



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSTGRADO EN HEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL DE OCCIDENTE**

**“ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA IN VITRO PARA LA
EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO DE VÍA ALTERNA EN PACIENTES
CON HEMOFILIA A GRAVE CON INHIBIDOR”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA.**

PRESENTA:

Anabel Beatriz Ramírez Ramírez

Director de Tesis: Dra. Janet Soto Padilla.
Médico Hematólogo Pediatra adscrito al servicio de Hematología
Asesor Metodológico: Dra. Ana Rebeca Jaloma Cruz
División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente

Guadalajara, Jalisco

Febrero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE	PÁGINA
1. IDENTIFICACION DE LOS AUTORES.....	4
2. RESUMEN.....	5
3. MARCO TEÓRICO.....	7
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4.1 Pregunta de investigación.....	18
4.2 Hipótesis.....	18
5. JUSTIFICACION.....	19
6. OBJETIVOS.....	20
6.1 Objetivo general.....	20
6.2 Objetivos específicos.....	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
7.1 Diseño del estudio.....	20
7.2 Universo de estudio.....	20
7.3 Tamaño de la muestra.....	20
8. CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	21
8.1 Criterios de inclusión.....	21
8.2 Criterios de exclusión.....	21

9. DEFINICION DE VARIABLES.....	21
9.1 Variable independiente.....	21
9.2 Variable dependiente.....	21
9.3 Definición Operacional de las variables.....	22
9.4 Operacionalización de las variables.....	24
9.5 Tratamiento de vía alterna analizado en el proyecto.....	25
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
11. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	26
12. DESARROLLO DE ESTUDIO.....	26
13. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	27
13.1.1 Recursos humanos.....	27
13.1.2 Recurso materiales.....	28
13.1.3 Financiamiento.....	28
14. RESULTADOS.....	29
15. DISCUSIÓN.....	35
16. CONCLUSIÓN.....	38
17. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	39
18. ANEXOS.....	41
19. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	45

1. IDENTIFICACION DE LOS AUTORES:

Director de Tesis: Dra. Janet Soto Padilla

Médico Hematólogo Pediatra adscrito al servicio de Hematología Pediátrica de la
UMAE Hospital de Pediatría CMNO

Domicilio: Belisario Domínguez No. 735. Col. Independencia CP. 44340

Email. sirenajanet@hotmail.com

Asesor Metodológico: Dra. Ana Rebeca Jaloma Cruz

División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente

Sierra Mojada 800. Col. Independencia CP. 44340

Email. arjaloma@gmail.com

Asesor Metodológico: Dra. Hilda Luna Zaizar

Centro Universitario de Ciencias exactas e Ingenierías / Departamento de Química

Universidad de Guadalajara.

Email. hiluna90@yahoo.com.mx

Tesista: Dra. Anabel Beatriz Ramírez Ramírez

Médico residente del segundo año en la subespecialidad de Hematología Pediátrica de
la UMAE Hospital de Pediatría CMNO.

Domicilio: Belisario Domínguez No. 735. Col. Independencia CP. 44340

Email. midavi-ae@hotmail.com.mx

2. RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La hemofilia A es el trastorno de coagulación más frecuente, determinada por un patrón de herencia recesivo ligado al X. La incidencia global de la hemofilia A es de 1 en 5000 – 10 000. Con una incidencia de desarrollo de inhibidores entre 3.6% a 21.4%. Se manifiesta clínicamente, con sangrado anormal, que puede ser espontáneo o inducido por algún trauma. La frecuencia y severidad del sangrado estará en relación al grado de deficiencia del factor. El tratamiento se basa en la sustitución del factor deficiente, con la finalidad de llevar el factor a niveles hemostáticos adecuados. Siendo en la actualidad la presencia de inhibidores, una complicación de la terapia de reemplazo de factor VIII en la hemofilia. En la actualidad las investigaciones se centran en el manejo de estos pacientes, una de ellas es el manejo de la terapia con tolerancia inmune sin embargo en los casos en los que esta terapia no se puede llevar a cabo el empleo de agentes de vía alterna son eficaces y bien tolerados. La capacidad de determinar la opción terapéutica más eficaz, dosis óptima y frecuencia de administración de un agente de vía alterna de manera individualizada a través de un estudio que permita valorar la respuesta hemostática, sería de gran apoyo en el manejo de estos pacientes, una opción es el estudio de generación de trombina ya que evalúa los distintos parámetros de la producción de trombina que reflejan el estado hemostático del paciente y con ello, su respuesta al tratamiento.

OBJETIVO GENERAL. Evaluar el tratamiento en los pacientes con hemofilia A grave con inhibidor mediante el ensayo de generación de trombina.

MATERIAL Y METODOS. Se realizó un estudio transversal, analítico. Pacientes menores de 16 años con el diagnóstico definitivo de hemofilia A grave con inhibidor, cuyos plasmas fueron expuestos *in vitro* a la aplicación de las terapias de vía alterna evaluándose la respuesta de generación de trombina a las distintas dosis. Para estadística descriptiva se utilizó medidas de tendencia central y dispersión; se utilizó Chi-cuadrada en el caso de las variables cualitativas con distribución normal y se aplicó la prueba de T-student para variables cuantitativas con distribución normal. Consideramos significativo una $P < 0.05$.

RESULTADOS. Se incluyeron 11 pacientes con inhibidor positivo, con un 56% de pacientes con inhibidor de alta respuesta. El plasma de cada uno fue expuesto *in vitro* al complejo protrombínico activado (*aPCC*) como agente de vía alterna a distintas dosis. Se observó que mediante el ensayo de generación de trombina el 67% de los pacientes genera la suficiente cantidad de trombina en relación al control sano, a partir de dosis de 50U/Kg/do, a la dosis de 100UI/kg/do, se alcanzan los niveles adecuados en el 90% de los pacientes con *aPCC*, con una $P=0.000001$. En el 90% de los pacientes las dosis elevadas de *aPCC* de 200UI/Kg/do, excedieron el nivel hemostático necesario.

CONCLUSIONES. El ensayo de generación de trombina evalúa de manera sistemática el proceso de la hemostasia, permitiendo una monitorización objetiva, accesible y fiable que puede servir como herramienta para el manejo de estos pacientes. El parámetro de ETP fue el de mayor utilidad para valorar la respuesta *in vitro* del *aPCC*, mostrando una concordancia con la dosis creciente así como con la evaluación clínica.

3. MARCO TEORICO.

ANTECEDENTES.

Historia.

La hemofilia es reconocida desde la antigüedad, las primeras descripciones datan del manuscrito rabínico del siglo II después de Cristo llamado Talmud, en el declara que los bebés varones no debían ser circuncidados, si previamente dos hermanos habían muerto a causa de una hemorragia excesiva debida al procedimiento. El médico árabe Albucasis del siglo 12, describe una familia con hombres que murieron por hemorragia después de una lesión trivial. La primera descripción moderna de la hemofilia es de John C. Otto, médico de Filadelfia, quien en 1803 publicó " La reseña de una disposición hemorrágica existente en ciertas familias". Él denota las características cardinales de la hemofilia, es decir, la tendencia heredada de los varones a sangrar. Sin embargo, el primer uso de la palabra "hemofilia" fue descrito por Hopff de la Universidad de Zurich en 1828.¹

Las primeras descripciones genéticas de la hemofilia fueron publicadas en 1820 por Nasse, quién establece que la hemofilia se transmite en su totalidad por mujeres no afectadas a sus hijos varones. En 1890, König describió por primera vez la relación entre la hemofilia y su afección hacia las articulaciones. La hemofilia es también llamada como "la enfermedad real", debido a que varios miembros de familias reales descendientes de la Reina Victoria de Inglaterra (1837 a 1901), eran afectados, como su octavo hijo Leopold quién sufría de hemorragias frecuentes y murió de una hemorragia cerebral a la edad 31 años, sus dos hijas Alicia y Beatriz, eran portadoras y a través de ellas se transmite la enfermedad a las familias reales españolas, alemanas y rusas.²

Creveld en 1934 demostró que una proteína obtenida a partir del suero reducía el tiempo de coagulación de la sangre hemofílica. Patek y Taylo, descubrieron en 1936 la globulina anti-hemofílica, la cuál era extraída del plasma, con la cuál podían corregir el defecto de coagulación mediante su adición. A mediados de la década de 1960, la introducción de concentrados derivados plasmáticos de factor VIII (FVIII) hizo posible la terapia de reemplazo, y con ello un aumento dramático en la calidad y la esperanza de vida de las personas con hemofilia A. En 1984, Gitschier y colaboradores describieron el gen del factor VIII causante de la hemofilia A.²

Epidemiología.

La hemofilia A es el trastorno de la coagulación más frecuente, con un patrón de herencia recesivo ligado al X, que condiciona deficiencia o ausencia del factor VIII, debido a mutaciones causales en el gen *F8*.³ La incidencia global de la hemofilia A es de 1 en 5000–10 000 nacimientos de varones, constituyendo el 80% de los casos de hemofilia. Se presenta en todos los grupos étnicos sin predilección, social, geográfica o racial.⁴

De acuerdo a la Federación Mundial de Hemofilia en el 2013 se estimó un total de 176,211 personas con hemofilia, de los cuales 140,313 son hemofilia A. En México hay

un total de 4 776 pacientes con hemofilia de los cuales 3 847 son hemofilia A.⁵ Una revisión del 2003 muestra la incidencia de desarrollo de inhibidores que varía de 3.6% a 21.4%, concluyendo una frecuencia global de 8- 14%.⁶

Manifestaciones clínicas.

Se manifiesta clínicamente, con sangrado anormal, que puede ser espontáneo o inducido por algún trauma y puede llegar a ser potencialmente mortal. El grado de severidad de la hemorragia está en relación con el grado de deficiencia del factor y es la base para la clasificación de la hemofilia; enfermedad grave se define como un nivel de plasma de la actividad del factor <1 UI / dl, enfermedad moderada 1 a 5 UI / dl, y la enfermedad leve > 5 a 40 UI /dL. Los pacientes con enfermedad grave son propensos a episodios frecuentes de sangrado espontáneo que con mayor frecuencia afectan a las articulaciones de golpe como tobillos, los codos y las rodillas, pero pueden ocurrir en cualquier lugar, incluyendo los músculos y otros sitios de los tejidos blandos, el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central. Sangrado articular recurrente puede conducir a la artropatía crónica, la principal causa de morbilidad en la hemofilia. Los pacientes con hemofilia moderada típicamente sangran sólo en respuesta a algún elemento de trauma, pero con el desarrollo del daño tisular de la lesión recurrente, las articulaciones y los músculos afectados pueden llegar a ser más propensos a sangrar con poca o ninguna provocación evidente. Los pacientes con hemofilia A leve sangran sólo en respuesta a la lesión tisular significativa inducida por trauma o cirugía. La mayoría de los pacientes con hemofilia grave (90%) se presentarán en el primer año de vida, sobre todo mientras aprende a caminar o gatear. El diagnóstico se sospecha ante la presencia de hemorragia mayor a la espera o en caso de los cuadros severos de manera espontánea. Los estudios de coagulación reportan prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activado, mientras que el tiempo de protrombina, el tiempo de sangrado, y el tiempo de trombina todo será normal. Debe confirmarse mediante la cuantificación del factor VIII. En la hemofilia A grave el tiempo parcial de tromboplastina activado será de 2 a 3 veces más prolongado que el intervalo de referencia. 4,5,6

Modelo Celular de la coagulación.

Dado que este es el trastorno de coagulación más frecuente, es importante describir la patogenia de la enfermedad. Siendo la función primaria del sistema de coagulación mantener un equilibrio entre los factores coagulantes y anticoagulantes, la disrupción en la integridad del endotelio disrupción provoca exposición del subendotelio e iniciación del mecanismo hemostático. La vía clásica de la coagulación ha sido reemplazada por el llamado modelo celular de la coagulación, en el que el factor tisular (TF), las plaquetas, y la trombina juegan un papel clave. La hemostasia primaria implica la compleja interacción de las plaquetas con la pared del vaso mediada principalmente por colágeno y factor de Von Willebrand (VWF), el cuál funciona como sitio de adhesión de las plaquetas al subendotelio, donde las proteínas de la coagulación mediante sitios de unión de fosfolípidos se unen a la superficie de las plaquetas activadas. La hemostasia

secundaria se activa después de la exposición del TF, que se une a factor VII activado (FVIIa) circulante. El complejo TF-FVIIa activa Factor X zimógeno y Factor IX, principalmente factor X. El Factor X activado (FXa) convierte la protrombina (FII) a trombina activada (FIIa). Las cantidades picomolares de FIIa generado en la superficie celular libera FVIII de su proteína transportadora factor de Von Willebrand activando el FVIII. La trombina también activa las plaquetas, exponiendo una superficie rica en fosfolípidos con carga negativa capaz de permitir la unión con las proteínas de la coagulación, incluyendo, factor IX activado (FIXa), previamente generado. FIXa junto FVIIIa, calcio y fosfolípidos forman el complejo tenasa, para activar al FXa. El FXa junto con FV, calcio y fosfolípidos forman el complejo de protrombinasa, que a su vez convierte grandes cantidades de protrombina en trombina, de tal manera que el fibrinógeno se convierte en monómeros de fibrina. La trombina también activa FXIII, que entrecruza los monómeros de fibrina para estabilizar el coágulo, la trombina también activa al factor inhibidor activado de la fibrinólisis, que previene el deterioro del coágulo, mejorando la firmeza del coágulo.^{4,6}

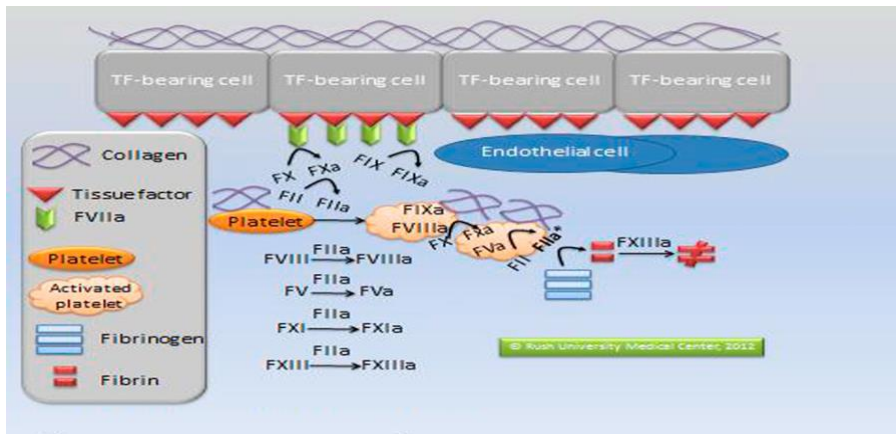


Figura 1. Modelo celular de la coagulación sanguínea. Haemophilia. 2003

Presencia de Inhibidor

El desarrollo de inhibidores es reconocido en la actualidad como la mayor complicación de la terapia de reemplazo con factor VIII, los cuales son resultado de una respuesta inmune compleja de origen multifactorial que involucra tanto a factores específicos de los pacientes como factores relacionados con el tratamiento.⁷ La incidencia de desarrollo de inhibidores varía de 3.6% a 21.4%, con un promedio global de 8-14%. Factores que se sabe que influyen en el riesgo de desarrollo de inhibidores en pacientes con hemofilia, son las grandes deleciones de genes, mutaciones sin sentido, inversiones del intrón 22 e intrón 1.^{6,8} Las variaciones de riesgo entre los grupos raciales y étnicos han sido un hallazgo consistente en varios estudios, por ejemplo, la ascendencia africana y latina representa un mayor riesgo de desarrollo de inhibidor. Factores relacionados en el paciente incluyen la gravedad de la hemofilia, el tipo de mutación genética presente, raza, etnia, antecedentes familiares de inhibidores, el genotipo del antígeno leucocitario humano (HLA), la edad del paciente y edad de primera exposición al tratamiento. Otros

factores incluyen exposiciones de riesgo, como cirugías, vacunación, número de exposiciones y los momentos pico de tratamiento. Los Inhibidores de FVIII suelen desarrollarse en la edad pediátrica con detección inicial después de una media de 14 a 16 días de tratamiento y rara vez después de 50 días de tratamiento. No se ha observado el desarrollo de inhibidores cuando se hacen cambios entre los diferentes productos. Las citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α], interleucina10 (IL -10) o linfocitos T citotóxicos y cooperadores también muestran importancia.⁹ Un factor muy importante en la presencia de inhibidor es el tipo de factor utilizado como terapia, una revisión sistemática de la literatura publicada por Wight y Paisley en 2003 identificó que la incidencia acumulada de desarrollo de inhibidores en estudios en pacientes no tratados previamente (PUP) fue de 0% a 39%, otras revisiones como las reportadas por Franchini et al., en la que incluye 800 PUPs de 25 estudios prospectivos publicados entre 1990 y 2007, encontró que la incidencia de desarrollo de inhibidores era menor en los pacientes tratados con derivados de plasma vs concentrados recombinantes (21% vs 27 %) respectivamente. El estudio RODIN, investigó la asociación entre el tipo de producto de FVIII con el desarrollo de inhibidores en 574 pacientes con hemofilia A grave. La incidencia acumulada de desarrollo de inhibidores fue 32.4% de los cuales 22.4% se catalogaron de alta respuesta siendo similar para ambos productos de FVIII tanto derivados del plasma como recombinantes (razón de riesgo ajustada 0.96- IC 95% 0.62- 1.49). Estudios recientes han sugerido una mayor frecuencia de inhibidores en pacientes tratados con productos de segunda generación. En el caso de los productos que contienen factor de Von Willebrand (VWF) no hubo diferencia significativa entre los concentrados que contienen y no VWF (razón de riesgo ajustada 0.90; IC del 95%: 0.57- 1.41).⁷

Los inhibidores también pueden ser provocados por el tratamiento intensivo con FVIII como en el caso de una cirugía o trauma. Un estudio de cohorte de 41 pacientes con hemofilia A moderada que recibieron terapia de reemplazo con FVIII peri operatoria reportó un incremento de 186 veces el riesgo de desarrollo de inhibidores (IC del 95%) cuando la cirugía era el motivo de la primera exposición intensiva. Otro estudio donde se analizaron 1079 infusiones continuas en 742 pacientes con hemofilia A estableció que el riesgo inhibitor se limitó tan sólo a nueve pacientes (1,2%).¹⁰

Respuesta inmune del factor VIII

La iniciación de una respuesta inmune y la formación de anticuerpos de alta afinidad hacia FVIII requiere endocitosis de la molécula infundida por células presentadoras de antígeno (APCs), por ejemplo, células dendríticas, macrófagos y/o células B, procesamiento intracelularmente en los endosomas, y presentación de péptidos derivados de antígenos a través de las moléculas de HLA de clase II en la superficie de células T CD4. En pacientes no tratados previamente la respuesta inmune tiene lugar presumiblemente a través de vías de células dendríticas, mientras que entre los pacientes con una respuesta inmune establecida, las células B parecen ser las células presentadoras de antígenos. La importancia de las células T reguladoras en el proceso de formación de anticuerpos se ha establecido, y hasta la fecha, diferentes subconjuntos de células con actividades supresoras se han definido, siendo CD4, CD25, FoxP3, las células Treg las

que han recibido mayor atención. Activación de Treg se produce a través de la unión antígeno específico a los receptores de las células T. La formación de Tregs es multifactorial e incluye mecanismos dependientes del contacto directo con participación de células APCs y/o células T efectoras, así como la supresión mediada por citoquinas. Tregs también han sido implicados en el proceso de inducir tolerancia en pacientes mediante la inducción de tolerancia inmune terapia (ITI). Aquí, la exposición frecuente al factor deficiente en ausencia de inflamación sistémica puede inducir células T reguladoras con una posterior falta de células T cooperadoras, falla de la diferenciación de células B y promover la tolerancia a través de la anergia de células B y / o eliminación. En este proceso, la dosificación se ha implicado como un factor crucial para que las altas dosis, inhiban irreversiblemente las células B de memoria a través de un efecto indirecto sobre ambas, APCs y células T. Esto puede explicar los beneficios de los protocolos de tolerancia inmune de dosis alta.^{9,11}

Mutación causal del gen *F8*

Existe un riesgo de desarrollar inhibidor si previamente este ha sido identificado dentro de la familia. Estos hallazgos sugieren una predisposición genética para el desarrollo de anticuerpos inhibidores. Hay más de 500 mutaciones sin sentido reportados en los pacientes con hemofilia A las cuales predisponen al desarrollo de inhibidores, que se agrupan en el dominio A2 y los dominios C1-C2, por ejemplo, Arg593Cys, Asn618Ser, Asp274Gly, Arg2150His, Arg2159Cys, Trp2229Cys, parece que un cambio en la sustitución de aminoácidos aumenta el riesgo inhibidor.

Genes de respuesta inmune

El gen polimórfico más consistentemente asociado con el riesgo inhibidor es el gen de IL-10, el cual parece ser un mediador inmune, con mecanismos que modifican la proliferación de células T, producción de citoquinas, proliferación de células Treg, proliferación y maduración de células B y acción sobre la APCs. Entre los otros genes asociados que codifican para el factor de necrosis tumoral α y linfocitos T citotóxicos relacionados con antígeno 4 (CTLA4).⁹⁻¹¹

El desarrollo de inhibidores al FVIII es la complicación más importante del tratamiento de la hemofilia, que ocurre hasta en el 33% de los pacientes con hemofilia A grave, en el 13% de las personas con hemofilia A no grave. En presencia de un inhibidor, los riesgos de morbilidad, mortalidad además de los costos aumentan sustancialmente. Afectando no solo la calidad de vida de los pacientes si no además de sus familias.¹²

Los inhibidores se clasifican de alta respuesta por arriba de 5 unidades Bethesda (UB) o de baja respuesta por debajo de 5 UB. Una unidad Bethesda se define como la cantidad de inhibidor necesaria para inactivar el 50% de FVIII. Los pacientes con inhibidores de baja respuesta pueden ser tratados con concentrados de FVIII a dosis convencionales o dosis mayores. En los casos de alta respuesta los concentrados de factores son típicamente ineficaces y se utilizan agentes con terapias de vía alterna, como complejo de protrombina activado o factor VII recombinante activado.¹³

Tratamiento.

El objetivo primario de los pacientes con hemofilia es la prevención de los eventos de hemorragia, a través de un manejo integral, que va desde el ejercicio regular y otras medidas para estimular el desarrollo psicomotor, una adecuada higiene bucal para prevenir enfermedades dentales y periodontales, control regular del estado de salud y evaluación periódica. Evitar el uso de medicamentos que afectan la función plaquetaria. Otro objetivo primordial es tratar las hemorragias con el factor de coagulación deficiente, siempre que sea posible, la deficiencia deberá tratarse con concentrados del factor específico, en el caso de la hemofilia A, será a través de la sustitución de factor VIII. Las hemorragias agudas se deben tratar lo antes posible, preferiblemente dentro de las primeras dos horas posteriores al evento. Aún en caso de duda, se debe dar tratamiento. Los pacientes suelen reconocer los primeros síntomas de sangrado, incluso antes de la manifestación de los signos físicos. Esto a menudo se describe como una sensación de hormigueo o "aura". Durante un episodio de hemorragia aguda, se debe realizar una evaluación para identificar el sitio de sangrado si no es clínicamente evidente y administrarse el factor de coagulación apropiado. En los episodios de sangrado severos que puedan poner en riesgo la vida, especialmente en cabeza, cuello, tórax, y el tracto gastrointestinal, el tratamiento con el factor debe iniciarse de inmediato, incluso antes de que se complete la evaluación de diagnóstico. La administración de desmopresina puede elevar el nivel de FVIII de tres a seis veces los niveles de referencia, para controlar el sangrado en pacientes con deficiencia leve y algunos casos de moderada. La inmovilización del área afectada, reposo, hielo, compresión y elevación puede utilizarse como tratamiento complementario para el sangrado en los músculos y las articulaciones. Cuando los concentrados de factor de coagulación no están disponibles, el acceso a los componentes sanguíneos seguros tales como plasma fresco congelado y crioprecipitado, son una opción en la terapia de sustitución. La terapia a demanda consiste en el tratamiento administrado en el momento de la hemorragia clínicamente evidente, este se utiliza en los casos de hemofilia leve y moderada, así como en los casos de hemofilia grave siendo en estos últimos pacientes de gran utilidad el uso de terapia profiláctica. La dosis e intervalo del factor deficiente dependerá del sitio y tipo de sangrado. ¹⁴

Profilaxis.

La prevención de la hemorragia se puede lograr mediante el reemplazo del factor profiláctico. La profilaxis previene el sangrado y la destrucción articular y debe ser el objetivo principal de la terapia con el fin de preservar la función musculoesquelética. Esta puede clasificarse en primaria, secundaria o terciaria. La terapia primaria consiste en la terapia continua tratando de llevar el tratamiento a 52 semanas durante el año o por lo menos cubrir el 85%, que corresponde a 45 semanas. Con un inicio de la terapia en ausencia de afección de las articulaciones por la enfermedad, determinado mediante un examen físico y/o estudios de imagen, y antes de la segunda gran hemorragia articular clínicamente evidente y de la edad de 3 años. Profilaxis secundaria que consiste en la terapia continua. Con un inicio de la terapia después de 2 o más hemorragias en articulaciones grandes como son tobillos, rodillas, caderas, codos y hombro y antes de la

aparición de la afección de las articulaciones documentado por estudios de exámenes físicos y de imagen. Terapia terciaria es el tratamiento que inicia posterior a la afección en articulaciones documentado mediante un examen físico y las radiografías simples de las articulaciones afectadas. Hay dos protocolos de profilaxis en la actualidad: el protocolo de Malmö: 25-40 UI / kg por dosis administrada tres veces por semana, y el protocolo de Utrecht: 15-30 UI / kg por dosis administrada tres veces a la semana.¹⁵ En la actualidad el tratamiento profiláctico ha mostrado su superioridad vs tratamiento a demanda en la calidad de vida de los pacientes con hemofilia. Aproximadamente el 10-15% de los niños con hemofilia grave tienen un fenotipo menos grave con una baja frecuencia de hemorragias articulares en los que su comportamiento determinará si requieren profilaxis. Además la dosis, el intervalo de la profilaxis debe adaptarse de forma individual.

La mayoría de los pacientes con hemofilia A son tratados con terapia de reemplazo a base de FVIII utilizando ya sea derivado plasmático o productos recombinantes.^{16,17} Los derivados plasmáticos fueron los primeros productos disponibles comercialmente, los cuales derivan de grandes pools de plasma humano. La principal discusión hasta la fecha ha sido su seguridad en cuanto a la transmisión de patógenos. Con el uso de nuevos métodos de inactivación y eliminación viral, la transmisión de patógenos de hepatitis B y C y el VIH han mejorado notablemente la seguridad. Hasta la fecha no se ha reportado transmisión de patógeno por productos recombinantes. Los factores recombinantes de primera generación contenían albúmina de suero humano o bovino, la segunda generación tenían estabilizadores no proteicos, pero todavía se utiliza pequeñas cantidades de material derivado de humano/animales, mientras que la tercera generación de Factor VIII carecen totalmente de proteína bovina / humana. Factor VIII puede ser "de dominio completo" o "dominio B suprimido", producida en riñón de hámster bebe o en células de ovario de hámster chino.^{16,18}

Inducción de la tolerancia inmune (ITI)

Se refiere a la exposición del paciente con el factor de manera regular, frecuente y prolongada con el objetivo de inducir la tolerancia inmune. ITI es actualmente el pilar del tratamiento para erradicar el inhibidor, particularmente en pacientes con hemofilia A grave. Los posibles mecanismos que inducen a la tolerancia incluyen, inhibición de la memoria en las células B e inducción de anergia en las células T. En general, ITI es exitoso en 70% de los pacientes con hemofilia A y 30% de aquellos con hemofilia B. Cuando se tiene éxito, los pacientes pueden volver a utilizar concentrados de factor para la prevención y tratamiento de los eventos de hemorragia.

En México, la mayoría de los pacientes con hemofilia reciben terapia a demanda, pero el número de nuevos pacientes que reciben profilaxis primaria o secundaria de acuerdo a las guías clínicas recientes está aumentando en los principales centros de atención de salud. Cuando los pacientes desarrollan inhibidores, son tratados con agentes de vía alterna (*aPCC o FVII*) de acuerdo con los criterios internacionales. En los últimos años, este tipo de terapia no era disponible en México de manera rutinaria, de forma alternativa, los

pacientes con inhibidores eran tratados con dosis elevadas de factor VIII en bolo o infusión continua, y en algunas ocasiones aunado al uso de esteroides. Aunque este no es el tratamiento de elección en algunos casos la hemorragia se pudo resolver y en los casos en los que no había respuesta se utilizaba la terapia de vía alterna.¹⁹

A pesar de que la terapia de tolerancia inmune puede erradicar los inhibidores, este tratamiento es ineficaz en aproximadamente el 30% de los pacientes y puede ser costoso. Por lo que el empleo de agentes de vía alterna, son bien tolerados y eficaces en la gestión de episodios hemorrágicos en pacientes con inhibidores.

En la actualidad los productos disponibles para el tratamiento y prevención de los eventos hemorrágicos en pacientes con inhibidores son el FVII recombinante activado (*FVIIa*) y complejo coagulante anti inhibidor (*aPCC*). FVII recombinante promueve la hemostasia mediante la amplificación del factor tisular inicial siendo capaz de activar FX directamente sobre la superficie de las plaquetas activadas independientes de FVIIIa o FIXa. El *aPCC* contiene FII, FIX, FX, complejo de protrombinasa (FII-FXa) y una pequeña cantidad de FVII activado. Su mecanismo de acción no se comprende completamente, pero hay una fuerte evidencia de su efecto sobre la protrombina y el complejo de protrombinasa para el efecto hemostático. La variación en la respuesta al tratamiento y la falta de métodos validados para evaluar y monitorizar la respuesta del efecto hemostático en pacientes con inhibidores es incierto.²⁰

Profilaxis usando *aPCC*.

En el estudio de Pro-FEIBA, realizado en pacientes >2años de edad con un inhibidor de alta respuesta y eventos hemorrágicos frecuentes, fueron tratados con la terapia de vía alterna y asignados al azar, en dos grupos. El primero tratado con profilaxis con *aPCC* a dosis 85 UI/kg 3 veces por semana y el segundo con tratamiento a demanda. Entre los 26 pacientes incluidos en el análisis, las hemorragias articulares se redujeron de 10.8 a 4.2 eventos en un período de 6 meses. Se observó pobre respuesta en un 38%. Los que presentaron buena respuesta a *aPCC* también demostraron mejoras en la calidad de vida.¹²

Profilaxis usando *FVIIa*

Un estudio multicéntrico, doble ciego, aleatorizado, de 22 pacientes con hemofilia A e inhibidor de alta respuesta fueron asignados al azar para recibir *FVIIa* a dosis de 90 o 270 mg/kg /día durante un período de 3 meses. Durante los 3 meses los episodios de sangrado se redujeron de 5.6 a 3.0 y de 5.3 a 2.2 eventos de sangrado respectivamente. Las hemorragias articulares se redujeron 61% y 43%. La calidad de vida también mejoró, así como reducción en las hospitalizaciones y días perdidos de la escuela o el trabajo.¹²

La profilaxis durante la inducción de tolerancia inmune

Actualmente, el uso de *FVIIa* o *aPCC* para la profilaxis durante ITI es reservado para los pacientes con hemorragia a pesar de un régimen de ITI de dosis alta y un título de inhibidor al inicio >10 UB. Una vez que el título del inhibidor cae a < 10 UB o cuando

hay recuperación del factor medible, la indicación clínica para la profilaxis debe ser reevaluado.¹²

Elección del agente

Tanto *aPCC* y *FVIIa* pueden reducir la frecuencia de los episodios de sangrado. La elección del agente dependerá de la situación clínica actual y la eficacia individual. Debido a que el *aPCC* contiene una pequeña cantidad del FVIII, que puede conducir a un aumento en el título del inhibidor, su uso se evita a menudo antes del inicio de la ITI. Dada la falta de eficacia de vista en algunos pacientes, en los estudios ProFEIBA y FENOC, la capacidad de respuesta de un paciente a un agente de vía alterna específico necesita ser evaluado y ajustado a las condiciones individuales de cada paciente. Por último, el tratamiento diario con FVII, dada su vida media más corta, es difícil y costoso cuando se usa durante períodos prolongados, lo que favorece una ventaja del *aPCC* comparado con el *FVIIa* en la profilaxis de rutina.¹²

Ensayo de generación de trombina.

Las anomalías hemostáticas tradicionalmente han sido evaluadas por los tiempos de coagulación de plasma, como tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Sin embargo, estos ensayos de coagulación estándar no reflejan la generación total de trombina, debido a que sólo miden el inicio de la formación del coágulo y no su velocidad o extensión total, y pueden no ser sensibles a la hipercoagulabilidad o hipocoagulación. En consecuencia, estas pruebas no pueden reflejar con precisión el riesgo de sangrado de un paciente o estado hemostático real.²¹ Estos ensayos hemostáticos convencionales, utilizan el primer pico de formación de fibrina, cuando sólo se forma menos del 5% de la trombina, mientras que el ensayo de generación de trombina (EGT) y Tromboelastografía (TEG) miden la dinámica de coagulación en tiempo, y reportan los resultados en formas de un Trombograma o tromboelastograma que proporcionan información más detallada sobre el proceso de coagulación y pueden reflejar ya sea la hipo o hipercoagulabilidad. Por lo que estos ensayos, son posibles métodos para monitorizar las terapias de vía alterna.²²

Se han propuesto escenarios en los que estos ensayos podrían proporcionar datos importantes en la toma de decisiones terapéuticas de los pacientes con hemofilia. Estos incluyen el fenotipo individual de cada paciente, individualización de la terapia profiláctica para los pacientes con o sin inhibidores, la individualización de la terapia de vía alterna para el manejo de hemorragias y ante un evento quirúrgico, así como evaluar el nivel hemostático de las nuevas terapias en desarrollo clínico.²³

Tromboelastografía (TEG) y los ensayos de generación de trombina (EGT) son ensayos hemostáticos altamente sensibles que han surgido como herramientas para evaluar la capacidad de coagulación y la generación de trombina en plasma. TEG mide la dinámica de la formación de coágulos en la sangre que resulta en una variedad de parámetros de coagulación [R (tiempo de coagulación), K y el ángulo (propagación de coágulos), MA (rigidez máxima de coágulo) y G (coágulo de módulo elástico)]. EGT mide la generación

de trombina a través de una variedad de parámetros de coagulación, incluyendo el tiempo de retardo (lagtime), la concentración pico de trombina (peak), velocidad de generación de trombina y potencial de trombina endógeno (ETP) que refleja la cantidad máxima de trombina que una muestra puede generar. Por lo tanto, la sensibilidad de estos ensayos puede demostrar diferencias sutiles en la formación de trombina y la cinética de coágulo. El TEG se puede utilizar para medir la cinética global de la generación de trombina y la eficiencia de todos los sistemas de activación e inactivación de la coagulación. Ambos métodos han sido propuestos como herramientas para la optimización de la dosis y la duración de las terapias de vía alterna. El ensayo de TEG se puede evaluar en dos medios que son, plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP), siendo el PRP que ha mostrado mayores resultados durante la generación de trombina esto puede ser explicado por la contribución de las plaquetas presentes que resulta en una mayor generación de trombina en comparación con PPP en donde las plaquetas se han reducido.
23,24,25

La medición de los parámetros del ensayo de generación de trombina se han utilizado para monitorizar los agentes de vía alterna tales como el factor VII recombinante (Novoseven, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) o derivados de plasma de complejo coagulante anti inhibidor (FEIBA, Baxter, Viena, Austria). La experiencia en general es todavía bastante limitada. Sin embargo, los resultados preliminares parecen prometedores.

En 2010 Yesim Dargaud y col. realizaron un estudio para evaluar la respuesta de los agentes de vía alterna a dosis escalonadas a través del ensayo de generación de trombina, mediante un protocolo de 3 pasos estandarizados, de 6 pacientes con hemofilia grave con inhibidor de alta respuesta, en 10 procedimientos invasivos electivos, con un control de 96 varones sanos (Paso1) Evaluar la capacidad de generación de trombina in vitro con concentraciones crecientes de *FVIIa* (0, 90, 180, 200, 240, y 270 mg / kg) y *aPCC* (0, 75, y 100 UI / kg) para determinar la dosis mínima de cada agente que normalizará la capacidad generación de trombina (Paso2) De confirmación ex vivo en la que la capacidad de generación de trombina se mide antes y después de la administración de la terapia de vía alterna para dar un mejor perfil hemostático en base al que mostró el mejor perfil hemostático en la prueba anterior; y (Paso3) el seguimiento de la dosis elegida durante la cirugía y postoperatorio. La eficacia hemostática del *FVIIa* se evaluó utilizando plasma rico en plaquetas (PRP). El *aPCC* se evaluó usando plasma pobre en plaquetas (PPP). La respuesta a cada uno de los agentes de vía alterna en base a la dosis, tipo de agente, horario de administración fue diferente en cada paciente, habiendo relación entre la prueba realizada in vitro a la realizada in vivo.²⁶

Otro estudio reciente en México fue realizado por Luna-Záizar y col., con el objetivo de investigar la utilidad de GT para predecir la respuesta al FVIII y *aPCC* en pacientes con hemofilia A grave con inhibidores de alta respuesta, en 189 pacientes conocidos o con sospecha de ser portador de inhibidor FVIII, en 20 instituciones de salud en México, se

encontraron 47 pacientes (24.9%) con títulos altos y 25 (13.2%) con títulos bajos de inhibidor, con un rango de edad entre 7 y 62 años con una media de 14 años. Se obtuvieron muestras de sangre sin tratamiento reciente o con al menos 5 días desde la última infusión de FVIII purificado. Análisis GT se hizo en plasma pobre en plaquetas (PPP) obtenido por centrifugación y se congelaron a -80 ° C hasta su uso, se obtuvieron además controles de plasma normal a partir de muestras de sangre de 35 voluntarios sanos. Para las pruebas de EGT, se definió la respuesta positiva a los agentes terapéuticos con un potencial endógeno de trombina $\geq 60\%$ de plasma normal. Se concluyó una concordancia entre la clínica y la respuesta a las infusiones de FVIII *in vitro* en 28/40 (70%) pacientes. Todos los plasmas con inhibidores mostraron en respuesta a *aPCC in vitro* de una manera dependiente de la dosis. Al evaluar cuantitativamente la capacidad de formación de trombina en una muestra de plasma, la GT es una poderosa herramienta que permite la individualización del tratamiento y la optimización de los recursos terapéuticos para los eventos hemorrágicos en pacientes con inhibidor positivo y así mejorar la rentabilidad global de tratamientos profilácticos y cirugía. La TEG y TGA pueden facilitar la evaluación de riesgo de sangrado y complicaciones trombóticas y ayudar a los clínicos de un paciente optimizar la dosificación estrategias y ofrecer pautas de tratamiento individualizados.²⁷

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hemofilia A es el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente, ligado al cromosoma X, con una incidencia de 1 en 5000 – 10 000 nacimientos, siendo la forma grave la forma de presentación más frecuente. En la actualidad su asociación con la presencia de inhibidor se ha visto en incremento, con una incidencia estimada entre 8% y 14%.

Los eventos hemorrágicos espontáneos y recurrentes son la presentación clínica más frecuente, sobre todo en aquellos con una actividad de factor <1%. Con la presencia de inhibidores se dificulta el manejo sobre todo en los eventos hemorrágicos, incrementando la morbilidad y mortalidad además de los costos.

En la actualidad nuevas herramientas para promover la hemostasia en estos pacientes se están empleando, como la tolerancia inmune, pero existe una pequeña proporción de hasta un 30 % que no habrá una respuesta adecuada y en ellos la terapia de vía alterna puede proporcionar una hemostasia adecuada e incluso prevenir el sangrado cuando se usa de forma profiláctica.

Por lo que determinar la opción terapéutica más eficaz, dosis óptima y la frecuencia de administración de un agente de vía alterna para el tratamiento del evento hemorrágico agudo o preparación para una cirugía en estos pacientes representarían un avance importante en relación al manejo. Debido a que no se cuentan con ensayos específicos que permitan monitorizar la actividad de estos agentes, esto representa un área donde la aplicación práctica de nuevos ensayos puede proporcionar un mejor entendimiento de la respuesta de los pacientes a las terapias de vía alterna.

La prueba de generación de trombina para la gestión de estos agentes ha mostrado ser una herramienta de laboratorio prometedora que puede ayudar a los médicos al entendimiento de la respuesta individual y monitorizar el tratamiento hemostático en pacientes con inhibidores.

4.1 PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Qué parámetros del ensayo de generación de trombina *in vitro* son significativos para evaluar el tratamiento de vía alterna en pacientes con hemofilia A grave con inhibidor?

4.2 HIPOTESIS

Los parámetros del ensayo de generación de trombina son eficaces para la monitorizar la respuesta al tratamiento con las terapias de vía alterna en los pacientes con hemofilia A grave con inhibidor.

5. JUSTIFICACIÓN

La hemofilia A es el trastorno de la coagulación más frecuente, ya que constituye el 80% de los casos de hemofilia. De acuerdo a la Federación Mundial de Hemofilia en el 2013 se estimó un total de 176,211 personas con hemofilia. En México hay un total de 4 776 pacientes con hemofilia de los cuales, 3 847 tienen hemofilia A siendo el 32% menores de 18 años de los cuales, 194 pacientes presentan inhibidor positivo. La manifestación principal de los pacientes con hemofilia A son los eventos hemorrágicos que pueden ser fatales en caso de no establecerse una terapia oportuna y adecuada, siendo esto aún más complejo en el caso de pacientes con presencia de inhibidor, ya que los riesgos de morbilidad y mortalidad así como los costos de atención se incrementan de manera sustancial, causando un impacto no sólo en el paciente sino en sus familias, afectando de manera directa su calidad de vida. Por estos motivos un manejo más específico e individualizado de los pacientes con hemofilia A e inhibidor, mejoraría las expectativas de vida, a través de una terapia dirigida.

La hemostasia y sus anomalías han sido evaluadas tradicionalmente por los tiempos de coagulación del plasma, como tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa). Sin embargo, estos parámetros no reflejan la generación total de trombina, miden sólo la iniciación de la formación de coágulo y no su velocidad o extensión total, y pueden no ser sensibles a la hipercoagulabilidad o hipocoagulación. En consecuencia, estas pruebas no pueden reflejar con precisión el fenómeno de sangrado de un paciente ni optimizar la dosis y grado de respuesta a la terapia empleada.

La prueba de generación de trombina, traduce la cinética global de la generación de trombina y la eficiencia de todos los sistemas de activación e inactivación de la coagulación, representa una herramienta de laboratorio prometedora que puede ayudar a los médicos a monitorizar el tratamiento hemostático de las terapias de vía alterna en pacientes con inhibidor. Su aplicación podría mejorar nuestra comprensión de los resultados de ensayos clínicos y mejorar nuestra capacidad de seleccionar la mejor dosis de reemplazo de factor. Esto a su vez, debería reducir el costo de la atención para los pacientes con hemofilia A con inhibidor al optimizar el recurso terapéutico, mejorando simultáneamente la calidad de vida del paciente.

Al ser la UMAE HP CMNO, un centro de referencia en el Occidente de nuestro país, y contar con los recursos humanos y farmacológicos necesarios, así como pacientes con estas características, se plantea conocer la respuesta de cada paciente hacia las terapias de vía alterna, lo cual aportaría información valiosa sobre el agente al que responde mejor el paciente y la dosis ideal para una adecuada hemostasia, con el fin de dirigir el tratamiento en cada uno de ellos.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el tratamiento en los pacientes con hemofilia A grave con inhibidor mediante el ensayo de generación de trombina.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Conocer los valores basales de los parámetros del ensayo de generación de trombina en el plasma de los pacientes con hemofilia A grave con inhibidor sin tratamiento de vía alterna.
- 2) Conocer las modificaciones de los parámetros de generación de trombina en el plasma de los pacientes con hemofilia A grave con inhibidor, adicionando *in vitro* los tratamientos de vía alterna disponibles, a las dosis equivalentes administradas a los pacientes.
- 3) Correlacionar los parámetros clínicos y hematológicos de la respuesta al tratamiento en los pacientes con hemofilia A grave con inhibidor con el ensayo de generación de trombina.
- 4) Evaluar la utilidad del ensayo de generación de trombina para monitorizar el tratamiento de vía alterna en los pacientes con Hemofilia A grave con inhibidor.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO:

Se realizara un estudio transversal, analítico.

7.2 UNIVERSO DE ESTUDIO:

Pacientes menores de 16 años con el diagnóstico definitivo de hemofilia A grave con inhibidor, cuyos plasmas serán expuestos *in vitro* a la aplicación de las terapias de vía alterna disponibles en la UMAE Hospital de Pediatría CMNO, para su evaluación a dosis equivalentes a las administradas en ellos, mediante el ensayo de generación de trombina.

7.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Es una muestra por conveniencia, en la cual se incluirán a todos los pacientes pediátricos con diagnóstico de hemofilia A grave con inhibidor, dados de alta en el hospital de Centro Nacional de Médico de Occidente, Unidad Médica de Alta Especialidad Pediatría.

8. CRITERIOS DE SELECCIÓN

8.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Ser derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social
- Edad entre 6 meses a 15 años 11 meses
- Cuenta con consentimiento informado
- Porcentaje de actividad del factor VIII menor al 1%
- Presencia de inhibidor > 1 U Bethesda

8.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Hemofilia A leve o moderada
- Hemofilia A grave sin inhibidor
- Otras alteraciones de la coagulación asociadas con Hemofilia A grave con inhibidor
- Aplicación de factor 48 hrs previas al estudio
- Ingesta de medicamentos que afecten a las plaquetas o al sistema de coagulación

9. DEFINICION DE LAS VARIABLES

9.1 VARIABLE INDEPENDIENTE

Edad:

Peso:

Tipo de inhibidor

9.2 VARIABLE DEPENDIENTE:

Edad al diagnostico del inhibidor

Cuantificación inicial del inhibidor

Ultima cuantificación de inhibidor

Tiempo de evolución del inhibidor

Eventos hemorrágicos por año

Dosis promedio de complejo coagulante anti-inhibidor (*aPCC*) administrado en los eventos hemorrágicos

Dosis promedio del factor VII (*FVIIa*) administrado en los eventos hemorrágicos

Respuesta clínica al tratamiento

Inhibidor de baja respuesta
Inhibidor de alta respuesta
Tiempo protrombina
Tiempo parcial de tromboplastina activado
Dosis del *aPCC* administrado
Dosis del *FVIIa* administrado
Cuantificación basal del FVIII previo *aPCC*
Cuantificación basal del FVIII previo *FVIIa*
Pico de trombina con *aPCC*
Pico de trombina con *FVIIa*
Tiempo para el pico con *aPCC*
Tiempo para el pico con *FVIIa*
Potencial de trombina endógeno con *aPCC*
Potencial de trombina endógeno con *FVIIa*
Velocidad de formación de trombina con *aPCC*
Velocidad de formación de trombina con *FVIIa*

9.3 DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES INTERVINIENTES

EDAD

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Es el tiempo transcurrido a partir del nacimiento de una persona.

DEFINICION OPERACIONAL: Es el tiempo transcurrido a partir del nacimiento hasta los 16 años de edad.

PESO

DEFINICION CONCEPTUAL: Peso de la materia contenida en un cuerpo, medida a través de su densidad física.

DEFINICION OPERACIONAL: Peso del individuo expresado en gramos.

INHIBIDOR

DEFINICION CONCEPTUAL: Respuesta inmune y formación de anticuerpos policlonales hacia FVIII, por endocitosis, procesamiento y presentación de péptidos a través de las moléculas de HLA de clase II en la superficie celular a las células T CD4, expresado en unidad Bethesda.

DEFINICION OPERACIONAL: Presencia de complejos inmunes hacia el FVIII expresado en unidades Bethesda.

UNIDAD BETHESDA

DEFINICION CONCEPTUAL: Se define como la cantidad de inhibidor necesaria para inactivar 50% de FVIII en un volumen igual de plasma normal.

DEFINICION OPERACIONAL: Reporte de laboratorio de la cuantificación de inhibidor expresada en unidades Bethesda.

INHIBIDOR DE BAJA RESPUESTA:

DEFINICION CONCEPTUAL: Respuesta inmune y formación de anticuerpos policlonales hacia FVIII expresado por debajo de 5 unidades Bethesda.

DEFINICION OPERACIONAL: Reporte de laboratorio de la cuantificación de inhibidor expresada por debajo de 5 unidades Bethesda.

INHIBIDOR DE ALTA RESPUESTA:

DEFINICION CONCEPTUAL: Respuesta inmune y formación de anticuerpos policlonales hacia FVIII expresado por arriba de 5 unidades Bethesda.

DEFINICION OPERACIONAL: Reporte de laboratorio de la cuantificación de inhibidor expresada por arriba de 5 unidades Bethesda.

TIEMPO DE PROTROMBINA

DEFINICION CONCEPTUAL: Prueba de laboratorio que informa sobre la normalidad o alteración en los niveles de los factores que intervienen en la vía extrínseca de la coagulación, evaluando la actividad de los factores I, II, V, VII y X.

DEFINICION OPERACIONAL: Tiempo que tarda en coagular la sangre cuantificando in vitro la vía extrínseca de la coagulación, expresada en segundos

TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADO:

DEFINICION CONCEPTUAL: Prueba de laboratorio que informa sobre la normalidad o alteración en los niveles de los factores que intervienen en la vía intrínseca de la coagulación, evaluando la actividad de los factores XII, XI, IX, VIII, X, V y I.

DEFINICION OPERACIONAL: Tiempo que tarda en coagular la sangre cuantificando in vitro la vía intrínseca de la coagulación, expresada en segundos.

EVENTO HEMORRAGICO:

DEFINICION CONCEPTUAL: Presencia de sangrado activo que se presente en mucosas, tejidos blandos, músculos, articulaciones y/o sistema nervioso central de manera espontanea o traumática.

DEFINICION OPERACIONAL: Presencia de eventos sangrado a cualquier nivel reportados en el último mes.

RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO:

DEFINICION CONCEPTUAL: Es la individualización posológica u optimización de los tratamientos farmacológicos, a fin de alcanzar la máxima eficacia terapéutica con la mínima incidencia de efectos adversos

DEFINICION OPERACIONAL: Evaluación de la respuesta a la terapia con el uso de agentes de vía de alterna medible en escala de 0-4, teniendo en cuenta respuesta positiva para valores de 3-4 y respuesta negativa para valores de de 0-2

ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA:

DEFINICION CONCEPTUAL: Medición de la generación de trombina en la formación de coágulos a través de una variedad de parámetros de coagulación, incluyendo pico de trombina, tiempo para el pico, potencial de trombina endógeno y velocidad de formación de trombina que refleja la cinética de trombina que una muestra puede generar el coagulo.

DEFINICION OPERACIONAL: Para fines del estudio se medirán los parámetros de generación de trombina en estado basal y en el plasma del paciente, extrapolando las dosis administradas con los agentes de vía alterna, y evaluar de manera in vitro, la respuesta de generación de trombina.

9.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
Edad	Es el tiempo transcurrido a partir del nacimiento	Cuantitativo Continua	Nominal	Años
Peso	Peso de la materia contenida en la unidad de volumen	Cuantitativo	Nominal	Gramos
Respuesta clínica al tratamiento	Estado de salud del paciente	Cualitativa	0 Mala 1 Regular 2 Buena	Expediente clínico

			3 Muy buena 4 Excelente	
Eventos hemorrágicos	Presencia de sangrado activo en mucosas. Incremento de volumen, dolor, calor y rubor, limitación de la función en tejidos blandos y articulaciones.	Cuantitativo	Nominal, politómica	Número eventos hemorrágicos.
Generación de trombina con plasma pobre en plaquetas	Tiempo de inicio (lagtime)	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central	Minutos
	Potencial endógeno de trombina (ETP)	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central	Nano moles por minutos
	Pico (peak)	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central	Nano moles.
	Velocidad de generación de trombina	Cualitativa discreta	Medidas de tendencia central	Nano moles por minutos
Inhibidor	Anticuerpo presente contra FVIII	Cuantitativo discreto	Medidas de tendencia central	Unidades Bethesda
Factor VIII	Cantidad de factor FVIII presente en el plasma	Cuantitativo discreto	Medidas de tendencia central	Porcentaje
TP	Prueba de laboratorio que mide los factores de coagulación de la vía extrínseca	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central	Segundos
TTPa	Prueba de laboratorio que mide los factores de coagulación de la vía intrínseca	Cuantitativa Discreta	Medidas de tendencia central	Segundos

9.5 TRATAMIENTO DE VÍA ALTERNA ANALIZADO EN EL PROYECTO.

Debido a causas ajenas al protocolo por la reparación tardía del fluorómetro, no pudieron realizarse los ensayos de valoración de respuesta al FVIIa, por lo cual el análisis la respuesta *in vitro* fue realizado únicamente con el aPCC.

El cálculo de dosis del aPCC *in vitro* se calculó a partir del rango de dosis terapéutica administrada a los pacientes pediátricos durante los eventos agudos de sangrado de acuerdo a las siguientes consideraciones:

Presentación de *aPCC*: 1000 U dilución 20 ml de agua inyectable
 Concentración: 50UI / ml = 0.05UI / μ L

Dosis terapéutica: 50U / 100U / 200 U
 Dosis de plasma: 30mL/Kg

Cada 30 mL de plasma contiene 50 UI de *aPCC*
 Cada 1 mL de plasma contiene 1.7UI de *aPCC*

DOSIS DE 50 U/Kg	DOSIS DE 100 U/Kg	DOSIS DE 200 U/Kg
50U _____ 30 mL	100U _____ 30 mL	200U _____ 30 mL
1.7U _____ 1 mL	3.4U _____ 1 mL	6.8U _____ 1 mL
0.17U _____ 0.1 mL	0.34U _____ 0.1 mL	0.68UI _____ 0.1 mL

Partiendo del *aPCC* a una concentración de 0.05U / μ L

0.05 UI en 1 μ L _____ 0.17 U en 3.4 μ L

0.05 UI en 1 μ L _____ 0.34 U en 6.8 μ L

0.05 UI en 1 μ L _____ 0.68 U en 13.6 μ L

En cada 100 mL de plasma pacientes contiene.

96.6 μ L Plasma + 3.4 μ L *aPCC* (0.05 UI en 1 μ L) _____ 0.5 U /mL

93.2 μ L Plasma + 6.8 μ L *aPCC* (0.05 UI en 1 μ L) _____ 1.0 U /mL

86.4 μ L Plasma + 13.6 μ L *aPCC* (0.05 UI en 1 μ L) _____ 2.0 U /mL

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los datos fueron obtenidos de la hoja de recolección de datos, capturados con el programa Microsoft Office Excel 2007. Para estadística descriptiva se utilizó medidas de tendencia central y dispersión; se utilizó Chi-cuadrada en el caso de las variables cualitativas con distribución normal y se aplicó prueba de T-student para variables cuantitativas con distribución normal mediante el programa SPSS versión 20.

11. CONSIDERACIONES ÉTICAS:

Esta investigación respeta de forma primordial la declaración de Helsinki de 1964. Se apega a la Ley General de Salud en materia de Investigación y a la Normatividad Institucional del IMSS. Por la naturaleza del estudio se considera de riesgo, por lo cual se requiere consentimiento informado, el cuál será firmado por el padre o tutor responsable del menor, previo conocimiento del estudio, al momento de la toma de muestra. El protocolo será sometido a revisión por el Comité Local de Investigación 1302 de la unidad.

12. DESARROLLO DEL ESTUDIO

Se estudiarán pacientes pediátricos que cumplan con los criterios de inclusión, con previo consentimiento informado de los tutores, quienes serán citados para la toma de muestra sanguínea, la cuál será realizada por personal especializado para obtener tres tubos de tapa azul con citrato de 3.5 mL, de los cuales uno se utilizará para estudio de tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina activado, determinación de factor VIII e inhibidor, dos tubos para la obtención de plasma pobre en plaquetas (PPP), para la realización del ensayo de generación de trombina y un tubo de tapa morada con EDTA para extracción de DNA para estudio molecular en ensayos posteriores. Las muestras serán procesadas y conservadas de acuerdo a las técnicas estandarizadas. A partir de los PPP de los pacientes, se evaluarán los parámetros de generación de trombina en condiciones basales en ausencia del tratamiento y posteriormente, serán adicionados el *FVIIa* y el *aPCC* a las dosis equivalentes a las empleadas en el paciente así como otras dosis con las que se logre la respuesta hemostática idónea. La referencia del nivel hemostático óptimo se obtendrá de un pool de plasmas de 15 menores masculinos en edades equivalentes con coagulación normal, que será corrido de forma paralela con los PPP de los pacientes.

13. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACION

13.1 RECURSOS Y FINANCIAMIENTO

13.1.1 HUMANOS

Director de Tesis: Dra. Janet Soto Padilla

Médico Hematólogo Pediatra adscrito al servicio de Hematología Pediátrica de la UMAE Hospital de Pediatría CMNO

Domicilio: Belisario Domínguez No. 735. Col. Independencia CP. 44340

Email. sirenajanet@hotmail.com

Asesor Metodológico: Dra. Ana Rebeca Jaloma Cruz

División de Genética, Centro de Investigación Biomedica de Occidente
Sierra Mojada 800. Col. Independencia CP. 44340

Email. arjaloma@gmail.com

Asesor Metodológico: Dra. Hilda Luna Zaizar
Centro Universitario de Ciencias exactas e Ingenierías / Departamento de Química
Universidad de Guadalajara.
Guadalajara, Jalisco.
Email. hiluna90@yahoo.com.mx

Tesista: Dra. Anabel Beatriz Ramírez Ramírez
Médico residente del segundo año en la subespecialidad de Hematología Pediátrica de
la UMAE Hospital de Pediatría CMNO.
Domicilio: Belisario Domínguez No. 735. Col. Independencia CP. 44340
Email. midavi-ae@hotmail.com.mx

13.1.2 MATERIALES

Hojas, bolígrafos, computadora, impresora.

Software Microsoft Office, Windows XP (Word, Excel y Power Point).

13.1.3 FINANCIEROS

Los gastos generales para realizar este protocolo serán cubiertos por el investigador. Los gastos que se generaron para el abordaje clínico de pacientes y la terapéutica es cubierta con recursos de la institución.

14. RESULTADOS

CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES.

En el hospital de UMAE HP CMNO se cuenta con un registro aproximado de 145 pacientes con hemofilia A de los cuales 11 pacientes presentan inhibidor positivo, lo que corresponde a un 7.5% de la población. En el estudio se incluyeron 9 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión para participar en el estudio. Entre 2 a 13 años con una mediana de edad de 7.6 años. De los cuales el 4 (45%) corresponden a menores de 5 años, 2 (22%) con edades entre 6 a 10 años y 3 (33%) mayores de 11 años. La prueba de TTPa fue anormal en todos los pacientes como era de esperarse (>180/33.8 segundos; normal 32.1- 46). La actividad promedio del factor al momento del estudio fue de 0.2%.

La edad promedio de diagnóstico de hemofilia fue de 11 meses. De los cuales 2 pacientes (22%) eran menores de 6 meses al diagnóstico, 4 (45%) de 7-12 meses y 3 (33%) de 13 a 24 meses de edad.

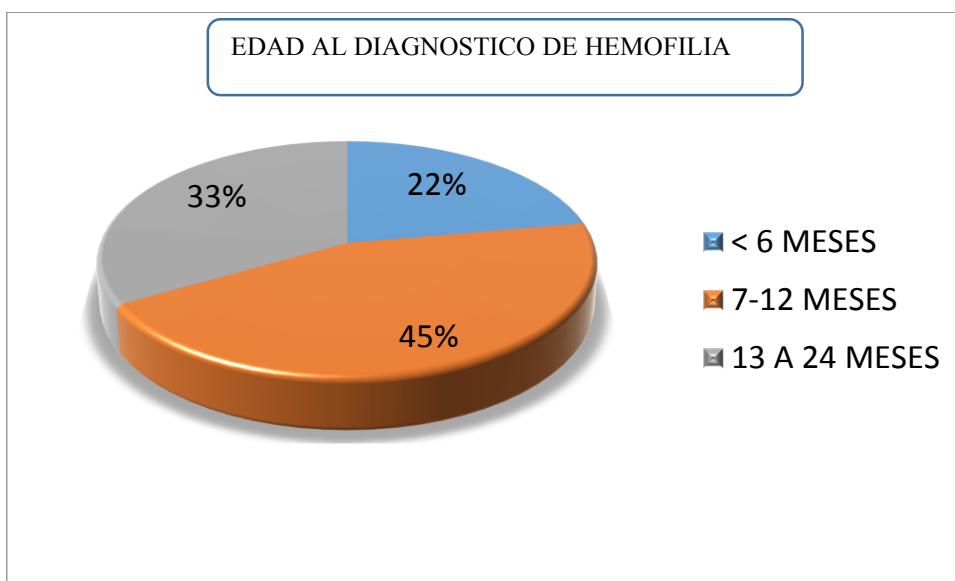


FIGURA 2. EDAD AL DIAGNOSTICO DE HEMOFILIA

BUSQUEDA Y CUANTIFICACIÓN DEL INHIBIDOR

La mediana de edad al diagnóstico de inhibidor fue 5 años, los rangos de edad fueron muy amplios de 1.5 años a 13 años. Al momento del diagnóstico 3 de 9 pacientes presentaron inhibidor de baja respuesta. Dos de los 3 pacientes con inhibidor de baja respuesta se encuentran en tratamiento a demanda con dosis altas de factor VIII sin presentar incremento en la cuantificación del inhibidor, la cuantificación inicial en estos dos

pacientes fue menor a 2 UI Bethesda. El tercer paciente su cuantificación inicial fue de 4.4 UI Bethesda, muy cercano al valor de alta respuesta, presentando eventos recurrentes de hemorragia tratado con terapia de vía alterna, siendo en su última cuantificación se reporta como de alta respuesta

Al momento del estudio se realizó una nueva cuantificación de inhibidor en la que 3 pacientes se reportaron como de baja respuesta incluyendo a los dos pacientes de menos de 2 U Bethesda al momento del diagnóstico y en un caso se reporto como negativo. La máxima determinación de inhibidor fue de 172 U Bethesda durante el estudio. En todos los pacientes al momento del diagnóstico de inhibidor se suspendió el tratamiento con FVIII quedando en la mayoría con tratamiento a demanda con agentes de vía alterna, sólo los dos pacientes con inhibidor de baja respuesta el tratamiento de los eventos agudos fue con FVIII a altas dosis. Lo que cabe destacar es que pese a la suspensión del tratamiento el 55% persiste con inhibidor de alta respuesta, lo que sigue siendo una problemática, ya que el manejo de estos pacientes en relación a las terapias de vía alterna es incierto. Ninguno de los pacientes fue sometido a terapia de inmunotolerancia. Solo un paciente al que se suspendió la profilaxis con FVIII y fue manejado con terapia de vía alterna a 5 años del diagnóstico se reporto como negativo.

Los eventos hemorrágicos se presentaron en más de 3 ocasiones en la mayoría de los casos, con excepción de un paciente que no presento ningún evento a 9 meses del diagnóstico de inhibidor de baja respuesta. Los sitios de sangrado fueron principalmente de alto riesgo ya que involucraban tubo digestivo, sistema genitourinario y de sistema nervioso central.

Los pacientes tratados con terapia de vía alterna el 70% han sido tratados con ambos agentes. Las dosis al inicio como durante el evento hemorrágico fueron establecidas por el médico tratante, así como la elección del medicamento en base a la clínica al momento del ingreso al servicio de urgencias y durante su hospitalización. En el manejo con *aPCC* el 34% se utilizaron dosis <50UI/Kg/do al igual que dosis de 150 a 200UI/Kg/do. En dos de los pacientes no se ha aplicado el agente previamente. En el caso del *FVIIa*, la dosis promedio utilizada fue de 51 a 100 mcg/Kg/do en el 33% de los pacientes, éste es el agente que menos ha sido utilizado como terapia de vía alterna. (Figura 3)

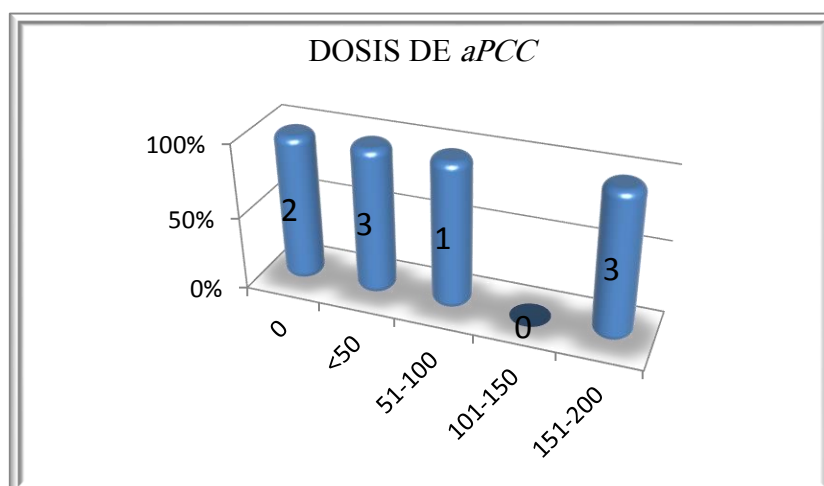


FIGURA 3. DOSIS PROMEDIO ADMINISTRADA aPCC

La evaluación de la respuesta al tratamiento en base a la clínica fue extraída del expediente y catalogada en 4 puntos, dando el valor de 0 como mala respuesta, 1 respuesta regular, 2 buena, 3 muy buena y 4 como excelente. En el caso de 2 de los 9 pacientes la respuesta no pudo ser evaluada debido a que no han sido expuestos a las terapias de vía alterna. Del resto el 57% se evaluó como muy buena respuesta. (Figura 4)

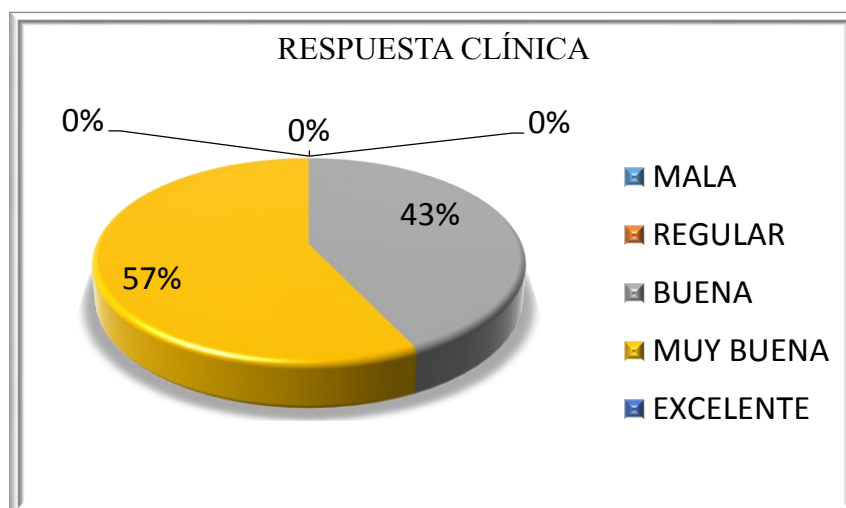


FIGURA 4. RESPUESTA CLÍNICA A LOS AGENTES DE VÍA ALTERNA

ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA

Se midió la generación de trombina en el 100% de los pacientes, así como su respuesta a la exposición in vitro del plasma de los pacientes con la terapia de vía alterna. Los parámetros que se midieron fueron Lagtime (Tiempo de inicio), ETP (Potencial de Trombina Endógeno), Peak (Pico), ttPeak (Tiempo al pico) y VelIndex (Velocidad de generación de trombina), en cada uno de los pacientes. Se presentan valores basales, y posterior a la aplicación de distintas dosis de *aPCC*, 50UI/Kg/do, 100UI/Kg/do y 200UI/Kg/do. Observándose el cambio en los parámetros comparado con los valores normales y basales de los pacientes control. Los valores normales corresponden al promedio de las determinaciones realizadas en alícuotas de plasmas normales \pm desviación estándar. Los resultados presentados corresponden al porcentaje de los parámetros de GT respecto a los de los plasmas normales de acuerdo pareados por edad.

Para la identificación de los nueve pacientes, se empleará una nomenclatura indicando el padecimiento y la positividad a inhibidor como sigue: HA Inh-1, con número consecutivo al final para cada paciente. (Figura 5). Serán ilustrados algunos casos representativos del comportamiento de los parámetros de la generación de trombina.

PACIENTE
HA Inh-1
HA Inh-2
HA Inh-3
HA Inh-4
HA Inh-5
HA Inh-6
HA Inh-7
HA Inh-8
HA Inh-9

Tabla 1. LISTA DE NOMENCLATURA DE LOS PACIENTES

Se observó que mediante el ensayo de generación de trombina 67% de los pacientes genera la suficiente cantidad de trombina en relación al control sano, a partir de dosis de 50U/Kg/do, a la dosis de 100U/kg/do, se alcanzan los niveles adecuados en el 90% de los pacientes.

Considerándose como respuesta adecuada por arriba del 80% en relación al valor control. (Figura 5)

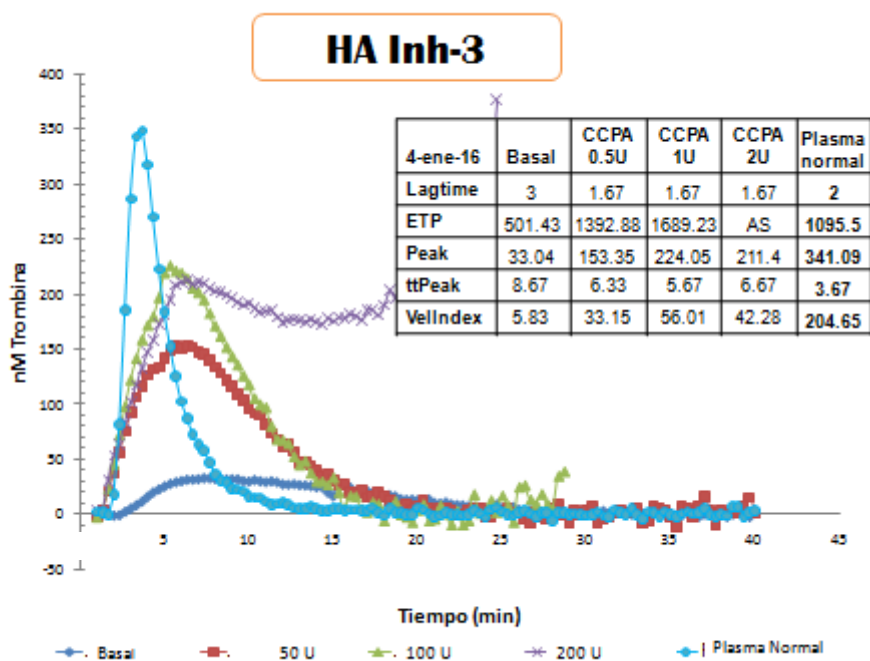


FIGURA 5. CURVA DE GENERACIÓN DE TROMBINA A DIFERENTES DOSIS EN EL PACIENTE HA INH-3 COMPARADA CON PLASMA NORMAL

Llama la atención que el 78% de los pacientes, presentan un nivel mínimo basal de ETP, aún siendo pacientes con hemofilia A severa con inhibidor, sólo en el caso de dos

pacientes la basal se reporta como 0, y esto se correlaciona con el fenotipo hemorrágico de los dos pacientes causado por la presencia del inhibidor. (Figura 6)

HA Inh-5

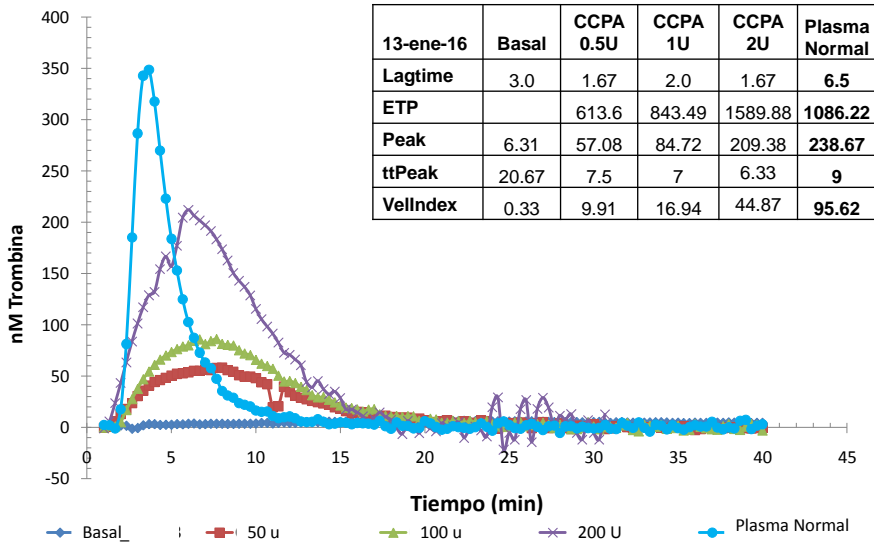


FIGURA 6. CURVA DE GENERACIÓN DE TROMBINA A DIFERENTES DOSIS EN EL PACIENTE HA INH-5 COMPARADA CON PLASMA NORMAL

En el 90% de los pacientes se observa que las dosis elevadas de aPCC de 200UI/Kg/do, se sale del nivel hemostático necesario, comparado con el pool control e incluso agota el sustrato necesario para seguir produciendo trombina en el ensayo lo que podría traducirse como un incremento en el riesgo de trombosis, siendo que con dosis menores se logra una adecuada generación de trombina. (Figura 7)

HA Inh-8

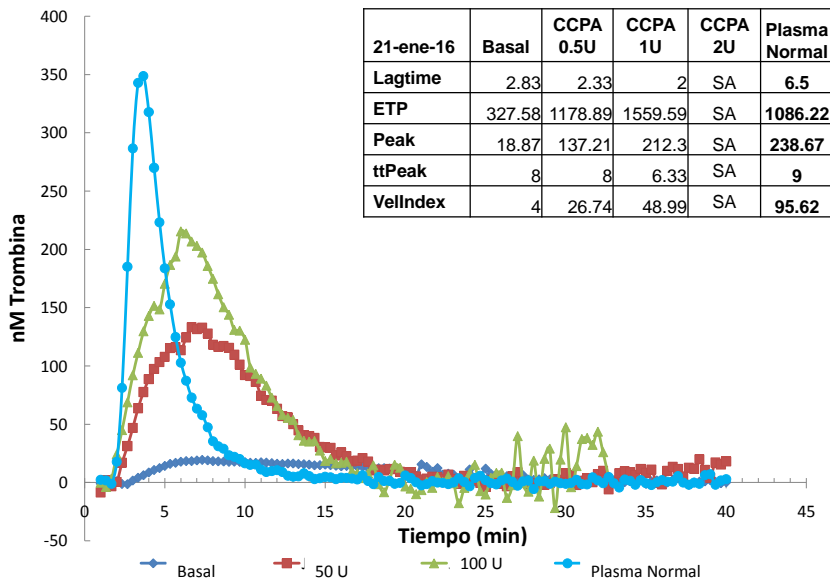


FIGURA 7. CURVA DE GENERACIÓN DE TROMBINA A DIFERENTES DOSIS EN EL PACIENTE HA INH-3 COMPARADA CON PLASMA NORMAL

Se integraron los valores promedio de parámetros del EGT de los nueve pacientes estudiados respecto al plasma normal que fueron agrupados de acuerdo a las dosis de tratamiento (Figura 8). Se pudo observar el aumento del ETP en relación a la dosis creciente de *aPCC* administrada, con una $P = 0.000001$. En el caso de la dosis de 200U/Kg/do la gráfica no muestra un incremento de la generación de ETP debido a que el potencial es muy alto desde dosis de 100U/Kg/do, que consume el sustrato e impide que se siga generando trombina, de manera *in vitro*, esto habría que correlacionarlo con pruebas *in vivo*. El pico también se observa que se va incrementando en relación al aumento de la dosis de *aPCC* con una $P=0.000001$ indicando que se está produciendo una adecuada generación de trombina. A diferencia el lagtime presenta una $P= 0.23$. La velocidad de generación de trombina se acelera en relación a al aumento de la dosis del *aPCC* con una $P=0.001$.

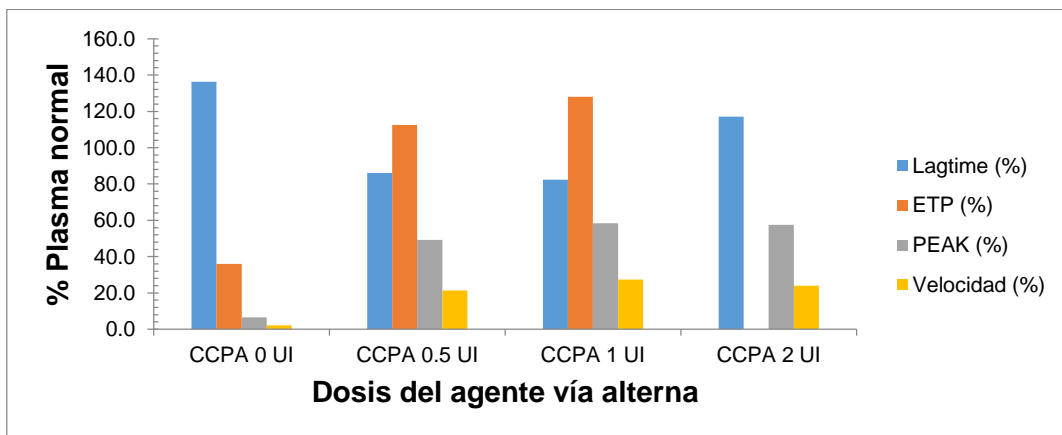


FIGURA 8. Gráfica de valores promedio de parámetros del EGT de los nueve pacientes estudiados respecto al plasma normal

15. DISCUSIÓN

El manejo de los eventos hemorrágicos en el paciente con hemofilia A grave es complejo y más aún ante la presencia de inhibidor, ya que incrementa la morbilidad y mortalidad en cada evento, afectando no sólo la calidad de vida del paciente si no de todos en su núcleo familiar. El tratamiento óptimo de los pacientes con hemofilia es la prevención de los eventos de sangrado mediante la profilaxis con infusiones regulares de FVIII, ya que de esta manera se ha mejorado de manera importante la calidad de vida en estos pacientes. Aunado a un manejo integral, que va desde el ejercicio regular y otras medidas para estimular el desarrollo psicomotor, control regular del estado de salud y evaluación periódica. La mayor complicación en el manejo de la terapia con FVIII es el desarrollo de inhibidor resultando en una disminución significativa de la respuesta de reemplazo con FVIII, lo que incrementa los eventos de sangrado y en muchas ocasiones elevación de los costos en el manejo de estos pacientes. La objetivo en el tratamiento de los pacientes con inhibidor son dos principalmente, uno es erradicar el inhibidor mediante el uso de inmunotolerancia, pero este tipo de tratamiento puede llevar tiempo para establecer su eficacia además de incrementar sustancialmente los costos de demanda de FVIII de hasta en un 70% (Tunstall 2015).

El otro objetivo es el control de los episodios de hemorragia, el enfoque del tratamiento depende de factores como la severidad del sangrado, título del inhibidor, pero principalmente de las características propias de cada paciente. Para la mayoría de los pacientes que son altos respondedores, los agentes de vía alterna como *aPCC* o *FVIIa* son útiles en los eventos de sangrado agudo (Wolfhart 2014).

La complejidad de establecer una dosificación terapéutica con los agentes de vía alterna de manera óptima y un monitoreo adecuado en pacientes con hemofilia A con inhibidor representa un desafío para cualquier especialista a nivel mundial. En parte debido a la variabilidad de cada paciente con respecto a las terapias de vía alterna, así como por las dificultades que pueden presentarse en el entorno del paciente.

Por lo que un tratamiento dirigido en base a parámetros medibles y fiables puede individualizar el manejo en estos pacientes y con ello mejorar la calidad de vida y disminuir la comorbilidades. La frecuencia de inhibidores se estima en un 20 a 30% de la población con hemofilia A. En CMNO UMAE Pediatría la población estudiada es representativa debido a que en una sola unidad de atención médica se identificaron 11 pacientes con inhibidor positivo, de los cuales 9 entraron en el universo de estudio.

El estudio demostró que el ensayo de generación de trombina es un método eficaz para evaluar la respuesta de los agentes de vía alterna, ya que se observa de manera gráfica que la adición del agente, al plasma problema, de estar en un nivel basal bajo que no genera trombina este se incrementa a niveles incluso superiores a los controles utilizando dosis bajas. El ensayo de generación de trombina mide las concentraciones reales de trombina antes y después que se forme el coágulo siendo sensible a las variaciones de

acuerdo a cada una de las dosis administradas. El parámetro que mostró mejor sensibilidad en la generación de trombina es ETG. Aunque la curva no muestre ser superior al control en las determinaciones de las tablas se observa que rebasa el 100%, tomando como una respuesta óptima por arriba del 80%, en ninguno de los pacientes se demostró que quedara por debajo de los niveles que pudieran predisponer al paciente a riesgo hemorrágico, con un valor por debajo del 30%. (Yilmaz, 2012).

La eficacia clínica de la terapia de vía alterna en los pacientes con inhibidor no se puede evaluar mediante pruebas de coagulación tradicionales. Las pruebas *in vitro* con dosis crecientes con *aPCC* en el plasma con inhibidor muestra un incremento de la curva de generación de trombina dependiente de la dosis y esto se correlaciona clínicamente con la respuesta de los pacientes ya que en la evaluación de la respuesta a los agentes de vía alterna se establece como muy buena, además la descripción de los parámetros es muy similar a los resultados de los pacientes *in vivo*, por ejemplo en el paciente HA Inb-8, quien presenta eventos de sangrado recurrentes pero no graves que responde a dosis bajas de *aPCC*, por el contrario el paciente HA Inh-5 que presenta niveles basales de ETG de 0 que presenta sangrados recurrentes graves principalmente a sistema nervioso central, debido a la nula actividad del factor que este paciente presenta al momento basal del estudio y al ser expuesto a dosis altas de *aPCC* responde aunque de manera un poco más lenta en relación a los controles.

El estudio además mostró que las dosis elevadas de *aPCC* generan mayor cantidad de trombina, lo cual se puede correlacionar con una mejor respuesta clínica del tratamiento y en exceso, puede incrementar el riesgo de trombosis que si bien, en el caso de los agentes de vía alterna esto es infrecuente, puede presentarse e incluso ser fatal o dejar secuelas graves en el paciente (Jan Astermak 2004). (Figura 9)

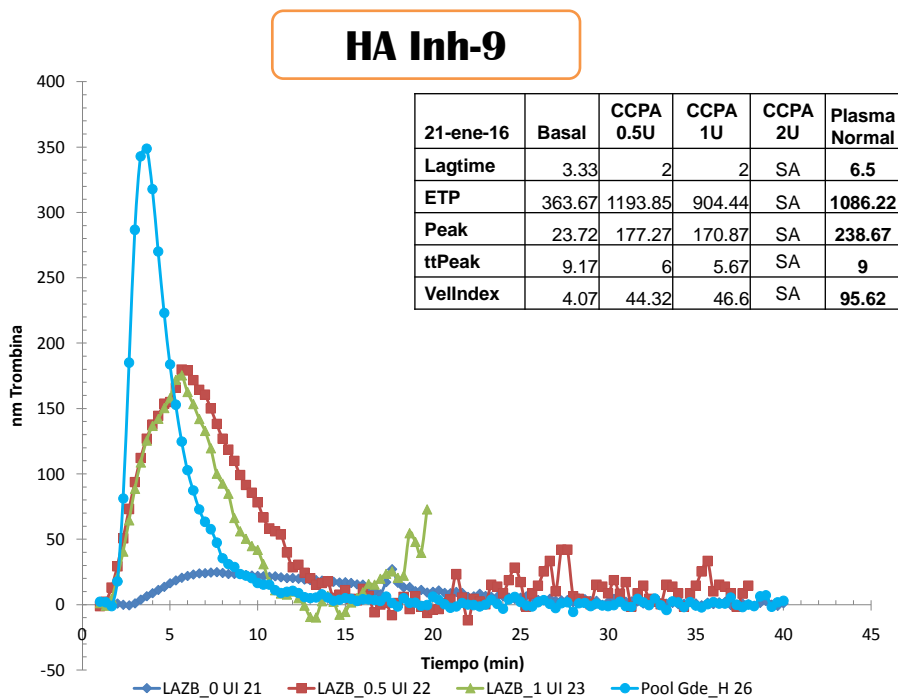


FIGURA 10. CURVA DE GENERACIÓN DE TROMBINA A DIFERENTES DOSIS EN EL PACIENTE HA Inh-9 COMPARADA CON PLASMA NORMAL

El ensayo de generación de trombina permite evaluar de manera global la función hemostática ya que en otras variantes del ensayo analiza la sangre entera y por lo tanto mide los efectos tanto de los componentes celulares como plasmáticos de la hemostasia, evalúa no solo la cinética del coágulo, sino además su estabilidad e incluso su lisis (Wenker 2000). En nuestro caso se empleó un plasma pobre en plaquetas que fue congelado previamente a su estudio por la logística empleada para la captación de los pacientes y su posterior estudio, sin embargo pese a la ausencia de plaquetas, se observó una clara correlación con la dosis del tratamiento y el comportamiento de los pacientes, indicando que la respuesta al agente terapéutico permite un análisis válido con la muestra de plasma en las condiciones empleadas y que resultan ampliamente factibles.

Esto fue demostrado por el estudio que constituye el antecedente de este trabajo en población mexicana, realizado por H. Luna y col. (2014), que tuvo el objetivo de investigar la utilidad de EGT para predecir la respuesta al FVIII y *aPCC* en pacientes con hemofilia A severa con inhibidores de alta respuesta, en 189 pacientes conocidos o con sospecha de ser portadores de inhibidor FVIII. Para las pruebas de EGT, se definió la respuesta positiva a los agentes terapéuticos con un potencial de trombina endógena $\geq 60\%$ de plasma valor normal. Se concluyó una concordancia entre la clínica y la respuesta a las infusiones de FVIII *in vitro* en 28/40 (70%) pacientes. Todos los plasmas con inhibidores mostraron en respuesta a *aPCC in vitro* de una manera dependiente de la dosis. Al evaluar cuantitativamente la capacidad de formación de trombina en una muestra de plasma, la EGT mostró ser una herramienta de laboratorio que permite la individualización del tratamiento y la optimización de los recursos terapéuticos para los eventos hemorrágicos en pacientes con inhibidor de positivo que permiten mejorar la rentabilidad global de los tratamientos profilácticos.

Así mismo, el EGT puede ser una herramienta sumamente valiosa para monitorear el tratamiento durante procedimientos quirúrgicos en estos pacientes, como lo demostró el estudio realizado en 2010 por Yesim Dargaud y col. evaluó la respuesta de los agentes de vía alterna a dosis escalonadas a través del ensayo de generación de trombina, mediante un protocolo de 3 pasos estandarizados, de 6 pacientes con hemofilia grave con inhibidor de alta respuesta, en 10 procedimientos invasivos electivos, con un control de 96 varones sanos. La respuesta a cada uno de los agentes de vía alterna en base a la dosis, tipo de agente, horario de administración fue diferente en cada paciente, habiendo relación entre la prueba realizada *in vitro* a la realizada *in vivo*.

16. CONCLUSIONES

El ensayo de generación de trombina (EGT) demostró potencial para ser empleado por el servicio de Hematología Pediátrica para establecer las dosis terapéuticas óptimas a través de manejo individualizado de los pacientes con hemofilia A grave positivos a inhibidores contra el FVIII.

El EGT permitió una evaluación sistemática del proceso de la hemostasia de forma objetiva, accesible y fiable y que permite la monitorización de la respuesta terapéutica, lo cual será de gran ayuda en el manejo de estos pacientes.

El ensayo de generación de trombina representa un marcador indirecto del monitoreo de los agentes de vía alterna en condiciones de evaluación de plasma pobre de plaquetas *in vitro*, que facilitó la evaluación de la respuesta al tratamiento y puede indicar el riesgo potencial de hemorragia o trombosis que deberá ser confirmado por estudios subsecuentes.

El parámetro ETP fue el más útil y de mayor sensibilidad en el ensayo de generación de trombina para valorar la respuesta *in vitro* al *aPCC*, seguido del parámetro pico, mostrando ambos una concordancia con la dosis creciente.

La respuesta de los agentes de vía alterna se debe valorar de manera individualizada dada la gran variabilidad observada en estos pacientes. Aunque nuestros resultados no pueden extrapolarse directamente a la respuesta *in vivo*, nos permite sugerir su uso como un estudio medible y confiable.

17. BIBLIOGRAFIA.

1. Franchini M, Mannucci PM. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:24.
2. Schramm W. The history of haemophilia a short review. *Thromb Res.* 2014;134;4–9.
3. Bhavya S, Gangadharan B, Doering CB, Meeks SL. Potentiation of Thrombin Generation in Hemophilia A Plasma by coagulation Factor VIII and Characterization of Antibody-Specific Inhibition. *PLoS One.* 2012;7(10):e48172.
4. Zimmerman B, Valentino LA. Hemophilia: In Review. *Pediatr Rev.* 2013;34(7):289-295.
5. World Federation of Hemophilia. Report on the Annual Global Survey 2013. <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1618.pdf>
6. Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia.* 2003;9:418–435.
7. Kreuz W, Ettingshausen CE. Inhibitors in patients with haemophilia A. *Thromb Res.* 2014;134:22–26.
8. Josephson N. The hemophilias and their clinical management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013:261-7.
9. Astermark J. FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. *Blood.* 2015;125(13): 2045-2051.
10. Lillicrap D, Hijnvandreaa K, Santagostino E. Inhibitors B genetic and environmental factors. *Haemophilia.* 2014;20:87–93.
11. Scott DW. Inhibitors cellular aspects and novel approaches for tolerance. *Haemophilia.* 2014;20:80–86.
12. Christine L, Meeks SL. Toward optimal therapy for inhibitors in hemophilia. *Blood.* 2014;124(23):3365-3372.
13. Leissinger CA, Singleton T, Kruse-Jarres R. How I use bypassing therapy for prophylaxis in patients with hemophilia A and inhibitors. *Blood.* 2015;126(2):153-9.
14. Guidelines for the management of hemophilia; 2nd edition. <http://www.wfh.org/es/resources/guias-para-el-tratamiento-de-la-hemofilia>
15. Ljung R, Andersson NG. The current status of prophylactic replacement therapy in children and adults with haemophilia. *Br J Haematol.* 2015;169:777–786.
16. Calvez T, Chambost H, Claeysens-Donade S. Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. *Blood.* 2014;124(23):3398-3408.
17. Berntorp E, Shapiro AD. Modern haemophilia care. *Lancet.* 2012; 379(9824):1447-1456.
18. Franchini M, Tagliaferri A, Mengoli C, Cruciani M. Cumulative inhibitor incidence in previously untreated patients with severe hemophilia A treated with plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates: a critical systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;81(1): 82-93.
19. H. Luna Zaizar, C. P. Beltran-miranda, M. Esparza Flores. “Thrombin generation as objective parameter of treatment response in patients with severe haemophilia A and high-titre inhibitors”. *Haemophilia.* 2014; 20; 7-14.
20. Tran HT, Sorensen B, Bjornsen S, Pripp AH. Monitoring bypassing agent therapy a prospective crossover study comparing thromboelastometry and thrombin generation assay. *Haemophilia;* 2015; 21; 275–283.

21. Qi X, Zhao Y, Li K, Fan L, Hua B. Evaluating and monitoring the efficacy of recombinant activated factor VIIa in patients with haemophilia and inhibitors. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014;25(7); 754-760.
22. Ay Y, Balkan C, Karapinar DY, Akin M. Feasibility of Using Thrombin Generation Assay (TGA) for Monitoring Bypassing Agent Therapy in Patients With Hemophilia Having Inhibitors. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012;19(4);389-394.
23. Young G, Sorensen B, Dargaud Y, Negrier C. Thrombin generation and whole blood viscoelastic assays in the management of hemophilia: current state of art and future perspectives. *Blood*. 2013;121(11);1943-1950.
24. Salinas V, Carmona R, Mohammed BM, Martin J. Is some better than none: are TEG and TGA profiles different in severe FVIII-deficient patients with inhibitors? *Haemophilia*. 2015;21;398–404.
25. Yesim Dargaud, Alisa S. Wolberg, Roger Luddington, Veronique Regnault. “Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: An international multicentre study”. *Thrombosis Research*. 2012; 130; 929–934.
26. Dargaud Y, Lienhart A, Negrier C. Prospective assessment of thrombin generation test for dose monitoring of bypassing therapy in hemophilia patients with inhibitors undergoing elective surgery. *Blood*. 2010;116(25);5734-5737.
27. Luna-Zaizar H, Beltran-Miranda CP, Esparza-Flores A. Thrombin generation as objective parameter of treatment response in patients with severe haemophilia A and high-titre inhibitors. *Haemophilia*. 2014;20;7-14.

18. ANEXOS



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CENTRO MEDICO NACIONAL DE OCCIDENTE

UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD PEDIATRIA

“ENSAYO DE GENERACION DE TROMBINA IN VITRO PARA LA EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO DE VÍA ALTERNA EN PACIENTES CON HEMOFILIA A GRAVE CON INHIBIDOR”

LUGAR Y FECHA:

EDAD:

NOMBRE

AFILIACIÓN:

JUSTIFICACION Y OBJETIVO DEL ESTUDIO:

Estamos invitando a participar a su hijo en un estudio de investigación que se lleva a cabo en el servicio de Hematología pediátrica, CMNO, del Instituto Mexicano del Seguro Social. El estudio tiene como propósito monitorizar la respuesta al tratamiento con los agentes de vía alterna a través del ensayo de generación de trombina de manera *in vitro*. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar en él. Con el objetivo de establecer la respuesta que presenta su hijo ante la exposición a las terapias de vía alterna.

PROCEDIMIENTO: Se estudiarán pacientes pediátricos, los cuales serán citados para la toma de muestra sanguínea, la cuál será realizada por personal especializado, de donde se obtendrán, tres tubos de tapa azul con citrato, de los cuales uno se utilizará para estudio de tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina activado, determinación de factor VIII e inhibidor, dos tubos para la realización del ensayo de generación de trombina y un tubo de tapa morada con EDTA para extracción de DNA para estudio molecular en ensayos posteriores. Las muestras serán procesadas y conservadas de acuerdo a las técnicas estandarizadas, una vez procesada la muestra, y se dé inicio al ensayo de generación de trombina se adicionará la terapia de vía alterna *in vitro* a dosis escalonadas, con medición de los parámetros de generación de trombina y monitorizar así la respuesta hemostática.

POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS:

Hematoma, hemorragia o dolor en el sitio de punción.

BENEFICIOS:

A usted no se le pagará, ni tendrá que pagar nada por ingresar al estudio. Usted no obtendrá ningún beneficio. Al participar en este estudio usted ayudará a monitorizar la respuesta hemostática a los agentes de vía alterna por medio del ensayo de degeneración de trombina, y por lo tanto conocer mejor la respuesta de su hijo a la terapia, para que en un futuro se pueda llevar un mejor manejo y optimización de la dosis para el tratamiento.

INFORMACION SOBRE RESULTADOS Y ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO:

Los resultados de este estudio ayudarán a monitorizar la respuesta a las terapias de vía alterna en los pacientes con presencia de inhibidor. Con ello optimizar la dosis, horario y tipo de medicamento, contribuirá a ayudar a un manejo más dirigido. Se le informará acerca de los resultados y si fuera necesario que usted continúe en el estudio, después se le solicitaría nueva autorización por escrito.

PARTICIPACION O RETIRO:

La participación en este estudio es totalmente voluntaria. Si usted acepta que su hijo ingrese al estudio los resultados serán procesados y después analizados. Usted no necesita retirarse del estudio, pero si usted desea que los resultados obtenidos de sus muestras no sean utilizados, podrá solicitarlo y entonces esto no influirá en la atención futura que el Instituto Mexicano del Seguro Social brinde a usted ni a sus familiares. Nadie le negará la atención ni el tratamiento que su hijo necesite. Usted no podrá ser identificado por ninguna persona ajena al personal médico, paramédico y científico que participó en este estudio.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD:

La información será resguardada por el equipo de investigadores, del servicio de hematología pediátrica, Centro Médico Nacional de Occidente, UMAE Pediatría, Instituto Mexicano del Seguro Social.

EN CASO DE DUDAS O ACLARACIONES DIRIGIRSE:

Dra. Janet Soto Padilla.

Médico Hematólogo Pediatra adscrito al servicio de Hematología

Nombre y firma del tutor

Nombre y firma de quien obtiene

el consentimiento

Nombre y Firma de testigo (1)

Nombre y firma de testigo (2)



HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS

CMNO- UMAE PEDIATRIA

***“ENSAYO DE GENERACION DE TROMBINA IN VITRO PARA LA
EVALUACIÓN EL TRATAMIENTO DE VÍA ALTERNA EN
PACIENTES CON HEMOFILIA A GRAVE CON INHIBIDOR”***

Lugar y fecha: _____

Nombre: _____

Afiliación: _____

Sexo: _____

Peso: _____

Edad: _____

Edad al diagnóstico de la hemofilia: _____

Edad al diagnóstico del inhibidor:: _____

Cuantificación inicial de inhibidor: _____

Cuantificación del último inhibidor: _____

Inhibidor de baja respuesta: _____ Inhibidor de alta respuesta: _____

Eventos hemorrágicos por año: _____

Respuesta clínica al tratamiento: _____

Dosis promedio del aPCC utilizado en los eventos hemorrágicos: _____

Dosis promedio del FVII utilizado en los eventos hemorrágicos: _____

Tiempo de protrombina: _____

Tiempo de tromboplastina activado: _____

Dosis de aPCC utilizado en el ensayo: _____

Dosis de FVII utilizado en el ensayo: _____

Cuantificación basal aPCC _____ Cuantificación basal FVII _____

Pico de trombina con aPCC _____ Pico de trombina con FVII _____

Tiempo para el pico con aPCC _____ Tiempo para el pico con FVII _____

Potencial de trombina endógeno con aPCC _____

Potencial de trombina endógeno con FVII _____

Velocidad de formación de trombina con aPCC: _____

Velocidad de formación de trombina con FVII _____

NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN ELABORO LA ENCUESTA

19. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	MAYO - JULIO 2015	SEPTIEMBRE-NOVIEMBRE 2015	DICIEMBRE 2015	ENERO 2015	FEBRERO 2015
REVISION BIBLIOGRAFICA	**	**	**	**	
ELABORACION DE PROTOCOLO		**			
ACEPTACION DE PROTOCOLO			**		
RECOLECCION DE DATOS				**	
ANALISIS DE DATOS				**	
REPORTE FINAL					**