

PROTOCOLO PARA EL ESTUDIO DE LAS HEMOFILIAS A Y B EN MEDELLIN

F. CUELLAR, J. LOZANO, J.J. SARMIENTO, J. VILLANUEVA, L. ALVAREZ,
M.L. MURILLO, L.M. MAYA, M.C. MONDRAGON

Se informan los resultados de un protocolo para el estudio de las hemofilias A y B. Se cuantifica el nivel de FVIII:C y FIX:C por la prueba de una etapa y con base en ello se establece la severidad de la enfermedad en 26 pacientes hemofílicos previamente conocidos como tales con base en las pruebas de coagulación más sencillas. Se discute la utilidad de nuestro perfil biológico en el estudio de pacientes con historia sugestiva de estas coagulopatías hereditarias.

Las hemofilias representan el 95% de las coagulopatías hereditarias. De éstas, la hemofilia A o clásica, secundaria a la deficiencia del factor VIII de la coagulación, no sólo es la más antigua (1) sino también la más frecuentemente diagnosticada. La hemofilia B o enfermedad de Christmas, secundaria a la deficiencia del factor IX de la coagulación, fue reconocida como una entidad diferente en los años 1951-1952 (2, 3). Se estima que la frecuencia de la hemofilia puede ser de 25 por 100.000 hombres (4). De éstos, 80-85% tienen hemofilia A y los restantes hemofilia B (5).

En la literatura colombiana sólo se conocen informes aislados de casos hemofílicos (6-8) estudiados por la técnica de la generación de la tromboplastina, o bien mencionados en revisiones del tema con un enfoque histórico (9-11), humorístico (12) o terapéutico (11, 13).

El objetivo del presente trabajo es el de informar los resultados del protocolo para el diagnóstico y clasificación de las hemofilias

basados en el tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa) y la cuantificación del defecto por la prueba de una etapa, en 26 pacientes previamente conocidos como hemofílicos diagnosticados por pruebas de coagulación más sencillas. Se discute la utilidad de este perfil básico como una de las metodologías más apropiadas para la caracterización de nuestros casos hemofílicos.

MATERIAL Y METODOS

El protocolo para el estudio de las hemofilias se basa en el análisis y evaluación conjunta de tres puntos principales:

1. En la investigación del patrón de herencia del defecto del paciente (recesivo ligado al sexo en caso de hemofilia A o B).
2. En la evaluación clínica del paciente (secuelas artropáticas).
3. Desde el punto de vista biológico por: a) Detección de un alargamiento del TPTa tanto en las pruebas basales como en las diluciones con solución salina, al ser comparado con una mezcla de plasmas normales escogidos al azar, como se muestra en la Figura 1. Este alargamiento del TPTa del paciente debe corregirse al agregar plasma normal, lo cual hace la diferenciación frente a la presencia de un inhibidor o anticoagulante circulante, tipo anticoagulante lúpico, o frente a la presencia de un inhibidor específico del factor VIII (este último caso se descartó con las pruebas de incubación del plasma hemofílico con plasma normal que no revelaron la presencia de anticoagulante dependiente de temperatura) lo cual es característico encontrarlo en pacientes con inhibidores específicos del factor VIII. b) Cuantificación de la deficiencia del factor VIII o IX utilizando la prueba de una etapa, técnica universalmente conocida y aceptada

Drs. Francisco Cuéllar A., Jorge Lozano B., Juan José Sarmiento D. y Jaime Villanueva L.: Profesores de Hematología y Medicina Interna; Bacteriólogas: Leonor Alvarez P., Magda Lucía Murillo, Luz Marina Maya y María Cecilia Mondragón; Sección de Hematología, Departamento de Medicina Interna, Universidad de Antioquia, Hospital San Vicente de Paúl, Medellín.

para estos fines y con la cual es posible determinar el tipo de hemofilia y su severidad.

El presente estudio se efectuó en 26 pacientes clasificados desde hacía más de 10 años como hemofílicos con base en la historia personal y familiar característica de hemofilia, alargamiento del tiempo de coagulación y/o tiempo de recalcificación del plasma y en algunos de ellos cualificación del defecto con la prueba de la generación de tromboplastina (14). La edad de estos pacientes fue de 12 a 30 años. Como controles se escogieron 30 sujetos de sexo masculino que como nuestros pacientes tenían más de un mes sin tomar drogas capaces de alterar los valores del factor VIII o alguna otra prueba de coagulación (4, 15). Los estudios de coagulación se realizaron en muestras de sangre mezcladas con citrato de sodio al 3.8% en una proporción de 9:1. Las muestras se guardaron inmediatamente en hielo y posteriormente fueron centrifugadas a 3000 rpm durante veinte minutos con el objeto de obtener plasma pobre en plaquetas; las pruebas se realizaron en las cuatro horas siguientes.

Como prueba de selección de los casos se utilizó el tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa, basal) el cual se consideró como anormal si se prolongaba más de 8" sobre el control (mezcla de tres plasmas normales). Con el objeto de establecer si los resultados anormales se debían a deficiencia de factores o a la presencia de inhibidores circulantes, se realizaron correcciones con plasma normal en las proporciones (paciente/plasma normal) de 1:2, 1:4 y 1:8 (16). El estudio de los factores VIII y IX procoagulantes (abreviatura internacional VIII:C y FIX:C) se hicieron por la prueba de una etapa, basada en el TPTa y que define el nivel del FVIII o FIX:C por el grado de corrección que hace el plasma del paciente a un plasma deficiente en factor VIII:C o FIX:C al ser evaluado contra una curva de actividad standard previamente preparada con varias diluciones de una mezcla de plasmas normales (17). La determinación del inhibidor del factor VIII:C o FIX:C se hizo por la técnica descrita por Simmons. También se hizo dosificación de los factores coagulantes V, X, XI, XII.

RESULTADOS

Todos nuestros pacientes tuvieron el tiempo de sangría normal lo mismo que los otros estudios básicos de coagulación: recuento de plaquetas, retracción del coágulo, tiempo de protrombina, tiempo de trombina, fibrinógeno y lisis de euglobulinas.

El TPTa es una prueba de selección muy útil para el diagnóstico de las deficiencias de los factores VIII y IX (18) como se corrobora en las Tablas 1, 2 y 3. Los tiempos de coagulación en todos los casos de aparente hemofilia A o B resultaron prolongados con relación a los valores obtenidos en el mismo estudio en una mezcla de plasmas normales. El grado de anormalidad del TPTa es correlacionable con el porcentaje de actividad del factor deficiente y por lo tanto con la severidad clínica de la enfermedad (19). En los casos en que el TPTa está muy cerca al valor del testigo como es el caso del paciente LM (54/44) y VRT (47/36) efectuamos diluciones del plasma problema y testigo en solución salina y así pudimos desmascarar una deficiencia leve, ya que cabría la posibilidad de pasar a tal paciente como normal (Figura 1). También es importante hacer

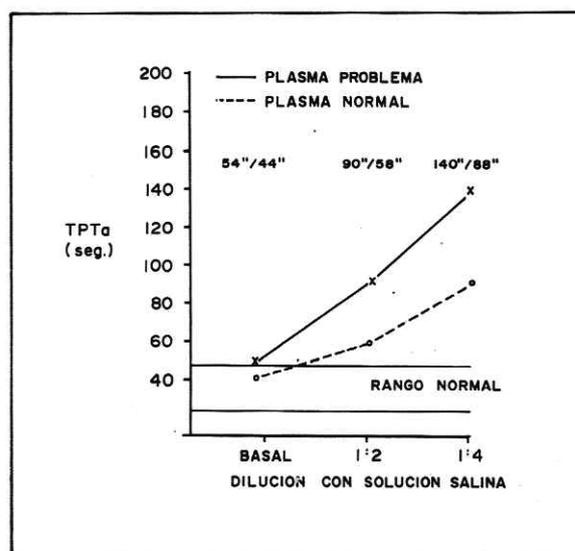


Figura 1. Los estudios con dilución en solución salina evidenciaron una deficiencia de factores de la vía intrínseca y/o común en el plasma problema al comparar su comportamiento con el del plasma normal.

notar que en todos los casos de alargamiento del TPTa, éste fue corregido con la adición de

proporciones variables de plasma normal y siempre estuvo en relación con la intensidad de la deficiencia (Figura 2) y la investigación de inhibidores endógenos para el FVIII:C o FIX:C, según el caso, fue negativa. Este patrón de resultados ha sido considerado en la literatura como característico de la deficiencia de factores de la coagulación plasmática hecho que en el presente estudio es reforzado por la ausencia de inhibidores de FVIII o IX (16, 20).

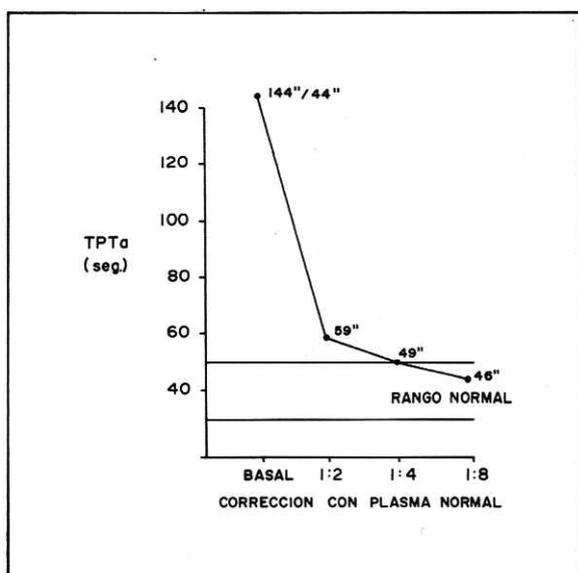


Figura 2. La adición de cantidades variables de plasma normal al caso problema (N.T.) corrige el defecto, indicando así deficiencia de uno o varios factores de la vía intrínseca y/o común y no inhibidores.

Determinación cuantitativa de los factores VIII y IX: el TPTa es sensible a anomalías en las vías intrínseca y/o común (no evalúa a los factores VII, XIII y al fosfolípido plaquetario (F3P) (17). Entonces el siguiente paso fue el de dosificar los factores VIII y IX en primer lugar, ya que son las coagulopatías hereditarias más frecuentes (4, 21) y para corroborar aún más los resultados obtenidos se efectuó posteriormente dosificación de los factores V, X, XI y XII, los cuales estuvieron en su mayoría dentro de límites normales. Además, como se observa en las tablas, se pudo clasificar la intensidad del padecimiento como leve si la actividad o los factores estaba

entre 5-35% (5 pacientes); moderada entre 1-5% (6 pacientes) y grave si era menos del 1% (15 pacientes) (19).

Respecto a los estudios de los otros factores de la vía intrínseca y común, se observó que cuatro pacientes con hemofilia A tuvieron el factor IX en el límite normal inferior bajo lo que también ocurrió en dos casos con el factor XII y un caso en que hubo una ligera disminución del factor X. Un paciente con hemofilia B tuvo concomitantemente un FVIII bajo.

DISCUSION

La evaluación por el laboratorio de las moléculas de factor VIII y factor IX se ha desarrollado en forma rápida en la última década. Como resultado de ello, el diagnóstico y tratamiento de pacientes con anomalías de estos factores ha mejorado considerablemente (4, 17, 21). En este artículo se describe una de las metodologías más comúnmente utilizadas para la evaluación de los factores VIII y IX, metodología que puede ser realizada en nuestro medio. Dado que las hemofilias A y B son indistinguibles tanto desde el punto de vista clínico y genético como en la capacidad de alterar el TPTa (3, 4, 22, 28), se hace necesario con fines básicamente terapéuticos realizar la cuantificación de los factores VIII y IX y con base en su nivel establecer la severidad clínica del defecto.

En nuestro estudio documentamos 26 pacientes hemofílicos adultos, 24 del tipo A y 2 del B. Los dos pacientes con hemofilia B y trece de los pacientes con hemofilia A tuvieron una deficiencia severa (57.7%); 6 tuvieron deficiencia moderada (23%) y en 5 ésta fue leve (19.3%). Esta alta incidencia de deficiencias severas sugiere muy posiblemente una baja detección de casos leves (28). En nuestro protocolo de estudio este problema se ha enfrentado aumentando la sensibilidad de la prueba de selección (TPTa) utilizando diluciones con solución salina normal con lo cual se busca amplificar el defecto y hacerlo más evidente por el laboratorio en forma rutinaria (Figura 1), evitando de esta manera gastos innecesarios en pacientes con estudios normales incluyendo las diluciones (16, 20). La severidad clínica se

correlacionó con el valor promedio del TPTa (Tablas 1, 2 y 3).

Tabla 1. Hemofilia grave FVIII o IX <1%

Paciente	TPTa ¹ seg.	VIII:C ² %	IX %	V %	X %	XI %	XII %	Inhibidor FVIII:C o IX
N.T.	144/42	< 1	84	-	-	90	60	Negativo
A.V.	146/44	< 1	100	79	91	84	68	"
O.V.	142/44	< 1	94	70	100	68	53	"
J.M.V.	99/44	< 1	82	79	91	74	31	"
H.J.	94/32	< 1	+ 100	88	76	+ 100	+ 100	"
W.M.	120/36	< 1	53	57	69	80	100	"
J.I.M.	120/36	< 1	66	60	52	80	100	"
C.M.S.	100/36	< 1	53	66	58	80	+ 100	"
J.P.M.	106/40	< 1	56	100	76	66	90	"
G.L.A.	98/40	< 1	56	92	84	82	100	"
A.V.M.	95/40	< 1	56	72	68	60	74	"
J.J.P.	137/34	< 1	66	82	86	74	+ 100	"
J.J.S.	155/44	< 1	82	70	50	68	+ 100	"
R.H.S.*	132/36	62	< 1	58	55	76	100	"
E.L.A.*	98/40	40	< 1	92	68	60	74	"

* Hemofilia B.

1. TPTa valor promedio: 119" ± 2 1" /40" ± 8 pacientes/controles (24).
2. Valor normal para todos los factores dosificados: entre 50 y + 100% de actividad.

Tabla 2. Hemofilia moderada: FVIII entre 1-5%

Paciente	TPTa	VIII:C seg.	IX %	V %	L %	XI %	XII %	Inhibidor FVIII:C
R.G.	81/40	1.8	100	74	86	82	62	Negativo
D.B.	76/32	2.6	+ 100	74	68	+ 100	+ 100	
J.I.B.	75/32	2.6	+ 100	74	68	+ 100	+ 100	
J.I.G.	118/40	3.7	74	70	64	82	62	
C.M.G.	72/40	4.5	94	78	76	76	74	
O.E.	68/42	5.0	100			90	60	

1. TPTa: promedio 82" ± 16"/40" ± 8" (24)
2. Valor normal para todos los factores dosificados: entre 50 y 100% de actividad.

Aunque se hace completamente necesario documentar ambas fracciones del complejo molecular del factor VIII para hacer el diagnóstico diferencial entre hemofilia A y enfermedad de Von Willebrand, basamos el diagnóstico de la primera entidad en la evaluación conjunta de los aspectos genéticos, clínicos y de laboratorio, lo cual hace muy improbable que algunos de nuestros pacientes presente la enfermedad de Von Willebrand (24, 25, 28). La comprobación de la hemofilia B es por el contrario mucho más sencilla y se basa específicamente en la documentación de la deficiencia del factor IX (5, 17).

Tabla 3. Hemofilia leve: FVIII entre 5-35%

Paciente	TPTa ¹ seg.	VIII:C ² %	IX %	V %	X %	XI %	XII %	Inhibidor FVIII:C
R.B.	60/32	8	98	74	55	+ 100	86	Negativo
J.H.S.	90/42	22	62	-	100	72	-	"
J.M.C.	83/42	27	50	71	+ 100	74	-	"
L.M.	54/44	30	79	74	100	70	51	"
V.R.T.	47/36	34	66	60	43	80	100	"

1. TPTa promedio: 67" ± 17"/40" ± 8" (24)
2. Valor normal para todos los factores dosificados: entre 50 y + 100% de actividad.

Por otra parte encontramos que en algunos casos de hemofilia A había asociada otra deficiencia de factores de la coagulación, aspecto éste que ya ha sido reportado en la literatura (26, 27), incluyendo la asociación de deficiencias de factores VIII y IX en un mismo paciente, tema que será analizado en próximas publicaciones. Es importante por último enfatizar que en nuestro medio existen muy pocos trabajos que hayan analizado las hemofilias haciendo énfasis en su forma de caracterización y diagnóstico como fue el objetivo de este trabajo.

SUMMARY

The diagnosis of hemophilia can be suspected on clinical grounds and the diagnosis established with simple laboratory tests. The severity of the disease requires quantification of the appropriate coagulation factors.

The usefulness of a simple working procedure for the diagnosis of classic hemophilia and factor IX deficiency is discussed. By using the one step test, the levels of factor VIII:C and factor IX:C were measured; these results were the basis to establish the severity of the disease in 26 patients known to have the deficiency.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-ROSNER F. Hemophilia in the Talmud and Rabbinic Writings. Ann Intern Med 1969; 70: 833-837.
- 2.-BIGGS R, MACFARLANE RG. The Reaction of Hemophilic plasma to thromboplastin. J Clin Pathol 1951; 4: 445-459.
- 3.-BIGGS R, DOUGLAS AS, MACFARLANE RG, et al. Christmas Disease: A condition previously mistaken for hemophilia. Br Med J 1952;2: 1378-1382.
- 4.-MAMMEN E. Factor VIII abnormalities. Semin Thromb Hemost 1983; 9: 22-27.
- 5.-MAMMEN E. Factor IX abnormalities. Semin Thromb Hemost 1983; 9: 28-30.
- 6.-SOLORZANO R, BOTERO D. Notas sobre el mecanis-

- mo de la hemostasia con aplicación de nuevas técnicas de laboratorio en dos pacientes hemofílicos y trombocitopénicos. *Antioquia Médica* 1955;5: 219-247.
- 7.- ECHAVARRIA A, Enfermedad de Christmas, deficiencia del factor PTC, Deutero hemofilia. Presentación de cinco casos. *Anotaciones Pediátricas* 1956;2 (10): 93-106.
 - 8.- PALACIO S. Estudio de dos familias hemofílicas. *Anotaciones Pediátricas* 1960; 4 (26): 67-75.
 - 9.- DOBAURY AY. Hemofilia Real. Hospital de Colombia 1967; 10: 148-149.
 - 10.- VAN CREVELD S. La clínica Holandesa de hemofílicos. Hospital de Colombia 1967; 10: 149-150.
 - 11.- HYNES H. Desarrollo del concepto actual de la Hemofilia. *Tribuna Médica* 1970; 36 (423): 174-183.
 - 12.- BERNAL MJ. La hemofilia y pseudohemofilia en el quirófano. *Orientaciones Pediátricas* 1959; 8: 545-547.
 - 13.- OSPINA L. Tratamiento de la Hemofilia Clásica con Crioprecipitado y presentación de siete casos. *Tribuna Médica* 1970; 39 (458): 95-100.
 - 14.- VERMYLEN J, VERSTRAETE M. Les Hemophilies. In *Hémostase*. De Nederlandse Bibliotheek der Geneeskunde (Edt) 1981; pág. 99.
 - 15.- GRALNICK HR, RICKM. Danazol increases Factor VIII and Factor IX in classic hemophilia and Christmas disease. *N Engl J Med* 1983; 308: 1393-1395.
 - 16.- REYNA MP. Pruebas de laboratorio accesibles en el estudio de las enfermedades hemorrágicas. En: *progresos recientes en Hematología*. PIZZUTO J, HARKER L, MARDER V (Edit) IMSS. México, Instituto Mexicano del Seguro Social 1978; 110.
 - 17.- BAGLINI R. Laboratory evaluation of factor VIII and factor IX. *Am J Med Tech* 1983; 49: 857-862.
 - 18.- O'BRIEN PF, NORTH WRS, INGRAM GIC. The diagnosis of mild Haemophilia by the partial thromboplastin Time test. WFH/ICTH Study of the Manchester method. *Thromb Haemost* 1981; 45 (2): 162-168.
 - 19.- RIZZA CR. Clinical management of haemophilia. *Br Med Bull* 1977; 33 (3): 225-230.
 - 20.- AMBRIZ R, AVILES MIRANDA A, PIZZUTO J. Utilidad de un perfil básico de estudio para la certeza diagnóstica en la hemofilia A. *Gac Med Méx* 1983. 119: 477-482.
 - 21.- HOYER LW. The factor VIII complex: structure and function. *Blood* 1981; 58: 1-13.
 - 22.- CIAVARELLA D, COUNTS R. Clinical aspects of Hemophilia and von Willebrand's disease. *Am J Med Tech* 1983; 49: 850-854.
 - 23.- LARSSON SA. Hemophilia in Sweden. *Acta Med Scand* 1984. (Suppl 684) 9-19.
 - 24.- DAHL CH, Mc ROYAN D, LIU P. Diagnostic Problems of von Willebrand's Disease in a General Hospital Laboratory. *Ann Clin Lab Sci* 1983; 13: 371-378.
 - 25.- ZIMMERNAN TS, RUGGERE ZM. Von Willebrand's Disease. *Clin Haematol* 1983; 12 (1): 175-199.
 - 26.- SOFF GA, LEVIN J, BELL WR. Familiar multiple coagulation factor deficiencies I-II. *Semin Thromb Hemost* 1981; 7: 112-169.
 - 27.- BARTHEL M. Additional Factor XII deficiency in hemophilia A and in von Willebrand's Syndrome. *Klin Wochenschr* 1982;60: 303-309.