

## HEMOFILIA. REVISION

**María Díez-Ewald\* y Angel Urdaneta\*\***

*\* Instituto de Investigaciones Clínicas. Apartado 1151. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo 4001-A, Venezuela. \*\*Cátedra de Propedéutica II. Escuela de Medicina. Universidad del Zulia. Apartado Postal 526. Maracaibo, Venezuela.*

### HEMOFILIA

Hemofilia es una enfermedad hemorrágica hereditaria debida a la deficiencia en la actividad de dos factores distintos de la coagulación: El factor VIII o globulina antihemofílica (GAH) o factor antihemofílico (FAH) y el factor IX o factor Christmas o componente tromboplastínico del plasma (CTP). Es una enfermedad ligada al sexo por lo que ocurre casi exclusivamente en varones. Anteriormente se incluyó en el término hemofilia a la deficiencia hereditaria del factor XI o antecedente tromboplastínico del plasma (ATC), pero como este defecto no está ligado al sexo y la enfermedad es menos común y severa, se ha dejado el término solo para las deficiencias de factores VIII y IX.

### HISTORIA

El conocimiento de la hemofilia data de miles de años: Una de las primeras menciones de lo que pudiera haber sido hemofilia y su herencia, se encuentra en el Talmud babilónico, escrito probablemente en el siglo III A.C.: "Se dijo de las cuatro hermanas de Séfora: La primera circuncidó a su hijo y éste murió; la segunda también circuncidó al suyo y el niño murió; la tercera también y el murió y la cuarta consultó con Rabban benGamaliel, quien le dijo: abstente de circuncidar a tus hijos, pues hay

familias que tienen la sangre suelta, mientras que en otras la sangre se coagula" (34). Se supone que las tres hermanas cuyos hijos murieron eran portadoras de hemofilia y el rabino le aconsejó a la cuarta que no circuncidara a su hijo pues ella también podría haberle transmitido la enfermedad que causaba hemorragia.

Después de lo anterior, la mayoría de los reportes antiguos son a partir del siglo XVIII, en los Estados Unidos (82-84, 103). La familia más importante afectada por esta enfermedad fue la de la reina Victoria de Inglaterra (86), quien en 1853 tuvo su octavo hijo, Leopoldo, quien tenía una rara tendencia a sangrar por las heridas más triviales. Después se supo que dos hijas de la reina eran portadoras, pero no se sabe si la deficiencia en esta familia era de factor VIII o IX.

Incidencia.— Ha habido varios intentos para estimar la incidencia mundial de Hemofilia. Los estudios más tempranos son los de los daneses con Andreassen (3) quien estimó 134 casos por cada millón de nacimientos de varones. Más recientemente se han separado los datos para hemofilia A y B y Stevenson y Kerr (142) en 1967 concluyeron que la incidencia de hemofilia A variaba de 100 a 120 por millón de nacimientos mientras que la hemofilia B se encontraba entre 20 y 30 por millón.

De acuerdo a los hallazgos de Ratnoff (119) en Cleveland, Ohio, ciudad que para la fecha contaba con un millón de habitantes masculinos, la frecuencia de hemofilia A es de 100 casos por millón de nacimientos masculinos. Aparentemente el 75 a 80% de los hemofílicos corresponden a hemofilia A. No existen buenos estimados en otras áreas y los datos raciales son también pobres. En Venezuela tampoco existen datos precisos sobre la frecuencia de esta enfermedad.

### **Factor VIII, estructura y función.**

El factor VIII juega un papel muy importante en la coagulación y hemostasis y se acepta que el factor VIII plasmático es un complejo de dos componentes que tienen distintas funciones, propiedades bioquímicas e inmunológicas y control genético (58). Un componente del complejo, tiene la actividad precoagulante y es designado como VIII:C; este componente puede ser inactivado por anticuerpos humanos y medido por inmunoanálisis. El otro componente que comprende la mayor parte de la proteína, interacciona con las plaquetas promoviendo la hemostasis primaria y puede ser precipitado mediante técnicas de inmunoanálisis utilizando anticuerpos heterólogos; se designa como proteína asociada al factor VIII o VIII:R o factor von Willebrand, ya que se encuentra reducido cuantitativamente o es funcionalmente anormal en la enfermedad de von Willebrand (61).

Se ha sugerido que los dos componentes del factor VIII son parte de una misma macromolécula, sin embargo hay hallazgos que demuestran diferencias importantes entre las dos proteínas:

1) La proteína procoagulante del factor VIII y la proteína asociada, son controladas por diferentes genes. La deficiencia aislada de VIII:C es característica de la hemofilia A, enfermedad que es transmitida por herencia del cromosoma X, en cambio en la enfermedad de von Willebrand se encuentra disminuido VIII:R o es anormal (VIII:C también puede estar disminuido) y la herencia es a través de un gen autosómico.

2) Las dos proteínas se pueden separar por cromatografía o centrifugación (104, 122, 157, 158).

3) La concentración plasmática de ambas proteínas, puede variar independientemente una de otra bajo ciertas condiciones (58).

4) Las dos proteínas tienen diferentes determinantes antigénicos. El VIII:C es inactivado por anticuerpos humanos de pacientes hemofílicos con múltiples transfusiones o de pacientes con inhibidores espontáneos. En estos pacientes el cofactor ristocetina (VIII:RC) y el tiempo de sangría son normales (56, 72).

5) Las propiedades biológicas de las dos proteínas también son independientes: La proteína procoagulante (VIII:C) retiene toda su actividad en ausencia virtual de la proteína asociada (VIII:R), y el factor ristocetina (VIII:RC) puede estar normal en ausencia de proteína procoagulante (163).

#### **Proteína procoagulante del factor VIII: Factor antihemofílico.— Propiedades bioquímicas.**

La proteína procoagulante tiene un peso molecular aproximado de 285.000 (61). Esta proteína (VIII:C) fue separada de la proteína asociada (VIII:R) mediante técnica de inmuoabsorción (150).

La actividad coagulante de VIII no es inactivada cuando todo el complejo VIII es incubado con agentes reductores como el 2-mercaptoetanol 0,05M, en cambio en estas condiciones se pierde rápidamente la actividad del cofactor ristocetina. Por otro lado, los inhibidores de los grupos tiol (ácido p-cloromercurobenzoico), inactivan VIII:C (150). La mayor estabilidad de VIII:C está entre pH 6,9 y 7,2 y a pH por debajo de 6 o por encima de 8 hay pérdida marcada de la actividad coagulante. También es importante la concentración plasmática de cationes, especialmente el

calcio, de ahí las bajas concentraciones de VIII:C en los plasmas tratados con EDTA o resinas de intercambio iónico (156). Aunque no se ha purificado suficiente cantidad de VIII humano o bovino, hay evidencias de que tiene residuos de carbohidratos (150, 151). Por estas mismas dificultades para purificarlo, su cuantificación plasmática se hace en referencia al "pool" de plasma normal estandarizado y almacenado, o sea que las medidas de VIII:C y VIII:CAG son arbitrarias y expresan una relación con el pool normal. También se puede expresar como la cantidad de proteína que corresponde a un nivel plasmático normal de 1U/ml, este valor es de aproximadamente 50 ng/U (calculado por la proporción de proteína coagulante que contiene el complejo de VIII entero (26, 99, 147).

Propiedades inmunológicas.— Los anticuerpos humanos anti VIII:C obtenidos de sujetos multitransfundidos o que desarrollan autoanticuerpos, no forman inmunoprecipitados detectables con VIII:C o con el complejo de factor VIII; sin embargo se puede utilizar el suero para detectar determinantes antigénicos para las pruebas de neutralización de anticuerpos (55) y para ensayos inmunoradiométricos de VIII:CAG (72, 94, 108). Para los inmunoensayos se utilizan anti VIII:C humano purificado y marcado. Los anticuerpos se obtienen de sueros con alto título (1000 U Bethesda/ml). Parece no haber diferencia entre los anticuerpos de hemofílicos y los anticuerpos espontáneos. La sensibilidad del ensayo es de 0,01-0,03 U/ml y el coeficiente de variación es de aproximadamente del 10% (72, 94, 108).

En general hay muy buena correlación entre VIII:C y VIII:CAG. Los determinantes VIII:CAG son sin embargo más estables que la actividad VIII:C, por ejemplo en el suero se puede encontrar 60-80% de la proteína que hay en el plasma y sin embargo no hay actividad residual (61, 94).

Síntesis.— El lugar de síntesis de VIII:C aún no se conoce. Se cree que es liberado por el hígado en algunas condiciones y aunque hay fuerte sugerencia de que el hígado juega un papel importante en su producción, el hecho de que esté normal o elevado en enfermedad hepática severa, apoya el concepto de que haya fuentes extrahepáticas (21, 105, 137, 155).

Función.— El papel de VIII:C en la coagulación es el de acelerar la reacción en la actividad enzimática del factor X por el factor IXa, en presencia de fosfolípido y  $Ca^{++}$  pero es incapaz de activar el factor X en ausencia del factor IX. Se ha demostrado que la trombina activa a VIII:C por una modificación proteolítica (61, 15), la incubación con trombina causa ruptura de cada una de las cadenas proteínicas en el VIII:C bovino (151) y el VIII:C activado por trombina tiene propiedades de filtración en gel y de ultracentrifugación como una proteína de 116.000 dalton,

mientras que el valor calculado para la molécula no activa es de 285.000 dalton (61). La exposición prolongada a la trombina o altas concentraciones de esta enzima, inactivan VIII:C.

El factor IX activa y degrada al factor VIII:C en una reacción cualitativamente similar a la de la trombina, dependiendo la extensión de la reacción, de las concentraciones relativas del factor IX activado y del factor VIII, pero esto afecta solo a VIII:C (123).

### **Proteína asociada del factor VIII: Factor von Willebrand.— Propiedades bioquímicas.**

La proteína asociada al factor VIII es una población heterogénea de multímeros que tienen un peso molecular entre 850.000 y  $12 \times 10^6$ . Esta propiedad se hizo aparente cuando se desarrolló la técnica de inmunoelectroforesis cruzada (165). Los polímeros más pequeños detectados en plasma normal humano tienen un peso molecular aparente de  $0,85 \times 10^5$  y parecen ser un tetrámero con uniones disulfídicas (59).

El factor von Willebrand o VIII:R es una glicoproteína que contiene 5 a 6% de carbohidratos hexosa, hexosamina y ácido siálico (81, 134). No tiene grupos sulfhidrilos libres, y las concentraciones de metionina, tirosina y triftofano son relativamente bajas (74, 81, 134). La cantidad de VIII:R del plasma se ha calculado de la actividad específica del factor VIII altamente purificado (74, 81, 99, 134) y por radioinmunoanálisis (26). Se estima que el valor de VIII:R en el plasma es de 5 a  $10 \mu\text{g/ml}$ , o sea aproximadamente 10 veces más que la concentración de VIII:C.

Propiedades inmunológicas.— Cuando se inyecta a conejos factor VIII humano purificado, estos animales producen anticuerpos anti factor VIII humano, inmunoprecipitantes (161). Los sueros obtenidos forman inmunoprecipitados con VIII:R e incluso inactivan al cofactor ristocetina y cualquier otra actividad que mida la interacción VIII:R-plaquetas, como por ejemplo la adhesividad plaquetaria, con aumento del tiempo de sangría (6, 22, 91). Si el factor VIII está bien purificado los antisueros son monoespecíficos, pero generalmente es necesario adsorberlos con fracciones de plasma deficientes en VIII:R. Para cuantificar y detectar este antígeno se utilizan la inmunoelectroforesis simple o cruzada y el radioinmunoanálisis, obteniéndose con todos estos métodos resultados similares (22, 55, 58, 159). Puede ser que algunos sueros tengan pequeñas cantidades de VIII:CAg, pero estas no afectan los resultados y en plasmas normales hay una buena correlación entre VIII:C y VIII:RAg que se mantiene en condiciones patológicas y algunas fisiológicas donde aumentan en forma paralela.

Actividad del factor von Willebrand.— La proteína asociada al factor VIII tiene un papel muy importante en la función plaquetaria normal. En la enfermedad de von Willebrand debido a la deficiencia de VIII:R, el tiempo de sangría se encuentra prolongado y el defecto se corrige con crioprecipitado que es rico en esta proteína, por ello VIII:R recibe también el nombre de factor von Willebrand. En esta enfermedad, generalmente también está afectada la aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina, lo mismo que la retención de plaquetas cuando se pasan por una columna que contiene perlas de vidrio. Ambos defectos se corrigen si a la sangre del paciente se le añade factor VIII normal. A esta propiedad se le ha denominado cofactor ristocetina (VIII:RC) y se puede cuantificar usando plaquetas normales lavadas, frescas o fijadas con formaldehído, y añadiendo diferentes diluciones de plasma normal para que sirva de patrón y luego se hace lo mismo con el plasma del paciente (159). Generalmente hay buena correlación entre el cofactor ristocetina y el tiempo de sangría, sin embargo algunos pacientes tienen tiempo de sangría prolongado a pesar de valores normales de cofactor ristocetina, e incluso reactividad aumentada (35, 129, 130).

Es importante saber que la medida de VIII:RAg y del cofactor ristocetina nos informa de dos propiedades diferentes de la molécula VIII:R con determinantes antigénicos específicos. El cofactor ristocetina solo identifica la proteína VIII:R que puede interaccionar con las plaquetas, y esta capacidad solo la tienen los polímeros más grandes (37). Aparentemente la ristocetina se une a la membrana plaquetaria (25) y hace disponibles los receptores que aparentemente existen en la membrana (64, 65, 93) para que se una VIII:R, y al mismo tiempo fortifica esta unión.

Se cree que en la interacción VIII:R-plaquetas, juegan un papel importante los carbohidratos. Algunos trabajos demuestran que la remoción de ácido siálico disminuye la agregación plaquetaria con ristocetina (139), en cambio otros autores no encuentran diferencia (50), pero si hallaron que la oxidación de la penúltima galactosa modificaba la agregación con ristocetina y reducía la función VIII:RC. Ninguna de estas alteraciones modificaba VIII:C.

Síntesis.— Por estudios de inmunofluorescencia se ha identificado el VIII:RAg en las células endoteliales de las arterias, arteriolas, capilares y venas de todo el cuerpo (20, 57). También se ha encontrado en megacariocitos y plaquetas. Tanto VIII:RAg como VIII:RC se han encontrado en el medio donde se cultivan células endoteliales del cordón umbilical (63, 124) y se ha demostrado síntesis de VIII:R en cultivos de tejido endotelial (63). Recientemente mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica se ha podido localizar también en el subendotelio y en las capas

de membrana elástica más cercanas a la luz de los vasos de humanos adultos (1). En estos experimentos además se evidenció que el antígeno asociado a factor VIII, está asociado a fibrillas de colágeno dentro de la pared del vaso, por lo que sugieren que el factor VIII:R endotelial juega un papel en la adhesión de las plaquetas a los componentes subendoteliales después de la injuria vascular.

Interacción de VIII:C y VIII:R en el complejo del factor VIII.— Aunque VIII:C y VIII:R tienen propiedades muy distintas, aparentemente interactúan entre sí a través de uniones no covalentes para formar un complejo. Esto se apoya en el hecho de que las concentraciones de las dos proteínas son similares en el plasma normal y en el de la mayoría de las enfermedades no hematológicas (57, 58, 76, 124, 161).

### **Distribución y recambio del Factor VIII.**

La concentración plasmática del factor VIII es de 1 a 8  $\mu\text{g/ml}$  (26, 41), pero no se conoce muy bien su distribución in vivo. Su rápida desaparición después de transfundido sugiere la existencia de un "pool" extravascular grande, sin embargo no existen evidencias que lo demuestren (2, 116). Su vida media biológica es de 10 a 14 horas y cuando se infunde a un hemofílico, la curva de desaparición del plasma es bifásica con una fase inicial de vida media de 3 a 6 horas y una fase lenta cuya vida media es de 12 horas (1, 107, 139).

### **Factor VIII y hemofilia A.**

Las bajas concentraciones de factor VIII en el plasma han dificultado mucho su estudio bioquímico y por lo tanto el poder establecer si la Hemofilia A es debida a una producción disminuída de factor VIII o es el resultado de la síntesis de una proteína defectuosa. Mediante técnicas de neutralización de anticuerpos autólogos se ha visto que en el 10% de los hemofílicos, su plasma da una reacción cruzada con estos anticuerpos (32, 43, 55), estos resultados permiten clasificar los plasmas como "material de reacción cruzada positivo" (CRM<sup>+</sup>) y aunque en ellos los niveles de VIII:C sean muy bajos, los niveles de VIII:R son normales (55). Cuando se utilizaron anticuerpos heterólogos de conejo, se halló que todos los plasmas hemofílicos formaban precipitinas (161). Esto llevó al concepto de que todos los plasmas hemofílicos CRM<sup>+</sup> y CRM<sup>-</sup> tienen un material de reacción cruzada no funcional. Hoy en día con las técnicas de inmunoanálisis (hemaglutinación, inmunoprecipitación y análisis inmunoradiométricos) usando antiseros heterólogos se sabe que lo que se detecta es el VIII:R Ag y no antígeno relacionado con la función de VIII:C (57, 72, 143). En la mayoría de los plasmas con Hemofilia A severa, no hay niveles detectables de VIII:C Ag (72, 94, 108).

En resumen la mayoría de los pacientes con Hemofilia A severa tienen VIII:C deficiente, con síntesis y función normal de VIII:R. Algunos pacientes sintetizan moléculas de VIII:C no funcionales, estos pacientes tienen una mutación en el cromosoma X que modifica la estructura de VIII:C (60).

### **Factor IX. Estructura y Función.**

El factor IX es una glicoproteína compuesta de una sola cadena polipeptídica con varios sitios de fijación de  $Ca^{++}$ . Su peso molecular se ha estimado en 62.000 (127), aunque se ha reportado una variante con un peso molecular más elevado (9). En realidad el peso molecular varía de acuerdo al sistema tampón utilizado, cuando se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y buffer tris, el peso tiende a ser mayor que cuando se realiza la técnica con buffer fosfato (10). Aparentemente el factor IX es sintetizado por un proceso como el de síntesis de protrombina, o sea, que primero se forma una cadena polipeptídica con incorporación de disulfuros y carbohidratos; esta es la molécula "incompleta" no funcional, después por acción de la vitamina K se produce la gammacarboxilación de residuos de ácido glutámico, este último es el determinante crítico para los sitios de fijación de  $Ca^{++}$  a la molécula del factor (44). En estudios realizados con factor IX bovino se han reconocido 4 regiones: la región de fijación de  $Ca^{++}$  (región GLA), la región conectadora (¿unión o sustrato?), la región peptídica de activación y la región catalítica (44).

El factor IX puede ser activado por el factor XIa y por el complejo de factor VII y factor tisular (102).

La mayoría de los estudios muestran que el factor IX activado, activa a su vez el factor X, teniendo como cofactor al factor VIII con  $Ca^{++}$  y fosfolípido (29, 62, 154), pero recientemente se ha demostrado que también activa al factor VIII (70) aunque no a la misma velocidad que lo hace la trombina (123). Tanto en plasma como usando factores de coagulación parcialmente purificados, se encontró que la activación del factor VIII era independiente de los fosfolípidos añadidos y en algunos casos también de la presencia de calcio (132), sin embargo, se ha descartado la posibilidad de que la activación sea el resultado de la acción de la trombina o del factor Xa que estén contaminando el sistema experimental (115).

Propiedades inmunológicas.— Mediante pruebas de neutralización de anticuerpos homólogos, provenientes de pacientes que han sido politransfundidos, con títulos altos de más de 30 U Bethesda, se pudo demostrar de una manera cualitativa la existencia de antígeno asociado a factor IX en el plasma de personas normales y un número reducido de pacientes con

hemofilia B (126). Posteriormente por inmunoelectroforesis (100) y radioinmunoensayo (146) utilizando anticuerpos específicos heterólogos producidos en conejos, se ha observado una importante correlación entre la actividad coagulante y el antígeno asociado a factor IX tanto en personas normales como en la mayoría de los pacientes hemofílicos, aunque en estos últimos los niveles son mucho más reducidos (90).

### **Distribución y recambio del factor IX.**

Aproximadamente el 60% del factor IX es extravascular. Cuando se transfunde este factor a una persona con deficiencia congénita, la curva de desaparición del plasma es bifásica y la media vida biológica es de 24 horas (55, 87). Un adulto sano produce de 3 a 5 mg diarios de factor IX cuando mantiene un nivel plasmático normal. La concentración plasmática normal es de 3 a 5  $\mu\text{g/ml}$  (35, 44, 144).

### **Factor IX y Hemofilia B.**

En la Hemofilia B se cree que la deficiencia de factor IX es debida a una proteína funcionalmente anormal pero inmunológicamente intacta. Por estudios de neutralización de inhibidores con anticuerpos homólogos a factor IX, se ha encontrado evidencia de proteína del factor IX anormal (42, 96, 126). Sin embargo, el inhibidor humano puede tener especificidad antigénica limitada y no detectar un antígeno del factor IX alterado. Esto se ha observado en hemofilia A donde solo 10 a 15% de los pacientes tienen material de reacción cruzada cuando se prueba con un inhibidor homólogo (32, 42, 54) y sin embargo el 100% tiene cantidades normales de antígeno VIII cuando se detectan con antisueros heterólogos precipitantes (56, 161).

Existen dos variantes de Hemofilia B: B<sup>+</sup> y B<sup>-</sup> (31), en la primera se puede detectar antígeno con un antisuero precipitante contra el factor IX bovino y en la segunda no. Se ha demostrado un variado rango de niveles de antígeno en Hemofilia B (100, 148). Con métodos inmunorradio-métricos (IRMA) se ha encontrado la existencia de heterogenicidad, o sea, aquellos pacientes que tiene cantidad normal y los que tienen cantidades bajas de factor IX inmunorreactivo (160), además se ha visto baja correlación entre el nivel procoagulante y el antigénico, al contrario de lo que sucede en personas normales. Parekh y colaboradores (106), confirmaron lo anterior en 117 pacientes con Hemofilia B, en quienes mediante inmunoelectroforesis y neutralización de anticuerpos con antisueros homólogos no precipitantes encontraron las siguientes variantes: deficiencia severa de actividad coagulante y antígeno indetectable donde se sospecha completa supresión de síntesis de factor IX; deficiencia severa o moderada de pro-

riedad coagulante con niveles normales o elevados de antígeno (Hemofilia B<sup>+</sup>) y entre estos un subgrupo que tenía alargado el trombotest (Hemofilia B<sup>m</sup>), en este grupo parece haber una síntesis normal o aumentada de la molécula de factor IX pero muy defectuosa en el sitio o sitios responsables de la actividad coagulante; en otro grupo encontraron antígeno disminuído y actividad coagulante variable entre menos que 0,01 y 0,21 U/ml sugiriendo capacidad de síntesis disminuída acompañada de defecto variable en el sitio coagulante.

## GENETICA DE HEMOFILIA

La hemofilia constituye el ejemplo clásico de enfermedad ligada al sexo. El gen defectuoso es un gen recesivo localizado en el cromosoma X. Como en los hombres no hay un alelo normal, en ellos se manifiesta clínicamente la enfermedad. Debido a que el cromosoma Y es normal, los varones hijos de hemofílico son todos normales, sin embargo todas las hembras serán portadoras de la enfermedad ya que todas tienen un cromosoma X defectuoso, pero en su mayoría no tendrán manifestaciones clínicas por poseer un alelo normal. La madre portadora transmitirá la enfermedad a la mitad de los hijos varones y la mitad de las hembras será a su vez portadora. La expresividad del defecto genético varía de familia a familia y la severidad de la enfermedad suele ser similar entre los miembros de una misma familia (109).

Aparentemente la tasa de mutaciones del gen responsable de la hemofilia es alta, pues siendo una enfermedad poco frecuente, se esperaría que la tendencia fuera de desaparecer después de varias generaciones y sin embargo, ello no ha ocurrido (4, 30, 114). Esto es más aplicable a la hemofilia A, donde es más frecuente que en hemofilia B la ausencia de antecedentes familiares.

### **Detección de portadoras.**

El diagnóstico de portadoras de hemofilia se puede hacer sin dificultad basándose en el conocimiento genético, en el caso de las llamadas "Portadoras obligatorias", o sea las hijas de hemofílico, las madres de más de un hemofílico o las mujeres que tengan un hijo hemofílico y otro familiar por línea materna que padezca la enfermedad. La genética no ayuda al diagnóstico en el caso de "Portadoras no obligatorias", que son aquellas mujeres hijas a su vez de portadoras que no llenan las condiciones de las obligatorias. En un principio se pensó que las portadoras de hemofilia deberían tener aproximadamente el 50% de la actividad normal del factor deficiente, sin embargo en la práctica se encontró gran variabilidad y solo

del 25 al 33% de las "Portadoras obligatorias" pudieron ser identificadas mediante la determinación del factor VIII (117, 152). Esta variabilidad en la concentración del factor VIII y IX en las portadoras de hemofilia, ha sido explicada por Lyon mediante la teoría del "Fenómeno de inactivación al azar del cromosoma X" también llamada fenómeno de Lyonización. Según esta teoría, en un momento durante el desarrollo del embrión femenino heterocigoto para Hemofilia A o B, las células reciben la señal de "lyonizarse" y uno de los dos cromosomas X de la célula se heterocromiza y se convierte en un cuerpo de Barr, haciéndose inerte. Una vez que se hace esta escogencia en cada célula, la división es irrevocable para todos sus descendientes, o sea que todas las células de ese clono van a ser idénticas en ese respecto (78). Si por azar todos los cromosomas que llevan los alelos normales se heterocromizan, la hembra que nazca será una hemofílica y al respecto están descritos en la literatura casos de Hemofilia A y B en mujeres (28, 52, 121). Si la heterocromatización se produce en la mayoría de los cromosomas con alelo normal, nacerá una heterocigota fenotípicamente normal y será el caso que no se puede diagnosticar mediante la cuantificación del factor deficiente. Se supone que el resultado más frecuente es que la heterocromatización se produzca en la mitad de los alelos normales y la mitad de los alelos con el gen de la hemofilia y en este caso la actividad de los factores VIII o IX sería aproximadamente el 50% de lo encontrado en mujeres normales (48).

Bennet en 1970 (8), comparó la concentración del factor VIII activo con la del material antigénico y observó que en las "portadoras obligatorias" había un exceso de material antigénico, y posteriormente Zimmerman y colaboradores mediante inmunoelectroforesis, utilizando antisero de conejo contra factor VIII humano purificado, llegaron a la misma conclusión y pudieron cuantificar el antígeno asociado al factor VIII (162). La medición de la concentración del antígeno aumentó la predicción de portadoras de hemofilia A entre 50 y 70% (7).

Cuando en la misma muestra de plasma, se determinan VIII:C por métodos de coagulación y VIII:R por inmunoensayo en plasma de personas normales, la razón entre VIII:C y VIII:R tiene un rango que va de 0,74 a 2,2, en cambio en las portadoras obligatorias la razón oscila entre 0,18 y 0,9 (53).

La determinación del cofactor ristocetina conjuntamente con VIII:C permite la misma diferenciación que la determinación del antígeno, o sea que identifica el 75% de las portadoras obligatorias y permite un método alterno o conjunto en esta identificación (76, 77).

La identificación de portadoras no obligatorias en hemofilia B sigue procedimientos similares a los utilizados para distinguir portadoras de he-

hemofilia A. La determinación de la actividad coagulante del factor IX permite identificar un buen porcentaje de portadoras ya que sus niveles por lo general están por debajo del rango normal (5, 66). Los niveles de antígeno en las portadoras de hemofilia B<sup>+</sup> han sido hallados por encima del rango normal cuando se utilizan técnicas de neutralización de anticuerpos homólogos. También se han reportado niveles inferiores a lo normal mediante técnicas de radioinmunoensayo (148) y recientemente mediante radioinmunoensayo pero con anticuerpos heterólogos más específicos, se ha reportado que las portadoras de hemofilia B tienen niveles de antígeno en exceso de la actividad coagulante, aún en aquellas mujeres donde los varones afectados de la familia tenían niveles bajos de ambos parámetros (126). Sin embargo la gran variabilidad de los resultados hace que la cuantificación del antígeno asociado a IX no sea tan útil en la identificación de heterocigotos para hemofilia B, como lo es el antígeno asociado a factor VIII en el caso de la hemofilia A.

## MANIFESTACIONES CLINICAS

Los hallazgos clínicos son similares en hemofilia A y B. Se caracterizan por sangramientos episódicos en uno o varios sitios del organismo, representados principalmente por hematomas, hemartrosis y otras hemorragias profundas, siendo poco común la pérdida externa excesiva ya que la hemostasis primaria está intacta y por lo tanto la tendencia a sangramiento suele ocurrir en vasos de mayor calibre. Por esta misma razón el sangrado puede presentarse en forma retardada, una vez que el reflejo axónico inicial ha cesado.

La severidad de la enfermedad está estrechamente relacionada con el grado de deficiencia del factor coagulante, aunque varía de familia a familia suele ser similar en los miembros afectados de una misma familia, quizás porque se hereda el mismo defecto a nivel molecular. En general no se presentan hemorragias espontáneas en aquellos hemofílicos con más de 30 U/dl del factor. Cuando el factor deficiente está en menos de 1 U/dl la hemofilia es severa, con hemartrosis y otros sangramientos espontáneos, aunque quizás hayan sido provocados por traumas inadvertidos.

Los pacientes moderadamente afectados tienen niveles de factor entre 2 y 5 U/dl y clínicamente presentan hemartrosis ocasionales y hematomas profundos post-traumáticos y a veces el sangramiento se repite en la misma articulación, ocasionando una artropatía crónica con incapacitación sugiriendo mayor severidad de la enfermedad que la situación real. En estos casos pudiera suceder que la actividad coagulante detectada *in vitro*, no correspondiese al funcionamiento *in vivo*. Por encima de 5 U/dl las mani-

festaciones clínicas son escasas y generalmente ocurren después de traumas importantes. Sin embargo, aunque esto constituye una guía para el clínico, debe tomarse en cuenta que existe gran variabilidad en la severidad de esta enfermedad.

Aunque la deficiencia está ya presente en el nacimiento, las hemorragias neonatales son raras, presentándose cuando existen traumas obstétricos o quirúrgicos, tales como uso de forceps o vacuum, circuncisión e inyecciones intramusculares.

La primera dentición no suele ir acompañada de hemorragia, pero las pequeñas laceraciones accidentales de las encías, el frenillo o la lengua suelen sangrar en forma prolongada por días y hasta por semanas. Cuando comienza la deambulación, por los traumas repetidos, hacen su aparición los hematomas y hemartrosis. En los casos más severos puede haber manifestaciones neurológicas por compresión nerviosa, hematuria y sangramiento gastrointestinal. El sangramiento intracraneal aunque serio, es relativamente infrecuente.

En pacientes moderadamente afectados puede no haber manifestaciones hasta que el niño participe en actividades más violentas o después de cirugía dental o de otro tipo. En los casos con el menor grado de severidad, el sangramiento pudiera presentarse por primera vez como manifestación de otra enfermedad, como por ejemplo úlcera gastroduodenal. La tensión emocional puede exacerbar las manifestaciones de la enfermedad.

**Hemartrosis.**— En orden descendente de frecuencia las articulaciones más afectadas son: rodillas, codos, tobillos, hombros, caderas y muñecas, aunque puede ser afectada cualquier articulación, aún las más pequeñas. El comienzo de la hemorragia es precedido por un aura que consiste en malestar en la zona, calor y sensación pulsátil y un estado de ansiedad que dura aproximadamente dos horas, posteriormente hay malestar y limitación de la articulación seguido de dolor, tumefacción, calor focal y eventual limitación severa de la motilidad.

El sangramiento presumiblemente se origina en los vasos sinoviales desarrollándose espontáneamente o como resultado de trauma trivial o imperceptible. La hemorragia ocurre dentro de la cavidad articular o en la diáfisis o epífisis del hueso. En la etapa aguda se distiende el espacio sinovial debido a la sangre y se produce espasmo muscular que aumenta la presión intrasinovial; en las pequeñas articulaciones se puede presentar hemorragia periarticular. Después de los primeros episodios se recupera la función, sin embargo más frecuentemente debido a que la absorción de la sangre intraarticular es incompleta, la sangre retenida produce inflamación

crónica de la membrana sinovial y la articulación permanece hinchada, sensible y dolorosa por meses o años, etapa denominada de panartritis o segundo estadio de la hemartrosis.

Con cada recurrencia la sinovial se hace más gruesa y vascular, apareciendo vellosidades y pliegues que favorecen la injuria. Esto aunado al debilitamiento de las estructuras periarticulares predispone a la recurrencia de la hemorragia. A su vez debido a la isquemia mantenida se pierde progresivamente el cartílago hialino, y los tejidos blandos que rodean la articulación se fibrosan y las estructuras libres se hacen adherentes, limitando el movimiento. Pueden observarse imágenes en sacabocados causadas por hemorragias subcondrales. La hemorragia ósea puede dar lugar a quistes, que al aumentar por subsecuentes sangramientos, producen pseudotumores que contienen material necrótico con fragmentos de hueso, dando el aspecto a los rayos X de tratarse de un sarcoma osteogénico.

El sangramiento alrededor de la articulación puede producir síntomas similares a la hemartrosis, pero con decoloración de la piel y a la larga depósitos de hemosiderina. Igualmente la hemorragia intramuscular limitará el movimiento, pero el dolor y la tumefacción tendrán otra localización y puede llegar a la contractura fibrótica.

**Hematomas.**— Los grandes hematomas pueden producir fiebre e hiperbilirrubinemia por destrucción eritrocitaria. Los hematomas del psoas y de los músculos retroperitoneales pueden causar dolor en fosa ilíaca derecha semejando un cuadro apendicular, o en la región inguinal haciendo pensar que se trata de una hemartrosis de la cadera. La compresión de los nervios de la región además de dolor puede producir parestesia, hiperestesias y llegar hasta la parálisis muscular.

Las hemorragias espontáneas o traumáticas de la lengua o de los músculos del cuello y la garganta, pueden obstruir rápidamente las vías aéreas por lo que deben tratarse inmediatamente.

**Hematuria.**— Un pequeño número de hemofílicos presenta hematuria que no suele ser importante pero que sin embargo puede dar lugar a la formación de coágulos causantes de dolores de tipo cólico.

**Epistaxis.**— La epistaxis puede ocurrir en la hemofilia, pero se presenta con más frecuencia en la forma grave de la enfermedad.

**Hemorragia gastrointestinal.**— Generalmente está asociada a una lesión orgánica subyacente como gastritis, úlcera gastroduodenal, etc.

**Hemorragia intracraneal.**— Esta complicación es la primera causa de muerte en hemofilia (17). Aproximadamente en el 50% de los casos es consecuencia de un traumatismo. La hemorragia puede ser subdural, epidural, subaracnoidea, intracerebral e intramedular. Un alto porcentaje de los sobrevivientes a este episodio, presenta secuelas neurológicas que pueden ir desde el retraso mental hasta alteraciones motoras. Es importante diferenciarla de otros trastornos neurológicos, en este respecto la punción lumbar y recientemente la tomografía computarizada son de gran valor.

**Sangramiento Post-traumático.**— El sangramiento después de pequeñas cortaduras generalmente no es importante, pero injurias más severas como procedimientos quirúrgicos menores tales como extracciones dentales o tonsilectomía o traumatismos fuertes, ocasionan hemorragias retardadas, prolongadas, contínuas o intermitentes debido a la ausencia del soporte de la fibrina en el trombo primario.

## CURSO Y PRONOSTICO

Desde la aparición de los concentrados de factores de la coagulación, el curso y pronóstico de la hemofilia ha cambiado dramáticamente. En los países desarrollados las secuelas deformantes y las muertes por hemorragias postraumáticas han sido minimizadas y el hemofílico tratado adecuadamente puede disfrutar de una vida casi normal y la expectativa de vida también es cercana a lo normal. Desafortunadamente en Venezuela el uso de concentrados de factores de la coagulación no está generalizado y entre nosotros es frecuente ver hemofílicos jóvenes con severas secuelas de hemartrosis.

## DIAGNOSTICO

La posibilidad de hemofilia debe ser considerada en todo varón con sangramiento anormal. Una historia clínica minuciosa debe descartar hemorragias personales y familiares. Es importante insistir en todo antecedente quirúrgico por trivial que parezca, y la ausencia de complicaciones hemorrágicas en estas ocasiones constituye un dato en contra del diagnóstico. Al examen físico pueden detectarse equimosis grandes, hematomas, hemartrosis, etc., pero no deben encontrarse petequias.

**Laboratorio.**— El estudio de sangre periférica no revela ningún dato característico de hemofilia, aunque puede haber anemia de severidad variable, de acuerdo a la cuantía del sangramiento. En casos de hemorragias profusas puede observarse leucocitosis con neutrofilia. El conteo plaque-

tario y el tiempo de sangría se encuentran dentro de límites normales, así como el tiempo de protrombina, ya que este último detecta *in vitro*, el funcionamiento del mecanismo extrínseco de la coagulación, que no está alterado.

El tiempo de coagulación puede estar alargado o normal dependiendo de la severidad de la deficiencia. Esto también es válido para el tiempo de tromboplastina parcial que detecta las anomalías del mecanismo intrínseco de la coagulación, ya que esta prueba generalmente es normal cuando la actividad de los factores VIII o IX está por encima del 25%. La prueba de generación de tromboplastina por las mismas razones puede estar alterada o normal. Cuando se encuentra un tiempo de tromboplastina parcial alargado, debe descartarse la presencia de inhibidores mezclando el plasma del paciente con plasma normal para ver si se corrige o no la prueba.

En laboratorios de pocos recursos, el diagnóstico se precisa mediante las llamadas "Pruebas de corrección". Dichas pruebas utilizan plasma adsorbido que carece de los factores II-VII-IX y X. Si la deficiencia es de factor VIII se observa que el tiempo de tromboplastina parcial no se corrige al añadir suero normal y en cambio si lo hace al añadir plasma normal adsorbido, obteniéndose los resultados contrarios cuando se trata de deficiencia de factor IX.

#### **Pruebas específicas.**

**Determinación de factor VIII:C.**— Esta determinación constituye un método sencillo de diagnóstico. Se puede realizar en una (118) o dos etapas (33). El método de una sola etapa es el más usado y se basa en la corrección del tiempo de tromboplastina parcial, de plasma deficiente congénito con menos de 1% de actividad, por plasma normal y plasma del paciente. Los valores normales tienen un amplio rango que va desde 50 hasta 200%, por lo que si se obtienen valores iguales a estos límites, la prueba debe repetirse.

**Determinación de factor VIII:R.**— La evaluación cualitativa de la proteína asociada al factor VIII, se puede hacer mediante inmunodifusión (79) e inmunoelectroforesis bidimensional (71); cuantitativamente también se puede determinar por inmunoelectroforesis y por métodos radioinmuno-métricos (IRMA). El antígeno asociado a factor VIII es cualitativa y cuantitativamente normal en hemofilia.

**Determinación del cofactor Ristocetina.**— La determinación de esta propiedad del factor VIII, se hace midiendo la agregación de plaquetas

normales lavadas, cuando se añade plasma y el antibiótico ristocetina (158). Los resultados son normales en pacientes hemofílicos.

**Determinación del factor IX.**— La determinación de factor IX se hace por métodos similares a la del factor VIII:C, variando el sustrato que en este caso es plasma deficiente congénito con menos de 1% de factor Christmas. El antígeno asociado a factor IX se demuestra por los métodos ya mencionados.

### **Diagnóstico Prenatal.**

A pesar de que el tratamiento moderno de hemofilia ha mejorado mucho el pronóstico y la calidad de vida del enfermo, las manifestaciones hemorrágicas y secuelas de éstas todavía ocurren, además de que son variadas las complicaciones derivadas de la terapia. Todo esto contribuye a que la portadora de hemofilia necesite consejo genético y que en caso de embarazo quiera saber si el feto es o no hemofílico. Muchas mujeres deciden terminar un embarazo ante el temor de tener un niño hemofílico y un diagnóstico prenatal evitaría en muchos casos el aborto de un feto sano. El estudio de la madre no ayuda en estos casos ya que los niveles de factor VIII y IX en el feto son independientes de los niveles maternos (23, 98).

El mejoramiento de las técnicas para la extracción de sangre fetal, evita la contaminación con líquido amniótico que pudiera activar los factores de coagulación. El tiempo óptimo para el estudio es entre las 18 y 20 semanas de embarazo, ya que más temprano se podría perder una proporción grande del volumen sanguíneo fetal, y más tarde la turbidez que adquiere el líquido amniótico impide una buena visualización. El método preferido se lleva a cabo bajo fetoscopia, extrayendo sangre directamente de la vena umbilical cerca de la inserción placentaria (127). La determinación de la actividad coagulante se realiza mediante microtécnicas derivadas de los métodos usuales y para la cuantificación es preferible usar el método radioinmunométrico (108).

### **Diagnóstico Diferencial.**

El diagnóstico de hemofilia no suele ser difícil sobre todo en los casos severos, ya que las manifestaciones hemorrágicas, sobre todo las hemartrosis, son raras en otros defectos de coagulación. En los casos de hemofilia moderada, el diagnóstico puede ser más difícil ya que las manifestaciones clínicas que presentan se pueden observar en cualquier otro trastorno hereditario de la coagulación, los antecedentes familiares a menudo son imprecisos y las pruebas de selección como los tiempos de tromboplastina parcial y generación de tromboplastina pueden ser normales por lo que se hace necesaria la determinación de los factores VIII y IX.

Las deficiencias de los factores XII, Fitzgerald y Precalicrofina, no cursan con manifestaciones clínicas, pero si tienen tiempos de generación de tromboplastina y tromboplastina parcial alargados. La deficiencia de factor XI en varones, puede confundirse clínicamente con hemofilia moderada, en este caso lo mejor es determinar la actividad de cada uno de los factores (VIII - IX y XI).

El diagnóstico diferencial entre hemofilia A y enfermedad de von Willebrand puede ser muy difícil. En la forma clásica de von Willebrand, el tiempo de sangría alargado y la disminución del antígeno asociado serían suficientes para hacer el diagnóstico, pero esta enfermedad presenta variantes y puede haber VIII:C anormal con valores de VIII:R y VIII R:RC normales (129, 153, 166).

## TRATAMIENTO

Como en todas las deficiencias congénitas de factores de coagulación, el tratamiento de la hemofilia está fundamentado primordialmente en la terapia sustitutiva, que tiene como efecto elevar el nivel del factor deficiente hasta los valores necesarios para asegurar una buena función hemostática y mantener éstos hasta que la causa del sangramiento haya sido superada. El nivel hemostático es diferente para cada factor de la coagulación, ya que depende de su media vida metabólica, de su aclaramiento y de su volumen de distribución en el cuerpo, así como también de la naturaleza y severidad de la lesión sangrante. La media vida plasmática del factor VIII oscila entre 8 y 12 horas y sus niveles hemostáticos ofrecen un amplio margen, por ej. una actividad de 15 a 20% puede ser suficiente para detener una hemorragia espontánea en una articulación, mientras que en un caso de cirugía mayor la actividad debe ser cercana al 100%. Para calcular la dosis de factor VIII requerida por un paciente se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Dosis (UI/kg)} = \frac{\text{Elevación de la actividad requerida (UI/dl)}}{2}$$

esta fórmula está basada en el conocimiento de que una unidad internacional por kg de peso de factor VIII, aumenta la actividad plasmática de este factor en 2 unidades por decilitro. Para calcular la respuesta en el paciente, se puede utilizar una segunda fórmula:

$$\frac{\text{Aumento observado (UI/dl)}}{\text{Dosis Administrada (UI/kg)}} = K$$

El valor de K debe ser 2 o cercano a 2, una respuesta muy baja sugiere la presencia de anticuerpos antifactor VIII en el plasma del paciente (125).

Esta misma fórmula se puede utilizar para calcular las necesidades de factor IX en hemofilia B, pero como la respuesta al factor IX es menor, el denominador debe ser 1 y por lo tanto K también debe ser igual a/o cercana a 1.

Los niveles hemostáticos de factor IX, son menores que los del factor VIII, así por ejemplo en caso de cirugía mayor, es suficiente con elevar la actividad hasta 40 a 60%. La media vida plasmática varía de 18 a 24 horas.

Tanto el factor VIII como el factor IX se encuentran en plasma fresco congelado normal, sin embargo esta fuente no es tan deseable como preparaciones donde estos factores se encuentren más concentrados. Durante el procedimiento de preparación de los concentrados de factor VIII, se pierde factor IX y viceversa, o sea que se necesitan preparados distintos para cada tipo de hemofilia.

Al presente el material terapéutico disponible es el siguiente:

**Plasma fresco congelado.**— Esta fue la única fuente utilizada para el tratamiento de hemofilia A hasta 1964, cuando se introdujo el crioprecipitado. Actualmente su uso está limitado a aquellos centros donde hay pocos recursos, pero aún es la forma de terapia más utilizada en el tratamiento de las deficiencias del factor IX, aunque en estos casos, si el cálculo de las necesidades de factor IX excede a 10 cc de plasma por kilogramo y por día, se debe utilizar un concentrado.

**Crioprecipitado.**— Su uso fue introducido por Pool y col en 1964<sup>(110)</sup>. Su obtención es relativamente fácil a partir de plasma fresco congelado después de descongelación lenta a 4°C<sup>(111)</sup>. De esta forma, en un pequeño volumen se recupera aproximadamente el 3% de la proteína plasmática original, 20-85% del factor VIII original y grandes cantidades de fibrinógeno. También se recoge suficiente cantidad de factor XIII como para tener uso terapéutico y pequeñas cantidades de los factores II, V y IX. Este preparado ofrece numerosas ventajas, tales como su fácil preparación, bajo costo y menor riesgo para el recipiente de contraer hepatitis u otras enfermedades transmisibles a través de transfusiones, aunque se han reportado alteraciones de funcionalismo hepático en pacientes que reciben este tratamiento<sup>(75)</sup>. Un inconveniente lo constituye el hecho de que las concentraciones de factor VIII varían de bolsa a bolsa y por lo tanto se dificulta el cálculo de la dosis. El crioprecipitado preparado de 200 ml de plasma contiene entre 50 y 120 U de factor VIII. La necesidad de mantenerlo congelado a -20°C y lo laborioso de reconstituirlo antes de su uso, hacen que el crioprecipitado no sea práctico para la terapia en el hogar. En los centros especializados de los países desarrollados, el crioprecipi-

tado está prácticamente restringido al tratamiento de la enfermedad de von Willebrand.

Concentrados de factor VIII humano.— El concentrado de factor VIII es el medio terapéutico más utilizado y que da mejores resultados en hemofilia. La mayoría de las preparaciones a partir de plasma humano se hacen por fraccionamiento, ya sea por crioprecipitación, precipitación con etanol, precipitación con polietilenglicol, precipitación con aminoácidos, o con combinación de estos procedimientos. Las proteínas del concentrado varían de acuerdo al método de su obtención, pero en general son lo suficientemente potentes para conseguir niveles plasmáticos hasta de 100 U/dl, sin que se produzca una expansión significativa del volumen plasmático del paciente (15, 18). Aparte de la efectividad terapéutica, estos preparados se pueden utilizar en el hogar o donde quiera que deba desplazarse el paciente ya que se pueden guardar refrigerados. La concentración de factor VIII es determinada al elaborar el producto, lo que hace posible una mejor planificación del tratamiento y el cálculo de las dosis requeridas es por lo tanto más preciso. Tienen el inconveniente de su alto costo y que al ser en su mayoría preparados a partir de plasmas de muchos donantes, el riesgo de contraer hepatitis también es mucho mayor. Recientemente se ha reportado la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), en hemofílicos que reciben este tipo de tratamiento (113).

Concentrado de factor VIII de origen animal.— El factor VIII ha sido concentrado a partir de plasma bovino y porcino y se ha utilizado con éxito en el tratamiento de hemofílicos con hemorragias severas (p. ej. cirugía mayor) A pesar de que la recuperación en el plasma del paciente es de solo 25%, su potencia es tal, que bajas dosis pueden producir un efecto hemostático adecuado (11, 12) El problema principal del factor VIII de origen animal es que es antigénico y entre el 7° y 8° día del curso del tratamiento, la mayoría de los pacientes demuestran una menor respuesta, además de que puede haber trombocitopenia moderada o severa. Aparentemente es menos reactivo a los anticuerpos adquiridos antifactor VIII humano y por ello su uso está prácticamente restringido al tratamiento de pacientes con anticoagulante circulante que no responden al tratamiento intensivo con factor VIII humano.

Concentrado de factor IX (Complejo de Protrombina).— Los procedimientos para obtener factor IX, se basan en el hecho de que los factores dependientes de vitamina K son adsorbidos por hidróxido de aluminio, sulfato de bario o por resinas de intercambio iónico. La mayoría de los concentrados que contienen factor IX, se preparan a partir del sobrenadante que queda después de crioprecipitación para obtener factor VIII (125). De-

pendiendo de la casa comercial que los prepara, contienen además los factores II, VII y X o II y X solamente. Son bastante confiables en su actividad, pero algunos preparados pueden tener pequeñas cantidades de factores activados y por lo tanto ser potencialmente trombogénicos. Al igual que los concentrados de factor VIII, son muy costosos y conllevan el peligro de adquirir hepatitis u otras enfermedades post-transfusionales a través de ellos.

### **Alternativas a la terapia de reemplazo en hemofilia moderada.**

Los pacientes con hemofilia moderada, reciben menos transfusiones y por lo tanto, como ha sido demostrado por Kasper y Kipnis<sup>(67)</sup>, cuando necesitan transfusiones por causas quirúrgicas, corren un mayor riesgo de contraer hepatitis B. Por esta razón se buscan alternativas a la terapia de reemplazo de los productos plasmáticos. En hemofilia grave se han utilizado con éxito productos no derivados del plasma, como es el caso de los antifibrinolíticos en cirugía dental, en la prevención de hemorragias espontáneas y en el tratamiento de la hematuria, aunque en esta última con resultados variables. También se han utilizado esteroides sin mucho éxito en la prevención de hemorragias espontáneas y en el tratamiento de pacientes con anticuerpos antifactor VIII.

Mannuci y col<sup>(80)</sup> han demostrado que la utilización de la droga 1-de amino-8-D-arginina vasopresina (DDAVP) (análogo sintético de la hormona antidiurética) por vía endovenosa, produce un aumento de las propiedades relacionadas con el factor VIII, de aproximadamente el doble de los niveles previos en el plasma. Esto se observó también en pacientes con hemofilia A y en personas con enfermedad de von Willebrand que tenían niveles detectables de actividad coagulante, pero no se observó en los casos severos de estas enfermedades. La respuesta del factor VIII tiende a decrecer en algunos pacientes después de inyecciones repetidas, pero no se sabe si esto es debido a que se terminan las reservas de factor VIII o a que se alteran los mecanismos de su liberación. Nilsson y col<sup>(97)</sup> han propuesto una nueva aplicación que consiste en inyectar DDAVP a los donadores de sangre antes de la extracción, obteniendo así el doble de factor VIII en los concentrados preparados a partir del plasma de los donantes.

### **Manejo de los diferentes tipos de hemorragia.**

Aunque la gran mayoría de las hemorragias en hemofilia ameritan una terapia de reemplazo, las dosis varían de acuerdo a la magnitud y localización de estas, así como serían variables otras medidas complementarias al tratamiento.

**Hemartrosis Aguda.**— Esta es la enfermedad hemorrágica más constante en hemofilia severa y si no se trata adecuadamente dará lugar a deformidades en las articulaciones con la consecuente pérdida de la función, acompañada de trastornos psicológicos, económicos y sociales en el paciente y su familia inmediata. El tratamiento precoz y efectivo de la hemorragia es por lo tanto imperativo, buscando con ello además de detener el sangramiento, aliviar el dolor y restaurar la función de la articulación.

La mayoría de las hemorragias de pequeñas articulaciones son fáciles de controlar si se tratan en cuanto comienzan los primeros signos y el paciente se restablece en pocas horas con una sola dosis de 5 a 10 UI/kg de peso. En hemorragias más severas la dosis tiene que ser más elevada, entre 10 y 20 UI/kg de peso y seguida de la administración de la mitad de la dosis inicial cada 12 horas y durante varios días. Puede ser necesario el uso de analgésicos y de un entablillado para inmovilizar la articulación entre 5 y 15° de flexión. Las bolsas de hielo alrededor de la articulación, también pueden aliviar el dolor. Cuando el dolor y el espasmo muscular se han aliviado, después de varios días, el paciente puede comenzar a hacer ejercicios moderados de extensión, en estos casos debe recibir una dosis profiláctica del factor deficiente, la cual en etapas tempranas debe ser de 10 UI. Como medida general no se debe aspirar la articulación a no ser que esté demasiado tensa y dolorosa (125).

**Hematomas musculares.**— Este tipo de hemorragia puede ser más difícil de controlar que la hemartrosis, ya que a menudo requiere más concentrados y tarda más en resolverse. De gran importancia son los hematomas del psoas ya que por su localización producen compresión y dolor que puede confundirse con un proceso apendicular. La compresión del nervio femoral va a producir trastornos del cuádriceps con inestabilidad de la rodilla. La dosis utilizada en estos casos varía de acuerdo a la localización y tamaño del hematoma entre 10 y 30 UI/kg de peso. Se requiere reposo y muy posiblemente inmovilización de la zona, además de terapia de reemplazo cada 12 horas.

**Hematuria.**— La hemorragia de origen renal se presenta con más frecuencia en hemofilia severa, suele ser espontánea y no cede fácilmente al tratamiento. Durante un tiempo se utilizaron los agentes antifibrinolíticos, como ácido tranexámico y ácido epsilon-aminocaproico, pero la práctica hubo de abandonarse por la frecuencia de fenómenos tromboembólicos en el tracto renal (45, 140).

**Hemorragia gastrointestinal.**— El sangramiento gastrointestinal es poco común, pero cuando ocurre puede ser masivo. Si el paciente se queja de dolor abdominal, se debe instituir tratamiento de reemplazo antes de proceder a la investigación de la causa del dolor.

**Hemorragia cerebral.**— Aunque no frecuente en hemofilia, cuando se presenta la hemorragia cerebral puede ser fatal. Cualquier trauma cefálico en un hemofílico, por insignificante que parezca, debe ser investigado inmediatamente. Cualquier procedimiento diagnóstico debe ser precedido por terapia de reemplazo, aunque hoy en día se tiene una excelente ayuda con la tomografía computarizada, que no necesita de mucha manipulación del paciente.

**Procedimientos Quirúrgicos.**— Previo a cirugía en un hemofílico, hay que tener muy claro de qué tipo de hemofilia se trata, descartar la presencia de anticoagulantes circulantes, los cuales constituyen una contraindicación formal a la cirugía, a no ser que sea una situación de vida o muerte, y conocer los niveles plasmáticos del factor deficiente. Antes de cirugía mayor, los niveles de factor VIII deben llevarse a los alrededores del 100%, en el caso del factor IX pueden ser entre 50 y 60%, y después mantener un control de los niveles plasmáticos, de forma que se encuentren por encima del 50%, aplicando varias dosis diarias según las necesidades y manteniendo este control hasta que se haya producido la cicatrización de la herida; como la sobrevivencia del factor IX es de 24 horas, la frecuencia de la dosis en hemofilia B puede ser de una sola vez al día, dependiendo de los niveles plasmáticos después de la infusión.

**Manejo de la artropatía hemofílica crónica.**— La hemartrosis repetida en una articulación lleva a restricción del movimiento, rigidez y atrofia muscular del miembro afectado. En la rodilla se produce pérdida de extensión y flexión, "genu valgum" subluxación y rotación de la tibia, con atrofia del cuádriceps. Cambios similares suceden cuando se trata de la articulación del codo, el antebrazo está en pronación y hay atrofia muscular de brazo y antebrazo. En la cadera se produce un aumento de tamaño de la cabeza del fémur con subluxación y limitación de los movimientos y dolor. Por estas razones, el hemofílico debe ser evaluado por el hematólogo en conjunto con el fisioterapeuta y al mismo tiempo que se establece la terapia con factores de coagulación, se implementa un plan de prevención o de rehabilitación de los problemas músculo-esqueléticos. Los fines del tratamiento de la artropatía crónica son los siguientes: 1) Disminuir la deformidad mediante fisioterapia. 2) Uso de aparatos correctores o auxiliares. 3) Estimular la actividad normal para aumentar la fuerza muscular. 4) Proceder a cirugía correctora cuando los demás métodos no han dado resultado, o cuando el paciente se presenta con artropatía muy avanzada. En los casos de deformidades musculares se obtiene mejoría de la función con procedimientos de alargamiento de tendones. Cuando el daño de la articulación es muy grande y el dolor es severo, se recurre a un procedimiento drástico como es la artrodesis, o sea que se deja la articulación rígida, esto aunque dificulta el movimiento no lo impide por completo y

tiene la ventaja de evitar el dolor y el sangramiento. En los últimos años se ha avanzado mucho en las técnicas de artroplastia, especialmente de la cadera.

### **Analgesia en Hemofilia.**

El dolor es un problema común en los hemofílicos, producido principalmente por la presión que ejerce la hemorragia en las articulaciones, músculos y otros tejidos, además del causado por la artropatía crónica. En el dolor agudo, la pronta administración del factor deficiente y la inmovilización pueden ser suficientes para calmarlo, por ello la Federación Mundial de Hemofilia tiene como regla que en presencia del dolor y ante la duda, primero transfundir y después buscar la causa, haciendo la salvedad que el paciente no tenga anticoagulantes circulantes. Si el dolor es muy severo y no cede a las medidas anteriores, se hace necesaria la administración de analgésicos, pero teniendo en cuenta que están totalmente contraindicados aquellos que tengan acción antiplaquetaria, como ácido acetilsalicílico, derivados de la fenilbutazona y la indometacina. Los medicamentos que se pueden usar son acetaminofen, propoxifene y pentazocine. En ocasiones puede ser necesario el uso de narcóticos, estos hay que utilizarlos con sumo cuidado a fin de no crear hábito y de acuerdo a la severidad del dolor, se puede prescribir codeína, meperidina, hidromorfina-HCL o sulfato de morfina.

Terapia en el hogar.— La mayoría de los Centros de Hemofilia de los países desarrollados y en muchos países en vías de desarrollo, entrenan al paciente o a un familiar cercano para que puedan administrar los concentrados de factores VIII o IX, de esta forma pueden llevar los preparados a la casa y mantenerlos en nevera, y a los primeros síntomas o signos de hemorragia proceder a la administración del factor faltante. Esto constituye un preventivo eficaz del daño articular, a la vez que permite al hemofílico una vida más independiente ya que puede llevar su tratamiento a donde quiera que desee movilizarse.

## **COMPLICACIONES DEL TRATAMIENTO DE HEMOFILIA**

**Inhibidores de factor VIII.**— Entre el 5 y 21% de los pacientes con hemofilia clásica desarrollan anticuerpos que neutralizan la actividad coagulante del factor VIII (anti-VIII:C) (134). Estos anticuerpos también pueden aparecer en personas no hemofílicas de manera espontánea o en asociación con enfermedades de tipo autoinmune.

En hemofilia A, el desarrollo de anticuerpos probablemente está relacionado de alguna manera con la terapia a base de factor VIII, sin em-

bargo, no hay una relación definitiva entre el desarrollo de anticuerpos y la cantidad de factor VIII administrado, tampoco se ha demostrado predisposición familiar.

Una vez que se desarrollan los anticuerpos, la administración del factor VIII actúa como un antígeno, dando lugar a la producción de más anticuerpos. La mayoría son inmunoglobulinas del tipo IgG y destruyen la actividad del factor VIII mediante una reacción dependiente de temperatura, pH y tiempo (13, 35). Uno de los métodos más utilizados para demostrar y cuantificar los anticuerpos, es el de Kasper (68) que se basa en la neutralización del factor VIII después de incubación prolongada con plasma que contiene el anticoagulante. El título se cuantifica en Unidades Bethesda que es la cantidad de anticuerpos que destruye 0,5 UI/ml de factor VIII después de 4 horas de incubación a 37°C.

La mayoría de los hemofílicos elevan el título de anticuerpos siete a diez días después de una transfusión de factor VIII, posteriormente caen lentamente en los próximos 3 a 9 meses.

Las manifestaciones hemorrágicas como consecuencia de la presencia de anticuerpos, son similares a las de la hemofilia. Puede haber hemorragias masivas espontáneas o después de traumas leves, pueden aparecer hematomas en sábana, epistaxis incontrolables y hasta hemartrosis. En estos casos la terapia de reemplazo puede ser inútil, dependiendo del título de anticuerpos. Por encima de 8 a 10 U Bethesda cualquiera sea la cantidad de factor VIII transfundida, éste será neutralizado, aunque en algunos pacientes se ha obtenido remisión parcial después de 200.000 UI (38). En pacientes con títulos más bajos, se administran dosis altas de factor VIII humano o animal varias veces al día durante varios días, con la esperanza de alcanzar un nivel de factor VIII en plasma aunque sea por poco tiempo. El factor VIII de origen animal es menos reactivo que el humano con la mayoría de los anticuerpos (144). Si no hay respuesta a las transfusiones puede ser necesario extraer la mayor cantidad de anticuerpos posible mediante plasmáferesis y una vez que el título haya descendido, volver a inyectar factor VIII.

En los últimos años se ha dado un nuevo enfoque al manejo del paciente con anti-VIII:C de alto título, y es el uso de concentrados de complejos de protrombina. Estos son los mismos complejos utilizados en el tratamiento de hemofilia B, o preparados especiales que contienen cantidades controladas de principios activados que actúan o desvían la coagulación más allá del factor VIII. No está muy claro cual es el principio activo de estos complejos, los más conocidos son: FEIBA (Factor eight inhibitor bypassing activity) o actividad que pasa al inhibidor del factor VIII, y

Autoplex o autofactor IX. Los resultados obtenidos con estos complejos han sido variables, por lo que se están haciendo encuestas organizadas para tener un concepto claro sobre los resultados, incluso hay trabajos que reportan respuesta anamnésica del inhibidor en algunos pacientes (69), también existe el riesgo de desarrollar coagulación intravascular diseminada, especialmente en pacientes con enfermedad hepática o shock hemorrágico (141).

Aunque no hay clara evidencia de que los inmunosupresores tales como esteroides, azatioprina, ciclofosfamida o 6-mercaptopurina, sean efectivos en la supresión de la respuesta anamnésica, en algunos casos han disminuído el título de anticuerpos, ya sea utilizándolos solos o combinados con dosis masivas de factor VIII (51, 138).

### **Inhibidores del factor IX.**

Los inhibidores del factor IX son menos frecuentes que los de factor VIII. En gran Bretaña reportan una incidencia del 1% (73), pero en otros países se ha reportado hasta 5%. Es raro que aparezcan en personas previamente normales, y cuando aparecen en los hemofílicos no suelen alcanzar títulos elevados.

### **Enfermedad hepática en hemofílicos.**

La frecuencia de transfusiones hace que los hemofílicos sean el grupo de población mas expuesto a la hepatitis post transfusional. Se ha demostrado una alta incidencia de positividad a los marcadores del virus de la hepatitis B en estos pacientes. Enk y col (40) hallaron una incidencia de casi 100% de anticuerpos contra el antígeno de superficie de hepatitis B; a pesar de ello la incidencia de manifestaciones clínicas es solo del 6 al 26% (131).

Kasper y Kipnis han encontrado que los niños y los hemofílicos moderados con poca exposición a productos derivados de la sangre, tienen un riesgo mayor de desarrollar enfermedad clínica que los hemofílicos multitransfundidos (67), sin embargo esto no significa que no exista la enfermedad asintomática con daño hepático por el contacto repetido con el virus. Tomando estos resultados en cuenta, muchos centros prefieren tratar a los niños hemofílicos con crioprecipitado preparado en el Banco de Sangre y proveniente de donadores conocidos cuya sangre se ha sometido a un exscrutinio exhaustivo. Este problema de la transmisión de enfermedades a través de las transfusiones a hemofílicos se ha venido a complicar más con los reportes recientes del "síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS)" en pacientes que reciben concentrados de factor VIII (113).

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ABILGAARD CF. The in vivo longevity of antihemophilic factor (Factor VIII). *Brit J Haematol* 10: 225-230, 1964.
- 2- ADELSON E. The survival of factor VIII (antihemophilic globulin) and factor IX (plasma thromboplastin component) in normal humans. *J Clin Invest* 42: 1040-1045, 1963.
- 3- ANDREASSEN M. Haemophili i Denmark. *Opera ex Domo Biol Hered Hum (Univ Hafnensis)* 6: 1-168, 1943.
- 4- BARRAI I, CANN HM., CAVALLI-SFORZA LL, DE NICOLA P. The effect of parental age on rates of mutation for hemophilia and evidence for differing mutation rates for hemophilia A and B. *Am J Hum Genet* 20: 175-196, 1968.
- 5- BARROW EM., BULLOCK WR., GRAHAM JB. A study of the carrier state for plasma thromboplastic component (PTC, Christmas factor) deficiency, utilizing a new assay procedure. *J Lab Clin Med* 55: 936-945, 1960.
- 6- BAUMGARTNER HR., TSCHOPP TB., MEYER D. Shear rate dependent inhibition of platelet adhesion and aggregation on collagenous surfaces by antibodies of human factor VIII/von Willebrand. *Brit J Haematol* 44: 127-139, 1980.
- 7- BENNET B., RATNOFF OD. Detection of the carrier state for classic hemophilia. *N Engl J Med* 288: 342-345, 1973.
- 8- BENNET E. Immunologic studies in hemophilia. *Clin Sci* 38: 118, 1970.
- 9- BERTINA RM., VELTKAMP JJ. A genetic variant of factor IX with decreased capacity for  $Ca^{2+}$  binding. *Brit J Hematol* 42: 623-635, 1979.
- 10- BERTINA RM., VELTKAMP JJ. Physiology and biochemistry of factor IX. In: *Haemostasis and thrombosis*. Bloom AL, Thomas DP ed p 98. Churchill and Livingston, 1981.
- 11- BIDWELL E. The purification of bovine antihemophilic globulin. *Brit J Haematol* 1: 35-45, 1955.
- 12- BIDWELL E. The purification of antihemophilic globulin from animal blood. *Brit J Haematol* 1: 386-389, 1955.
- 13- BIGGS R., BIDWELL E. Method for the study of antihemophilic globulin inhibitors with reference to six cases. *Brit J Haematol* 5: 379-385, 1959.

- 14- BIGGS R., DENSON KWE. The fate of prothrombin and factors VIII, IX y X transfused to patients deficient in these factors. *Brit J Haematol* 9: 532, 1963.
- 15- BIGGS R: Further experience in use of human antihemophilic globulin (HAHG) for the control of bleeding after dental extraction in hemophilic patients. *Lancet* 1: 969, 1965.
- 16- BIGGS R. Inhibitors in haemophilia. In "The Haemophilic and his world. p 125. Basel Karger 1970.
- 17- BIGGS R. Haemophilia treatment in the United Kingdom from 1969-1974. *Brit J Haematol* 35: 487-504, 1977.
- 18- BLOMBACK SM., NELSSON IM. "Treatment of Hemophilia A, with human antihemophilic globulin" *Acta Med Scand* 161: 301, 1958.
- 19- BLOMSTRAND R. Coagulation studies on human thoracic duct lymph. *Am J Med Sci* 253: 99, 1967.
- 20- BLOOM AL., GIDDINGS JC., WILKS CJ. Factor VIII on the vascular intima possible importance in haemostasis and thrombosis. *Nature (New Biol)* 241: 217-219, 1973.
- 21- BLOOM AL. The byosynthesis of factor VIII. *Clin Haematol* 8: 53-77, 1977.
- 22- BOUMA BN., WIEGERINK Y., SIXMA JJ. Immunological characterization of purified antihemophilic factor A (factor VIII) which corrects abnormal platelet retention in von Willebrand's disease. *Nature (New Biol)* 236: 104-106, 1977.
- 23- CADE JF., HIRSH J., MARTIN M. Placental barrier to coagulation factors: its relevance to the coagulation defect at birth and to haemorrhage in the newborn. *Brit Med J* 2: 281-283, 1969.
- 24- CHROBACK L. Coagulation properties of human thoracic duct lymph. *Am J Med Sci* 253: 99, 1967.
- 25- COLLER BS. The effects of Ristocetin and von Willebrand Factor on platelet electrophoretic mobility. *Journal Clin Invest* 61: 1168-1175, 1977.
- 26- COUNTS RB. Solid phase immunoradiometric assay of factor VIII protein. *Brit J Haematol* 31: 429-436, 1975.
- 27- COUNTS RB., PASKELL SL., ELGEC SK. Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/von Willebrand factor. *J Clin Invest* 62: 702-708, 1978.

- 28- CZAPEK EE., HOYER LW., SCHWARTZ AD. Hemophilia A in a female. Use of factor VIII antigen levels as a diagnostic aid. *J Pediat* 84: 485-489, 1974.
- 29- DAVIE EW., FUJIKAWA K. Basic mechanisms in blood coagulation. *Ann Rev Biochem* 44: 799-828, 1975.
- 30- DE NICOLA P. Mutation rate in hemophilia A and B, and effect of parental age. In current studies in hemophilia. *Proc 3rd Congr World Fed Hemophilia*. Paris 1965. p 91 Karger ed. Basel/New York, 1971.
- 31- DENSON KEW., BIGGS R., MANNUCCI PM. An investigation of three patients with Christmas disease due to an abnormal type of factor IX. *J Clin Pathol* 21: 160, 1968.
- 32- DENSON KWE., BIGGS R., HADDON ME., BARRETT R., COBB K. Two types of Haemophilia A ( $A^+$  and  $A^-$ ): A study of 48 cases. *Brit J Haematol* 17: 163-171, 1969.
- 33- DENSON KWE. The simplified two-stage assay for factor VIII. In human blood coagulation, haemostasis and thrombosis. p 688. Biggs R (ed) Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1976.
- 34- DIDISHEIM P. Historical comments of hemophilia and carrier detection. *Ann N y Acad Sci* 240: 138-140, 1975. Tomado de: A Talmudic reference to hemophilia and its genetic transmission. Babylonian Talmud tractate Yebamot, fol 64 p 2. Translated into English in *Israel J Med Sci* 1: 593, 1965.
- 35- DIEZ-EWALD M., LIAN ECY., NUÑEZ R., DEYKIN D., HARKNESS DR. Circulating anticoagulant in a family with prolonged bleeding time and factor VIII deficiency. *Blood* 49: 799-806, 1977.
- 36- DI-SCIPIO RG., HERMALSON MA., YATES SG., DAVIE EW. A comparison of human prothrombin factor IX (Christmas factor) factor X (Stewart factor) and protein S. *Biochem* 16: 698-706, 1977.
- 37- DOUCET-DE BRUINE MHM., SIXMA JJ., OVER J., BEESER-VISSER NH. Heterogeneity of human factor VIII. II Characterization of forms of factor VIII binding to platelets in the presence of ristocetin. *J Lab Clin Med* 92: 96-107, 1978.
- 38- EDSON JR., McARTHUR JR., BRANCH RF., McCULLOUGH JJ., CHON SN. Successful management of a subdural hematoma in a hemophiliac with an antifactor VIII antibody. *Blood* 41: 113-119, 1973.

- 39-- ELODI S. Factor IX activity and factor IX antigen in haemophilia B carriers. *Thromb Res* 6: 39-51, 1975.
- 40-- ENK RE., BETTS RF., BROWN MR., MILLER G. Viral serology (hepatitis B virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus) and abnormal function tests in transfused patients with hereditary hemorrhagic diseases. *Transfusion* 19: 32-38, 1979.
- 41-- ESNOUF MP., McFARLANE RG. Enzymology of the blood clotting mechanism. *Adv. Enzymol* 30: 325, 1968.
- 42-- FAUTL P., SAWERS RR., MARR AG. Investigation of a haemorrhagic disease due to betathromboplastin deficiency complicated by a specific inhibitor of thromboplastin formation. *Aust Ann Med* 5: 163, 1956.
- 43-- FEINSTEIN D., CHONG MNY., KASPER CK., RAPAPORT SI. Hemophilia A. Polymorphism detectable by a factor VIII antibody. *Science* 163: 1071-1072, 1969.
- 44-- FERNLUND P., STENFLO J. Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. *J Biol Chem* 250: 6125, 1975.
- 45-- FUJIKAWA K. Isolation and characterization of bovine factor IX (Christmas factor). *Biochemistry* 12: 4938, 1973.
- 46-- GOBBI F. Use and mis-use of E-amino-caproic acid. *Lancet* 11: 472, 1967.
- 47-- GRAHAM JB., MC LENDON WW., BRINKHOUS KM. Mild hemophilia: an allelic form of the disease. *Am J Med Sci* 225: 46, 1953.
- 48-- GRAHAM JB., BARROW ES., ELSTON RC. Lyonization in hemophilia: a cause of error in direct detection of heterozygous carriers. *Ann N Y Acad Sci* 240: 141-146, 1975.
- 49-- GRAHAM JB. Dominant inheritance of hemophilia B in three generations of women. *Blood* 46: 175-188, 1975.
- 50-- GRALNICK HR. Factor VIII/von Willebrand factor protein: Galactose, a cryptic determinant of von Willebrand factor activity *J Clin Invest* 62: 496-499, 1978.
- 51-- GREEN D. Suppression of an antibody to factor VIII by a combination of factor VIII and cyclophosphamide. *Brit J Haematol* 37: 381, 1971.
- 52-- HASHMI KZ., MacIVER JE., DELAWARE IW. Christmas disease in a female. *Lancet* 1: 965-966, 1978.

- 53- HATHAWAY HS., LUBS ML., KIMBERLING WJ., HATHAWAY WE. Carrier detection in classical hemophilia. *Pediatr* 57: 251-254, 1976.
- 54- HOAG MS. Treatment of hemophilia B with a new clotting factor concentrate. *N Engl J Med* 280: 581, 1969.
- 55- HOYER LW., BRECKENRIDGE RT. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII): cross-reacting material in a genetic variant of hemophilia A. *Blood* 32: 962-971, 1968.
- 56- HOYER LW. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). IV. Radioimmunoassay of AHF antigen. *J Lab Clin Med* 80: 822-833, 1972.
- 57- HOYER LW., DE LOS SANTOS R., HOYER JR. Antihemophilic factor antigen. Localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy. *J Clin Invest* 52: 2737-2744, 1973.
- 58- HOYER LW. Von Willebrand's disease. In Spact TH (ed) *Progress in Hemostasis and thrombosis* p 231-287. Grune & Stratton. New York, 1976.
- 59- HOYER LW, SHAINOFF JR. Factor VIII related protein circulates in normal plasma as high molecular weight multimers. *Blood* 55: 1056-1059, 1980.
- 60- HOYER LW. The factor VIII complex: structure and function. *Blood* 58: 1-13, 1981.
- 61- HOYER LW., TRABOLD NC. The effect of thrombin on human factor VIII. Cleavage of the factor VIII procoagulant protein during activation. *J Lab Clin Med* 97: 50-64, 1981.
- 62- HULTIN MB., NEMERSON Y. Activation of factor X by factors IXa and VIII. A specific assay for factor IXa in the presence of thrombin-activated factor VIII. *Blood* 52: 928-940, 1978.
- 63- JAFFE EA., HOYER LW., NACHMAN RL. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52: 2757-2764, 1973.
- 64- KAO KJ., PIZZO SV., McKEE P. Platelet receptors for human factor VIII/von Willebrand factor protein: Functional correlation of receptor occupancy and ristocetin-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 5317-5320, 1979.
- 65- KAO KJ., PIZZO SV., McKEE P. Demonstration and characterization of specific binding sites for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. *J Clin Invest* 63: 656-664, 1979.

- 66- KASPER CK., MINAMI JY., RAPAPORT SI. Detection of the carrier state in hemophilia B. *Clin Res* 17: 116, 1969.
- 67- KASPER CK., KIPNIS SA. Hepatitis and clotting factor concentrates (letter). *J Am Med Ass* 221: 510, 1972.
- 68- KASPER CK., ALEDORT LM., COUNTS RB., EDSON JR., FRANTANTONI J., GREEN D., HAMPTON JW., HILGARTNER MW., LAZERSON J., LEVINE PH., McMILLAN CW., POOL JG., SHAPIRO SS., SHULMAN NR., VAN EYS J. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 34: 869-872, 1975.
- 69- KASPER CK., FEINSTEIN DI. Rising factor VIII inhibitor titers after Konyne factor IX complex (letter). *N Engl J Med* 295: 505, 1976.
- 70- LAAKE K., OSTERUD B. Activation of purified plasma factor VIII by human plasmin, plasma Kallikrein and activated components of the human intrinsic coagulation system. *Thromb Res* 5: 759-772, 1974.
- 71- LAURELL C. Quantitative stimulation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 15: 45-52, 1966.
- 72- LAZARCHICK J., HOYER LW. Immunoradiometric measurement of the factor VIII procoagulant antigen. *J Clin Invest* 62: 1048-1052, 1978.
- 73- LECHNER K. Factor IX inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 25: 447, 1971.
- 74- LEGAZ ME., SCHEMER G., COUNTS RB., DAVIE EW. Isolation and characterization of human factor VIII (antihemophilic factor) *J Biol Chem* 248: 3946-3955, 1973.
- 75- LEVINE PH., McVERRY BA., ATTOCK B. Health of the intensively treated hemophiliac with special reference to abnormal liver chemistries and splenomegaly. *Blood* 50: 1-9, 1977.
- 76- LIAN ECY., DIEZ-EWALD M., LIAN MJ. Detection of hemophilia carriers by determination of the ratio between ristocetin cofactor activity and factor VIII (AHF) activity (abstract) 16th Congress Int Soc Hematl p 327, 1976.
- 77- LIAN ECY., DIEZ-EWALD M., WALTER SD., NUÑEZ R., LIAN JF., HARKNESS DR. Prediction of hemophilia carriers: a new sta-

- tistical approach using simultaneous assays of factor VIII coagulant activity. *Invest Clin* 20: 162-178, 1979.
- 78- LYON MF. Possible mechanisms of x-chromosome inactivation. *Nature New Biol* 232: 229, 1971.
- 79- MANCINI G., CARBONARA AO., HEREMANS JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radioimmunoassay. *Immuno Chem* 2: 235, 1965.
- 80- MANNUCCI PM., ABERG M., NILSSON IM., ROBERTSON B. Mechanism of plasminogen activator and factor VIII increase after vasoactive drugs. *Brit J Haematol* 30: 81-93, 1975.
- 81- MARCHESI SL., SCHULMAN NR., GRALNICK HR. Studies on the purification and characterization of human factor VIII. *J Clin Inv* 51: 2151-2161, 1972.
- 82- MATSUOKA M., ITO M., TAKAHASLIN K., SALSURAGAWA N. An immunological method for detection of the carrier of haemophilia B. *Thromb Haemost* 36: 441-450, 1976.
- 83- McKUSICK VA., RAPAPORT SI. History of classical hemophilia in a New England family. *Arch Int Med* 110: 144-149, 1962.
- 84- McKUSICK VA. The earliest record of hemophilia in America? *Blood* 19: 243-244, 1962.
- 85- McKUSICK VA. Hemophilia in early New England. A follow up of four kindreds in which hemophilia occurred in the pre-revolutionary period. *J Hist Med* 17: 342-363, 1962.
- 86- McKUSICK VA. The royal hemophilia. *Sci Amer* 213: 88-95, 1965.
- 87- MENACHE D. The turnover rate of the coagulation factors II, VII and IX under normal metabolic conditions. *Thromb Diath Haemorrh. Suppl* 13: 187, 1964.
- 88- MERRIT DA. Population genetics and hemophilia. Implications of mutation and carrier recognition. *Ann New York Acad Sci* 240: 121-131, 1975.
- 89- MERSKEY C. The laboratory diagnosis of hemophilia. *J Clin Pathol* 3: 301, 1950.
- 90- MEYER D., LARRIEU MJ. Factor VIII and IX. Relationship between hemophilia BM and hemophilia B<sup>+</sup>. *Europ J Clin Invest* 1: 425, 1971.

- 91- MEYER D., JENKINS C., DREYFUS M., LARRIEU MJ. An experimental model for von Willebrand's disease. *Nature* 243: 293-294, 1973.
- 92- MIBASHAN RS., RODECK CH., THUMPSTON JK., ADELMAN MA., SINGLE JD., WHITE JM., CAMPBELL S. Prenatal plasma assay of fetal factors VIII and IX. *Brit J Haematol* 41: 611-612, 1979.
- 93- MORISATO DK., GRALNICK HR. Selective binding of the factor VIII/von Willebrand factor protein to human platelets. *Blood* 55: 9-15, 1980.
- 94- MULLER HP., VAN TILBURY NH., BERTINA RM., TERWILL JP., VELTKAMP JJ. Immunoradiometric assay of procoagulant factor VIII antigen (VIII:CAg). *Clin Chim Acta* 107: 11-19, 1980.
- 95- NATIONAL BLOOD RESOURCE PROGRAM. Pilot study of hemophilia in the US National Institutes of Health. Department of Health, Education and Welfare. Bethesda Md. 1972.
- 96- NEAL WR., TAYLOE DT., CEDERBAUM AI., ROBERTS HR. Detection of genetic variants of haemophilia B with an immunosorbent technique. *Brit J Haematol* 25: 63-68, 1973.
- 97- NILSSON IM., WALTER H., MICHAELSSON M., VILBARDT T. Factor VIII concentrate prepared from DDAVP stimulated blood donor plasma. *Scand J Haematol* 22: 42-46, 1979.
- 98- NOSCEL HL., LANZKOWSKY P., LEVY S., MIBASHAN RS., HANSEN JDC. A study of coagulation factor levels in women during labour and in their newborn infants. *Thromb Diath Haemorrh* 16: 185-192, 1969.
- 99- OLSON JD., BROCKWAY WJ., FASS DN., BOWIE EJW., MANN KG. Purification of porcine and human ristocetin-Willebrand factor. *J Lab Clin Med* 89: 1278-1294, 1977.
- 100- ORSTAVIK KH., OSTERUD B., PRYDZ H., BERG K. Electroimmunoassay of factor IX in hemophilia B. *Thromb Rev* 7: 373-382, 1975.
- 101- ORSTAVIK KH., VELTKAMP JJ., BERTINA RM., HERMANS J. Detection of carriers of haemophilia B. *Brit J Haematol* 42: 293-301, 1979.
- 102- OSTERUD B., RAPAPORT SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VIII. *Proc Nat Acad Sci* 74: 5260-5264, 1977.

- 103—OTTO JC. An account of an haemorrhagic disposition existing in certain families. *Med Report* 6: 1, 1803.
- 104—OWEN WG., WAGNER RH. Antihemophilic factor. Separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents. *Thromb Diath Haemorrh* 27: 502-515, 1972.
- 105—OWEN CA JR., BOWIE EJW., FASS DN. Generation of factor VIII coagulant activity by isolated perfused neonatal pig livers and adult rat livers. *Brit J Haematol* 43: 307-315, 1979.
- 106—PAREKH VR., MANNUCCI PM., RUGGERI ZM. Immunological heterogeneity of hemophilia B: a multicentre study of 98 kindreds. *Brit J Haematol* 40: 643-655, 1978.
- 107—PAVLOVSKY A. Turnover rate of factor VIII. *Thromb Diath Haemorrh Suppl* 13: 209, 1964.
- 108—PEAKE IR., BLOOM AL., GIDDINGS JC., LUDLAN CA. An immunoradiometric assay for procoagulant factor VIII antigen: Results in hemophilia, von Willebrand's disease and fetal plasma and serum. *Brit J Haematol* 42: 269-281, 1979.
- 109—PINEY WR., ARNOLD BJ. Plasma antihemophilic factor (AHF) concentrations in families of patients with haemorrhagic states. *Brit J Haematol* 5: 184, 1959.
- 110—POOL JG., HERSGOLD EJ., PAPPENHAGEN A. High potency antihemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature*. 203: 312, 1964.
- 111—POOL JG., SHANNON AE. Production of high potency antihemophilic globulin in a closed bag system. *N Engl J Med* 273: 1443-1447, 1965.
- 112—POOL JG. Biological half life of transfused antihemophilic factor (Factor VIII) synthesis. *Arch Surg* 103: 398, 1971.
- 113—Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *California Morbid Mortal Weekly Report* 31: 652-654, 1982.
- 114—QUICK AJ. Sporadic hemophilia. *Arch Int Med* 106: 335, 1960.
- 115—RADCLIFFE R., NEMERSON Y. Activation and control of factor VII by activated factor X and thrombin. Isolation and characterization of a single chain form of factor VIII. *J Biol Chem* 250: 388-395, 1975.

- 116—RAND JH., GORDON RE., SUSSMAN II., CHU SV., SOLOMON V. Electron microscopic localization of factor VIII-related antigen in adult human blood vessels. *Blood* 60: 627-634, 1982.
- 117—RAPAPORT SI., PATCH MJ., MOORE FJ. Antihemophilic globulin levels in carriers of hemophilia. *A J Clin Invest* 39: 1619-1625, 1960.
- 118—RAPAPORT SI., SCHIFFMAN S., PATH MJ., WARE AG. A simple, specific one stage assay for plasma thromboplastin antecedent (PTA) activity. *J Lab Clin Med* 51: 771-780, 1961.
- 119—RATNOFF OD., BENNETT B. The genetics of hereditary disorders of blood coagulation. *Science* 179: 1291-1298, 1973.
- 120—RATNOFF OD., LEWIS JH. Heckathorn's disease: variable functional deficiency of antihemophilic factor (Factor VIII). *Blood* 46: 161-173, 1975.
- 121—REVESZ T., SHULLER D., GOLDSCHMIDT B., ELODI S. Christmas disease in one of a pair of monozygotic twins, possibly the effect of lyonization. *J Med Genet* 9: 396, 1972.
- 122—RICK ME., HOYER LW. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII) V. Immunologic properties of AHF subunits produced by salt dissociation. *Blood* 42: 737-747, 1973.
- 123—RICK ME. Activation of factor VIII by factor IXa. *Blood* 60: 744-751, 1982.
- 124—RIZZA CR., RHYMES IL., AUSTEN DEG., KERNOFF PBA., ARONI SA. Detection of carriers of haemophilia: a "blind" study. *Brit J Haematol* 30: 447-456, 1975.
- 125—RIZZA CR. Management of patients with inherited blood coagulation defects. In: *Haemostasis and thrombosis*. Bloom AL, Thomas DP eds. p 374. Churchill Livingstone 1981.
- 126—ROBERTS HR., GRIZZLE JE., McLESTER WD., PENICK GD. Genetic variants of hemophilia B: detection by means of a specific PTC inhibitor. *J Clin Invest* 47: 360-365, 1968.
- 127—RODECK CH. Fetoscopy guided by real time ultrasound for pure fetal blood samples, fetal skin samples and examination of the fetus in utero. *Brit J Obstet Gynaec* 87: 449-456, 1980.
- 128—ROSENBERG JS. Inhibition of human factor IXa by human anti-thrombin. *J Biol Chem* 250: 8883, 1975.

- 129- RUGGERI ZM., PARETTI FI., MANNUCCI PM., CIAVARELLA N., ZIMMERMAN TS. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 302: 1047-1051, 1980.
- 130- RUGGERI ZM., ZIMMERMAN TS. Variant von Willebrand disease. Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J Clin Invest* 65: 1318-1325, 1980.
- 131- SEEF LB., HOOFNAGLE J. Acute and chronic liver disease in hemophilia. In: *Unsolved therapeutic problems in hemophilia*. Frantoni JC, Asonson DL ed. DHEW Public (NIH) 77-1089 US Gov. Print Office Washington DC 1976.
- 132- SELIGSOHN U., OSTERUD B., BROWN SF., GRIFFIN J., RAPAPORT SI. Activation of human factor VIII in plasma and purified systems. Roles of activated factor IX, kallikrein and activated factor XII. *J Clin Invest* 64: 1056-1065, 1979.
- 133- SHAPIRO SS., HULTIN M. Acquired circulating anticoagulants in hemophilia A. *N Engl J Med* 281: 866, 1969.
- 134- SHAPIRO GA., ANDERSEN JC., PIZZO SV., McKEE PA. The subunit structure of normal and hemophilic factor VIII. *J Clin Inv* 52: 2198-2210, 1973.
- 135- SHAPIRO SS., HULTIN M. Acquired inhibitors to the blood coagulation factors. *Semm Thromb Hemost* 1: 336-385, 1975.
- 136- SHAW E., GIDDINGS JC., PEAKE IR., BLOOM AL. Synthesis of procoagulant factor VIII, factor VIII related antigen and other coagulation factors by the isolated perfused rat liver. *Brit J Haematol* 41: 585-596, 1979.
- 137- SHERMAN IA. Circulating anticoagulant (antifactor VIII) treated with immunosuppressive drugs. *Thromb Diath Haemorrh* 21: 249-258, 1969.
- 138- SHULMAN NR. A new method for measuring minimum in vitro concentrations of factor VIII applied to distribution and survival studies and in detecting factor VIII inhibitors. In: *The hemophilias, an International Symposium*. Brimkhauss KM ed. pag 29. Chapel Hill: UNC Press 1964.
- 139- SODETZ JM., PIZZO SV., McKEE P. Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. *J Biol Chem* 252: 5538-5546, 1977.

- 140- STARK SN., WHITE JG., KRIVIT W. Epsilon-aminocaproic acid therapy as a cause of intrarenal obstruction in haematuria of haemophiliacs. *Scand J Haematol* 2: 99-107, 1965.
- 141- STENBJERG S., JORGENSEN J. Activated F IX concentrate (FEIBA) used in the treatment of hemophilic patients with antibody to FVIII. *Acta Med Scand* 203: 471-474, 1978.
- 142- STEVENSON AC., KERR CB. On the distribution of frequencies of mutation to genes determining harmful traits in man. *Mutat Res* 4: 339-352, 1967.
- 143- STITES DP. Factor VIII detection by hemagglutination inhibition: hemophilia A and von Willebrand's disease. *Science* 171: 196, 1971.
- 144- STRAUSS HS. Acquired circulating anticoagulants in hemophilia A. *N Engl J Med* 281: 866, 1969.
- 145- STUTMAN LJ. Coagulation factors in human lymph and plasma. *Am J Med Sci* 250: 292, 1965.
- 146- SUONELA H. Human coagulation factor IX. Isolation and characterization. *Europ J Biochem* 71: 145-154, 1976.
- 147- SWITZER ME., KcKEE PA. Studies on human antihemophilic factor. *J Clin Invest* 57: 925-937, 1976.
- 148- THOMPSON AR. Factor IX antigen by radioimmunoassay in heterozygotes for hemophilia B. *Thromb Res* 11: 193-203, 1977.
- 149- THOMPSON AR., RATNOFF OD., POWELL AE. Factor IX antigen by radioimmunoassay: abnormal factor IX protein in patients on warfarin therapy and with hemophilia B. *J Clin Invest* 59: 900-910, 1977.
- 150- TUDDENHAM EGD., TRABOLD NC., COLLINS JA., HOYER LW. The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoabsorbent chromatography. *J Lab Clin Med* 93: 40-53, 1979.
- 151- VELCAR GA., DAVIE EW. Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). *Biochem* 19: 401-410, 1980.
- 152- VELTKAMP JJ., DRION EF., LOELIZER EA. Detection of the carrier state in hereditary coagulation disorders. *Thromb Diath Haemorrh* 19: 279-303, 1968.
- 153- VELTKAMP JJ., VAN TILBURG NH. Autosomal hemophilia: a variant of von Willebrand disease. *Brit J Haematol* 26: 141-152, 1974.

- 154- WEBER K., OSBORN M. Proteins and sodium dodecyl sulphate: molecular weight determinations on polyacrilamide gels and related procedures. In: The proteins. Neurath H. Hill RL ed. p 180-221. Academic Press New York 1975.
- 155- WEBSTER WP., ZUKOSKJ CF., HUTCHIN P., REDDICK RL., MANDEL ST., PENICK GD. Plasma factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation. *Am J Physiol* 220: 1147-1154, 1971.
- 156- WEISS HJ. A study of the cation and pH dependent stability of factors V and VIII in plasma. *Thromb Diath Haemorrh* 14: 32-51, 1965.
- 157- WEISS HJ., KOCHWA S. Molecular forms of antihemophilic globulin in plasma, cryoprecipitate and after thrombin activation. *Brit J Haematol* 18: 89-100, 1970.
- 158- WEISS HJ., HOYER LW: Von Willebrand factor: Dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. *Science* 182: 1149-1151, 1973.
- 159- WEISS HJ., HOYER LW., RICKLES FR., VARMA A., ROGERS J. Quantitative assay of a plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. *J Clin Invest* 52: 2708, 1973.
- 160- YANG HC. Immunologic studies of factor IX (Christmas factor) II Immunoradiometric assay of factor IX antigen. *Brit J Haematol* 39: 215-224, 1978.
- 161- ZIMMERMAN TS., RATNOFF OD., POWELL AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. *J Clin Invest* 50: 244-254, 1971.
- 162- ZIMMERMAN TS., RATNOFF OD., LITTELL AS. Detection of carriers of classic hemophilia using an immunologic assay for antihemophilic factor (Factor VIII) *J Clin Invest* 50: 255-258, 1971.
- 163- ZIMMERMAN TS., EDGINGTON TS. Factor VIII coagulant activity and factor VIII like antigen. Independent molecular entities. *J Exp Med* 138: 1015-1020, 1973.
- 164- ZIMMERMAN TS., HOYER LW., KICKSON L., EDGINGTON TS. Determination of the von Willebrand's disease antigen (factor VIII related antigen) in plasma by quantitative immunoelectrophoresis. *J Lab Clin Med* 86: 152-159, 1975.

165—ZIMMERMAN TS., ROBERTS J., EDGINGTON TS. Factor VIII related antigen: Multiple molecular forms in human plasma. Proc Nat Acad Sci USA. 72: 5121-5125, 1975.

166—ZIMMERMAN TS., ABILDGAARD CF., MEYER D. The factor VIII abnormality in severe von Willebrand's disease. N Engl J Med 301: 1307-1310, 1979.

---