



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Tesis:

Medición de la actividad de Factores VIII y IX coagulante y detección de inhibidores dirigidos a estos factores, en la población de niños hemofílicos del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, en el período 2001-2003.

Que para obtener el título de Licenciatura en
Química Farmacéutica Bióloga
Presenta: Alma Rosa Luna Gaspar

Directora de Tesis:
M.C. Clara Monsserratt Rivera Pasos

Asesora Interna por la UNAM
FES-Zaragoza:
QFB. Patricia Vidal M.

México D.F. 2006



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.

Honorable Jurado:

Presidente: Q.F.B. Patricia Vidal Millán

Vocal: M.C. Clara Monserratt Rivera Pazos

Secretario: Q.F.B. Roberto Cruz González Meléndez

Suplente: Q.F.B. Ma. Galia Martínez Flores

Suplente: Q.F.B. Alicia Cabrera Aguilar

Esta investigación se realizó en el Hospital Infantil de México (HIM) “Federico Gómez”, en el laboratorio de Hematología de Investigación, en el periodo 2001-2003.



AGRADECIMIENTOS

UNAM FES- ZARAGOZA:

Por abrirme sus puertas, brindarme todas sus bondades y privilegios y porque marcaron con hermosas vivencias mi vida.

HIM "Federico Gómez" Lab. Hemat. de Inv:

Por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis.

M.C. Clara Monserratt Rivera Pazos:

Por su asesoramiento y tiempo dedicado en la realización de esta tesis.

Dr. José Arellano Galindo:

Por compartirme sus experiencias y sus valiosas aportaciones a esta tesis

Dr. Abel Bello González:

Por su confianza y apoyo en la culminación de esta tesis

A mis padres:

Quienes con su ejemplo de lucha, trabajo, esfuerzo y valores marcaron el sendero de mi vida y de quienes aprendí a tener fe y perseverancia.

A mis hermanas y hermanos:

Por su cariño, por su apoyo y por ser lo maravillosos que son.

A Socorro González y Fermín Domínguez:

Por su valioso apoyo, por su paciencia y su comprensión.

A Miguel Ángel:

Por ser el complemento de mi vida, pero sobre todo por ser mi mejor amigo.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 8 |
| 1. Introducción..... | 9 |
| 2. Marco Teórico | |
| 2.1 Antecedentes Históricos de la Hemofilia..... | 10 |
| 2.2 Generalidades de la Hemofilia..... | 11 |
| 2.3 Clasificación de la Hemofilia..... | 12 |
| 2.4 Incidencia..... | 12 |
| 2.5 Características Bioquímicas y Moleculares del Factor VIII y IX..... | 12 |
| 2.6 Inhibidores..... | 16 |
| 2.7 Diagnóstico Clínico de la Hemofilia..... | 16 |
| 2.8 Diagnóstico de Laboratorio..... | 18 |
| 2.9 Tratamiento..... | 19 |
| 2.10 Fisiología de la Hemostasia..... | 20 |
| 3. Justificación..... | 25 |
| 4. Objetivos..... | 26 |
| 5. Hipótesis..... | 26 |
| 6. Diseño Experimental | |
| 6.1 Tipo de Estudio..... | 26 |
| 6.2 Población Estudiada..... | 26 |
| 6.3 Criterios de Inclusión..... | 26 |
| 6.4 Criterios de Exclusión..... | 26 |
| 6.5 Variables Dependientes..... | 26 |
| 6.6 Variables Independientes..... | 26 |
| 6.7 Material Biológico..... | 27 |
| 6.8 Descripción del Procedimiento..... | 27 |
| 7. Material y Método | |
| 7.1 Material Equipo y Reactivos..... | 28 |
| 7.2 Toma de Muestras | |
| 7.2.1 Toma de Muestras Problema..... | 29 |
| 7.3 Determinaciones Cuagulométricas..... | 31 |
| 7.3.1 Medición del tiempo de tromboplastina parcial activado TTPa | 31 |

| | |
|--|----|
| 7.3.2 Prueba de Corrección con Plasma Normal..... | 32 |
| 7.3.3 Determinación Coagulométrica de la Actividad de Factores VIII:C y IX:C..... | 32 |
| 7.3.4 Medición de inhibidores dirigidos a FVIII:C y FIX:C, por el método Bethesda..... | 36 |
| 7.4 Análisis Estadístico..... | 38 |
| 8. Resultados..... | 39 |
| 9. Discusión de Resultados..... | 47 |
| 10. Conclusión..... | 49 |
| 11. Perspectivas..... | 50 |
| 12. Bibliografía..... | 51 |
| 13. Anexos..... | 57 |
| 14. Abreviaturas..... | 63 |

14 ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| aa | Aminoácidos |
| BFT | Fibrintimer |
| CSA | Coagulómetro Semiautomatizado |
| DNA | ácido Desoxirribonucleico |
| EGF | Epidermal Growth Factor (Factor de crecimiento epidérmico) |
| ELISA | Enzimoinmunoensayo |
| FIX:C | Factor IX coagulante |
| FVIII:C | Factor VIII coagulante |
| HIMFG | Hospital Infantil de México Federico Gómez |
| Kb | Kilobases |
| Kd | Kilodaltons |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PFN | Plasma Fresco Normal |
| PM | Peso Molecular |
| ppp | Plasma pobre en plaquetas |
| RNA_m | Ácido Ribonucleíco mensajero |
| TTPa | Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada |
| UB | Unidades Bethesda |
| UI | Unidades Internacionales |

RESUMEN

La hemofilia es una enfermedad hemorrágica hereditaria ligada al cromosoma X caracterizada por las deficiencias del factor VIII, causante de la hemofilia A, o factor IX, causante de la hemofilia B. Clínicamente se manifiesta con episodios hemorrágicos recurrentes, especialmente en músculos y articulaciones. La localización de las hemorragias, potencialmente, puede producir discapacidad. El desarrollo de anticuerpos (también llamados inhibidores) dirigidos al factor afectado representa la complicación más severa en el tratamiento del enfermo hemofílico. En México existen aproximadamente 6000 enfermos hemofílicos, de los cuales únicamente han sido diagnosticados el 50% de ellos.

A pesar de que el HIM “Federico Gómez” se considera uno de los centros de atención de hemofilia más importantes del país, en ésta institución la cuantificación de los FVIII, FIX y medición de inhibidores dirigidos a estos factores no se realizaban, sino que se determinaban en otras instituciones de apoyo. Esto suscitaba, entre otras dificultades, retraso en el diagnóstico y en el tratamiento oportuno de dicha enfermedad.

OBJETIVO: Implementar el método de Biggs & Douglas modificado, para cuantificar la actividad de FVIII:C, FIX:C, y detectar la presencia de inhibidores dirigidos a estos factores por el método Bethesda en la población de hemofílicos del HIM “Federico Gómez”.

MÉTODO: Tipo de estudio: descriptivo, transversal, prospectivo y observacional. Se implementó el método de Biggs & Douglas y el método Bethesda, con ello se cuantificó FVIII:C, FIX:C e inhibidores, respectivamente a 119 niños hemofílicos.

RESULTADOS: De los 119 niños estudiados 96 casos resultaron ser hemofílicos A, 9 presentan hemofilia grave, 63 hemofilia moderada y 24 hemofilia leve; 23 casos resultaron ser hemofílicos B, 7 presentan hemofilia grave, 8 hemofilia moderada y 8 hemofilia leve. Seis de los 119 casos habían desarrollado inhibidor dirigido al factor VIII.

CONCLUSIONES: Fue posible implementar un método que permitió establecer tempranamente el diagnóstico y pronóstico del paciente, con ello se logró dar un tratamiento veraz y oportuno.

PERSPECTIVAS: Los resultados de éste trabajo dejan abierta la posibilidad de realizar técnicas de biología molecular para realizar estudios de portadoras del gen de la hemofilia, para identificar las mutaciones que se relacionen con mal pronóstico, entre otros.

1. INTRODUCCIÓN

La hemofilia constituye una enfermedad hemorrágica hereditaria, caracterizada por la deficiencia funcional o cuantitativa del factor VIII coagulante (FVIII:C) causante de la hemofilia A y factor IX coagulante (FIX:C) causante de la hemofilia B. La hemofilia se presenta debido a un defecto en los genes localizados en el brazo largo del cromosoma X. Clínicamente se manifiesta con episodios hemorrágicos recurrentes especialmente en músculo y articulaciones, de intensidad variable de acuerdo con la concentración circulante del factor afectado. La localización de las hemorragias otorga a la hemofilia un patrón clínico particular que potencialmente puede producir discapacidad. El desarrollo de inhibidores, dirigidos al factor afectado representa la complicación más severa en el tratamiento del enfermo hemofílico⁷.

Dadas las características fisiopatológicas de la enfermedad, se requiere de la participación de un grupo multidisciplinario: hematólogos, químicos, enfermería, trabajo social, ortopedia, reumatología, odontología, psicología, asistencia médica, etc., capacitados para brindar el manejo terapéutico adecuado a los pacientes que padecen hemofilia.

El HIM “Federico Gómez” es una institución pionera en el manejo enfermos hemofílicos entre 0 -18 años de edad. Se ha constituido como uno de los centros de referencia más importantes en todo el país, ya que cuenta con una clínica de hemofilia que brinda servicio asistencial a enfermos hemofílicos provenientes de diferentes estados de la República Mexicana, que en su gran mayoría son de recursos económicos bajos.

En el periodo que comprende los años 2001 al 2003 se han captado a 119 hemofílicos que acuden periódicamente a control.

Por diversas razones, el laboratorio de hematología de ésta Institución no había realizado la valoración cuantitativa de los factores VIII y IX coagulante, ni la determinación de los inhibidores dirigidos a éstos factores, por lo que se hace necesario implementar éstos estudios en éste hospital con el fin que de manera directa y en el menor tiempo posible, el médico hematólogo tenga la información necesaria para confirmar el diagnóstico clínico, adecuar oportunamente el tratamiento y monitorear la evolución de la enfermedad.

Actualmente a los 119 hemofílicos que se han captado se les ha determinado el factor que está deficiente (FVIII:C o FIX:C), en qué concentración (porcentaje de actividad) es la deficiencia y así también se detectaron a los que ya han desarrollado inhibidor y en qué grado el paciente ha dado ésta respuesta de inmunidad, es decir, en qué grado se ha desarrollado el inhibidor.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes históricos de la hemofilia

En el siglo II a.C. en la obra sagrada de la ley judaica, el Talmud, de Babilonia, se menciona la ocurrencia de una hemorragia mortal después de la circuncisión en los hijos varones.⁶

En 1803, un médico norteamericano llamado John Conrad Otto, demostró que la enfermedad estaba ligada al cromosoma X, quedando limitada a los varones, siendo las mujeres portadoras.³⁴

En 1853, nace Leopoldo quien fue hemofílico, hijo de la Reina Victoria de Inglaterra. Leopoldo muere a los 31 años de edad por una hemorragia cerebral después de una caída.³⁴

En 1893, el patólogo inglés Almoth E. Wright, descubrió que la sangre de los enfermos con hemofilia tardaba más tiempo en coagular, con respecto a los individuos normales.⁴⁸

En 1904, el profesor Paul Morawitz propuso la “teoría clásica de la coagulación”.¹⁶

En 1936, los profesores Patek y Taylor en Harvard, demostraron que el defecto en la hemofilia se debe a la deficiencia de un factor denominado antihemofílico.⁸⁰

En 1939, el profesor argentino Alfredo Pavlovsky, encontró que al agregar plasma normal al plasma de un hemofílico se corregía el tiempo de coagulación.⁵⁸

En 1952 el profesor Armando J Quick y colaboradores definieron la hemofilia como una enfermedad hemorrágica ligada al cromosoma sexual X. La anomalía se debía a una deficiencia de globulina antihemofílica.⁴¹

En 1952, la Dra. Rose Mary Biggs y los profesores Douglas y Macfarlane en Oxford, descubrieron la enfermedad de Christmas o hemofilia B y desarrollaron la prueba de tiempo de generación de tromboplastina para evaluar la funcionalidad de FVIII, FIX y plaquetas.⁹

En 1953, los profesores Langdell, Wagner y Brickhow desarrollaron la prueba Tiempo de tromboplastina parcial (TTP). La Dra. Biggs más tarde utilizaría ésta prueba para determinar coagulométricamente la concentración de factores de la coagulación, entre ellos, factores VIII y IX. Hoy en día éste estudio es considerado prueba tamiz para detectar la presencia de hemofilia.⁴¹

En 1965, la Dra. Judith Graham Pool, norteamericana, descubrió los crioprecipitados que revolucionaron el tratamiento de la hemofilia.⁶⁰

En los años 70 se desarrolló la producción de liofilizados de concentrados de FVIII y FIX de elevada pureza.⁴⁸

En 1984, después de clonado y caracterizado el gen del FVIII, diversos grupos de investigadores, como los de Gitschier, Toole y Word, en diversos estudios han reportado algunas de las mutaciones que dan origen a la hemofilia en sus tres formas de manifestarse: leve, moderada y de alto riesgo o severa.^{23,27,81}

2.2 Generalidades de la hemofilia

La hemofilia es una enfermedad hemorrágica que se hereda como carácter recesivo ligada al cromosoma sexual X, se caracteriza por deficiencia o ausencia del FVIII:C o FIX:C del mecanismo de la coagulación. Se trata de una enfermedad crónica que persiste a lo largo de toda la vida del enfermo.⁷

Un paciente hemofílico no tiene la cantidad suficiente del factor VIII o IX en el plasma circulante, lo que impide una adecuada coagulación de la sangre. Estos enfermos manifiestan hemorragias prolongadas, particularmente en las articulaciones y músculos, donde la repetición de los procesos hemorrágicos conduce a lesiones irreversibles e invalidez debido a las artropatías.⁵³

Los genes que codifican para los factores VIII y IX se encuentran localizados en el brazo largo del cromosoma X, por lo que se trata de un trastorno ligado al sexo, por lo tanto, el varón quien es hemicigoto (X^hY) manifiesta la enfermedad y las mujeres (X^hX) son las portadoras.⁶

Las madres de los hemofílicos son portadoras en la mayoría de los casos, excepto cuando aparecen nuevas mutaciones (de “novo”) lo cual sucede en el 30% de los casos, éstas transmitirán la hemofilia a la mitad de sus hijos varones y la otra mitad serán sanos, mientras que el estado de portador la transmitirá a la mitad de sus hijas. Se han descrito casos aislados en el que las mujeres han desarrollado la enfermedad.⁴¹

Por su parte los padres hemofílicos transmitirán el trastorno a todas sus hijas pero sus hijos serán sanos.^{54,77} (Figura 1)

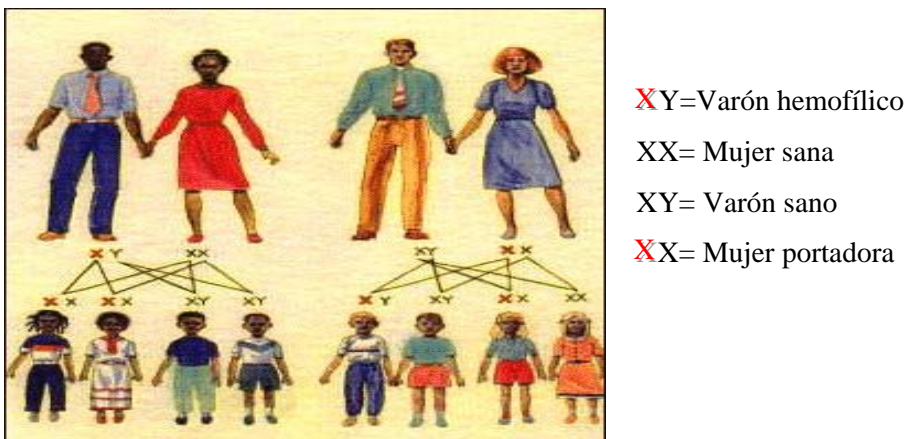


Figura 1. Transmisión la hemofilia (tomado de <http://www.wfh.org>)

2.3 Clasificación de la hemofilia

La hemofilia se clasifica en dos tipos clínicamente indistinguibles: la hemofilia A o hemofilia clásica, caracterizada por la deficiencia o ausencia de la globulina antihemofílica denominada FVIII:C y la hemofilia B o enfermedad de Christmas que se caracteriza por la deficiencia o ausencia del FIX:C.⁷

2.4 Incidencia

La hemofilia es una enfermedad de distribución mundial. La hemofilia A afecta al varón con una incidencia global de 1-2 casos por 10 000 varones, mientras que la hemofilia B ocurre de 1 por cada 25,000 varones.³³

La Federación Mundial de Hemofilia, cuyas siglas en inglés son WFH, hasta Agosto del 2000 reporta 105,000 casos de hemofílicos en todo el mundo.³²

La Federación de Hemofilia de la República Mexicana A.C. tiene registrados a 2900 hemofílicos, aunque se estima que hay más de 6000 y que en su mayoría aún no han sido diagnosticados.¹⁹

La proporción de pacientes con deficiencia de factor VIII, en relación con aquellos que padecen deficiencia del factor IX, es de 5 casos de hemofilia A por 1 caso de hemofilia B.⁴⁸

2.5 Características bioquímicas y moleculares del factor VIII y IX

Factor VIII

El factor VIII es una glicoproteína de cadena única, tiene un Peso molecular (PM) de 280 kilodaltons (Kd). La estructura del polipéptido del FVIII presenta tres unidades funcionales peptídicas A,B,C, con aproximadamente 330 aa, 980 aa y 150 aa, respectivamente, los cuales están en el orden siguiente: NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH., A1-A2-B constituyen la cadena pesada, su PM es de 210,000 kd y A3-C1-C2 que constituyen la cadena ligera cuyo PM es de 80 kd.⁵²(Figura 2)

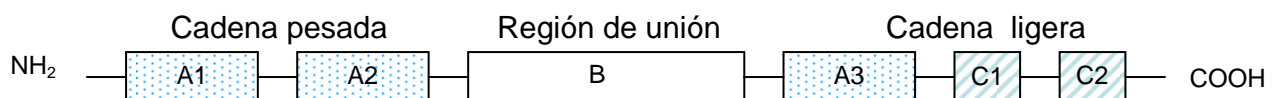


Figura 2. Unidad funcional del factor VIII.

(Tomado de Michael W. Mosesson, *et al.* Structural Model of Porcine Factor VIII and Factor VIII Molecules Based on Scanning Transmission Electron Microscope (STEM) Images and STEM Mass Analysis. *J Clin Invest.* 1990; 85: 1983-1990)

Activación del FVIII

La activación proteolítica del FVIII es necesaria para la generación del complejo de activación del FX en el sistema de coagulación *in vitro*. El FVIII puede ser activado por el FXa (factor X activado) y por la trombina. La activación por trombina se asocia a una ruptura en la cadena pesada en el residuo Arginina (Arg) 372, así como en la posición Arg 740 (a nivel de la unión A2B) que libera al dominio B. En la cadena ligera a nivel de Arg 1689 existe otra ruptura que contribuye a incrementar su actividad de cofactor y a liberar el FVIII del Factor de von Willebrand (FvW). La actividad del cofactor en el complejo Xasa es obtenida por la ruptura en Arg 372. Las rupturas específicas para generar el FVIIIa (Factor VIII activado) son a nivel de Arg 740 y 372.^{21,81}

El factor VIII presenta una vida media de 8-12 horas, se sintetiza principalmente en las células endoteliales de los hepatocitos, bazo, nódulos linfáticos y riñón, circula normalmente en el plasma como un gran complejo unido al factor de von Willebrand en una concentración de 0.1 mg/mL.¹² (Ver cuadro1)

| | Factor VIII | Factor IX |
|----------------------------------|--|--|
| Nombre | Factor antihemofílico A | Factor de Christmas |
| Genética | Cromosoma X q28 | Cromosoma X q27 |
| Síntesis | Endotelio y hepática, riñón | Hepática |
| Características moleculares | 3 dominios A, 1 dominio B y 2 dominios C | 1 dominio gla y 2 dominios FCE* |
| Peso molecular (kd) | 280 | 68 |
| Vida media (horas) | 8-12 | 18-24 |
| Concentración plasmática (mg/dL) | 0.1 | 4 |
| Características en plasma | Complejo con el factor de von Willebrand | Circula libre |
| Características funcionales | Cofactor | Zimógeno de serina, vitamina K dependiente |
| Estabilidad | Factor lábil | Factor estable |
| Función | Complejo X asa de la coagulación | Complejo X asa de la coagulación |

*FCE: factor de crecimiento epidérmico.

Cuadro 1. Características bioquímicas y moleculares de los factores VIII y IX
(Tomado de Martínez Murillo C, Quintana González S, Ambríz Fernández R. *Hemofilia*. Ed. Prado; 2000)

Gen del factor VIII

El gen que codifica al factor VIII representa el 0.1% de la longitud total del cromosoma X. Se localiza en un extremo del brazo largo del cromosoma X, en la región q28, tiene una longitud de 186 kb. Contiene 26 exones con tamaño comprendido entre 69 y 3106 pares de bases (pb) que se transcriben a un RNA mensajero (RNAm) de 9 kb. Las secuencias correspondientes a los intrones ocupan 177 kb del gen, siendo el intron 22 el de mayor tamaño.²³ (Figura 3)

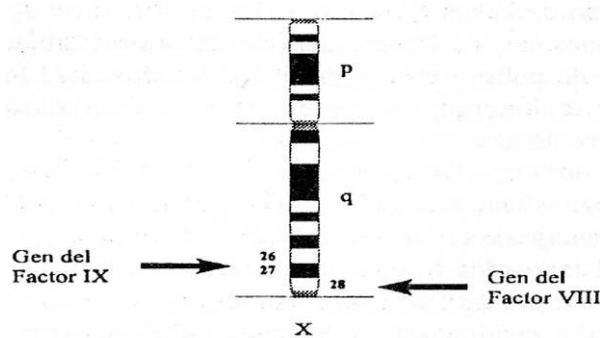


Figura 3. Diagrama de la banda G del cromosoma X mostrando la ubicación de los genes del factor VIII y factor IX (Tomado de Martínez Murillo C, Quintana González S, Ambríz Fernández R. *Hemofilia*. Ed. Prado; 2000)

Factor IX

El factor IX es una glicoproteína con PM 57 daltons, se sintetiza en el hígado como una enzima, con un péptido inicial de más de 46 residuos, se secreta a la circulación como una proteína o zimógeno inactivo de 415 aa, y contiene el 17% de hidratos de carbono.⁴¹

El péptido está conformado por: 1) la región Gla, que presenta 14 residuos de ácido γ -carboxiglutámico, 2) Unidades funcionales peptídicas hidrofóbico, 3 y 4) dos regiones (A y B) de Factor de crecimiento epidérmico, (EGF), por sus siglas en inglés, 5) unidades funcionales de activación peptídica y, 6 y 7) región catalítica.⁴⁰ (Figura 4).

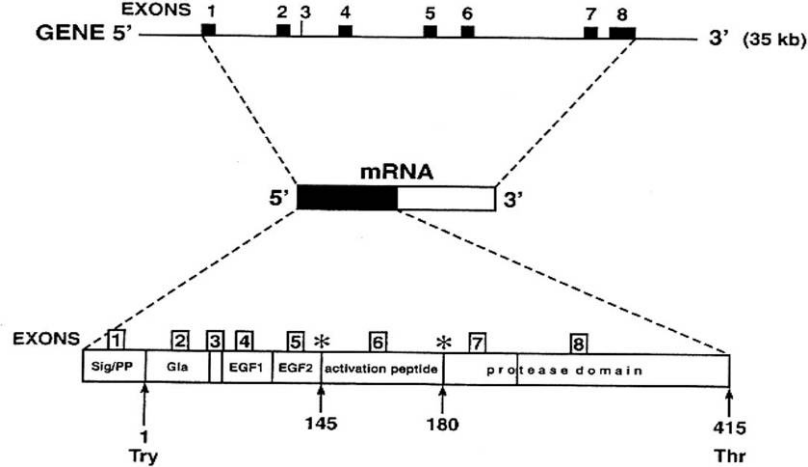


Figura 4. Dominios de la estructura peptídica del factor IX.

(Tomado de: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ y col. *Hemostasis and thrombosis*. 4ª ed. USA: Ed. Lippincot Williams & Wilkins; 2001)

Activación de FIX:C

Éste factor es activado de manera enzimática. El FIXa (Factor IX activado) se produce después de dos rupturas a nivel de Arg 145 y Arg 180 mismas que son catalizadas por el FIX, o por el complejo Factor tisular/FVIIa (Factor VII activado).⁴⁰

El factor IX tiene una vida media de 18 a 24 horas, su concentración plasmática es de 4 mg/mL.⁴ (Cuadro 1)

Gen del factor IX

El gen del factor IX esta localizado en un extremo del brazo largo del cromosoma X en la posición Xq27.1-q27.2, abarca una región de 34 kb, consta de 8 exones y 7 intrones. El RNAm tiene menos de 3 kb de longitud.¹³ (Figura 4)

En estudios posteriores a la clonación y caracterización de los genes de los factores causantes de la hemofilia, se han detectado diferentes tipos de mutaciones: a) mutaciones del gen del factor VIII: grandes y pequeñas deleciones 118 y 10 respectivamente; mutaciones de falso sentido o “*Missense*” 434, sin sentido o “*nonsense*” 75, inserciones 42, duplicaciones y mutaciones que afectan sitios clave para la maduración del RNA o *splicing* 44, b) mutaciones del gen del factor IX: mutaciones puntuales 180, deleciones 140, dobles mutaciones 27, triples mutaciones.^{2,31}

2.6 Inhibidores

Los inhibidores son inmunoglobulinas de clase IgG4, éstas van a neutralizar la actividad procoagulante del FVIII y FIX. Están dirigidos a epitopes de la cadena ligera en los dominios A2, A3 y C2 y en los dominios A1 y A2 de la región acídica de la molécula de estos factores coagulantes.^{17,68, 75}

Los factores de riesgo que se predisponen para desarrollar inhibidores en el hemofílico son:

- a) hemofílicos cuya deficiencia del factor afectado es menor del 1% de actividad, desarrollan inhibidores en 5 - 30% de los casos con hemofilia A y del 1-3% en los casos con hemofilia B
- b) número de exposiciones a los concentrados terapéuticos y c) tipo de mutación del gen del factor afectado, siendo las mutaciones de grandes deleciones las más susceptibles de desarrollar inhibidores.^{43,70}

Los hemofílicos que desarrollan inhibidores se clasifican como: a) bajos respondedores si presentan 0.6 – 5 Unidades Bethesda (UB) y b) altos respondedores si tienen >5 UB.⁵¹

Se sospecha de la presencia del inhibidor cuando el enfermo no responde a las dosis habituales de los concentrados transfundidos y si el reporte de TTPa no se corrige con plasmas normales.^{15,42}

Aunque el desarrollo de inhibidores en los pacientes con hemofilia no incrementa la frecuencia de sus hemorragias, su presencia representa un problema importante en el manejo terapéutico de las hemorragias, suprimir éstas con la terapia de reemplazo del factor deficiente representa un reto para el médico hematólogo tratante.^{3,61}

La presencia del inhibidor puede ser confirmada en el laboratorio por diferentes métodos, Oxford, Bethesda y Nijmegen.¹ Siendo el método Bethesda el más utilizado en diferentes países de EEUU, Europa y Latinoamérica.³⁷ Este método es considerado “estándar de oro”, por ser un método sencillo, rápido, confiable y poco costoso.^{66,76} Se ha demostrado que los resultados obtenidos por el ensayo Bethesda no son significativamente diferentes de los que se obtienen por ensayos cromogénicos, (p=0.2).¹

2.7 Diagnóstico clínico de la hemofilia

Clínicamente la hemofilia se manifiesta con episodios hemorrágicos de intensidad variable, provocando hematomas subcutáneos o en cavidades, afectando gradualmente a múltiples órganos y sistemas tisulares. Las hemorragias repetidas en las articulaciones pueden causar daños severos como las artropatías hemofílicas (cualquier enfermedad

articular), que dejan secuelas de incapacidad para ejercer movimiento en la articulación afectada.⁶ Las manifestaciones graves en los hemofílicos son las hemorragias intracraneanas, que suceden del 2-12% de los casos y son la principal causa de muerte en estos enfermos. El riesgo de los episodios hemorrágicos se incrementa cuando el enfermo empieza a deambular.⁴⁸

Por orden de frecuencia las hemartrosis (hemorragias intraarticulares), se presentan en rodilla en el 44% de los casos, codos 25%, tobillo 15%, hombros 8%, cadera 5% , el 3% de hemorragias pueden suceder en muñecas, falanges, hematurias, hemorragias gastrointestinales, hemorragias bucales, etc.²⁰

El 100% de niños entre 10 y 14 años tienen por lo menos una rodilla afectada, mientras que el 68% de adultos mayores de 25 años tienen ambas afectadas.²⁰ (Ver figura 5)

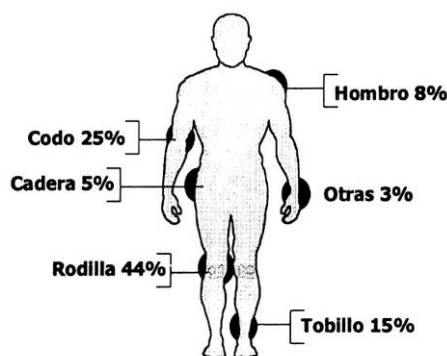


Figura 5. Sitios más frecuentes de hemorragias en el enfermo hemofílico

(Tomado de <http://www.wfg.org>)

En función de la concentración plasmática del factor deficiente y de las manifestaciones clínicas, la hemofilia también se clasifica en:

a) *Hemofilia de alto riesgo o grave*: mantienen en la circulación < del 1% de actividad del factor afectado, inicia sus hemorragias cuando empieza a deambular, con la aparición de equimosis (extravasación de sangre hacia los tejidos celulares subcutáneos), en la piel y hematomas subcutáneos aparentemente espontáneos, la presencia de hemartrosis en un lactante es sugestivo de hemofilia grave. Las hemorragias intracraneanas son un factor de riesgo latente.

b) *Hemofilia moderada*: hay de 1-5% de actividad del factor afectado, se presentan hemorragias de menos magnitud y con menos frecuencia que los graves.

c) *Hemofilia de bajo riesgo o leve*: hay de 6-30% de actividad del factor afectado, no se presentan sangrados anormales excepto cuando sufren traumatismos o intervenciones quirúrgicas.^{5,6}

2.8 Diagnóstico de laboratorio

La confirmación del diagnóstico de laboratorio permite al clínico conocer la gravedad, evolución y pronóstico de la enfermedad. Así mismo permite establecer el tratamiento adecuado y oportuno. Después de los seis meses de vida es la edad conveniente para hacer los exámenes de laboratorio de perfil hemorrágico, puesto que los niveles de factores se han estabilizado.⁵³

En el laboratorio de hematología del HIMFG, el diagnóstico de hemofilia se realiza bajo el siguiente protocolo de estudios: tiempo de sangrado, cuenta de plaquetas, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada y corrección del TTPa con plasma normal.^{55,56,58} Para hacer la medición de factores VIII, IX y medición de inhibidores dirigidos a estos factores existen diferentes metodologías como: inmunológicos¹⁰, cromogénicos⁷³ y coagulométricos⁹, siendo éstos últimos dos métodos los más utilizados tanto en Europa como en los países Latinoamericanos.³⁹

Por razones desconocidas, para las mediciones de factores VIII, IX y la determinación de inhibidores, se contaba con apoyo de otras instituciones tanto gubernamentales (Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán”), como privadas (laboratorios Durango) y otros. Actualmente se han implementado en el laboratorio de HIMFG el método coagulométrico de Biggs & Duoglas para medir factores VIII y IX, y para medir inhibidores se ha implementado el método Bethesda. Las ventajas por las cuales se eligieron éstos métodos ya fueron anteriormente expuestas. (Ver cuadro 2)

| Tipo de estudio | Nomenclatura | Método | Resultado | Valor de referencia |
|---|---------------------|--------------------|--|--|
| Tiempo de sangrado | TS | Ivy | Normal | 1-5 seg |
| Cuenta de plaquetas | CP | automatizado | Normal | 150 000-450 000 /mm ³ |
| Tiempo de protrombina | TP | Quick automatizado | Normal | 11.5-14.5 seg |
| Tiempo de tromboplastina parcial activado | TTPa | Biggs Automatizado | Alargado | 25-34 seg |
| Corrección del TTPa | Corrección del TTPa | Automatizado | Corrige | Corrige con respecto al testigo normal |
| Cuantificación de FVIII:C o FIX:C | | Biggs Automatizado | Disminuidos con respecto a valores de referencia | 50-180 % |
| Medición de inhibidores | | Bethesda | Negativo | < 0.5 UB |

Cuadro 2. Pruebas de escrutinio para orientar al diagnóstico de hemofilia.

Gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular hoy en día se están realizando estudios de detección de portadoras en sangre de cordón umbilical, analizando las principales mutaciones en el gen del FVIII con el uso de marcadores polimórficos intragénicos y extragénicos del DNA (54). Esto ha permitido detectar el estado de portadora en el 95% de los casos.⁷⁵ También, gracias a técnicas con PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se está haciendo el diagnóstico prenatal a partir de muestras con vellosidades coriónicas o líquido amniótico.

La aplicación de métodos moleculares está permitiendo pronosticar la gravedad de la hemofilia y así tomar medidas profilácticas oportunas en el tratamiento; de manera que el paciente tenga mejores perspectivas en su calidad de vida. Desde el punto de vista económico, al tener un diagnóstico oportuno evita a las familias afrontar los gastos de muchas de las complicaciones de la hemofilia.⁵⁹

En México el IMSS está realizando estudios moleculares para evaluar el patrón de mutaciones en la población de hemofílicos B derechohabientes.⁴⁹

Una vez que se ha iniciado el estudio de la población de hemofílicos del HIMFG aparecen nuevas perspectivas para estudiar otros aspectos de la enfermedad. Después de los resultados arrojados durante este proyecto se quiere continuar con estudios a nivel molecular para la detección de madres portadoras, diagnóstico prenatal y el estudio de mutaciones en hemofílicos A y B. Para ello se buscará, entre otros, uno de los marcadores genéticos que se ha asociado más frecuentemente (40%) con hemofilia grave que es la inversión en el intron 22 en el gen del FVIII.⁶⁴

2.9 Tratamiento

El tratamiento de la hemofilia es la terapia de reemplazo y tiene como objetivo incrementar el nivel plasmático del factor deficiente, mediante la administración de concentrados que contengan el factor que se encuentre disminuido.⁶² El tipo de tratamiento está en función del: a) tipo de hemofilia, b) porcentaje de actividad, c) sitio de la hemorragia, y d) presencia de inhibidores.⁶⁷

A finales de los años 50 por medio del fraccionamiento de la sangre se tuvo acceso a la obtención de plasmas. Años más tarde la Dra. Judith Pool descubrió los crioprecipitados de concentrados de factor VIII, posteriormente aparecerían los liofilizados de concentrados de factores VIII y IX. En los años 80, debido a la alta frecuencia de pacientes infectados por el virus de la hepatitis B, hepatitis C y VIH se emplearon nuevos métodos de inactivación viral. Recientemente, el factor VIII se ha obtenido por tecnología recombinante, el factor es producido por células hamster en

cultivo y posteriormente es purificado por inmunoafinidad cromatográfica con anticuerpos monoclonales.^{45,71,72}

2.10 Fisiología de la hemostasia

La hemostasis es un sistema fisiológico que regula y mantiene íntegro el funcionamiento del sistema vascular cuando ha sido lesionado. Este mecanismo repara rápidamente algún rompimiento vascular, restaura el flujo sanguíneo, desintegra y retira el coágulo formado a través del sistema fibrinolítico⁵³

Cuando ocurre una lesión de un vaso sanguíneo, el endotelio se ve afectado para ejercer sus funciones tromborreguladoras, disminuye importantemente la producción de prostaglandinas (PGI₂) y favorece los mecanismos de activación plaquetaria. El músculo liso se contrae disminuyendo el calibre y el flujo sanguíneo del vaso, seguido por la exposición del subendotelio, quien, está constituido por colágeno y elastina. Al quedar expuesto el colágeno, sus cargas negativas sirven como sitios de unión con las plaquetas a través de receptores específicos.^{37,50}

Para la formación del tapón plaquetario se presentan una serie de mecanismos como: 1) adhesión plaquetaria al subendotelio expuesto por el daño vascular, 2) agregación plaquetaria primaria al activarse el complejo glucoreceptor IIb/IIIa y permitir la unión entre las plaquetas, 3) liberación de compuestos intraplaquetarios que provocan, 4) agregación secundaria de nuevas plaquetas al tapón hemostático, 5) consolidación y retracción del coágulo y 6) formación del tapón hemostático definitivo con la formación del polímero de fibrina y la detención de la hemorragia.²⁶

Actualmente se sabe que las superficies celulares (plaquetas, células endoteliales, fibroblastos, monocitos) juegan un papel esencial en la coagulación sanguínea ya que proporcionan por un lado los factores esenciales para la hemostasis normal que no están presentes en el plasma normal y por otro lado, constituyen una superficie para el ensamblaje de los complejos enzima-cofactor y su interacción con los sustratos para formar el coágulo de fibrina.⁵⁵ (Ver figura 6)

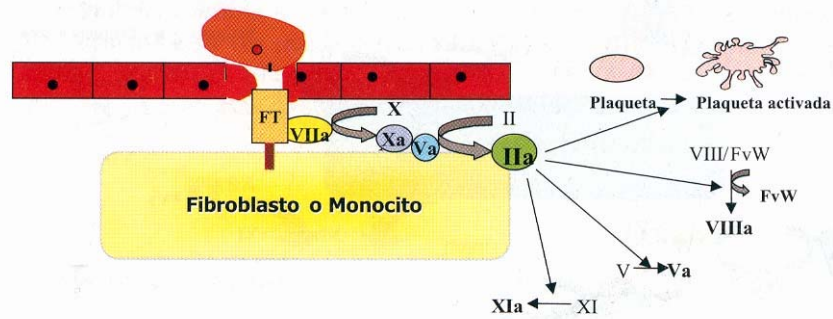


Figura 6. Activación del FX por el complejo FT/FVIIa, se genera el complejo protrombinasa (Xa/Va/Fosfolípidos y Calcio, activando al sustrato; protrombina para generar trombina suficiente para activar plaquetas y los factores: VIII, V y XI. (Tomado de Martínez Murillo C, Quintana González S, Ambríz Fernández R. *Hemofilia*. Ed. Prado; 2000)

Existen 5 teorías que explican como se inicia la coagulación.

1.- Morawitz. Es considerado el padre de la coagulación. En 1904, describió que las reacciones fundamentales involucradas en la coagulación incluían la activación de la protrombina a trombina por la tromboplastina y la conversión del fibrinógeno a fibrina por la trombina. Actualmente, estas ideas siguen siendo vigentes para explicar el mecanismo de coagulación.³⁰

2.- Cascada de coagulación. En 1960 dos grupos por separado, proponen que la coagulación es un proceso enzimático en cascada en la que participan: a) una vía intrínseca, quien inicia la coagulación con el daño vascular y la interacción de superficies cargadas negativamente con tres proteínas plasmáticas: FXII, precalicreína y cininógeno de alto peso molecular (CAMP); y b) una vía extrínseca en donde participan el FT y el FVII. Ambas vías podrían activar al FX, que junto con el FV convertirían a la protrombina en trombina. Varios grupos han reconocido que ambas vías de la coagulación no pueden funcionar de manera independiente uno del otro, ya que todos los factores se interrelacionan entre ambos.⁴⁵

3.- Teoría de los complejos. Esta teoría explicó el incremento de la velocidad e intensidad de las reacciones de la coagulación, un complejo integrado por una proteasa de serina, un cofactor proteico, la superficie de la membrana y los iones calcio. El complejo X-asa (FIXa, FVIIIa, fosfolípidos e iones calcio) y el complejo protrombinasa (FXa, FVa, fosfolípidos y calcio).¹⁴

4.- Teoría de Nemerson, Rappaport y Nemerson. Describen que el FVII activa las dos vías de la coagulación. En 1955, Rappaport y Nemerson proponen al FT como la “Prima Ballerina”, es decir; el primer factor iniciador del mecanismo de la coagulación.⁵⁸

5.- Teoría actual de la coagulación. Este modelo describe la iniciación de la coagulación sin dividir el sistema en vías separadas sino en una sola vía que inicia y, junto con diferentes factores de coagulación, interactúan entre sí para sostener de manera adecuada el sistema de coagulación. Sin embargo, para fines de diagnóstico por el laboratorio, el esquema general de la cascada de la coagulación, aún, es útil.^{16,48} (Ver figura 7)

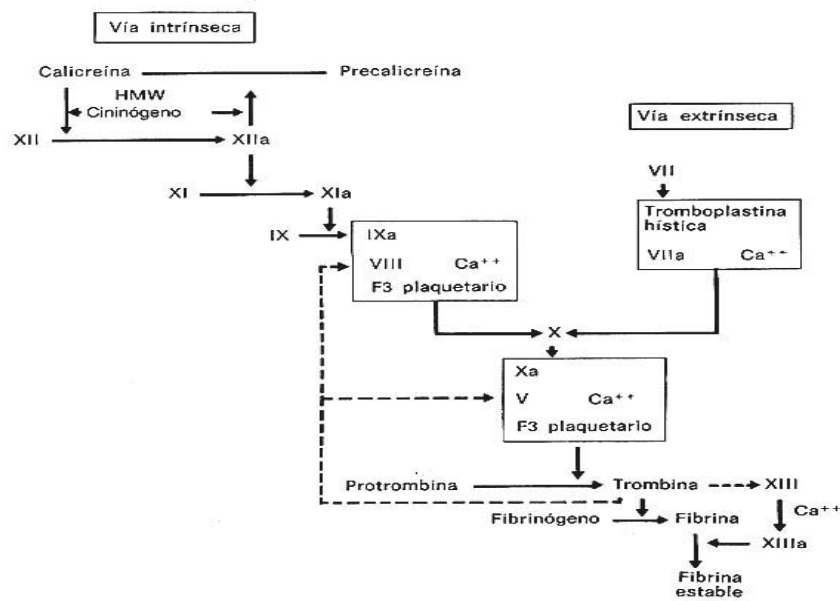


Figura 7. Esquema general de la coagulación sanguínea

El modelo de la coagulación que actualmente se propone: cuando hay una lesión vascular y queda expuesto el endotelio, la coagulación *in vivo* requiere de la presencia del Factor Tisular (FT), de origen extravascular, de células inflamatorias o del endotelio. El FT se une inmediatamente a receptores del factor VII (FVII), en plasma activándolo (FVIIa), dando lugar a la formación del complejo FT/FVIIa. La autoconversión de FVII a FVIIa amplifica la respuesta hemostática para generar más complejo FT/FVIIa la formación de este complejo en presencia de fosfolípidos y calcio da lugar a: 1) la activación del Factor X (FXa) y 2) activación del Factor IX (FIXa) produciéndose inicialmente y de manera rápida pequeñas cantidades de trombina (microdosis).

El Factor X activado (FXa) presente en la superficie celular, activará al Factor V (FVa), formándose el complejo protrombinasa FVa/FXa que, en presencia de fosfolípidos (FL) y calcio (Ca^{++}), dará lugar a la formación de pequeñas cantidades de

trombina suficiente para llevar a cabo las siguientes reacciones: 1) activación de las plaquetas, 2) activación del Factor V, 3) activación del FVIII y disociación de éste del factor de von Willebran (FvW) y, 4) activación del Factor XI.

La cantidad de trombina generada por la acción del FT/FVIIa sobre el FX es insuficiente y la reacción involucrada es muy acelerada. La trombina es rápidamente degradada por un Inhibidor de la Vía del Factor Tisular (IVFT) producido al generarse el FXa. (Ver figura 8)

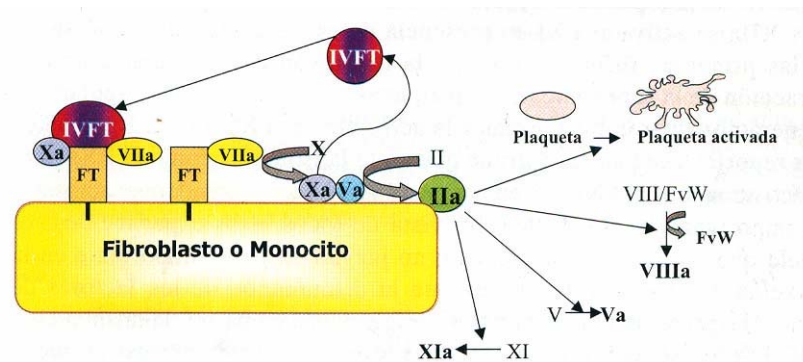


Figura 8. Papel del inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT)

(Tomado de Martínez Murillo C, Quintana González S, Ambríz Fernández R. *Hemofilia*. Ed. Prado; 2000)

Por otro lado, el complejo formado por el FT/FVIIa activa también al Factor IX, el cual una vez activado (FIXa) se une al FVIIIa (cofactor) para actuar sobre su sustrato: el FX, en la superficie de la plaqueta y se convierte en FXa, que en presencia de su cofactor el FVa, producirán mayores cantidades de trombina (macro dosis), suficientes para generar la formación del coágulo de fibrina, la cual no es inhibida por IVFT pero si por la Antitrombina III (ATIII) aunque esta inhibición sucede más lentamente. También se inicia la ruptura de fibrinógeno y la activación del FXIII lo que permite estabilizar el coágulo de fibrina. (Ver figura 9)

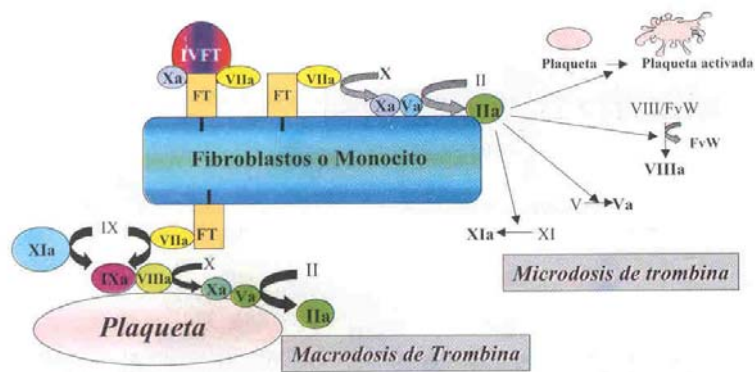


Figura 9. Importancia de la vía alterna formada por FVIIIa, FIXa y FXa en la generación de macrodosis de trombina.
 (Tomado de Martínez Murillo C, Quintana González S, Ambríz Fernández R. *Hemofilia*. Ed. Prado; 2000)

En los hemofílicos el complejo FT/FVIIa activa al FX, pero esta activación es cuantitativamente insuficiente para proporcionar hemostasis *in vivo*. Al formarse el complejo FT/FVIIa inmediatamente se libera IVFT para inhibir FT, lo que resulta insuficiente para sostener la hemostasis debido a que la amplificación y propagación de la coagulación es por control catalítico y se requiere de la acción de la vía complementaria del FXI para activar la formación del complejo del FVIIIa/FIXa y de ésta forma propagar y amplificar el sistema de coagulación. (7,45,58) . Como ya se mencionó, el Factor X puede activarse por el complejo formado por FT/FVIIa, FL y Ca^{++} y por el factor IXa, FVIIIa, FL y Ca^{2+}

La trombina se forma a partir de la activación del Factor Xa, y la formación del complejo “protrombinasa”. Este complejo puede ser formado sobre una célula o sobre la superficie de la membrana de fosfolípido. Formada la trombina participa en la proteólisis del fibrinógeno para formar monómeros de fibrina, quien a su vez, tiene las siguientes funciones: a) participa en la agregación plaquetaria, b) regula la actividad de la trombina y, c) activa y regula del FXIII.³⁸

3. JUSTIFICACIÓN

La atención médica de los enfermos hemofílicos requiere, entre otras acciones y procedimientos, de estudios de laboratorio que proporcionen al médico hematólogo las herramientas necesarias para atender al paciente de manera eficaz y oportuna.

El HIM “Federico Gómez” cuenta con una clínica de hemofilia, que funciona como centro de referencia a nivel nacional para la atención enfermos hemofílicos entre 0 y 18 años de edad, enfocándose principalmente en atender a los sectores de la población más desprotegidos.

A pesar de ser uno de los centros de atención de hemofilia más importantes del país, algunas pruebas de laboratorio como la cuantificación de los factores VIII, IX y medición de inhibidores dirigidos a estos factores, se realizaban con el apoyo de otras instituciones tanto gubernamentales como privadas. Esto suscitaba, entre otras dificultades, retraso en el diagnóstico y en el tratamiento oportuno. Con el fin de eliminar estos inconvenientes se inició en el laboratorio de Hematología del HIM “Federico Gómez” la implementación de las condiciones y la metodología para medir factores VIII y IX coagulante, y para detectar la presencia de inhibidores dirigidos a estos factores en la población de niños hemofílicos que acuden a esta Institución. Esto, a su vez, permitió determinar el tipo y el grado de la deficiencia del factor involucrado, lo cual es fundamental para que el médico hematólogo confirme el diagnóstico clínico, proporcioné el tratamiento adecuado y realice un monitoreo de la evolución de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar los métodos para medir la actividad de factores VIII y IX coagulante así como sus inhibidores, dirigidos en una población pediátrica hemofílica de un hospital de concentración de tercer nivel.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

A) Cuantificar la actividad de los factores VIII:C y IX:C, en enfermos hemofílicos que acuden a la clínica de hemofilia, por el método coagulométrico de Biggs & Douglas modificado.

4.3 METAS

- A) Determinar la frecuencia de hemofilia A y hemofilia B en la población estudiada.
- B) Cuantificar títulos Bethesda de inhibidores dirigidos a factores VIII:C y IX:C en la población de estudio.

5. HIPÓTESIS

- A) La hemofilia A es más frecuente que la hemofilia B, y
- B) El uso del método Bethesda podría ser de utilidad para la identificación de inhibidores dirigidos a los factores de la hemofilia.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Tipo de estudio

Descriptivo, transversal, prospectivo y observacional.

6.2 Población estudiada

Pacientes de la clínica de hemofilia del servicio de Hematología del HIM “Federico Gómez”, durante el periodo 2001-2003 con TTPa prolongados, antecedentes heredo-familiares y datos clínicos asociados a hemofilia.

6.3 Criterios de inclusión

Enfermos con probable deficiencia de factores VIII:C o IX:C diagnosticados previamente en la clínica de hemofilia del HIMFG por datos clínicos de sangrados recurrentes en articulaciones y otros sitios, TTPa prolongado y antecedentes familiares de enfermos varones hemofílicos.

6.4 Criterios de exclusión

- A) Niños con datos clínicos de hemofilia que fueron transfundidos con plasmas frescos congelados en las 24 horas anteriores al estudio.
- B) Pacientes con muestras hemolizadas o lipémicas

6.5 Variables dependientes

- Actividad de FVIII:C
- Actividad de FIX:C
- Nivel de inhibidor (UB)

6.6 Variables independientes

- Hemofilia

6.7 Material biológico

Plasmas de los pacientes, obtenidos a partir de muestras de sangre total, anticoagulados con citrato de sodio.

6.8 Descripción del procedimiento

A los pacientes estudiados por primera vez se les determinó por duplicado TTPa, reportando el valor promedio a quienes resultaron con TTPa prolongado, es decir, fuera del rango normal de referencia (obtenido de una mezcla de plasmas de donadores sanos) se les realizó la prueba de corrección del TTPa con plasma normal. Este estudio nos permitió conocer si hay deficiencia de factores de la vía intrínseca de la coagulación, además de que nos indicó si hay desarrollo de inhibidores. (Ver diagrama de flujo 1 y 2)

La búsqueda de inhibidores se realizó en base a dos criterios: a) por datos clínicos en aquellos pacientes que presentaron complicaciones en el tratamiento sustitutivo del factor de interés. A estos enfermos se les hizo búsqueda cualitativa y cuantitativa de inhibidores, b) por control preventivo a todos los pacientes se les determinó cualitativamente la presencia de inhibidores, a los que dieron positiva ésta prueba se les hizo el estudio cuantitativo. (Ver diagrama de flujo 3 y 4).

Los resultados fueron avalados por un programa de control de calidad interno, para ello, en cada jornada de mediciones se corrieron plasmas de referencia normales. Estas mediciones fueron también evaluadas por un programa Internacional de Calidad denominado Esquema Nacional de Evaluación Externa de la Calidad (UK NEQAS, por sus siglas en inglés), perteneciente a la Federación Mundial de Hemofilia.

7 MATERIAL Y METODO

7.1 Material, equipo y reactivos

Material.

- Jeringas de plástico con aguja estéril de 10 y 5 ml
- Torundas
- Gradillas metálicas
- Ligadura
- Copas de reacción para equipo BFT II
- Tubos de ensayo de 11 X 75mm de cristal
- Tubos cónicos de plástico con capacidad de 10 ml
- Tubos cónicos de plástico con capacidad de 5 ml
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Pipetas graduadas de 0.1 ml
- Micropipetas automatizadas de 1000 μ l, 200 μ l, y 100 μ l
- Tubos Eppendorf 2ml
- Puntas para micropipetas de polipropileno
- Pizeta
- Vasos de precipitados 100 mL, 250mL y 500 mL
- Matraz erlenmeyer 100 mL y 250 mL
- Espátula
- Matraces aforados 100 y 250 mL
- Pipetas multiusos de plástico
- Hielo seco
- Frascos de vidrio 7mL
- Tapones de goma

Equipos.

- Centrífuga refrigerada marca ICECR-6000
- Refrigeradores (4°C)
- Ultracongelador marca Queue-94-0150 (-70°C)
- Congelador marca IEM Westinhouse-410313 (-20°C)
- Congelador sin marca No. inv-657/96
- Coagulómetro semiautomatizado Fibrintimer II (BFTII) de Behring
- Baño maria BC-410969
- Balanza analítica marca Chyo JL-200-050303
- Balanza granataria Ohaus-050028
- Estufa de secado
- Potenciómetro Corning pH 2000 plus-538196

Material diverso:

- Termómetro
- Cronómetro
- Computadora

- Calculadora

Reactivos y soluciones

- Cloruro de sodio 0.85%
- Cloruro de calcio 0.025M
- Anticoagulante (citrato de sodio 3.8 %)
- Solución buffer de imidazol pH 7.3 L-29060.
- Ácido clorhídrico 0.1N
- Hidróxido de sodio 0.1N
- Solución buffer de fosfatos pH 4 y 7 (de referencia)
- Agua destilada pH 7.3
- Agua desionizada
- Cefaloplastina activada, Actin[®] FS, Marca Dade Behring, L- 527129
- Plasma deficitario de factor VIII, Marca Dade Behring, L-500876
- Plasma deficitario de factor IX, Marca Dade Behring, L-500858
- Plasmas control normal (QC1), Dade Behring L- 528162

Muestra biológicas

- Plasma testigo
- Plasma problema

7.2 Toma de muestras

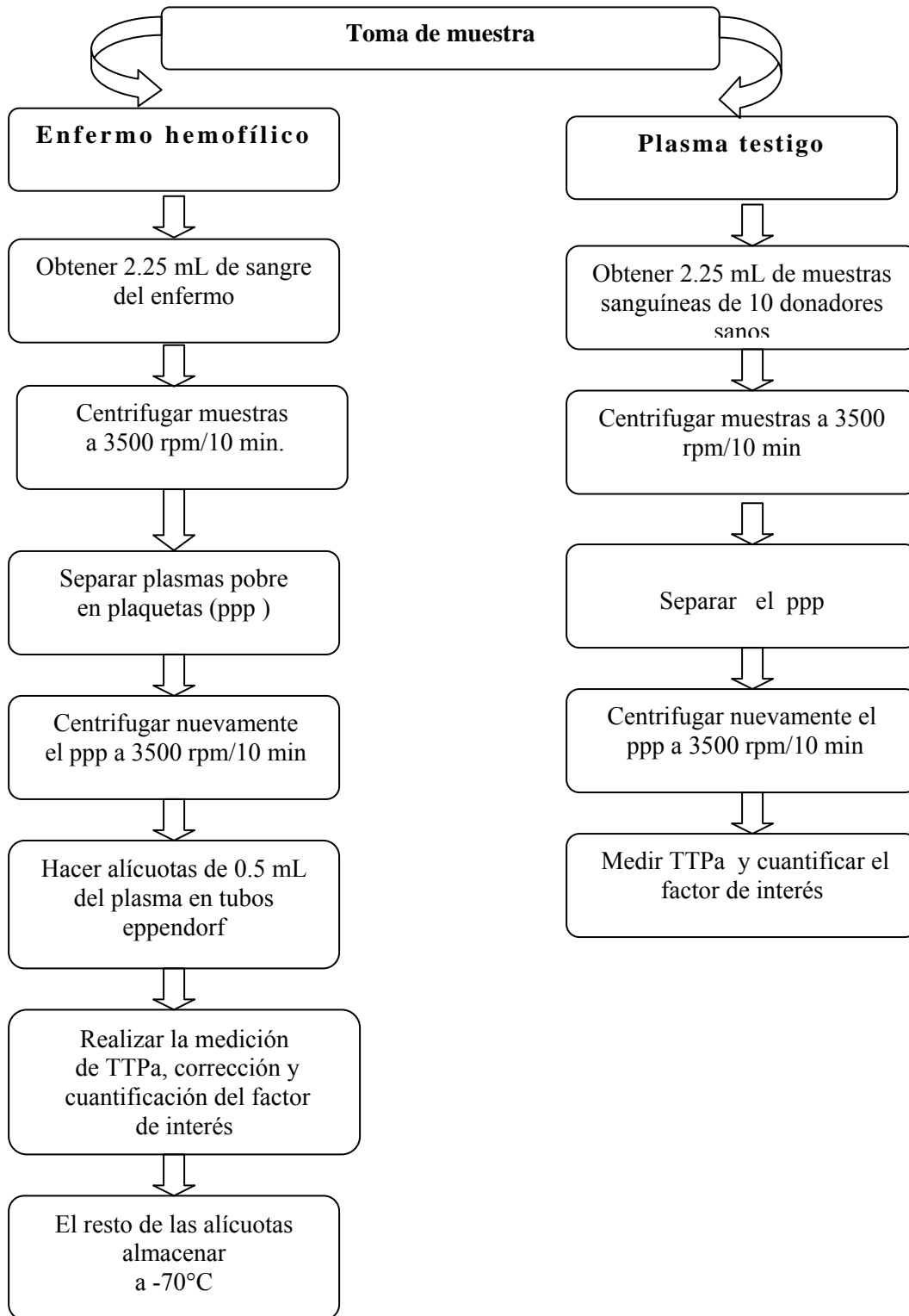
7.2.1 Toma de muestras problema

En tubos cónicos de plástico (conteniendo 0.25 mL de citrato de sodio 3.8%) se extrajeron 2.25 mL de sangre del paciente, las muestras se mezclaron suavemente evitando la formación de burbujas y se mantuvieron 4°C. Para recuperar el plasma pobre en plaquetas (ppp) se centrifugaron a 15000g por 10 minutos en centrífuga. Para eliminar completamente las plaquetas del ppp se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. En tubos eppendorf se alícuotaron 0.5 mL del ppp para su análisis. Los volúmenes de plasmas restantes se congelaron a -70°C en el ultracongelador para usarlos como controles. Los plasmas se analizaron antes de 2 horas después de la obtención de la muestra (diagrama de flujo 1).

El plasma de referencia se obtuvo de donadores voluntarios sanos siguiendo el procedimiento antes mencionado.

DIAGRAMA DE FLUJO 1

Obtención de toma de muestras sanguíneas



7.3 Determinaciones cuagulométricas

7.3.1 Medición del tiempo de tromboplastina parcial activado TTPa

Fundamento: El TTPa, es un método usado para medir la funcionalidad de los factores de coagulación que intervienen en la “la vía intrínseca” (XII,XI,IX y VIII), y de la “vía común” (II, V, y X), que en presencia del reactivo de tromboplastina y calcio mide el tiempo de formación de fibrina.^{13,47,50}

Se precalentó a 37°C el Actin FS[®] y Cloruro de calcio (0.025) en el coagulómetro Fibrintimer II (BFT II), a la copa de reacción se agregaron 0.05 mL de Actin[®] FS + 0.05 mL de plasma problema, testigo o control, se agitó y se incubo por 2 min., al cabo del cual se adicionaron 0.05 mL de Cloruro de calcio 0.025M. El tiempo se midió usando el cronómetro del BFT II hasta detectar el tiempo de formación del coágulo de fibrina. Cuadro 3.

| REACTIVOS | PROBLEMA | CONTROL COMERCIAL (QC1) | TESTIGO |
|--|----------|-------------------------|---------|
| Plasma | 0.05 MI | 0.05 mL | 0.05 mL |
| Actin [®] FS precalentado a 37°C | 0.05 MI | 0.05 mL | 0.05 mL |
| Mezclar y calentar a 37°C/ 120 seg. | | | |
| Cloruro de calcio 0.025M precalentado a 37°C | 0.05 MI | 0.05 mL | 0.05 mL |
| Mezclar y simultáneamente poner en marcha el cronómetro, Reportar el tiempo promedio de formación del coagulo. | | | |
| ¹ Valores de referencia: 25 – 34 seg. | | | |

Cuadro 3. Determinación de TTPa

Interpretación de resultado: TTPa > 2 Desviaciones Estándar (DE) con respecto al testigo es sospechoso de deficiencia de algún factor de la vía intrínseca, por lo que se continúa con el estudio de una prueba de corrección con un plasma normal.

¹ Cada laboratorio debe definir sus propios valores se referencia (Ver anexo 5)

7.3.2 Prueba de corrección con plasma normal.³⁶

Fundamento: Esta es una prueba presuntiva *in vitro*, que consiste en proporcionar al plasma del hemofílico el factor que está deficiente, para ello se le adiciona una cantidad equivalente de plasma normal. Al medir el TTPa de la mezcla se espera que éste se acorte con respecto al TTPa del plasma testigo normal.

Procedimiento:

En un tubo eppendorf por duplicado se dispensaron 0.2 mL de la mezcla de plasmas + 0.2 mL de plasma del enfermo, se incubó a 37°C/15 minutos. Se midió el TTPa y se reportó el valor promedio. Cuadro 1. En nuestra experiencia el resultado se interpretó de la siguiente manera: el TTPa de la mezcla no supera en más de 10 segundos al TTPa del testigo. Si no se corrigió el TTPa entonces sospechamos de la presencia de inhibidores.⁶¹

7.3.3 Determinación coagulométrica de la actividad de factores VIII:C y IX:C (Biggs & Douglas modificado en una etapa).³⁶

Fundamento: El déficit de uno de los factores del sistema intrínseco de la coagulación conduce a una prolongación del TTPa. Para la determinación del factor VIII o IX coagulante se mide el TTPa de una mezcla en cantidades equivalentes de plasma sustrato (deficiente del factor en estudio), plasma problema y buffer de imidazol. El plasma problema deficiente del factor afectado no está en condiciones de compensar ese factor en el plasma sustrato, lo cual conduce a una prolongación del TTPa. La actividad del factor de coagulación en estudio, expresado en porcentaje, se obtiene mediante una curva estándar establecida con diluciones de una mezcla de plasmas normales y plasma deficiente en estudio.³³

Procedimiento:

Se obtuvo la curva estándar de la siguiente manera (diagrama de flujo 2): el plasma estándar (hidratado 30 minutos antes de su uso) se diluyó 1:5(100%), 1:10(50%), 1:50(10%), 1:500(1%). Se midió el TTPa a cada dilución como se describe a continuación: en las copas de reacción se dispensaron 0.05 mL de Actin[®] FS + 0.05 mL del plasma deficiente del factor de interés + 0.05 mL del plasma estándar diluido, se incubó a 37°C/2 minutos en el BFT II, al cabo del cual se adicionó 0.05 mL de CaCl₂ 0.025M (precalentado a 37°C). Se midió el tiempo de formación del coágulo de fibrina. El BFT II graficó en el eje de las ordenadas el logaritmo del tiempo (segundos) de

formación del coágulo y en el eje de las abscisas el logaritmo de la concentración establecida (% de actividad) del factor de estudio. Figura 10

El plasma problema se diluyó en buffer de imidazol 1:5 (100% de actividad) y se le realizó el procedimiento antes descrito. El BFT II extrapola el tiempo de formación del coágulo y emite el resultado del porcentaje de actividad del factor medido. Cuadro 4

| REACTIVOS | CANTIDADES |
|---|------------|
| Plasma deficiente en factor (VIII o IX) | 0.050 mL |
| Plasma problema diluido 1:5, 1:10, 1:50, 1:500 en buffer de imidazol pH 7.3 o plasma problema diluido 1:5 | 0.050 mL |
| Actin® (reactivo de cefaloplastina activada) | 0.050 mL |
| Incubar a 37°C/ 2min | |
| CaCl ₂ 0.025M | 0.050 mL |
| Medir el tiempo de formación de fibrina .La prueba se realiza por duplicado y se reporta el valor promedio. | |

Valores de referencia: (Ver anexo 2)

Factor VIII= 91-138% de actividad

Factor IX= 77-149% de actividad

Interpretación de resultados.⁸⁰

< 1 % de actividad = hemofílicos de alto riesgo

1 - 5 % de actividad = hemofílico moderado

5 - 30 % de actividad = hemofílico leve

Cuadro 4. Cuantificación de Factores VIII y IX coagulante

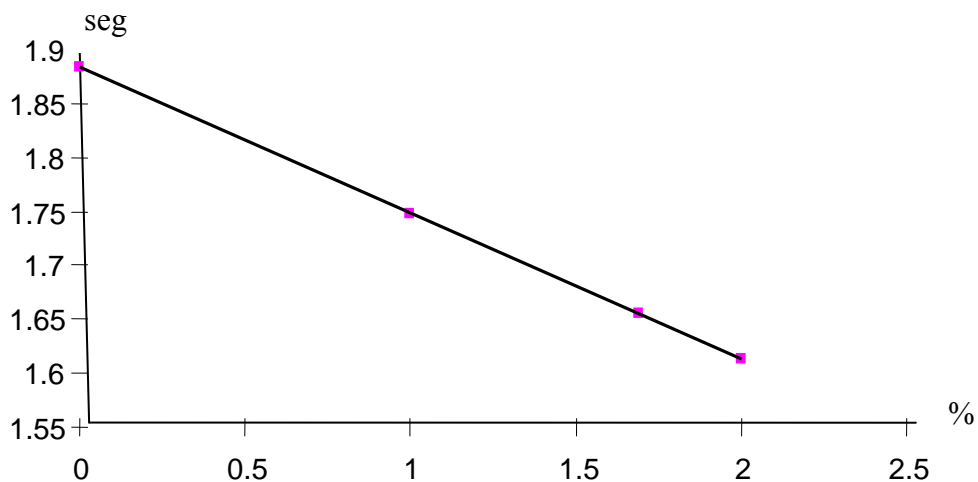


Figura 10. Curva estándar de log-log porcentaje de actividad de FVIII y FIX vs tiempo (seg) de formación de coágulos.

DIAGRAMA DE FLUJO 2

Estudio del paciente hemofílico

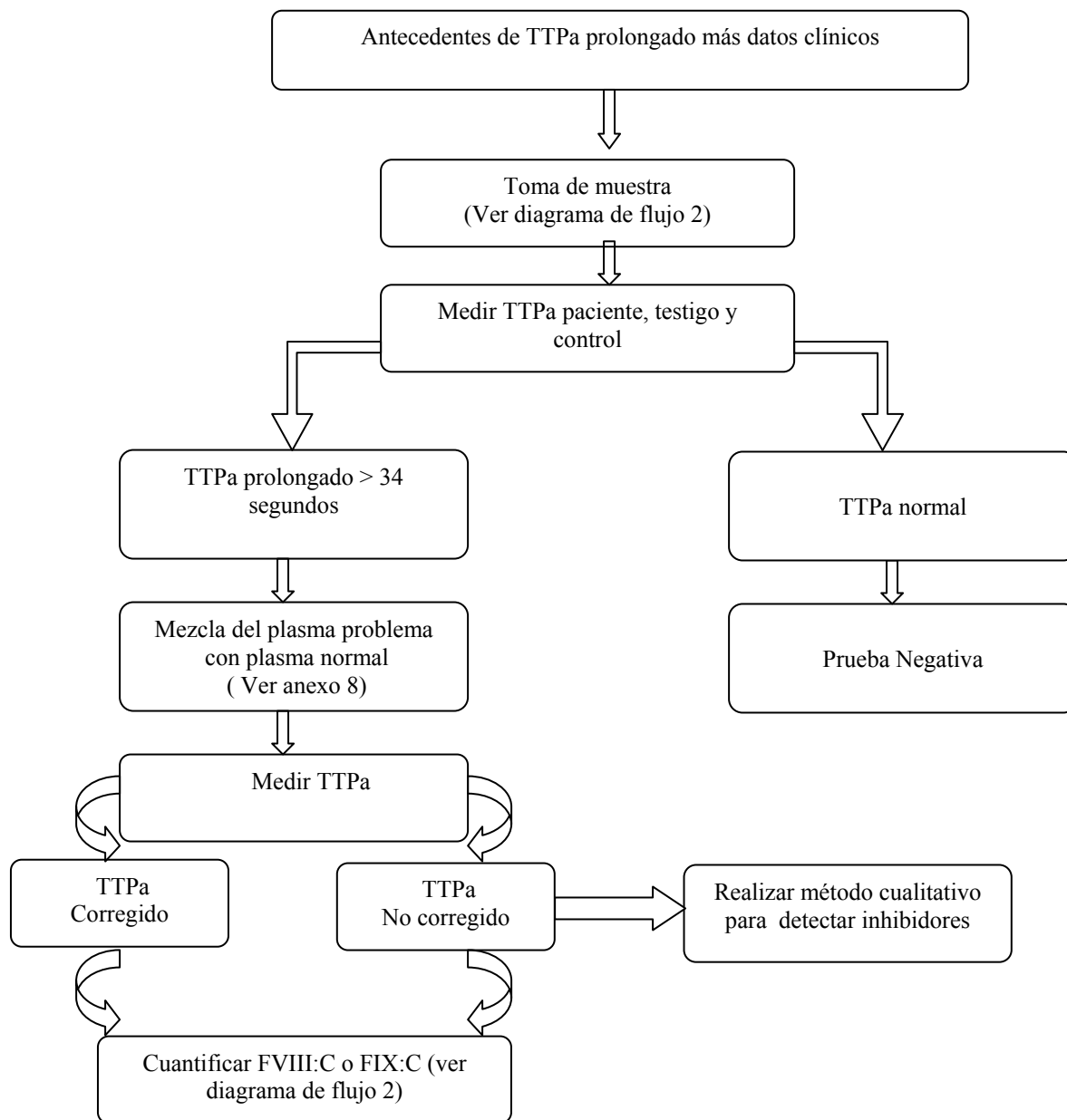
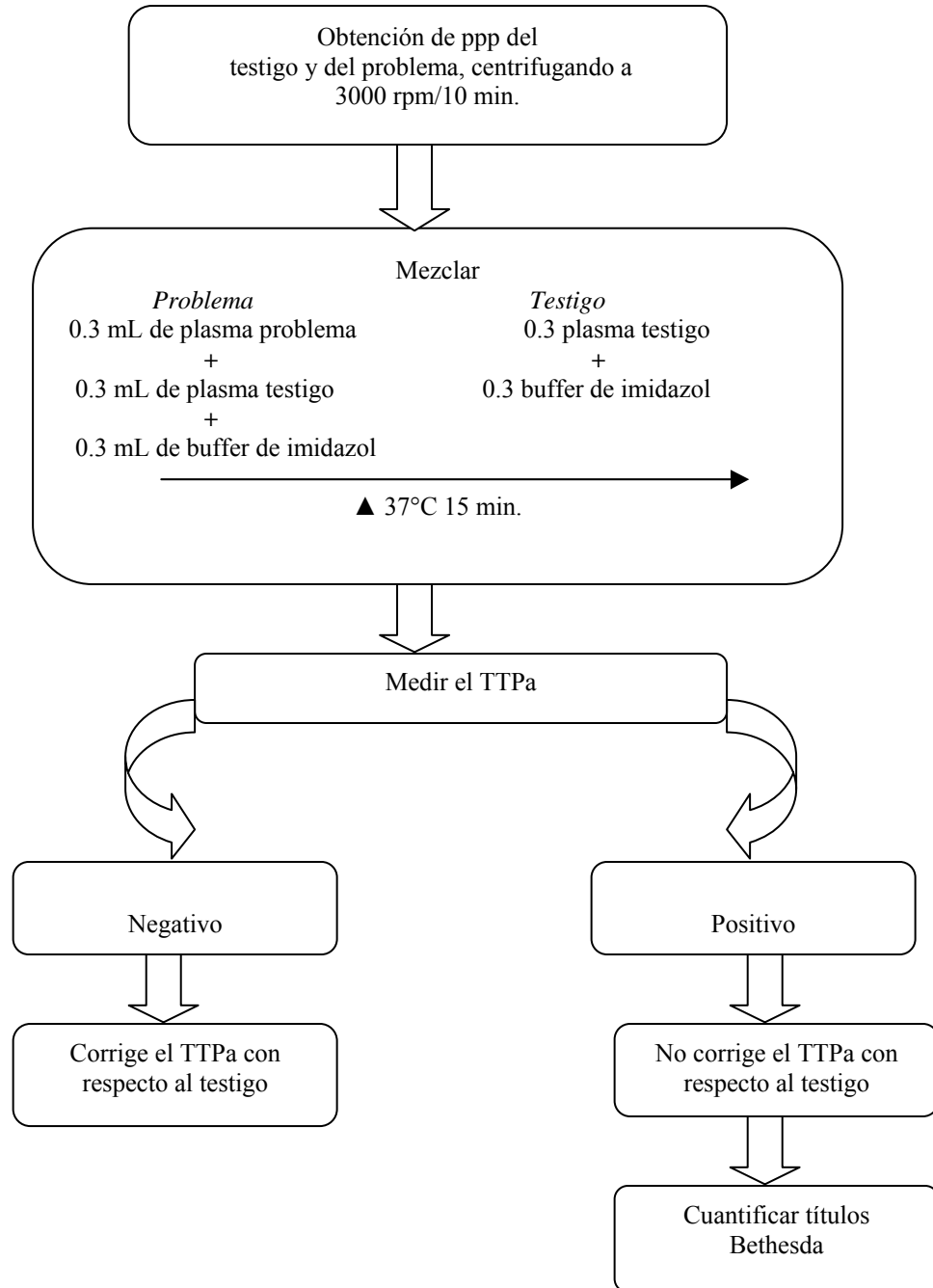


DIAGRAMA DE FLUJO 3

Estudio cualitativo para medir inhibidores dirigidos a FVIII:C y FIX:C



7.3.4 Medición de inhibidores dirigidos a FVIII:C y FIX:C, por el método Bethesda.^{42,51}

Fundamento: El plasma problema se mezcla en partes iguales con la mezcla de plasmas normales y se somete a incubación 37°C/2 hrs, realizando a continuación la medición del FVIII o FIX residual. En caso de existir inhibidor en el plasma, éste neutralizará la actividad procoagulante del FVIII o FIX de la mezcla de plasmas, lo que impedirá que se corrija, esto se verá reflejado con la prolongación del TTPa con respecto al testigo y la actividad procoagulante estará disminuida con respecto al control normal negativo.

Procedimiento:

En tubos eppendorf se hicieron las diluciones del plasma problema en buffer de imidazol (pH 7.3) 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc., a cada dilución se le adicionaron una cantidad igual de la mezcla de plasmas normales (300 µL). Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por 2 horas. El plasma testigo se diluyó 1:2 en buffer de imidazol pH 7.3. Ambas muestras se trabajaron en las mismas condiciones. Se midieron el TTPa al tubo testigo y cada dilución de la muestra problema (si en la dilución 1:2 el TTPa del problema no se acortó con respecto al testigo normal y estuvo prolongado por más de 10 segundos se midió el TTPa a la siguiente dilución 1:4, y así sucesivamente, hasta que el TTPa se iguale al TTPa del testigo normal.

e) Se midió el porcentaje de actividad de factor VIII y factor IX, en la dilución anterior a la dilución donde el TTPa se igualó con respecto al PCN. Se midió el porcentaje de actividad de factor de interés al PCN y al problema. Se calculó el FVIII residual con la fórmula siguiente:

$$\text{F:VIII residual}^2 = \frac{\% \text{ de F:VIII del problema}}{\% \text{ de F:VIII del testigo}} \times 100$$

² El Factor residual: es el factor VIII que no fue neutralizado por el inhibidor después de haber incubado a 37°C /2 hrs.

El FVIII residual se extrapola en la curva estándar de la figura 10 para obtener unidades Bethesda (UB), para el reporte final se multiplica por el factor de dilución.

Para determinar el inhibidor dirigido al FIX se sigue el mismo procedimiento.

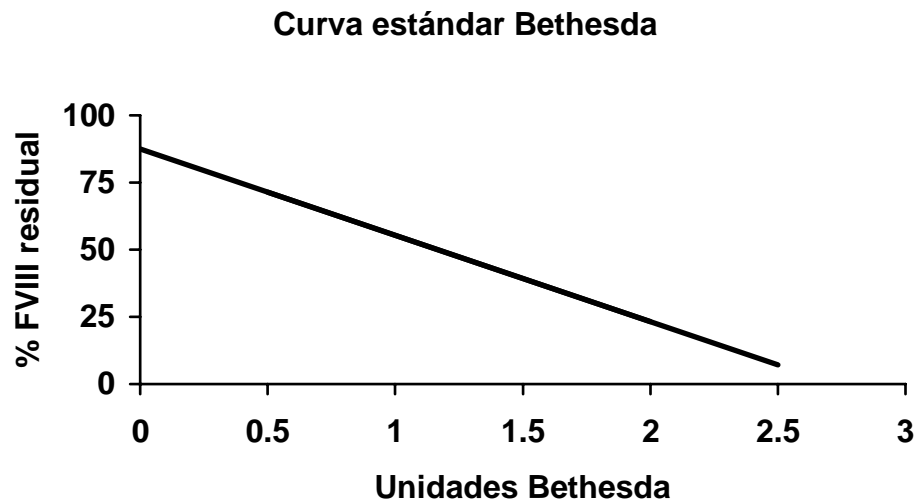
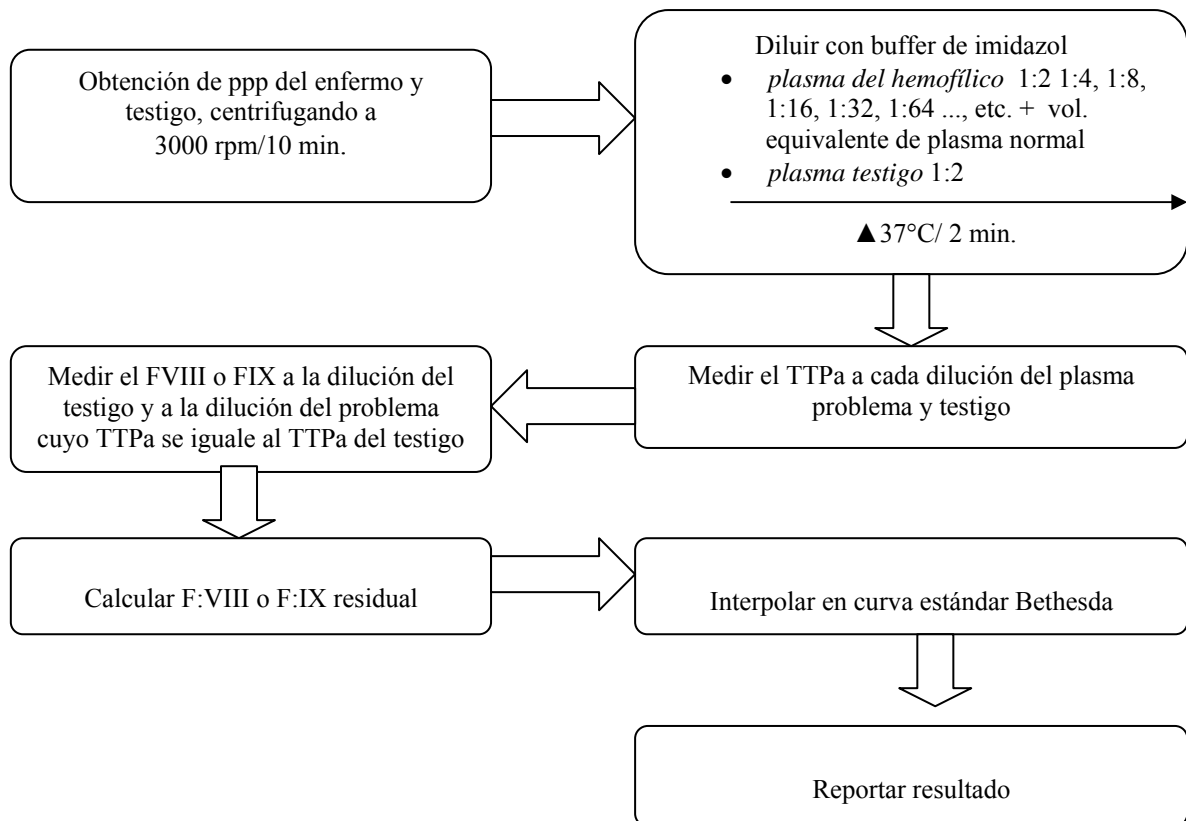


Figura 11. Gráfica Bethesda, después de 2 hrs/37°C de incubación es determinado el factor VIII residual. El 25% de FVIII residual equivale al 2UB, el 50% de FVIII residual equivale 1 UB, el 75% de FVIII residual equivale al 0.5 UB.

DIAGRAMA DE FLUJO 4

Estudio Bethesda para detectar inhibidores dirigidos a FVIII:C y FIX:C



7.4 Análisis estadístico

El resultado reportado fue el valor del TTPa promedio de las dos mediciones que se hicieron. Para determinar los rangos de referencia de TTPa y de porcentaje de actividad de FVIII:C y FIX:C se calcularon ± 2 Desviaciones estándar (DE).

El título de inhibidor (UB) dirigido a FVIII que se reportó fue el valor promedio de cada medición hecha por duplicado.

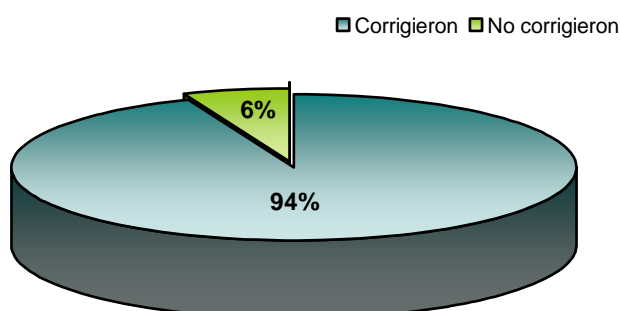
8 Resultados

En el cuadro 6 se muestra que el TTPa basal de los pacientes estudiados se encuentran prolongados en relación con el TTPa de referencia normal de nuestro laboratorio, que es de 28-34 segundos, con valor medio de 30.6 segundos (Ver anexo 2), los rangos normales se obtuvieron calculando $\pm 2DE$, con respecto al valor medio. En los enfermos con hemofilia A, el TTPa varió de 37.8-103 segundos, con valor medio de 73.2 segundos, y de 35-93 segundos, con valor medio de 63.1 segundos en los enfermos con hemofilia B. Cuadro 6

| | TTPa (seg) | Valor medio (seg) |
|-----------------------|------------|-------------------|
| Plasma Control Normal | 28-34 | 30.6 |
| Hemofilia A (n=96) | 37.8-103 | 73.2 |
| Hemofilia B (n=23) | 35-93 | 63.1 |

Cuadro 5. Resultados de TTPa de la población estudiada

La gráfica 1 muestra que en el 94% de los casos el TTPa de los plasmas problema se corrigieron con plasmas normales, mientras que el 6% de los casos el TTPa se mantuvo alargado con respecto al plasma control normal (PCN).



Gráfica 1. Corrección del TTPa con plasmas normales

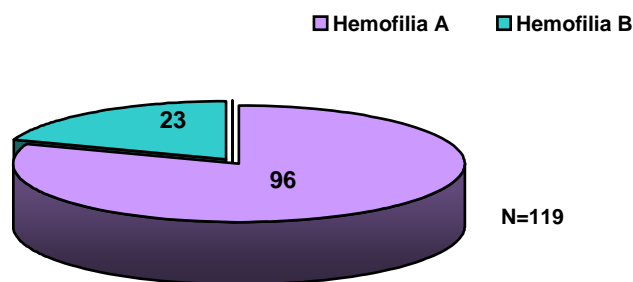
En el anexo 2 se muestran los resultados de los reportes de TTPa corregidos y no corregidos.

Los casos que no corrigieron el TTPa fueron hemofílicos A y fueron los siguientes: 8,20,49,54,86 ,96. En los hemofílicos tipo B el 100% de los casos el TTPa se corrigió con respecto al PCN. Cuadro 7

| No. Paciente | TTPa basal (segundos) | Corrección del TTPa (segundos) | TTPa PCN(segundos) |
|--------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------|
| 8 | 92.3 | 117 | 29.8 |
| 20 | 91 | 89.3 | 31.5 |
| 49 | 93 | 53.7 | 30.1 |
| 54 | 80 | 49.4 | 28.9 |
| 86 | 89 | 43 | 31.1 |
| 96 | 72 | 111 | 31.1 |

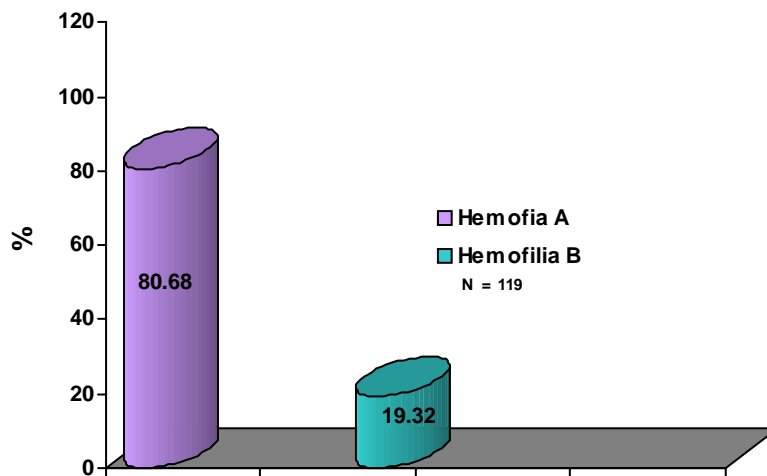
Cuadro 6. Resultados de TTPa que no corrigieron después de adicionarle plasma normal, en cantidades equivalentes, calentar a 37°C/ 2 hrs

En la gráfica 2 se representan los 119 casos estudiados, 96 tienen deficiencia de FVIII:C, por lo tanto se clasificaron como hemofílicos A y 23 tienen deficiencia de FIX:C, clasificándose como hemofílicos B.



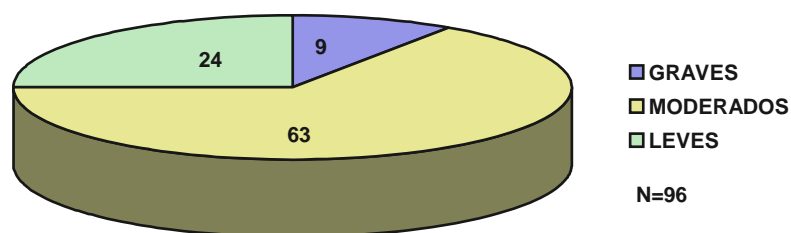
Gráfica 2. Casos de niños hemofílicos del HIMFG a los que se midió FVIII:C y FIX:C

En la gráfica 3 se muestra que la prevalencia de hemofilia A y hemofilia B son de 80.7% y 19.3%.

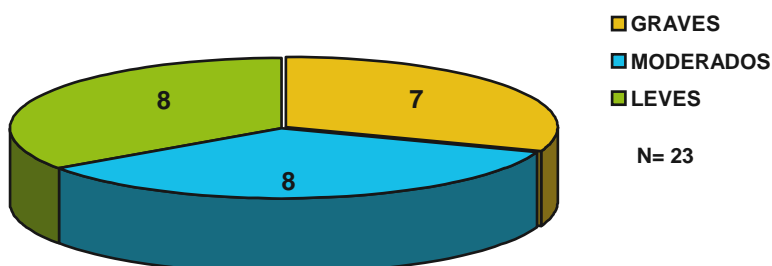


Gráfica 3. Casos de Hemofilia A y hemofilia B, representados en frecuencia

En la gráfica 4 y 5 se muestran los casos con hemofilia A y B, respectivamente que resultaron graves, moderados y leves.

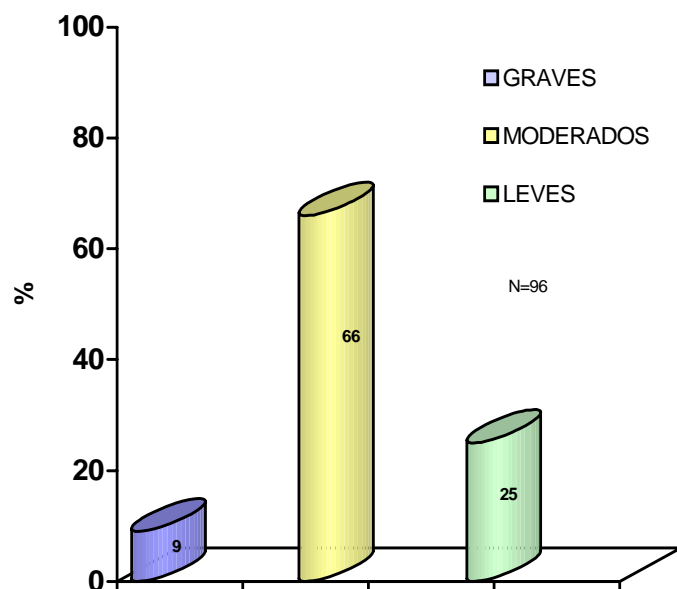


Gráfica 4. Casos de hemofilia A clasificados en base a la actividad medida de FVIII:C



Gráfica 5. Casos de Hemofilia B, clasificados en base a la actividad medida de FIX:C

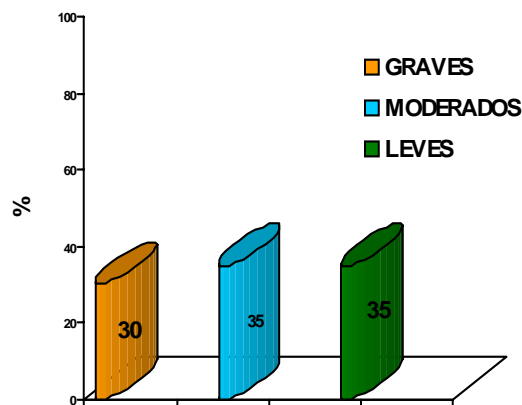
En la gráfica 6 se observa que, de los casos con hemofilia A, el 9% tienen menos 1% de actividad de FVIII:C, clasificándose como hemofílicos graves, el 68% tienen entre 1-5% de actividad, clasificándose como hemofílicos moderados y el 25% tienen entre 5-30%, de actividad, clasificándose como hemofílicos leves.



Gráfica 6. Casos de Hemofilia A, en base al nivel de deficiencia de FVIII:C, representados en porcentaje.

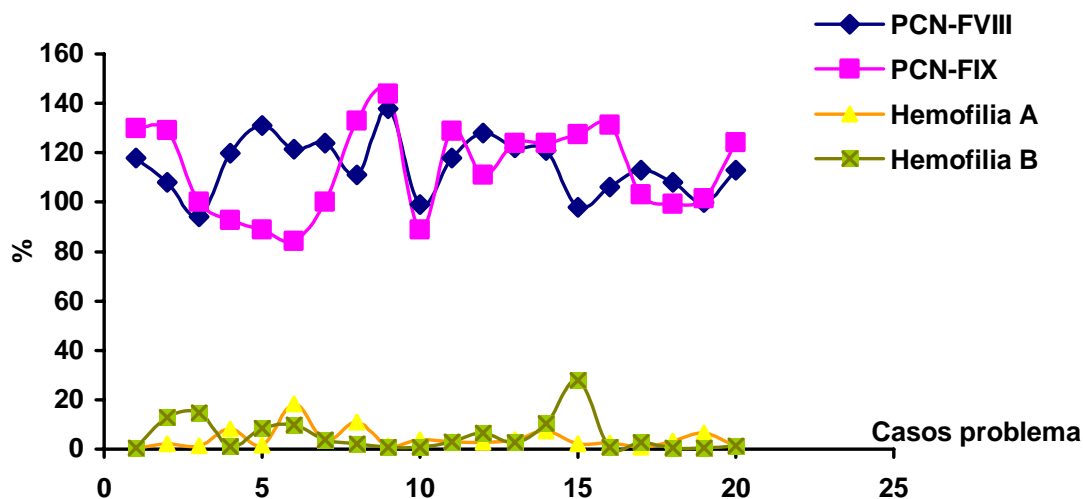
En la gráfica 7 se muestran que de los casos con hemofilia B, o deficientes de FIX:C, 30% son hemofílicos graves, 35% son moderados y 35% son leves.¹

¹ En el anexo 2 se muestran los resultados de TTPa, corrección y porcentaje de actividad de factores VIII:C y IX:C de los 119 casos estudiados.



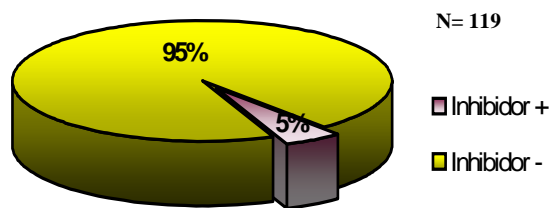
Gráfica 7. Casos de Hemofilia B, en base al nivel de deficiencia de FIX:C, representados en porcentajes.

En las gráficas 8 se muestran los porcentajes de actividad de FVIII y FIX coagulante de 20 casos problema tomados al azar, en la gráfica se observa que los valores están por debajo de los rangos de referencia normales de porcentajes de actividad del PCN. En la tablas de los anexos 1 y 2 se muestran los valores de los porcentajes de actividad del PCN y plasmas problema.



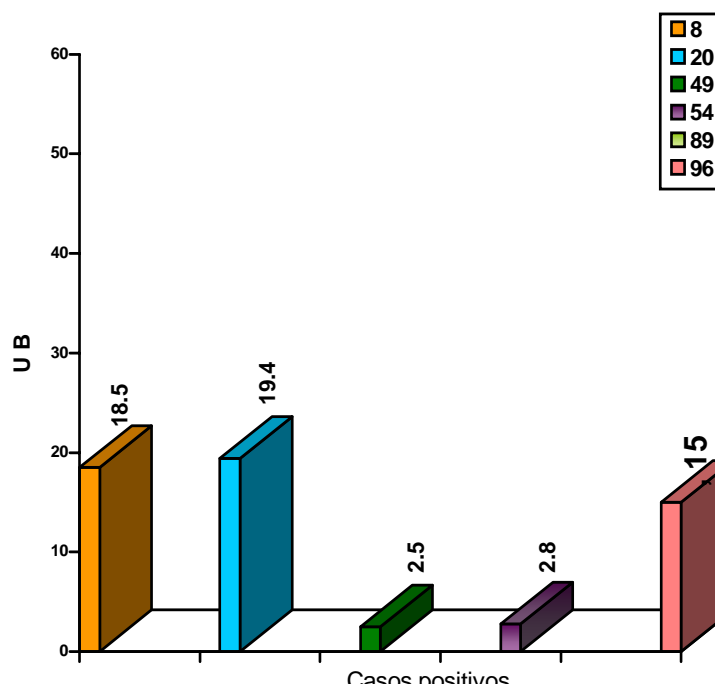
Gráfica 8. Porcentajes de actividad de plasmas y PCN

En la gráfica 9 se muestran los 119 casos estudiados de hemofilia A y B a los que se les realizó la prueba tamiz para detectar inhibidor, solo 6 de ellos (5%), habían desarrollado inhibidor dirigido a FVIII:C, lo cual se confirmó cuantificando títulos Bethesda. Ningún caso había desarrollado inhibidores dirigidos a FIX:C.



Gráfica 9. Casos de hemofílicos tipo A que desarrollaron inhibidores.

En la gráfica 10 se muestran los títulos en UB de los casos 8,20,49,54,89 y 96, positivos para inhibidor dirigido a FVIII:C. Los títulos oscilaron entre 2.5 y 57 UB. Los casos 49 y 54 fueron bajos respondedores mientras que 8, 20, 89 y 96 como altos respondedores.



Gráfica 10. Títulos de inhibidor dirigido a FVIII

El cuadro 7 muestra los resultados del TTPa de las diferentes diluciones de los casos mostrados en la gráfica anterior. Los casos 8, 20 49,54,89 y 96 muestran que el TTPa se corrigió en las diluciones 1:64, 1:32, 1:4, 1:8, 1:64 y 1:16, respectivamente con respecto al Control Normal (CN).

| Casos | Diluciones | TTP(s), de la mezcla (PN + PP + BI) /Δ 37°C/ 120 min. | | | | | | | CN L-100802N |
|-------|------------|--|------|-----|------|------|------|-------|-----------------|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:2 |
| 8 | | 132 | 123 | 102 | 84 | 48 | 43 | - | 42.3 |
| 20 | | 91 | 79 | 68 | 48 | 44 | 45 | - | 40.9 |
| 49 | | 53 | 44 | - | - | - | - | - | 44 |
| 54 | | 62 | 52.3 | 47 | | | | - | 45.7 |
| 89 | | 124 | 108 | 98 | 72 | 65 | 55 | - | 43.3 |
| 96 | | 130 | 113 | 70 | 58 | - | - | - | 42 |

Cuadro 7. Reporte del TTPa en las diferentes diluciones estequeométricas para cuantificar títulos de inhibidor dirigido a FVIII:C.

(s) = segundos

PP= Plasma Problema

CN= Control Normal

PN= Plasma Normal

BI= Buffer de Imidazol

El cuadro 8 muestra los porcentajes de actividad de factor VIII, FVIII residual y UB, de los casos del cuadro anterior. Los porcentajes de actividad de FVIII fueron de 9-42%, los del FVIII residual, fueron de 27.3-68.8% y los títulos de inhibidor fueron de 2.5-57UB, el valor medio del PCN fue de 48%, 98.3% y 0.02 UB, respectivamente.

| Casos | % FVIII:C | | % FVIII res | | UB | |
|-------|------------------|------|------------------|------|------------------|------|
| | PCN L-100802N | P | PCN L-100802N | P | PCN L-100802N | P |
| 8 | 47.1 | 31.9 | 100 | 68.8 | 0 | 18.5 |
| 20 | 47.8 | 21.8 | 106 | 48.4 | 0 | 19.4 |
| 49 | 50.9 | 28 | 86 | 47.4 | 0.07 | 2.5 |
| 54 | 56.6 | 42 | 87 | 64.6 | 0.02 | 2.8 |
| 89 | 47 | 14.2 | 87 | 30.2 | 0.02 | 57 |
| 96 | 40 | 9 | 121 | 27.3 | 0 | 15 |

PCN= Control normal % FVIIIres = Por ciento de factor VIII residual
 UB= Unidades Bethesda P= Paciente

8. Reporte del FVIII residual y títulos de inhibidor antiFVIII en Unidades Bethesda (UB)

De los plasmas que resultaron negativos con la prueba tamiz, a la presencia de inhibidores dirigidos a FVIII y FIX, se tomaron al azar 8 plasmas de hemofílicos A y 2 plasmas de hemofílicos B y se les realizó el método Bethesda.

El cuadro 9 muestra que los títulos Bethesda fueron de cero, por lo tanto, se confirma que en estos plasmas no hay presencia de inhibidores dirigidos a los factores estudiados.

| Caso | FVIII % | | | FVIIIres % | | FIX % | | | FIXres % | | UB | |
|--------------------|------------|------|--------------------------------|---------------|-----|----------------------------|------|------|-----------------------|------|----|---|
| | B | CN | P | CN | P | B | CN | P | CN | P | CN | P |
| | 43 | 47.1 | | 100.9 | | 52 | 54.3 | | 104 | | 0 | 0 |
| 4 | “ | “ | 51.9 | “ | 120 | | | | | | 0 | 0 |
| 13 | “ | “ | 49.3 | “ | 114 | | | | | | 0 | 0 |
| 19 | “ | “ | 57.8 | “ | 134 | | | | | | 0 | 0 |
| 23 | “ | “ | 61.2 | “ | 142 | | | | | | 0 | 0 |
| 29 | “ | “ | 60.1 | “ | 139 | | | | | | 0 | 0 |
| 34 | “ | “ | 58.3 | “ | 135 | | | | | | 0 | 0 |
| 38 | “ | “ | 49.3 | “ | 114 | | | | | | 0 | 0 |
| 42 | “ | “ | 50.1 | “ | 116 | | | | | | 0 | 0 |
| 107 | “ | | | | | | | 50.1 | | 96.3 | 0 | 0 |
| 109 | “ | | | | | | | 51.4 | | 100 | 0 | 0 |
| B= Blanco | | | P= Paciente | | | FIXres= Factor IX residual | | | UB= Unidades Bethesda | | | |
| CN= Control Normal | | | FVIIIres= Factor VIII residual | | | | | | | | | |

Cuadro 9. Casos control, tomados al azar con prueba tamiz negativa para la detección de Inhibidores dirigidos a FVIII:C y FIX:C y con el método Bethesda también negativo.

9 Discusión de resultados

La prueba del TTPa nos permitió detectar de forma preliminar deficiencias de factores VIII:C o IX:C, estas deficiencias se manifestaron obteniendo TTPa alargados por arriba de ± 2 DE con respecto al plasma control normal (28-34 segundos), ésta prueba también nos permitió detectar cualitativamente y cuantitativamente la presencia de inhibidores dirigidos a dichos factores. Peñaloza Santillán y cols en 1975 confirmaron la utilidad del ensayo del TTPa como prueba tamiz más accesible para apoyar el diagnóstico de hemofilia,⁵⁸ tal como lo habían descrito el grupo de Ingram G.³⁵ Ambríz Fernández y cols describieron que el TTPa fue 100% útil como prueba de escrutinio en un estudio de 22 pacientes con hemofilia A.⁴

De los casos de niños hemofílicos estudiados, observamos que la frecuencia de casos con hemofilia A es de 80.7% mientras que de hemofilia B es de 19.3%. Mc Music en 1995 describió que la frecuencia de los casos de hemofilia A es mayor con respecto a los de hemofilia B.⁴⁷ Windyga J y col, en Polonia, estudiaron a 2269 hemofílicos, de los cuales 1953 casos (86%) fueron hemofílicos A y 316 casos (14%) fueron hemofílicos B. En México, Dorantes, describió que hay 5 casos de hemofilia A por cada caso de hemofilia B.⁵⁰

Con respecto a hemofilia A, en nuestra Institución, la hemofilia moderada es más frecuente (66%) con respecto a la hemofilia leve (25%) y grave (9%). En el caso de hemofilia B, tanto la moderada (35%), leve (35%) y grave (30%) sucede en igual frecuencia. Peñaloza y col. en 1975, en México estudiaron a 56 hemofílicos A y 6 hemofílicos B, de los casos con hemofilia A, 63% fueron graves, el 32% moderados y 5% leves, de los casos con hemofilia B, 4 fueron graves, un moderado y un leve. Sadler y Davie, 1994 describen que la hemofilia B grave sucede en el 80% de los casos, mientras que la hemofilia B moderada y leve sucede en el 5% y 15% respectivamente.

La frecuencia de desarrollar inhibidores en la población estudiada es del 5%, es decir, hay 1 caso positivo por cada 20 hemofílicos. De los 6 hemofílicos que desarrollaron inhibidor dirigido a FVIII:C o enfermos con hemofilia A, 4 son hemofílicos graves (<1% de actividad de FVIII:C) y de alta respuesta a inhibidores dirigidos a este factor (15-57 UB) mientras que 2 son moderados (1-5% de actividad de FVIII:C) y de baja respuesta a inhibidores (2.5-2.8 UB). No se detectó ningún caso de inhibidores dirigidos a FIX:C. Lusher JM y col, 2000 describieron que el riesgo de desarrollar inhibidores dirigidos a FVIII:C en enfermos con hemofilia A grave es de 5 - 30%.⁴³ Schwaab R y col, 1990 describió que el riesgo de desarrollar inhibidores dirigidos a FIX:C en enfermos con hemofilia B grave es de 1-3%,⁶³ considerando estas

referencias, observamos que la incidencia de desarrollar inhibidores en la población de estudio, es baja (5%). Ehrenforth y col, 1992 aceptó ampliamente que la incidencia de desarrollo de inhibidores estaba influenciada por la hemofilia severa,¹⁸ Schwaab, 1995 y Scharrer, 1999, con sus respectivos colaboradores, mencionan que el tipo de mutación es factor de riesgo para el desarrollo de inhibidores, siendo la Inversión en el intron 22 la más relacionada hasta en un 40%.⁶³ Briet, 1994 describió que existen evidencias de que los hemofílicos tratados con concentrados altamente purificados o FVIII recombinante eleva la incidencia del desarrollo de inhibidores,¹² esto pudiera explicar por que en nuestra población de enfermos con hemofilia la incidencia de desarrollar inhibidores dirigidos a FVIII sea tan baja, ya que el tratamiento de reemplazo ha sido el uso de crioprecipitados de FVIII en el 80% de los casos. Shwaab describió que la edad de inicio de exposición al tratamiento también es un factor de riesgo para su desarrollo, en la población estudiada 2 de los niños tenían menos de 5 años de edad y desarrollaron baja respuesta (<5UB) a inhibidores dirigidos a FVIII, mientras que 4 de ellos tenían entre 11 y 14 años de edad y fueron de alta respuesta (> 5UB).⁶³

El empleo de métodos más sensibles, reproducibles, confiables y menos laboriosos, siguiendo el mismo principio de Biggs para cuantificar factores de coagulación incluyendo el FVIII y FIX^{9,10,73} ha traído como consecuencia el desuso del método de generación de tromboplastina de Biggs, método que se empleó en los años setentas por Dorantes y col en el HIMFG, para diagnosticar deficiencias de factores VIII y IX, aunque representa un método muy útil, para detectar deficiencias del factor de coagulación de interés, es también un método bastante laborioso, tardado, y se requieren grandes cantidades de muestras de sangre, esto me hace suponer la causa por la que se dejo de practicar dicha prueba por varios años y por que hubo la necesidad de solicitar apoyo de otras instituciones para realizarlas.⁶⁵

El método coagulométrico de un paso, elegido en nuestro laboratorio nos permitió obtener resultados confiables y reproducibles, esto se confirmo con el programa de control de calidad externa llamado Esquema Nacional de Evaluación Externa de la calidad (UK-NEQAS) por sus siglas en ingles, provenientes de la Federación Mundial de Hemofilia. Barrocliffe TW y col 2002, encontró que no había diferencia significativa ($p < 0.05$) al emplear el método de un paso, dos pasos y el cromogénico siempre y cuando se utilicen las mismas condiciones de trabajo.¹⁸ El emplear fosfolípidos de diferente origen o plasmas comerciales de diferentes métodos de obtención da lugar a obtener diferencias hasta de 30% y 50% respectivamente en las mediciones, Mikaelsson M, 2002.²⁵

10 Conclusión

Con la implementación en nuestra institución del método para medir factores VIII y IX coagulante, ahora se tiene como ventajas el poder clasificar a nuestros enfermos en hemofílicos A y hemofílicos B, clasificarlos en base al grado de severidad de la hemofilia y detectar si alguno ha desarrollado inhibidores, esto ha permitido que los niños sean diagnosticados, tratados veraz y oportunamente en el menor tiempo posible. Debido a que el método implementado es sencillo de realizar, el paciente puede ser diagnosticado a más tardar en la segunda consulta. La cantidad de muestra utilizada es mínima comparada con la cantidad utilizada con el método de generación de tromboplastina de Biggs tradicional. También se tiene la ventaja de tener un resultado más exacto, debido al control en la manipulación y análisis de las muestras en las fases pre-analítica y analítica, recordemos que los factores VIII y V son muy lábiles a temperatura ambiente, por lo que resulta importante analizarse en el menor tiempo posible después de obtenidas las muestras para tener un resultado altamente confiable.

El desarrollo del método cualitativo para detectar inhibidores, como medida profiláctica, permitió detectar que algunos hemofílicos A habían desarrollado inhibidores dirigidos al FVIII favoreciendo con ello que el médico tratante tomara las medidas terapéuticas necesarias para resolver las complicaciones que implica la presencia de estos.

Desde el punto de vista de costos, también se han visto beneficiados los pacientes, en especial los de escasos recursos económicos, ya que el costo de los estudios realizados en el hospital es mucho menor con respecto a una institución privada, además de de que el familiar evita desplazarse con sus muestras a la institución asignada para la realización de las pruebas.

11 Perspectivas

Los resultados de éste trabajo dejan abierta la posibilidad de continuar estudiando la población de hemofílicos, principalmente por medio de técnicas de biología molecular en tres posibles campos:

- A) Identificar las mutaciones en la población de hemofílicos del HIMFG.
- B) Identificar las mutaciones asociadas al desarrollo de inhibidores.
- C) Identificación de portadoras de la hemofilia.

13 Anexos

ANEXO 1

| Medición | TTPa (s) | Factor VIII:C (%) | Factor IX:C (%) |
|----------|-------------|----------------------|--------------------|
| 1 | 29.8 | 118 | 129.9 |
| 2 | 31.5 | 108 | 129.1 |
| 3 | 31.1 | 94 | 100 |
| 4 | 33.1 | 119.8 | 92.7 |
| 5 | 30.1 | 131.1 | 89 |
| 6 | 28.9 | 121.4 | 84.3 |
| 7 | 31.7 | 123.9 | 100 |
| 8 | 33.2 | 111 | 133 |
| 9 | 31.1 | 137.8 | 144 |
| 10 | 29.8 | 99 | 89 |
| 11 | 30.1 | 118 | 128.7 |
| 12 | 31.3 | 128 | 111 |
| 13 | 33.5 | 122 | 124 |
| 14 | 30.7 | 120.8 | 124 |
| 15 | 29.5 | 98 | 127.9 |
| 16 | 29.6 | 106 | 131.4 |
| 17 | 29.9 | 113 | 103.1 |
| 18 | 29.6 | 108.1 | 99.9 |
| 19 | 29.6 | 99.8 | 101.4 |
| 20 | 28.7 | 113.1 | 124.2 |
| N=20 | 20 | 20 | 20 |
| Media | 30.6 | 114.54 | 113.3 |
| ± 2DE= | 28-33 | 91-138 | 77-149 |

Tabla 19. Determinación de rango de referencia normal poblacional de una mezcla de 25 plasmas normales. L-060501N

ANEXO 2

Tabla 1. Resultados del TTPa, corrección y porcentaje de actividad de factor VIII coagulante en enfermos con hemofilia tipo A

| Casos | (a) TTPa | | Corrección de TTPa P P | Actividad de FVIII:C | | | | |
|-------|--------------------|---------|------------------------|----------------------|-------------------|------|-----|------|
| | (b) PC N L-060501N | (c) P P | | PC N L-060501N | (d) PCA L-060501A | | PP | |
| | (e) s | S | | | (f) % | S | % | S |
| 1 | 29.8 | 90..3 | 32.1 | 118 | 116 | 1.2 | 149 | 0.3 |
| 2 | “ | 84.3 | 33.2 | “ | “ | “ | 111 | 1.6 |
| 3 | “ | 87.6 | 31.1 | “ | “ | “ | 107 | 1.9 |
| 4 | “ | 65 | 33 | “ | “ | “ | 105 | 2.2 |
| 5 | “ | 55.3 | 31 | “ | “ | “ | 100 | 2.9 |
| 6 | “ | 58 | 31.3 | “ | “ | “ | 115 | 1.2 |
| 7 | “ | 101 | 36.1 | “ | “ | “ | 114 | 1.3 |
| 8 | “ | 92.3 | 40.5 | “ | “ | “ | 124 | 0.8 |
| 9 | “ | 80 | 35.1 | “ | “ | “ | 112 | 1.5 |
| 10 | “ | 75.3 | 33 | “ | “ | “ | 97 | 3.3 |
| 11 | 31.5 | 76.9 | 36 | 108 | 117 | 1.2 | 94 | 4.2 |
| 12 | “ | 71.5 | 30 | “ | “ | “ | 105 | 2.3 |
| 13 | “ | 71 | 33.3 | “ | “ | “ | 102 | 2.6 |
| 14 | “ | 55 | 31.4 | “ | “ | “ | 84 | 8.1 |
| 15 | “ | 52.6 | 32.7 | “ | “ | “ | 80 | 10.8 |
| 16 | “ | 73.6 | 31.1 | “ | “ | “ | 103 | 2.5 |
| 17 | “ | 73.3 | 32.9 | “ | “ | “ | 95 | 4.0 |
| 18 | “ | 76 | 34.3 | “ | “ | “ | 102 | 2.6 |
| 19 | “ | 86 | 33 | “ | “ | “ | 110 | 1.7 |
| 20 | “ | 91 | 43.2 | “ | “ | “ | 122 | 0.9 |
| 21 | 31.1 | 78.4 | 34.3 | 94 | 112 | 1.52 | 103 | 2.5 |
| 22 | “ | 76 | 35 | “ | “ | “ | 105 | 2.2 |
| 23 | “ | 78 | 31.6 | “ | “ | “ | 114 | 1.7 |
| 24 | “ | 40 | 32.9 | “ | “ | “ | 73 | 18.2 |
| 25 | “ | 85.3 | 35.1 | “ | “ | “ | 109 | 1.7 |

- (a) TTPa = Tiempo de tromboplastina parcial activado
- (b) PCN = Plasma Control Normal
- (c) PP = Plasma de Paciente
- (d) PCA = Plasma Control Anormal
- (e) s = segundos
- (f) % = porcentaje de actividad de factor VIII coagulante

| Casos | (a) TTPa | | Corrección de TTPa P P | Actividad de FVIII:C | | | | |
|-------|--------------------|---------|------------------------|----------------------|-------------------|------|-----|------|
| | (b) PC N L-060501N | (c) P P | | PC N L-060501N | (d) PCA L-060501A | | PP | |
| | (e) s | S | | | (f) % | s | % | s |
| 26 | “ | 79 | 32.3 | “ | “ | “ | 111 | 1.6 |
| 27 | “ | 69 | 30.8 | “ | “ | “ | 90 | 5.4 |
| 28 | “ | 93 | 31 | “ | “ | “ | 114 | 1.4 |
| 29 | “ | 103 | 33 | “ | “ | “ | 149 | 0.3 |
| 30 | “ | 77 | 34 | “ | “ | “ | 97 | 3.5 |
| 31 | 31.1 | 97 | 34.3 | 119.8 | 91 | 1.56 | 93 | 1.2 |
| 32 | “ | 41 | 37.1 | “ | “ | “ | 79 | 6.9 |
| 33 | “ | 83.3 | 34 | “ | “ | “ | 91 | 1.6 |
| 34 | “ | 53 | 36.3 | “ | “ | “ | 75 | 10.9 |
| 35 | “ | 49 | 32.1 | “ | “ | “ | 79 | 6.9 |
| 36 | “ | 40 | 34.7 | “ | “ | “ | 72 | 17.7 |
| 37 | “ | 38.4 | 30.4 | “ | “ | “ | 71 | 19 |
| 38 | “ | 86.3 | 33.3 | “ | “ | “ | 88 | 2.2 |
| 39 | “ | 80 | 34.1 | “ | “ | “ | 92 | 1.3 |
| 40 | “ | 81 | 31.7 | “ | “ | “ | 86 | 2.4 |
| 41 | 30.1 | 69 | 35 | 131.1 | 92 | 1.4 | 81 | 4.9 |
| 42 | “ | 58 | 32 | “ | “ | “ | 82 | 4.7 |
| 43 | “ | 67.5 | 36 | “ | “ | “ | 88 | 2.1 |
| 44 | “ | 66 | 32 | “ | “ | “ | 83 | 3.8 |
| 45 | “ | 37.8 | 36.3 | “ | “ | “ | 72 | 17.2 |
| 46 | “ | 75 | 28.8 | “ | “ | “ | 87 | 2.6 |
| 47 | “ | 70 | 34.1 | “ | “ | “ | 89 | 1.9 |
| 48 | “ | 88 | 35.1 | “ | “ | “ | 85 | 3.1 |
| 49 | “ | 93 | 62 | “ | “ | “ | 86 | 2.9 |
| 50 | “ | 85 | 31 | “ | “ | “ | 98 | 0.8 |
| 51 | 28.9 | 67 | 33.8 | 121.4 | 92 | 1.47 | 85 | 3.0 |
| 52 | “ | 70.3 | 34 | “ | “ | “ | 87 | 2.4 |
| 53 | “ | 61.3 | 31 | “ | “ | “ | 73 | 14 |
| 54 | “ | 80 | 58 | “ | “ | “ | 87 | 2.6 |
| 55 | “ | 67.5 | 32 | “ | “ | “ | 80 | 5.8 |

(a) TTPa = Tiempo de tromboplastina parcial activado

(b) PCN = Plasma Control Normal

(c) PP = Plasma de Paciente

(d) PCA = Plasma Control Anormal

(e) s = segundos

(f) % = porcentaje de actividad de factor VIII coagulante

| Casos | (a) TTPa | | Corrección de TTPa P P | Actividad de FVIII:C | | | | |
|-------|-----------------------|--------|------------------------------|----------------------|---------------------|------|----|------|
| | (b) PC N L-060501N | (c)P P | | PC N L-060501N | (d)PCA L-060501A | | PP | |
| | (e) s | S | | | (f) % | s | % | s |
| 56 | “ | 85 | 35.3 | “ | “ | “ | 87 | 2.6 |
| 57 | “ | 67 | 29 | “ | “ | “ | 77 | 8.4 |
| 58 | “ | 79 | 29 | “ | “ | “ | 88 | 2.1 |
| 59 | “ | 74 | 35 | “ | “ | “ | 84 | 3.7 |
| 60 | “ | 73.9 | 34.6 | “ | “ | “ | 86 | 2.8 |
| 61 | “ | 78.9 | 34.4 | “ | “ | “ | 82 | 4.5 |
| 62 | “ | 55 | 32.3 | “ | “ | “ | 87 | 2.4 |
| 73 | 33.2 | 66 | 36.1 | 111 | 96 | 1.50 | 75 | 6.4 |
| 74 | “ | 66 | 34.3 | “ | “ | “ | 74 | 7.4 |
| 75 | “ | 96 | 34.1 | “ | “ | “ | 94 | 1.2 |
| 76 | “ | 83 | 31.4 | “ | “ | “ | 87 | 2.0 |
| 77 | “ | 98 | 35.3 | “ | “ | “ | 99 | 0.8 |
| 78 | “ | 72.8 | 36.1 | “ | “ | “ | 91 | 1.5 |
| 79 | “ | 98 | 35.3 | “ | “ | “ | 86 | 2.3 |
| 80 | “ | 72 | 34.1 | “ | “ | “ | 97 | 0.9 |
| 81 | “ | 72 | 34.3 | “ | “ | “ | 87 | 2.0 |
| 82 | “ | 95.5 | 35.5 | “ | “ | “ | 85 | 2.5 |
| 83 | 31.1 | 87 | 34 | 137.8 | 93 | 1.0 | 86 | 2.3 |
| 84 | “ | 79 | 31.1 | “ | “ | “ | 85 | 2.5 |
| 85 | “ | 98 | 31.2 | “ | “ | “ | 90 | 1.6 |
| 86 | “ | 76 | 34.1 | “ | “ | “ | 87 | 2.1 |
| 87 | “ | 89 | 32.3 | “ | “ | “ | 90 | 1.6 |
| 88 | “ | 63 | 31.1 | “ | “ | “ | 65 | 20.2 |
| 89 | “ | 99 | 58.3 | “ | “ | “ | 87 | 0.9 |
| 90 | “ | 91 | 35 | “ | “ | “ | 85 | 2.5 |
| 91 | “ | 81.5 | 33.3 | “ | “ | “ | 83 | 3.0 |
| 92 | “ | 72.3 | 31.1 | “ | “ | “ | 72 | 9.1 |
| 93 | “ | 62.3 | 29.4 | “ | “ | “ | 82 | 3.3 |
| 94 | “ | 65 | 31.3 | “ | “ | “ | 79 | 4.3 |
| 95 | “ | 46 | 31.3 | “ | “ | “ | 75 | 6.6 |
| 96 | “ | 72 | 44.2 | “ | “ | “ | 93 | 1.2 |

(a) TTPa = Tiempo de tromboplastina parcial activado

(b) PCN = Plasma Control Normal

(c) PP = Plasma de Paciente

(d) PCA = Plasma Control Anormal

(e) s = segundos

(f) % = porcentaje de actividad de factor VIII coagulante

Tabla 2. Resultados del TTPa, corrección y porcentaje de actividad de FIX:C en enfermos con hemofilia tipo B

| Paciente | (a) TTPa | | Corrección de TTPa PP | Actividad de FIX:C | | | | |
|----------|-------------------|--------|-----------------------|--------------------|------------------|------|----|------|
| | (b) PCN L-060501N | (c) PP | | PCN L-060501N | (d)PCA L-060501A | | PP | |
| | (e) s | S | | (f) % | S | % | S | % |
| 97 | 29.8 | 84 | 30 | 129.9 | 80 | 1.0 | 85 | 0.6 |
| 98 | “ | 49.6 | 28.2 | “ | “ | “ | 58 | 12.9 |
| 99 | “ | 43.3 | 29.7 | “ | “ | “ | 57 | 14.7 |
| 100 | “ | 71 | 31 | “ | “ | “ | 80 | 1.0 |
| 101 | “ | 46 | 33.1 | “ | “ | “ | 61 | 8.6 |
| 102 | “ | 45.5 | 34.7 | “ | “ | “ | 60 | 9.8 |
| 103 | “ | 53.3 | 31.3 | “ | “ | “ | 68 | 3.7 |
| 104 | “ | 60 | 31.2 | “ | “ | “ | 68 | 3.7 |
| 105 | “ | 55.5 | 33.1 | “ | “ | “ | 73 | 2.1 |
| 106 | “ | 51.5 | 33.3 | “ | “ | “ | 68 | 3.7 |
| 107 | “ | 93 | 30.2 | “ | “ | “ | 84 | 0.7 |
| 108 | 30.1 | 91 | 29.3 | 129.1 | 78 | 0.89 | 79 | 0.8 |
| 109 | “ | 66.6 | 34.1 | “ | “ | “ | 71 | 3.0 |
| 110 | “ | 40 | 33.4 | “ | “ | “ | 63 | 6.7 |
| 111 | “ | 57.9 | 33.4 | “ | “ | “ | 71 | 2.6 |
| 112 | “ | 44.5 | 34.1 | “ | “ | “ | 60 | 10.5 |
| 113 | “ | 35 | 35.1 | “ | “ | “ | 53 | 28 |
| 114 | “ | 88 | 33.7 | “ | “ | “ | 83 | 0.8 |
| 115 | “ | 69 | 32.4 | “ | “ | “ | 71 | 2.6 |
| 116 | “ | 89 | 30.1 | “ | “ | “ | 87 | 0.5 |
| 117 | “ | 92 | 29.9 | “ | “ | “ | 88 | 0.5 |
| 118 | “ | 86 | 29.7 | “ | “ | “ | 76 | 1.5 |
| 119 | “ | 40 | 27.1 | “ | “ | “ | 64 | 5.9 |

(a) TTPa = Tiempo de tromboplastina parcial activado

(b) PCN = Plasma Control Normal

(c) PP = Plasma de Paciente

(d) PCA = Plasma Control Anormal

(e) s= segundos

(f) %= porcentaje de actividad de FVIII:C

ANEXO 3

Preparación de reactivos

a) Buffer de imidazol

Solución buffer de imidazol 0.05M, pH 7.3. (0.68 g de imidazol+1.17g de NaCl 100 mL de agua destilada + 37.2 mL de HCl 0.1N).

a) Citrato de sodio 3.8%

Pesar 3.8g de citrato de sodio y disolver en 100mL de agua destilada.

d) Cloruro de calcio 0.025M

Pesar 2.78g de cloruro de calcio y disolver en 100 mL de agua destilada en matraz aforado.

e) Cloruro de Sodio 0.85%

Pesar 8.5g de Cloruro de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada.

f) Acido clorhídrico 0.1N

Medir 0.81mL de ácido clorhídrico y llevar a un volumen de 100 mL en matraz aforado.

g) Hidróxido de sodio 0.1N

Pesar 0.4g de hidróxido de sodio y llevar a 100mL de agua destilada en matraz aforado.

12 Bibliografía

1. Alistair R M, Alaine King, Gary Moore et all. Chromogenic vs One Stage Measurement of residual factor VIII Activity in the Bethesda Assay: Metodological Comparison. Blood 1998(11):82b.
2. Alsohttp://www17966.63/usr/www/webpages/main.dir/copywrigt.htm
3. Altmman R, Almagro D, Restrepo Alberto, et all. Manual de hemostasia y trombosis. Grupo cooperativo latinoamericano de hemostasia y trombosis. 2ª ed. Buenos Aires 1991.
4. Ambríz Fernández R, Avilés Miranda A, et all. Utilidad de un perfil básico para la certeza diagnóstica en la hemofilia A. Gac Med Méx 1983;119:477-482.
5. Ayalew Tefferi. Primary hematology .Ed Humana Press. USA;2001
6. Bello González, A. Hematología básica. México: Ed Prado;2001:466-469.
7. Beutler, Lichtman, Coller, Kipps, Seligsohn. Williams Hematology. 6ª ed. USA: Ed McGraw Hill;2001:1409,1426-1428.
8. Biggs,R. Human Blood Coagulation Haemostasis and Trombosis. SA:Ed. Blackwell Scientific Publication;1972:591-614-617
9. Bigss R, Douglas A, MacFarlane R. Chistmas disease. A condition previously mistaken for haemophilia. BMJ 1952;2:1378
10. Bowie EJ y Fass DN: Factor VIII-related antigen (VIIR:Ag) in hemophilic patients and carriers. Lancet 1979;2:1049.
11. Briet E, Rosendaal FR, Inhibitors in hemophilia A; are some products safer? Semin Hematol. 1994;32:11-15
12. Colman RW, Hirsh J, Morder VJ y col. Hemostasis and thrombosis. 4ª ed. USA: Ed. Lippincot Williams & Wilkins;2001.
13. Chance PF, Dyer KA, Kurachi K, et all: Regional localization of the human factor IX gene by molecular hybridization: Hum Genet 1983; 65:207-208.
14. Davie EW. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. Thromb Haemost 1995,74:1-6.
15. Deitcher SR, Carman TL, Kottke-Marchant K. Simultaneous deep venous thrombosis and acquired factor VIII inhibitor. Clin Appl Thromb Hemos 2002 4:375-9.
16. Earl W. D Biochemical and Molecular aspects of the coagulation cascade. Thromb Haemost 1995;74:1-6.

17. Edward N van den Brink, Ellen AM Turenhout, Julian Davies et al. Human antibodies with specificity for the C2 domain of factor VIII are derived from VH1 germline genes. *Blood* 2000;95:558-563.
18. Ehrenforth S, Kreuz W, Sharrer I, Linde R, Funkn M, Güngör T. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitor in haemophiliae. *Lancet*,339: 594-598.
19. Federación de Hemofilia de la República Mexicana A.C. Tabasqueña de hemofilia. *Hemos*. 2 ed. México. 2004; 1-30.
20. Federación de Hemofilia de la República Mexicana A.C. Tabasqueña de hemofilia. *Hemos*. 6 ed. México. 2004; 1-32.
21. Gibert C, White II, Charles B. Factor VIII Gene and Hemophilia A. *Blood* 1989;73:1-12.
22. Giles AR, Verbruggen B, Rivard GE, Teitel J et al. A Detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII:C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. *Tromb Haemost* 1998;79:872-875.
23. Gitschier J, Kogan S et al. Detection and sequence of mutation in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature* 1985;315:427-430
24. Goldsmith JC. The challenges of inhibitors patient care. *Sem Hematol* 1993;30:1-2.
25. Goodeve A, Factor VIII gene rearrangements in patients with severe haemophilia A. *Lancet* 1994; 343:329-30
26. Harmening, Denise M. *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. 3^a ed. USA: Ed Davis Company; 1997:496-500,662-665.
27. Harper K, Pembrey M E, et al. A clinically useful DNA probe closely linked to haemophilia A. *Lancet* 2; 1984;6: 6-8.
28. Harper TA, Chauman K. A collaborative study on the suitability of commercial, assayed plasma for one-stage factor VIII assays. *Am J Clin Pathol* 1982;77:614-618.
29. Higuchi M, Kazazian HH Jr, Kash L, et al. Molecular characterization of severe haemophilia A suggests that about half the mutation are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene: *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7405-09
30. Huber P, Laurent M, Dalmon J. human b-fibrinogen gene expression. Upstream sequences involved in its tissue specific expression and its dexamethasone and interleukin-6 stimulation. *J.Biol Chem* 1990;265:5695
31. <http://www.kc.ac.uk/ip/petrqreen/intro.html>

32. <http://www.wfg.org>
33. Hoyer LW. Hemophilia A. *N Engl J Med* 1994;330:38-47
34. Ingram G C I. The history of haemophilia. *J Clin Path* 1976;29:469-479.
35. Ingram G I, O'Brien PF y North WR. The ICT/WFH study of the partial thromboplastin time in haemophilia. *Scand J Haematol.* 1980, 25:64
36. Inserto del Fabricante Dade Behring Marburg GMBH, para determinación de factores de coagulación VIII, IX, XI y XII. OTXW G13 E0534. Mayo 2000
37. Kasper C K, Aledort LM, Counts RB, Edson, JR, Fratantoni J, Green D, Hampton JW, Hilgartner MW, Lazerson J, Levine PH, McMillan CW, Pool JG, Shapiro SS, Shulman NR, Eys J v. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diathes Haemorrh* 1975;34:869-872.
38. Kenneth G M. *Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation.* *Thromb Haemost* 1999;82(2):165-174.
39. Kitchen S, McCraw A. Diagnóstico de hemofilia y otros trastornos de la coagulación. *Manual de laboratorio. Federación Mundial de la Hemofilia.* 2002; 5-105.
40. Kurachi A, Kurachi S. Regulatory mechanism of the factor IX gene. *Thromb Haemost.* 1995;73:333-339.
41. López Borrascá, A. Arocha Piñango C. Campos Guerra C y col. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología.* T III. España. Ed. Salamanca; 1992:291-297, 301-303,309-310.
42. Lossing S, Kasper C, Feinstein ID. Partial thromboplastin time. *Blood* 1977;49:193-197.
43. Lusher JM. Inhibitor antibodies to factor VIII and factor IX: Management. *Sem Thromb Hemost* 2000; 26 (2): 178-188.
44. Macartney A R., King E, Moore G, Alhaq A, Savidge G. Chromogenic vs one stage measurement of residual factor VIII activity in the Bethesda Assay: A methodological comparison. *Blood.* 98(11):82b Abstract # 3958.
45. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202:498-9
46. McKusick VA, *Mendelian Inheritance in Man. A catalog of human genes and genetic disorders.* Eleventh. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 1994. Vol II: 2384-93
47. Mannucci PM, Tuddenham E GD. The hemophilic progress and problems. *Sem Hematol* 1999;36:104-116.

48. Martínez Murillo C, Quintana González S, Ambríz Fernández R. Hemofilia. Ed. Prado;2000.p.1-17.
49. Martínez MC, Quintana GS y col. Hemofilia. Genética de la hemofilia y herencia. México D.F. Manual Moderno.2003:
50. Martínez Murillo, C. Quintana González, S. Manual de hemostasia y trombosis. Bases fisiológicas y clínicas de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas. México: Ed Prado; 1996:413-420.
51. Mervina Sahud MD. Laboratory Diagnosis of inhibitors: Sem Tromb Hemost. 2000;26;195-2003.
52. Mosesson MW, Fass DN, Lollar P, DiOrío JP, Parker CG et al. Structural model of porcine factor VIII and factor VIII molecules based on scanning transmission electron microscope (STEM) images and STEM mass analysis. J Clin Invest 1990;85:1983-1990.
53. Nathan, D. H. Orian S. Hematology of infancy and childhood. 5ª ed. USA: Ed. WB Saunders Company; 1998: vol. II: 1631-1632, 1640-1642.
54. Naylor J A, Green P M, Montandon A J. Detection of three novel mutation in two haemophilia A patient by rapid screening of whole essential region of factor VIII gene. Lancet 1991;337:635-639.
55. Nawroth PP, Stern MD. Endothelial cell procoagulant properties and the hot response. Semin Thromb and Hemost 1987;13:391-397
56. Nilsson IM, Kirkwood TBL, Barrowcliffe TW In vivo recovery of factor VIII. Comparison of one-stage and two stage assay methods. Thromb Haemost 1979;42:1280-1239.
57. Pateck AJ Jr, Taylor FHL. Hemophilia II. The abnormal coagulation of the blood and its relation to the blood platelets. J Clin Invest . Pieneman WC, Deutz-Terlouw PP, Rettsma PH. Screening for mutation in haemophilia A patients by multiplex PCR_SSCP, Southern blotting and RNA analysis: the detection of a genetic abnormality in the factor VIII gene in 30 out of 35 patients. Br J Haematology 1995;90;442-449.
58. Peñaloza Santillán JA, Arias y Arias J, Resano Pérez F. Dosificación del factor deficiente en los pacientes hemofílicos. Bol Med Hosp Inf 1975;32:51-59.
59. Petrova R, Chakarov S, Kremensky I. Genetic analysis of haemophilia A in Bulgaria. BMC Blood disorders 2004;4:1-7
60. Pool JD, Shannon AE. Production of high-potency concentrates of ant hemophilic globulin in a closed bag system. N Engl J Med 195;237:1443

61. Prowse CV. In vivo recovery of factor VIII following transfusion survey of recent data and publications to assess the influence of standards used for potency assignment. *Thromb Haemost* 1995;74:1191-1196.
62. Quintana G S, Martínez M C, Ambríz F R, Collazo J J. Empleo de productos de coagulación ¿Cuál elegir? *Rev. de hematología*. 2001;2:68-79.
63. Rappaport SI, Rao LVM. The tissue factor pathway: How it has become a “Prima Ballerina”. *Thromb Haemost* 1995;74:7-14.
64. Rossetti LR et. al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51(7):1154-1158.
65. Sagaón J, Castrejon O, Arceo Ernesto, Soto Rafael, Dorantes S, Vazquez J. La hemostasia en el niño prematuro. *Bol Med Hosp. Inf Méx*. 1960 (17);157-178.
66. Sanchez Cuenca JM, Carmona E, Villanueva MJ, Aznar JA. Immunological characterization of factor VIII inhibitors by a sensitive micro-ELISA method. *Thromb Res* 1990;57:897-908.
67. Santagostino E, Mannucci PM, Bianchi B A. Guideline on replacement therapy for haemophilia and inherited coagulation disorders in Italy. *Haemophilia* 2000;6:1-10.
68. Scandella D. New characteristics of any-factor VIII inhibitors antibody epitopes and unusual immune responses to factor VIII. *Sem Thromb Haem* 2002;28;291-296.
69. Scharrer I, Bray GL & Nautzling O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patient a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. *Haemophilia*. 1999;5:145-154.
70. Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, and et al. Haemophilia A: mutation type determiners risk of inhibitor formation. *Throm Haemost* 1995;74(6):1402-1406.
71. Schwartz R, Abildgaard C, Aledort L et al. Safety and efficacy of human recombinant DNA-derived factor VIII in treatment of hemophilia A. *N Engl J Med* 1990; 323:1800.
72. Teitel JM,. Safety of coagulation factor concentrates. *Haemophilia*. 1998;4: 393-401.
73. Trevor W B, Sanjeev Raut, Dawn Sands et al. Coagulation and Chromogenic Assay of Factor VIII Activity: General Aspects, Standardization, and recommendations. *Sem Thromb Haemost* 28:247-255.
74. Thompson Jean M. *Blood. Blood coagulation and haemostasis, a practical guide*. 2^a ed. Ed. Churchill Livingstone. USA: 1980;662-665.
75. Turner P.C, Mc Lennan A G, Bates A D. Análisis and uses of cloned DNA. Polymerase chain reaction. *Mol Biology*. Ed Springer. USA;2000:165-169

76. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Bunschoten EM. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995;73(2):247-251.
77. Ville A C. *Biología*. Ed. Interamericana. México;1982:578-582.
78. Vives JL, Aguilar JL. *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. 2ª Ed . España. Masso. 2002.
79. Widyga J, Lopaciuk S, Stefanska E, Juszynski A, Wozniak D, Strzelecki O, Szczepanik AB. Haemophilia in Poland. *Haemophilia*. 2006;12(1):52-57.
80. William J, Williams. Beutler Ernest. *Hematologia Tomo II*. 2ª ed. Ed.Salvat. España 1983.
81. Whyte G C, B Shoemaker Ch, Factor VIII Gene and Hemophilia A. *J of The Am Soc of Hemat* 1987; 73: 1-12.
82. Xiaoping DU, Beutler L, Ruan CH, Castaldi PA. Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood*. 1986, 720-724.