reacción antígeno-anticuerpo es dependiente de la concentración relativa --- de los reaccionantes (30).

Estas investigaciones sentaron las bases para concluir que el inhibidor debe ser considerado como un anticuerpo, pues además puede ser removido por precipitación con antisueros de conejo antigamaglobulina G. lo cual fué reforzado con las siguientes observaciones:

1.- La actividad inhibitoria reside en el fragmento -- Fab obtenido por digestión de las gamas globulinas con papaína.

2.- El nivel del inhibidor incrementa rápidamente después de una transfusión sanguínea disminuyendo lentamente al nivel preinfusional.

3.- Pequeñas cantidades del inhibidor son inactivadas por plasma normal.

4.- Cuando existen altas concentraciones del inhibidor cantidades significativas de factor VIII son inactivadas y la mezcla de prueba puede estar prolongada aún sin incubación.

La velocidad de reacción inhibidor factor VIII es dependiente de la temperatura de incubación, siendo más rápida entre 35° y 40°c y es progresiva con el tiempo y la cantidad de factor VIII residual después del periodo de incubación, es proporcional a la concentración de ambos (30).

La posible reacción del inhibidor con el factor VIII ha sido incorporada por Leon W. Hoyer a un modelo esquemático de la molécula de factor VIII normal. La reacción está basada en estudios inmunológicos realizados sobre los sitios de actividad procoagulante y factor Von Willebrand empleando anticuerpos antifactor VIII humano y de conejo.

Los anticuerpos antifactor VIII humano reaccionan con los determinantes antigénicos designados como "H" mientras que los de conejo reaccionan con los determinantes antigénicos designados como R1 y R2 (31).

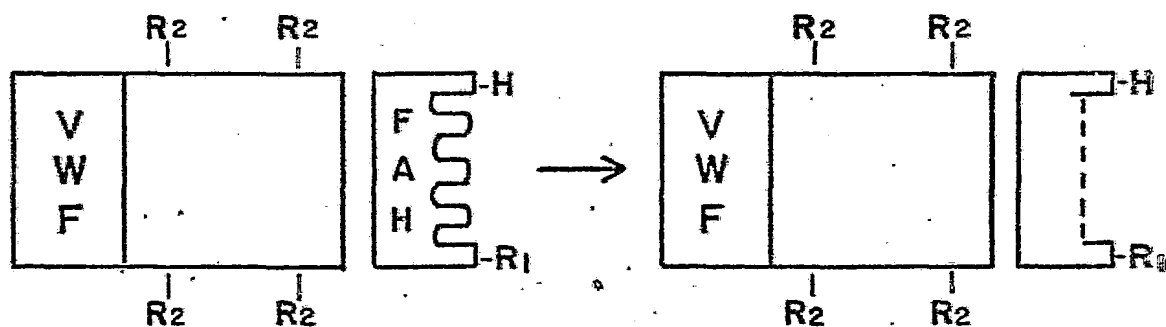
Figura No. 3

Otros autores consideran que la inactivación de la fracción procoagulante de la molécula del factor VIII por el inhibidor se debe probablemente a su habilidad para enlazar específicamente a los determinantes antigénicos próximos al sitio

de actividad biológica de la molécula (32).

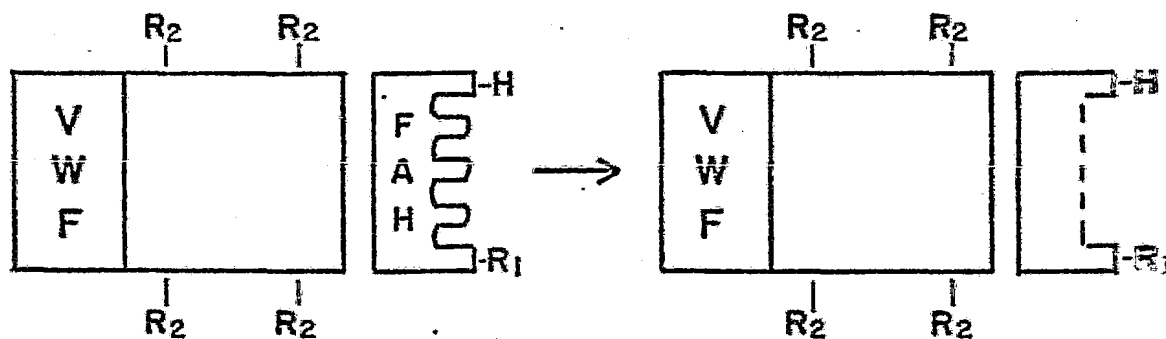
El tiempo requerido para la desaparición del inhibi -
dor en ausencia del estímulo antigénico no está bien documentado. En algunos casos se ha observado una persistencia que va -
de meses hasta años.

PROBABLE REACCION INMUNOLOGICA DEL INHIBIDOR CON EL FACTOR VIII.



LA REACCION DEL ANTICUERPO ANTI FACTOR VIII SE REALIZA CON EL DETERMINANTE ANTIGENICO H y

LA FRACCION PROCOAGULANTE ES INACTIVADA POR EL ANTICUERPO ANTI FVIII HUMANO.



CON EL SUERO ANTI FACTOR VIII OBTENIDO EN CONEJOS LA INACTIVACION SE REALIZA SOBRE EL SITIO ANTIGENICO R1 y R2

LA FRACCION PROCOAGULANTE ES INACTIVADA POR EL ANTICUERPO ANTI FVIII OBTENIDO EN CONEJOS.

Figura No. 3

ETIOLOGIA

Se han expuesto varias teorías para explicar el desarrollo de inhibidores del factor VIII, en el paciente hemofílico, pero hasta la fecha se desconoce su mecanismo de producción. Algunos autores lo relacionan con la cantidad de factor VIII administrado, considerando que éste puede constituir una sustancia antigénica por el cual se desarrolla un anticuerpo contra el factor VIII humano. Sin embargo, se ha observado que no todos los pacientes sometidos a terapia de reemplazo, desarrollan inhibidores y es además imposible decir quienes lo harán.

La razón por la cual únicamente ciertos pacientes llegan a desarrollar el inhibidor no ha sido aún explicada y se considera que esto puede depender de varios factores como; el grado de exposición, a mayor cantidad de crioprecipitados parece haber mayor incidencia, la tolerancia y reacción inmunológica de cada individuo y por último algún polimorfismo genético (33).

Los hemofílicos severos son los más afectados por la presencia de estos inhibidores, llegando a presentar en algunos casos títulos muy altos del anticuerpo, los cuales persisten por meses o por años causando una respuesta anamnésica típica ante sucesivas exposiciones a concentrados de factor VIII.

Se ha visto que los hemofílicos moderados raramente desarrollan inhibidores y en los pocos casos en que lo hacen éstos son de carácter débil y no están sujetos a elevaciones anamnésicas por tratamiento.

En algunos casos de hemofilia leve se han detectado inhibidores que desaparecen espontáneamente sin manifestación de respuesta anamnésica por una nueva aplicación de factor VIII. En ocasiones los niveles de factor VIII llegan a cero y las manifestaciones clínicas predominantes son las de una hemofilia severa (34).

El comportamiento del inhibidor en hemofilias graves y leves es diferente ya que en estas últimas, desaparece en un periodo de tiempo mucho más corto, aproximadamente tres meses. Su actividad es detectada después de uno o dos meses de efectuada la transfusión y los estudios inmunológicos han demostrado que al igual que en los casos graves el anticuerpo es una inmunoglobulina del tipo IgG. (34)

INCIDENCIA

En la última década se ha incrementado el conocimiento acerca de los inhibidores en pacientes con hemofilia clásica. Sin embargo, aún existe una gran variación en cuanto a la incidencia reportada, y así tenemos publicaciones en que se informa una incidencia de inhibidores hasta de un 21% cuando los estudios se han llevado a cabo en pacientes hemofílicos graves (18). Cuando dicha incidencia se calcula con referencia al número total de hemofílicos las cifras obtenidas son mucho más bajas, entre 4 y 6%. (35)

Kasper, de 1967 a 1972, llevó a cabo un estudio en una población pediátrica con hemofilia A severa en el hospital de ortopedia de los Angeles, California y encontró que el 14.6% de los niños menores de 10 años presentaron inhibidores (19).

Biggs, haciendo un estudio semejante en grandes series de pacientes de la misma edad, descubrió una incidencia del 6.2% lo cual nos da una variación en la frecuencia general.

La Unidad de hemofilia "La Paz" en Madrid, España, reporta una incidencia de inhibidores del 7.04% tomando en consideración el total de los hemofílicos. Cuando solo se toma en cuenta pacientes con hemofilia severa, la incidencia es

del 11.0% (36).

La mortalidad tampoco ha sido reportada adecuadamente y ésto pudiera ser significativo desde el punto de vista clínico, ya que la mayoría de los anticuerpos se presentan por -- grave deficiencia del factor VIII.

CUANTIFICACION DEL INHIBIDOR SEGUN EL METODO DE KASPER

Los inhibidores del factor VIII usualmente son cuantificados por una mezcla de incubación del plasma del paciente, - diluído o sin diluir con un volumen igual de plasma normal como fuente de factor VIII, empleando durante el ensayo un control negativo preparado con plasma normal y solución amortiguadora de Imidazol pH 7.3 en una relación de 1:1. Las mezclas de incubación se colocan durante 120 min. a 37°C al cabo de los -- cuales se determina la actividad del factor VIII.

La actividad del factor VIII de la mezcla de incubación plasma del paciente más plasma normal, es dividida entre la actividad del factor VIII de la mezcla de incubación normal más solución amortiguadora para obtener el factor VIII residual.

Si el plasma problema no tiene inhibidor la actividad del factor VIII en la mezcla plasma del paciente mas plasma normal será igual a la del control negativo y la actividad del factor VIII residual será del 100%. Si el plasma del paciente tiene inhibidor, la actividad del factor VIII en la mezcla plasma del paciente mas plasma normal será menor que la del control negativo y la actividad del factor VIII residual será menor del 100%.

Si la actividad del factor VIII residual es cercana --

al 100% se utiliza un método más sensible de tal manera que --
 pueda confirmar la ausencia del inhibidor si clínicamente se --
 sospecha que existe una acción inhibitoria sobre el factor --
 VIII del paciente. Se ha observado que en tales casos, una mezcla
 de cuatro partes del plasma del paciente con una parte del --
 plasma normal (4:1) ofrece una gran sensibilidad permitiendo --
 la detección de inhibidores hasta de 0.3 unidades Bethesda --
 (37, 38)

Quando la actividad del factor VIII residual se en --
 cuenta entre 75 y 25% las unidades de inhibidor pueden ser --
 leídas directamente de la gráfica, pero si la actividad del --
 factor VIII residual es menor del 25% se harán diluciones geo-
 métricas (cuantas sean necesarias), del plasma del paciente --
 con solución amortiguadora hasta que el factor VIII residual --
 pueda ser incorporado a la curva tipo. En este caso las unida-
 des del inhibidor se multiplican por el factor de dilución ---
 del plasma para obtener la cifra total de unidades presentes, --
 por ejemplo si se hizo una dilución 1:5 del plasma del pacien-
 te y después de la incubación se encontró un 35% de factor ---
 VIII residual el cual corresponde en la curva tipo de las uní-
 dades Bethesda a 1.5 unidades de inhibidor éstas se deben ---
 multiplicar por el factor de dilución que en este caso es 5, --
 por lo tanto $1.5 \times 5 = 7.5$ unidades Bethesda por ml. Este método

do de Kasper también se conoce como método de las unidades Bethesda y es el más apropiado para la medición de los inhibidores producidos en los hemofílicos, aunque como ya se mencionó, puede no detectar algunos inhibidores débiles que sin embargo son clínicamente significativos.

Este método define una unidad Bethesda como la cantidad que inhibe el 50% de factor VIII presente en la mezcla de plasma del paciente plasma normal después de 120 min. de incubación.

Durante los ensayos para la cuantificación del inhibidor se ha observado que el tipo de factor VIII utilizado y la especificidad de la especie del anticuerpo tiene una gran influencia en la sensibilidad de la prueba; muchos inhibidores son menos potentes en presencia de factor VIII bovino y porcino que en presencia de factor VIII humano por lo cual se recomienda la utilización de factor VIII humano como sustrato durante los ensayos de detección de inhibidores al factor VIII (9).

CURVA TIPO PARA LAS UNIDADES BETHESDA.

La curva tipo para las unidades Bethesda es una gráfica similar a la descrita por Biggs y Bidwell (1959) y se traza en papel semilogarítmico bajo los siguientes parámetros: En el eje logarítmico, por ciento de actividad del factor VIII residual; en el eje aritmético, unidades Bethesda por ml. de plasma.

Esta curva está basada en un título de inhibidor de 0 a 2.0 unidades Bethesda, por lo tanto solo pueden leerse los resultados comprendidos en el rango de 75 y 25% de factor VIII residual.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo representa el estudio de 50 niños con hemofilia A en los distintos grados clínicos de la enfermedad que concurrieron al servicio de Hematología Pediátrica del Hospital General del Centro Médico La Raza (IMSS). Las características de los pacientes estudiados fueron: Pacientes de sexo masculino con hemofilia A, con edades comprendidas entre 1 y 15 años, en los que la mayoría de ellos recibieron en una o más ocasiones trasfusiones con crioprecipitados o concentrados de factor VIII.

El control del estudio se realizó con 30 niños que concurrieron al servicio de Pediatría del mismo Hospital, para la realización de exámenes preoperatorios, sin que ninguno de ellos cursara aparentemente con algún trastorno hemorrágico. En cada uno de ellos se realizó tiempo de tromboplastina parcial activado, porcentaje de actividad de factor VIII y factor VIII residual después de 120 min de incubación de una mezcla de plasmas, para determinar los valores de referencia de nuestra población en estudio.

ENSAYOS DE LABORATORIO

Se hizo el tiempo de tromboplastina activado, utilizando como reactivo una mezcla de fosfolípidos y caolin según el método de Proctor Rapaport (39) ensayos de factor VIII en una etapa según el método de Denson (40) basado en un tiempo de ---

tromboplastina parcial activada utilizando plasma deficiente en factor VIII humano como sustrato, y por último el ensayo para inhibidores del factor VIII según el método de Kasper de las unidades Bethesda(3); empleando una mezcla a partes iguales entre el plasma del paciente y la mezcla de plasmas normales, preparando un control negativo colocando a partes iguales solución amortiguadora de imidazol y plasma normal.

TOMA DE MUESTRAS: La preparación de las muestras de plasma es esencial en la investigación de factores de la coagulación, una punción limpia y rápida así como una relación exacta sangre anticoagulante -- son de especial importancia.

Para la punción es recomendable seguir el siguiente método.

- 1.-Escoger una vena adecuada y visible y aplicar el torniquete de tal modo que la vena quede fija y se pueda puncionar con facilidad.
- 2.-Efectuar la punción venosa con rapidez sin hacer movimientos de exploración y extraer la cantidad de sangre necesaria para una relación de 9 partes de sangre por una de citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante.
- 3.-Retirar la aguja de la jeringa y colocar la sangre en un tubo de protrombina e invertir el tubo suavemente varias veces para mezclar la sangre con el anticoagulante.
- 4.- Centrifugar la sangre a 3000 r.p.m. durante 10 min. y separar el plasma para su procesamiento.

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO

PRINCIPIO

El T. P. es una prueba de recalcificación del plasma a la que se le adiciona fosfolípidos como sustituto plaquetario una sustancia activadora con el fin de aumentar y estandarizar la activación de contacto. Esto proporciona tiempos de coagulación más cortos y una mayor confiabilidad y sensibilidad a la prueba.

Esta prueba nos detecta en forma global el sistema intrínseco de la coagulación y es sensible a todos los factores de la coagulación con excepción del factor VII y el factor XIII. También tiene una gran importancia en los procedimientos de cuantificación de los factores de la coagulación y para efectuar estudios en pacientes que están recibiendo terapia sustitutiva.

MATERIAL Y EQUIPO

- 1.- Fibrómetro B.B.L.
- 2.- Centrífuga.
- 3.- Pipetas automáticas para medir 0.1 y 0.2 ml.
- 4.- Puntas de plástico desechables para el fibrómetro.
- 5.- Copas de plástico desechables diseñadas especialmente para el fibrometro.

6.- Cronómetros.

REACTIVOS

- 1.- Reactivo para T.T.P. activado (caolin fosfolipidos)*
- 2.- Cloruro de calcio 0.25 M.
- 3.- Citrato de sodio al 3.8%.

* Reactivo comercial de los laboratorios Behring de Alemania.

MATERIAL BIOLÓGICO

- 1.- Plasma fresco citratado del paciente, pobre en plaquetas.
- 2.- Mezcla de plasmas normales preparada de por lo menos 10 personas sanas.

PREPARACION DE REACTIVOS

El plasma citratado, es preparado a partir de sangre total mezclada con citrado de sodio al 3.8% como anticoagulante en una proporción de nueve partes de sangre por una de anti-coagulante. La sangre se centrifuga a 3000 r.p.m., durante 10 minutos con el fin de obtener plasma pobre en plaquetas.

El plasma sobrenadante se pasa con una pipeta pasteur a tubos de plástico procurando no remover las células, estos tubos se mantienen en baño de hielo hasta su utilización, la cual debe ser de inmediato preferentemente o durante las primeras -

cuatro horas de extraída la muestra con el fin de evitar la pérdida de actividad de los factores lábiles de la coagulación.

PREPARACION DE LA MEZCLA DE PLASMAS NORMALES (POOL)

Para la mezcla de plasmas normales se toman muestra - de sangre total a 10 personas sanas, obteniendo el plasma de la forma antes descrita mezclando los plasmas en un tubo de plástico. Esta mezcla servira como testigo normal.

PREPARACION DE CLORURO DE CALCIO 0.025M

Pesar 0.277 gr de cloruro de calcio anhidro, colocarlos en un matriz volumétrico de 100 ml y aforar con agua destilada mezclando perfectamente antes de su uso.

PREPARACION DE CITRATO DE SODIO AL 3.8%

Colocar 3.8 gr de citrato de sodio en un matriz volumétrico de 100 ml aforar a 100 ml con agua destilada y mezclar bien.

PROCEDIMIENTO

1.- En una copa de plástico diseñada especialmente para el fibrometro colocar 0.1 ml de plasma y 0.1 ml de reactivo- para T.T.P. y mezclar poner en marcha el cronómetro.

2.- Incubar la mezcla exactamente durante dos minutos a 37° c en el block térmico.

3.- Pipetear 0.1 ml de cloruro de calcio 0.25 M preincubando a 37 c a la mezcla anterior y poner en marcha el registrador de tiempo de fibrómetro.

4.- Determinar la prueba por duplicado y promediar los tiempos obtenidos.

5.- Repetir la prueba con la mezcla de plasmas normales que corresponderá al valor del control normal.

VALORES DE REFERENCIA

El valor de la prueba no debe exceder el valor del control por más de 10 seg.

DETERMINACION DE FACTOR VIII EN UNA ETAPA

METODO DE DANSON

Fundamento:

Se hacen diluciones seriadas del plasma control normal y se adiciona un plasma sustrato que es congenitamente deficiente en factor VIII, el plasma sustrato contiene niveles normales de todos los otros factores de la coagulación y por lo tanto, el tiempo de coagulación de cada dilución es proporcional a la concentración de factor VIII.

El plasma del paciente tratado en la misma forma se interpola en la curva tipo para establecer la concentración de factor VIII en la muestra.

Esta prueba es muy útil para conocer la respuesta de los hemofilicos a la terapia sustitutiva, cuando se requiere el resultado de inmediato.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE PLASMA CITRATADO

Tanto la mezcla de plasmas normales como la muestra del paciente se preparan en la misma forma que la descrita para el T.T.P.

MATERIAL Y EQUIPO

- 1.- Fibrómetro B.B.L.
- 2.- Centrifuga.

- 3.- Pipetas automáticas para medir 0.1 ml y 0.2 ml.
- 4.- Puntas de plástico desechables para el fibrómetro.
- 5.- Copas de plástico desechables para el fibrómetro.
- 6.- Cronómetros.
- 7.- Papel semilogarítmico de dos ciclos.

REACTIVOS

- 1.- Amortiguador de Imidazol 0.05 m pH 7.3
 - 2.- Reactivo para T.T.P. (caolin fosfolípidos)
 - 3.- Plasma sustrato deficiente en factor VIII. La actividad del factor VIII en este plasma debe ser menor del 1.0%.
 - 4.- Mezcla de plasmas normales.
 - 5.- Plasma del paciente pobre en plaquetas.
- Nota: Los últimos tres reactivos se deben mantener en hielo.

PREPARACION DE REACTIVOS

Solución amortiguadora de Imidazol pH 7.3

3.045 gr de imidazol.

5.85 gr de NaCl

Colocar los reactivos en un matraz volumétrico de 1000 ml y adicionar agua destilada hasta aproximadamente 980 ml; mezclar para disolver y ajustar el pH con HCl concentrado. Completar a 1000 ml con agua destilada, guardar en el refrigerador el recipiente tapado.

CURVA TIPO PARA FACTOR VIII

La curva tipo para el ensayo está basada en la actividad de una mezcla de plasmas normales preparada de por lo menos 10 personas sanas.

PROCEDIMIENTO

1.- Se hacen diluciones de la mezcla de plasmas normales en amortiguador de Imidazol inmediatamente antes de su uso, de la siguiente manera.

a).- Colocar cuatro tubos de plástico de 12 x 75 y marcarlos con las diluciones, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80. Al primer tubo adicionar 1.8 ml de la solución amortiguadora de imidazol y a los tres restantes 1.0 mililitros de la misma.

b).- Agregar al primer tubo 0.2 ml de la mezcla de plasmas normales, mezclar y transferir un mililitro al tubo No. 2, y así sucesivamente hasta el tubo No. 4 figura No. 4.

Estas diluciones representan un porcentaje de actividad de 100%, 50%, 25% y 12.5% respectivamente. La curva tipo debe trazarse para cada día de trabajo.

2.- Determinar un tiempo de tromboplastina parcial activado (T.T.P.), por duplicado a cada dilución colocando en las copas de plástico preincubadas, 0.1 ml de la dilución correspondiente, 0.1 ml del plasma deficiente en factor VIII y 0.1 ml del reactivo de caolin fosfolípidos.

3.- Mezclar e incubar exactamente dos minutos.

4.- Agregar 0.1 ml de cloruro de calcio 0.025 M preincubado y poner en marcha el registrador de tiempo del fibrómetro.

5.- Determinar por duplicado cada dilución y promediar los tiempos obtenidos.

6.- En un papel semilogarítmico de dos ciclos trazar la curva correspondiente colocando en el eje de las ordenadas el tiempo de coagulación en segundos, y el porciento de actividad de cada dilución en el eje de las abscisas.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR VIII DEL PACIENTE

Hacer una dilución 1:10 del plasma del paciente con solución amortiguadora de Imidazol pH 7.3 y proceder de la misma forma apartir del inciso No. 2 hasta el No. 5. El tiempo de coagulación se interpola en la curva tipo para obtener el porciento de actividad.

Valores de referencia de 50% a 200%.

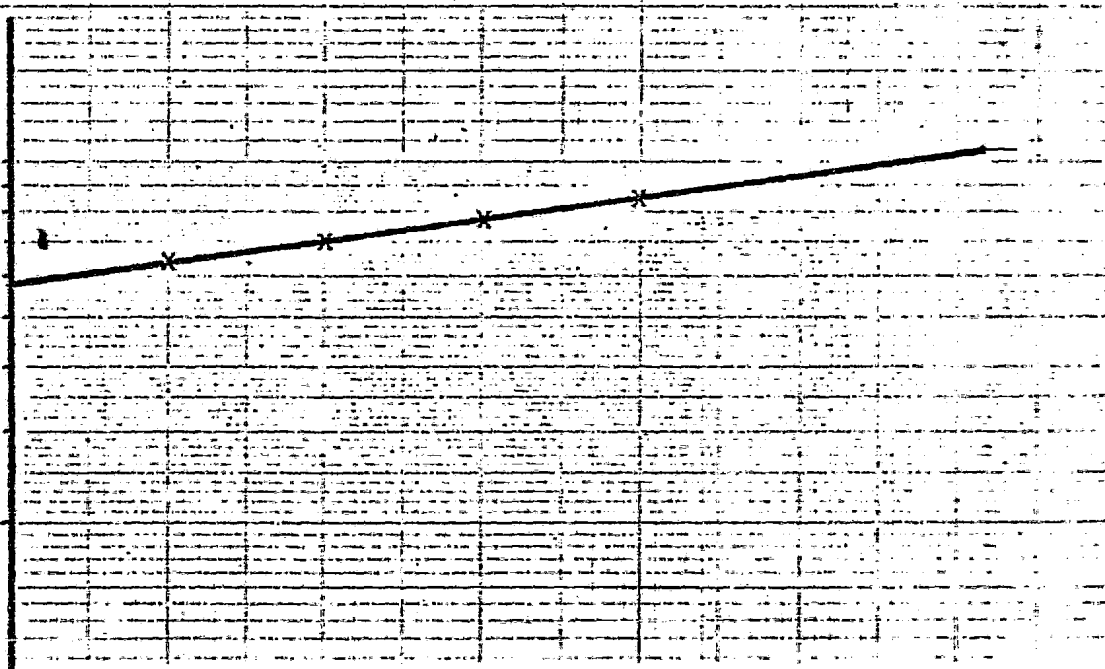
CURVA NORMAL PARA F VIII

TUBO	1	2	3	4
BUFFER	1.8 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
PL. N	0.2 ml	—	—	—
MEZCLAR Y TRANSFERIR		(1.0 ml) ↗	(1.0 ml) ↗	(1.0 ml) ↗
DILUCION	1:10	1:20	1:40	1:80
% FACTOR <u>VIII</u>	100 %	50 %	25 %	12.5 %

Figura No. 4

CURVA TIPO PARA FACTOR VIII

TIEMPO DE COAGULACION en SEG.



100% 50% 25% 12.5% PORCIENTO DE ACTIVIDAD DE FACTOR VIII

DETERMINACION DE INHIBIDORES CIRCULANTES DEL F VIII POR EL METODO DE KASPER (UNIDADES BATHESDA).

FUNDAMENTO:

El plasma problema se mezcla a partes iguales con la mezcla de plasmas normales (relación 1:1) y se incuba durante 120 min. a 37°C efectuando a continuación una dosificación de FVIII. En caso de existir un inhibidor en el plasma, éste neutralizará la actividad procoagulante del F VIII y la cantidad presente de éste en la mezcla se verá disminuida al compararse con el testigo control.

Cuando bajo estas condiciones se observa que la mezcla problema y el plasma normal proporciona una actividad de F VIII residual del 50% o menos, se dice que el inhibidor está presente.

MATERIAL Y EQUIPO.

Los mismos de la técnica anterior.

REACTIVOS.

Los mismos de la técnica anterior.

MATERIAL BIOLÓGICO

El mismo de la técnica anterior.

PROCEDIMIENTO

1.- Preparar las siguientes mezclas en tubos de plástico de 12 x 75 previamente etiquetados como control y problema.

a).- Colocar 0.2 ml. de la mezcla de plasmas normales y agregar 0.2 ml. de plasma del paciente (problema).

b).- Colocar 0.2 ml. de la solución amortiguadora de Imidazol y agregar 0.2 ml. de la mezcla de plasmas normales (control).

2.- Tapar y mezclar los tubos, someterlos a incubación durante 120 min. a 37c.

3.- Después de la incubación las muestras se ponen en baño de hielo y de cada una se hace una dilución 1:10 con solución amortiguadora de imidazol, se tapan y se mezclan.

4.- Si el título del inhibidor es mayor de dos unidades Bethesda se hacen diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 etc., del plasma problema en la solución amortiguadora de Imidazol, adicionando a cada dilución una cantidad igual de la mezcla de plasmas normales; se recomienda hacer estas diluciones al inicio del ensayo y así someter todos los tubos a incubación al mismo tiempo. Figura No. 5.

Nota: Si se procesan dos o más problemas solo es necesaria una mezcla control.

5.- Determinar un T.T.P. por duplicado colocando en las copas de plástico preincubadas;

Plasma deficiente en F VIII _____ 0.1 ml.

Dilución 1:10 de la muestra correspondiente según el -
paso No. 3 _____ 0.1 ml.

Reactivo de caolin fosfolipidos _____ 0.1 ml.

Mezclar

6.- Incubar la mezcla exactamente dos minutos.

7.- Agregar 0.1 ml. de Ca Cl₂ 0.025 M preincubado y -
poner en marcha el registrador de tiempo del fibrómetro.

8.- Determinar por duplicado todas las muestras y pro-
mediar los tiempos obtenidos.

9.- Interpolar en la curva tipo de F VIII los tiempos-
obtenidos y anotar el % de actividad de este factor presente en-
cada muestra.

10.- Obtener el F VIII residual.

11.- Obtener el título del inhibidor interpolando so-
bre la gráfica de unidades Bethesda la cantidad de F VIII resi-
dual.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

1.- Si el paciente tiene inhibidores al factor VIII la
actividad del F VIII residual será menor al 100 %.

2.- El plasma de un paciente que produce una actividad
de F VIII residual del 50 % se considera que contiene una unidad
Bethesda por ml. de plasma.

3.- Si el plasma del paciente produce una actividad - de F VIII residual del 25 % se considera que contiene dos unidades Bethesda por ml. de plasma.

4.- Si el plasma problema contiene una actividad del- F VIII residual del 75 % este contiene 0.5 unidades Bethesda de inhibidor por ml. de plasma.

5.- Si el plasma problema produce una actividad resi- dual menor del 25 % el título del inhibidor es mayor de dos unidades y el plasma problema debe diluirse con solución amortiguadora hasta que la actividad del F VIII residual se encuentra en el rango de 75-25 %.

6.- Si el factor VIII residual es cercano al 100 % se debe probar con métodos más sensibles.

DETERMINACION DE INHIBIDORES DE FACTOR VIII (UNIDADES BETHESDA)

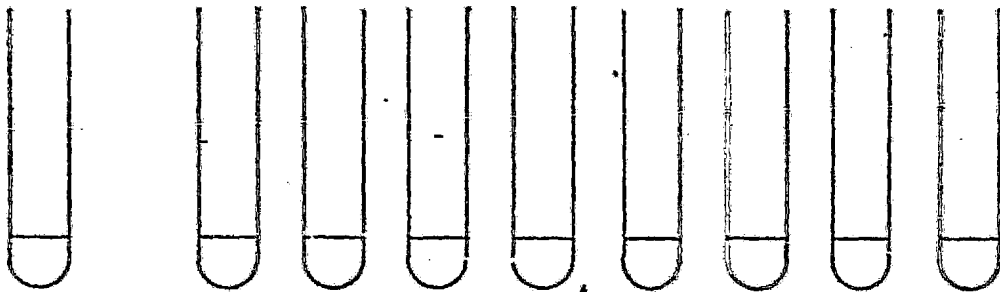
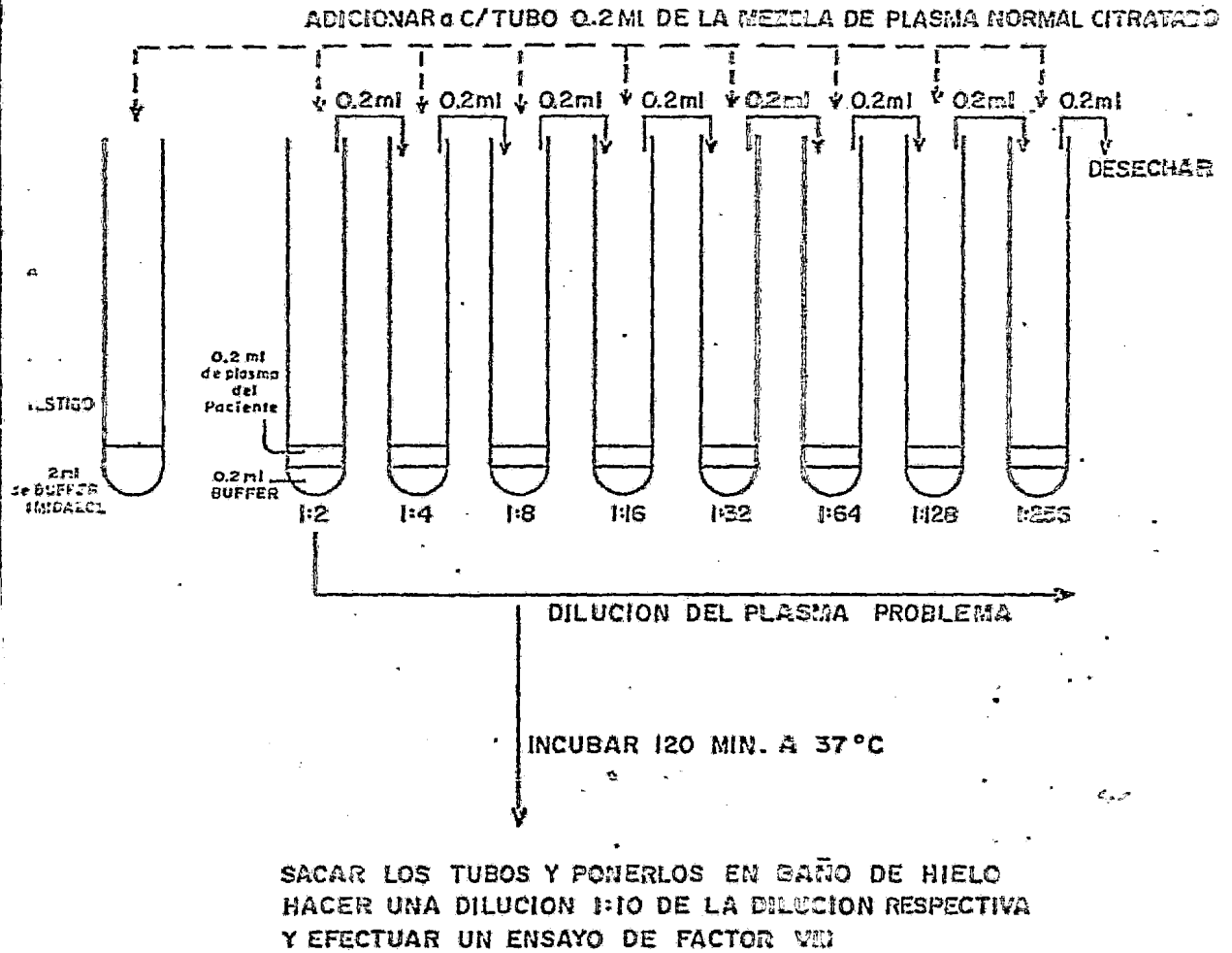
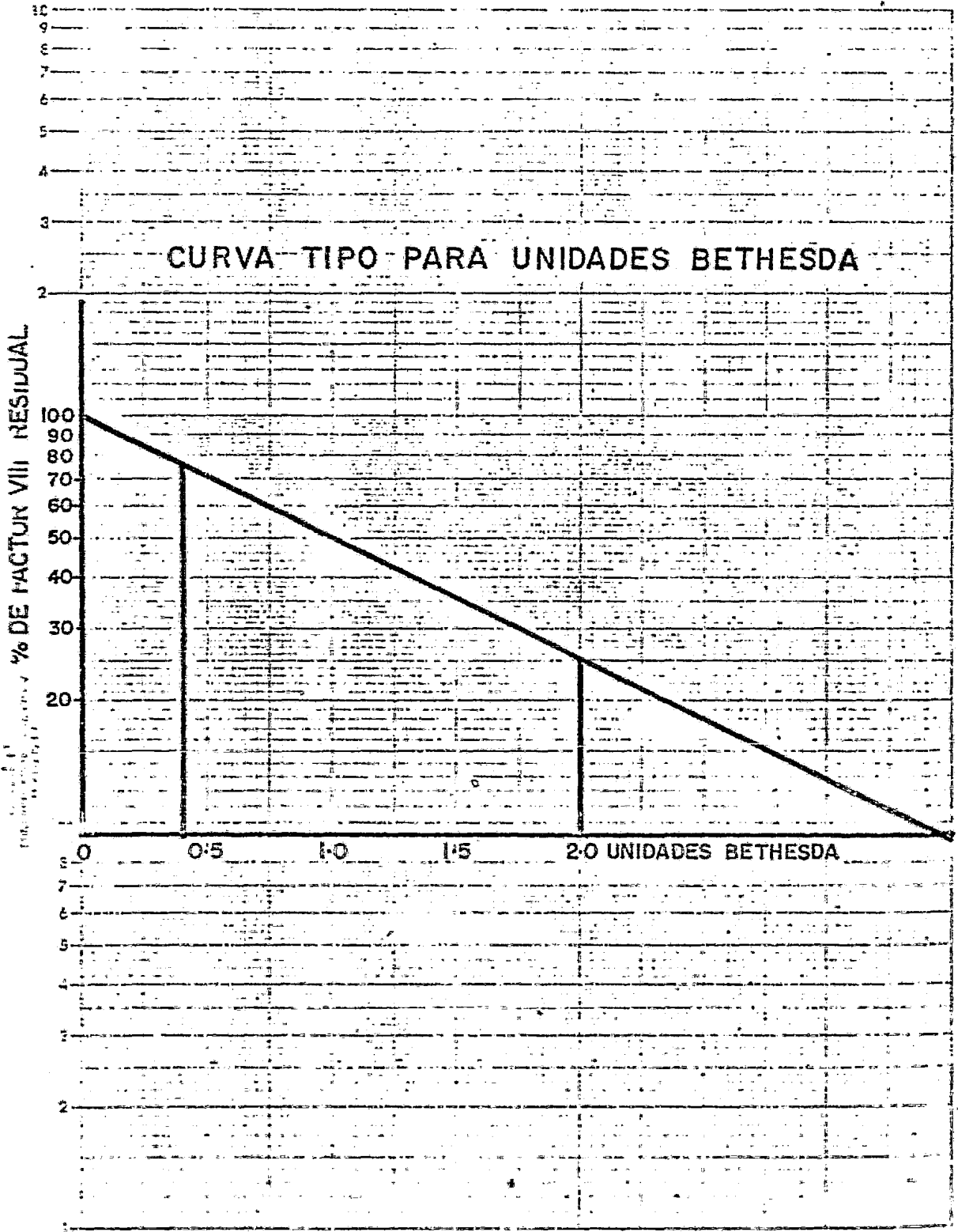


Figura No. 5



RESULTADOS

I.- CONTROLES SANOS

Las pruebas de laboratorio en todos los casos estuvieron en los límites normales; tiempo de tromboplastina parcial - activado, actividad biológica de F VIII procoagulante y actividad de F VIII residual después de 120 min. de incubación a 37°c.

a).- El tiempo de tromboplastina parcial activado varió en el rango de 35.4 a 43 seg. con un promedio de 40.6 seg.

b).- La actividad de F VIII procoagulante varió en el rango de 50 a 200 % con un valor promedio de 113.3 %.

c).- La actividad de F VIII residual que es la que nos indica el título del inhibidor en unidades Bethesda, estuvo en el rango de 100 a 240 % con un valor promedio de 140.4 %

II.- PACIENTES HEMOFILICOS

Estos pacientes fueron sometidos a las mismas pruebas de laboratorio que el grupo control y los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 1

Como puede observarse en esta tabla, el tiempo de tromboplastina parcial activado resultó prolongado o muy prolongado en relación al testigo normal.

La actividad biológica del F VIII estuvo en el rango de 0.8 a 42.5 % con un valor promedio de 6.83 %.

La actividad de F VIII residual, de 2.3-1000 % con un rango de 0.5 a 66 unidades Bethesda.

Una comparación más objetiva en cuanto a las pruebas de laboratorio, realizadas en ambas poblaciones se muestra en la tabla No. 1

INCIDENCIA DEL INHIBIDOR

De los 50 pacientes hemofílicos 12 desarrollaron el inhibidor representando una incidencia del 24% en relación al total de la población.

La tabla No. 1 muestra los límites superiores e inferiores de los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio a las cuales fué sometida nuestra población en estudio.

La tabla No. 2 agrupa a los 50 pacientes con hemofilia en los distintos grados clínicos de la enfermedad así mismo se observan aquellos casos que presentan el inhibidor, así como los que no desarrollaron.

La gráfica No. 1 es una representación esquemática de los pacientes que presentaron el inhibidor así como su grado de hemofilia.

La tabla No. 3 relaciona el número de pacientes que presentaron el inhibidor, con respecto al título de unidades Bethesda.

La figura No. 6 muestra la incidencia del inhibidor -

al factor VIII encontrada en la población estudiada, en relación al número total de hemofílicos.

CONCENTRACION DE DATOS

No. de Pacientes	T.T.P./TEST	% de Actividad de F VIII	Unidades de Inhib.	Transfuciones con F V III
1.-	108.7/39.4	4.8	0.0	*
2.-	77.2/39.4	8.4	0.0	*
3.-	+120/35.5	0.9	58	si
4.-	104.1/33.1	4.3	0.0	si
5.-	68.3/35.7	5.3	9.0	si
6.-	53.8/35.5	13.7	0.0	*
7.-	87.5/34.8	0.7	7.0	*
8.-	121.8/36.6	2.0	0.0	*
9.-	90.3/33.8	1.0	1.0	si
10.-	67.3/36.1	5.0	0.0	si
11.-	113.6/35.3	1.2	0.0	*
12.-	86.3/35.6	1.5	0.0	*
13.-	60.8/35.4	8.7	0.0	*
14.-	63.1/35.4	5.0	0.0	*
15.-	110.7/32.8	2.1	0.0	*
16.-	67.4/34.9	7.0	0.0	*
17.-	49.9/32.4	17.2	0.0	*
18.-	55.1/32.4	18.7	0.0	*
19.-	109.6/38.9	2.2	0.0	si
20.-	62.1/35.2	11.3	0.0	*
21.-	54.9/35.2	17.5	0.0	*
22.-	116.4/34.9	1.9	0.0	*
23.-	107.4/32.4	2.3	3.0	si
24.-	98.7/36.4	2.1	0.9	*
25.-	52.6/36.2	42.5	0.0	*
26.-	74.8/34.7	4.6	0.0	*
27.-	107.4/33.0	0.8	66	si
28.-	130.9/35.8	1.4	1.9	si
29.-	120.6/40.6	1.8	0.0	*
30.-	61.3/35.4	30	0.0	*
31.-	157.9/33.2	6.8	0.0	si
32.-	71.9/35.9	4.6	0.0	*
33.-	63.4/34.3	5.6	0.0	si
34.-	112.4/33.0	0.8	0.0	*
35.-	78.4/34.4	12.5	0.0	*
36.-	134.1/33.7	1.0	2.4	si
37.-	66.4/32.1	5.6	0.5	*
38.-	117.8/37.4	2.4	16	si
39.-	50.6/33.0	12.5	0.0	si

* Sin información

No. de Pacientes	F.T.P./TEST	% de Actividades de F VIII	Unidades de Inhib.	Transfuciones con F VIII
40.-	70.4/34.2	22	0.0	si
41.-	107.9/37.9	1.6	0.0	si
42.-	78.4/33.1	5.3	0.0	*
43.-	84.7/33.1	5.0	0.0	*
44.-	78.8/35.2	1.56	0.0	*
45.-	74.5/31.3	4.4	0.0	*
46.-	95.9/37.2	3.8	0.0	*
47.-	108.2/33.1	5.6	0.0	*
48.-	81.4/35.0	0.8	1.5	si
49.-	62.4/36.3	1.8	0.0	*
50.-	87.2/34.7	7.0	0.0	*

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO
A QUE FUE SOMETIDA NUESTRA POBLACION DE ESTUDIO.

	Tiempo de tromboplastina parcial activada	por ciento de actividad del F VIII	Actividad de F VIII residual	unidades de inhibidor
Controles sanos	35.4-41.6 seg. promedio 40.6	50-200% promedio 113.3%	100-240% promedio 140.4	0
pacientes * hemofilicos	53.7-157.9 seg.	0.8-42.5%	2.3-100%	0.5-66

* No se determinaron valores promedio por los rangos tan amplios entre un valor y otro.

Tabla No.1

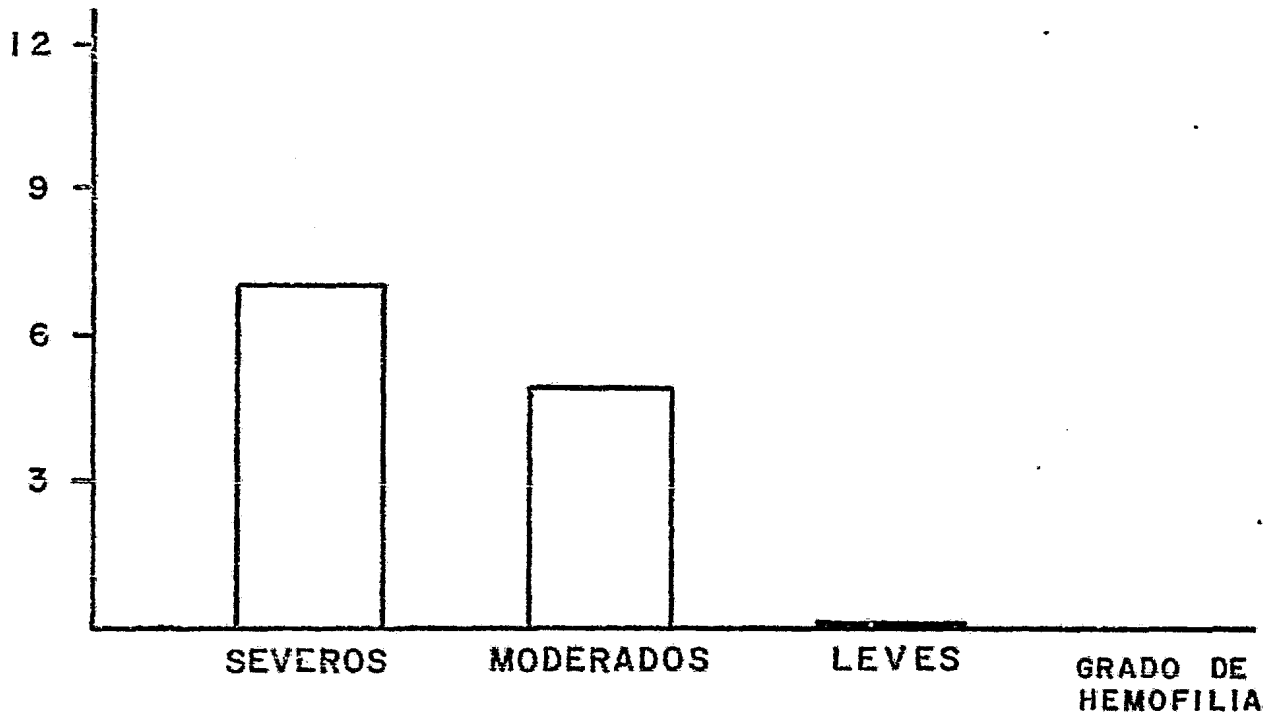
Comparación de los pacientes hemofílicos según el grado clínico de la enfermedad, con respecto a los inhibidores encontrados.

Grado de Hemofilia	con inhibidor	sin inhibidor	total
1.- Severos	6	2	8
2.- Moderados	6	23	29
3.- Leves	0	13	13
Suma	12	38	50

Tabla No 2



No. DE PACIENTES
CON INHIBIDOR



Grafica No. 1

PACIENTES CON INHIBIDOR AL F VIII

UNIDADES DEL INHIBIDOR	No. DE PACIENTES
0.5 — 2	6
2.5 — 4	1
4.5 7	1
7.5 — 10	1
10.5 o MAS	3
No. TOTAL DE PACIENTES	12

Tabla No. 4

FRECUENCIA DEL INHIBIDOR EN EL
TOTAL DE LA POBLACION ESTUDIADA

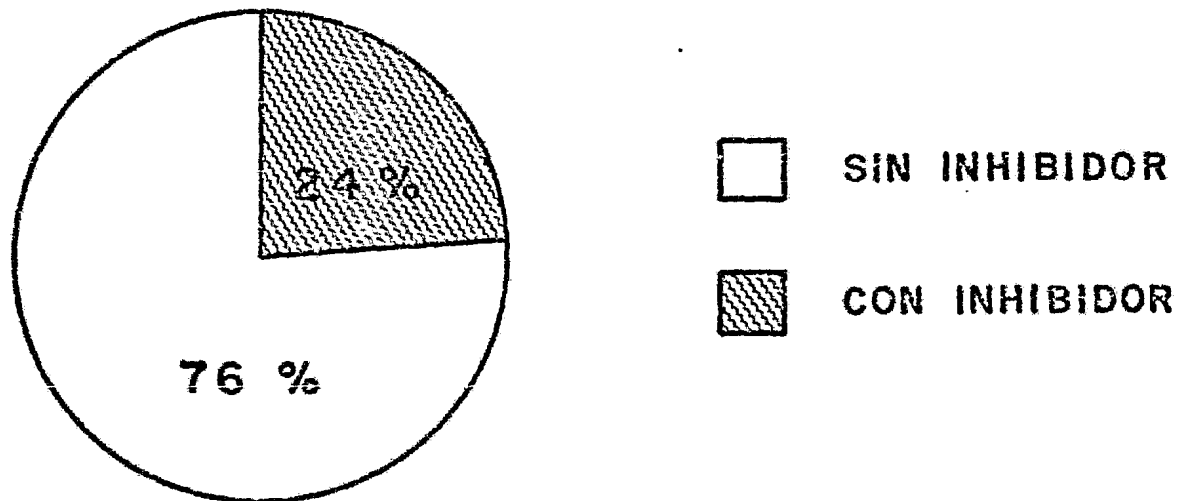


Figura No. 6

DISCUSION

La presencia del inhibidor del factor VIII en pacientes con hemofilia A no es rara y complica gravemente el tratamiento de los pacientes con hemorragia. Su detección es de gran importancia desde el punto de vista práctico, clínico y diagnóstico pues facilita en gran medida la terapéutica a seguir.

De los resultados obtenidos puede observarse que de los 50 pacientes con hemofilia 29 fueron moderados, 8 severos y 13 leves; detectando el inhibidor en 12 casos de la población estudiada. Tabla No. 2.

De los 12 pacientes con inhibidor, 6 fueron moderados y 6 severos; no detectándose en ningún caso de hemofilia leve. El título del inhibidor varió en el rango de 0.5 a 66 unidades. Tabla No. 3.

Estos resultados con presencia del inhibidor dan una incidencia del 24% en relación al número total de hemofílicos estudiados, que si se compara con la encontrada por Strause (18) que fué del 21%, realmente no existe una diferencia significativa. Sin embargo en la actualidad la literatura relacionada con el tema señala muchas variaciones en la incidencia del inhibidor, esta variación se debe posiblemente a las distintas metodologías empleadas en la cuantificación. De tal manera que en investigaciones futuras en cuanto a aspectos estadísticos, es con

veniente primero estandarizar la metodología para obtener datos dignos de comparación.

La edad del grupo de pacientes con inhibidor fue de 3 a 14 años lo cual nos da una edad promedio de 7 años. Kasper (19) estudiando una población pediátrica de pacientes hemofílicos descubrió que la aparición del inhibidor era mayor en los niños mayores de 10 años.

De los 12 pacientes que desarrollaron el inhibidor 4 de ellos tenían hermanos con hemofilia pero no el inhibidor confirmando la observación de Strauss (18) que al estudiar familias de hemofílicos vió que no existía predisposición familiar alguna para el desarrollo del inhibidor.

En relación al método utilizado para la cuantificación del inhibidor se puede decir que tiene varias ventajas sobre otros métodos anteriormente publicados en la literatura, entre estas están:

- 1.- Un tiempo menor para la realización del ensayo.
- 2.- Es una técnica que no requiere de reactivos sofisticados ni de personal muy especializado.
- 3.- Ofrece una gran sensibilidad para títulos de inhibidor de más de 0.5 unidades bethesda.

Las unidades definidas en este método para medir la potencia del inhibidor, no pueden ser transformadas por algún factor de conversión a unidades de otro método; ya que existen mu-

chas variantes entre un método y otro, pues no hay que olvidar que se trata de métodos convencionales.

Actualmente existe una tendencia para unificar la metodología en este campo con objeto de evitar discrepancias tan marcadas como es en el caso de la incidencia reportada para el inhibidor.

CONCLUSIONES

1.- Los objetivos emprendidos fueron alcanzados. Es decir, la detección del inhibidor del factor VIII en los pacientes con hemofilia A en sus distintos grados clínicos de la enfermedad. La obtención de una incidencia del inhibidor en la población pediátrica de hemofílicos de la zona norte del D.F. así como la revisión bibliográfica actualizada del tema.

2.- La aparición del inhibidor es más frecuente en los casos con grave deficiencia de factor VIII.

3.- La incidencia encontrada en nuestra población no tiene diferencias significativas con la reportada en la literatura extranjera.

4.- La transfusión con productos sanguíneos que contienen factor VIII parecen ser la causa directa de la aparición de inhibidores en el paciente hemofílico severo.

5.- El método utilizado para la cuantificación del inhibidor es muy sensible para títulos de más de 0.5 unidades Bethesda.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Horowitz. H.I. Fujimoto.M.M.: Aquired hemophili a due to --
circulating anticoagulants.
A.J. Med. 33:501;1962.
- 2.- Margolius. A, Junr, Jackson.D.P, and Ratnoff.O.D,: Circula-
lating anticoagulants a study of 40 cases and review of the
literature.
Medicine (Balt) 40: 145; 1961
- 3.- Kasper.C.K, Lendorf.L.M, Count.R.B, Edson. JR.Frantoni.J. -
Green.D. A more uniform measurement of factor VIII inhibi-
tor.
Thromb. Diathes Haemorrh. 34:869; 1975.
- 4.- Rosner.F: Hemophilia in the talmud and rabbinic writings.
Ann. Inter.Med. 70: 833: 1969.
- 5.- Gralnick.M.R, Collier B.S, Shulman N.R, Andersen J. C and
Hilgartner.R.M.: Factor VIII.
Ann Inter. Med. 86:598; 1977.
- 6.- Rapaport. Introduction to Hematology
Copyright 1971 pag 345.
- 7.- Davisohn.I. Dianóstico clínico por el laboratorio Tood
sanford Salvat 1978 pag 436-38.
- 8.- Hoffbrand.A. Hematology Tutorial in posgraduate Medicine.
Vol II 1971 Pag 577-87.
- 9.- Weiss.A.Hambook of hemophilia; Excerta medica 1975 pag 629
46.
- 10.- Rocha.E. Fernandez J. Solana J.M. Perez J.A: Sintesis Bio-
química y Estructura Molecular del factor VIII.
Sangre 25 (5B) 642; 1978.
- 11.- Hultin.M: Activation of factor X by factor IXa and factor-
VIII; a especific assay for factor IXa in the presence of-
thrombin activated factor VIII.
Blood 52:928; 1978.
- 12.- Gralnick.H.R, Marchesi S.L. Boller B.S: Theoretical approach-
to molecular biology of factor VIII heterogeneity of mole-
cule.

Ann.N.Y. Academic. Sci. 240: 378; 1975.

- 13.- Eurkhan.
Antihemophilic factor (factor VIII) an alpha 2 globulin
Brith.J.Hematol.9:499;1963
- 14.- Hershgold.E.J. Davison.A.M. Janzen M: Isolation and some chemical properties of human factor VIII (antihemophilic factor).
J.Lab. Clin. Med. 77:206;1971
- 15.- Hoyer.L.
The factor VIII complex: structure and funtion.
Blood 49(5) I; 1981
- 16.- Greem.D. Spontaneous inhibitor of factor VIII.
Brithis. J. Haematol. 15;57 1968.
- 17.- Biggs. R.
Jaudice and antibodies directed agaist factor VIII and IX in patients treated for hemophilia or cristmas disease-
inthe united Kinddon.
Brithis.J.Haemat. 26:313; 1974.
- 18.- Strauss. H.S ; Aquired circulating Anticoagulants in Haemophilia A. New. Eng. J. Med. 281:866; 1969
- 19.- Kasper.C.K. Incidence and course of Inhibitor among patients with classic hemphilia.
Thromb. Diathesis. Haemrrh. 30; 264; 1973
- 20.- Buchanna.G.R, Kevy S.V.: Use of phrothrombin complex concentrate in hemophiliacs with inhibitors: clinical and laboratory studies.
pediatrics 62 (5) 767; 1978
- 21.- Scranton.P. Hasiba.U,Garent.T.J.
Intramuscular hemorrhage in hemophiliacs with inhibitor.
J.A.M.A. 241 (19)2028;1979
- 22.- Allain.J.P. Fromel.D. Antibodies to factor VIII:V. Pa --
tterns of immune response to factor VIII in hemophilia A.
Blood 47(6); 973, 1976
- 23.- Brackman.H. Etzal.F.R. Egli.J.E: Tratamiento de hemofíli
cos con inhibidores.
Artículo de cortesia de los laboratorios travenol Mex. -
D.F.

- 24.- Pintado.T, Taswell.H.f, Walter.E.J. Treatmen of life --
threatening hemorrhage due to aquired factor VIII inhibi
tors.
Blood46 (4)535;1975
- 25.- Ortega.F.MartinVillar, Megallon.M: Epidemiología, inmu-
nología y métodos de detección de inhibidores en hemo -
filia.
Sangre 23 (5)-B) 688-698 1978
- 26.- Robboy.S.T, Lewis.E.J,Schur.P.H,Colman.R.W. Circulating-
anticoagulants to factor VIII.
Am.J.Med.49:742;1970
- 27.- Andersen.B.R, Terry,WB: Gamma G₄ globulin antibody cau--
sing inhibition of clotting factor VIII.
Nature 217: 174; 1968
- 28.- Shapiro.S.S: Immunologic character of acquired inhibi --
tors to antihemophilic globulin (factor VIII) and the --
Kinetics of their interaction with factor VIII.
J. Clin. Invest. 46: 147; 1967.
- 29.- Feinstein.D: Immunologic characterization of 12 factor -
VIII inhibitors.
Blood 34:85;1969.
- 30.- Leitner.B.
An antihemophilic globulin (factor VIII) inhibitor: puri
fication characterization an reaction Kinetics.
Brith.J.Haematol.9:245,1963
- 31.- Hoyer.L; Implication of immunologic methods for measuring
antihemophilic factor (factor VIII).
Ann.N.Y.Acad. Sci. 240:97,1975
- 32.- Laverne.J, Meyer.D,Reisner.H. Characterization of human
antibody puriefed by immune complex formation.
Blood 48(6) 931; 1976
- 33.- Panner.J: Eficacy of activated prothrombin complex.
Scand.J.Haematol (Supplement) 24(3)146;1980.
- 34.- Beck.D, Giddings. and Bloom.A.L: Inhibitor of factor VIII
in Mild haemophilia.
Brethis J. Haematol. 17:283,1969.

- 35.- Ortega F. Martin Villar. Magallon. M: Epidemiología, Inmunología y Métodos de Detección de Inhibidores en Hemofilia. --
Sangre 23(5-B): 688; 1978.
- 36.- Gago J. Magallon Martínez, Ortega Blanco, Jover Sagarra. --
S: Enfermos Hemofílicos con inhibidores métodos de estudio y clasificación. Unidad de Hemofilia "La Paz" Madrid Servicio de Hematología 1978. Artículo de Cortesía de los laboratorios travenol Méx. D.F.
- 37.- Kasper. C.K: Measurement of mild factor VIII inhibitor in Bethesda Units.
Thrombos. Diathes Haemorrh. 34:869; 1975.
- 38.- Lossing. T.S, Kasper. C.K, Feinstein. D.I: Detection of factor VIII inhibitor with partial thromboplastin time. Blood 49 (5) 793: 1977.
- 39.- Proctor. R.R, Rapaport. S.T: The partial thromboplastin time with kaolin o simple screenig test for first stage plasma clotting factor deficiencias.
Am. J. Clin. Pathol. 36:121; 1961.
- 40.- Denson.K. Treatment of the haemophilic and othes coagulation disorder. Ed. Macfarlane, R.C. Oxfor. Blakwell Scientific Publication 1966.