

## Notas Científicas

# Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante la metodología de Nijmegen en pacientes con hemofilia

## Frequency of factor VIII inhibitor using the Nijmegen methodology in patients with hemophilia

Karla Molina Maldonado<sup>1</sup>  , Wendy Guerrero Vinueza<sup>1</sup>  ,  
Marcela Mardones Montañares<sup>1,2\*</sup>  

<sup>1</sup> Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

<sup>2</sup> Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISEAL), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

DOI: <https://doi:10.26807/remcb.v46i1.1009> | \*Autor de correspondencia: [mmardones382@puce.edu.ec](mailto:mmardones382@puce.edu.ec)

Fecha de envío: 06/08/2024 | Fecha de aceptación: 28/04/2025 | Fecha de publicación: 30/05/2025

**Resumen.-** Una de las complicaciones más grandes de un paciente hemofílico es el desarrollo de inhibidores, al mismo tiempo es uno de los desafíos más importantes para los médicos tratantes, por lo tanto, su detección temprana y la búsqueda de una prueba que apoye el diagnóstico es de gran importancia para el tratamiento adecuado del paciente con hemofilia. La presencia de inhibidores se encuentra asociada a esta morbilidad, la cual está acompañada de complicaciones hemorrágicas y baja calidad de vida. El objetivo de la investigación fue determinar inhibidores en pacientes hemofílicos mediante la prueba de Nijmegen, como una técnica que permite detectar bajos niveles de inhibidores. La metodología fue descriptiva y transversal. La frecuencia del inhibidor del FVIII fue 11.84 % en 118 pacientes que se realizaron la prueba. El 64.28 % fueron bajos respondedores con un título por inferior a las 5 (Unidades Nijmegen Bethesda) UNB y el 35.71 % altos respondedores con una respuesta superior a 5 UNB. El grupo etario con presencia de inhibidores se conformó por 16.66 % de preescolares, 23.07 % de escolares, 26.31 % de adolescentes y, finalmente, 4.76 % de adultos. La presencia de inhibidores se asocia con un alto riesgo para los pacientes, en especial población joven. Es crucial priorizar las pruebas de laboratorio con metodologías sensibles y confiables para los resultados. Se recomienda realizar más investigaciones en la comunidad con esta patología y estudiar otras variables que intervienen en el desarrollo de inhibidores.

**Palabras clave:** anticuerpo, hemofilia, inhibidor de FVIII, morbilidad, calidad de vida.

**Abstract.-** One of the greatest complications in hemophiliac patients is the development of inhibitors. It is also one of the most significant challenges for treating physicians. Therefore, early detection and the search for a test to support the diagnosis are of great importance for the proper treatment of patients with hemophilia. The presence of inhibitors is associated with this morbidity, which is accompanied by bleeding complications and low quality of life. The objective of this study was to determine inhibitors in hemophiliac patients using the Nijmegen test, a technique that allows the detection of low levels of inhibitors. The methodology was descriptive and cross-sectional. The frequency of FVIII inhibitors was 11.84% of 118 patients who underwent the test. 64.28% were low responders with a titer below 5 (Nijmegen Bethesda Units) NBU, and 35.71% were high responders with a response greater than 5 BUN. The age group with inhibitors included preschoolers (16.66%), schoolchildren (23.07%), adolescents (26.31%), and finally, adults (4.76%). The presence of inhibitors is associated with a high risk for patients, especially young people. It is crucial to prioritize laboratory testing with sensitive and reliable methodologies for results. Further research is recommended in the community with this pathology to study other variables involved in developing inhibitors.

**Keywords:** antibody, hemophilia, FVIII inhibitor, morbidity, quality of life.



## Introducción

La hemofilia es una enfermedad genética recesiva ligada al cromosoma X. Los estudios más recientes estiman una prevalencia de 25 casos por cada 100 000 nacimientos masculinos (Iorio et al. 2019). Esta enfermedad es causada por diversas mutaciones heterogéneas en el gen F8, como inversiones, mutaciones puntuales que producen el reemplazo de aminoácidos, mutaciones sin sentido, defectos en los sitios de empalme del ARN, duplicaciones e inserciones (Hwang et al. 2012). Como resultado, se generan deficiencias cuantitativas o funcionales en la proteína y se incrementa la probabilidad de formación de inhibidores a lo largo de la vida del paciente, lo que puede dar lugar a complicaciones graves, algunas de las cuales pueden ser fatales. En pacientes con hemofilia severa, la presencia de inhibidores se observa en un 20 a 30 % de los casos, lo que, en muchos casos, reduce la esperanza de vida (Gouw et al. 2013).

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) clasifica la hemofilia como una enfermedad catastrófica, incluyéndola en el grupo de enfermedades raras o huérfanas y catastróficas (MSP 2012). En 2018, el MSP reportó 799 casos de hemofilia, siendo la hemofilia A la más frecuente, con 584 casos, causada por la disminución o ausencia del factor VIII (FVIII) (MSP, 2018). En 2020, el informe anual de la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) indicó que el tratamiento de elección para pacientes con hemofilia fue la administración de concentrado de FVIII liofilizado derivado del plasma, con 34 943 250 unidades utilizadas, seguido por el FVIII recombinante de vida media prolongada, con 6 174 000 unidades. Esto implica un uso per cápita de 2 331 unidades de FVIII (FMH, 2020). A nivel nacional, en ese mismo año, se diagnosticaron 21 pacientes con inhibidores activos (FMH 2020; MSP 2022).

Si bien, la administración de FVIII derivado del plasma es útil, se estima que, alrededor de un 20 a 30 % de pacientes con hemofilia severa y del 5 % a 10 % con hemofilia moderada o leve, desarrollan inhibidores (Hwang et al. 2012). La presencia de estos inhibidores en personas con hemofilia A dependerá de varios factores que influyen en su aparición como el genotipo de F8, la historia familiar, el inicio temprano de la terapia de reemplazo, la genética principalmente por la inversión de intrón 22 y otras mutaciones menos frecuentes, lo que resulta una complicación grave de la enfermedad, porque disminuye la calidad de vida del paciente hemofílico (Müller et al. 2019).

En los últimos años, se han logrado importantes avances en las técnicas de diagnóstico, lo que ha permitido una detección más rápida de la hemofilia y, en consecuencia, contribuido a reducir la mortalidad y la morbilidad en los pacientes. Sin embargo, en países con recursos limitados, el diagnóstico insuficiente de inhibidores repercute en la falta de tratamiento adecuado, lo que afecta negativamente la esperanza de vida de los pacientes (Iorio et al., 2019). A esto se suman las complicaciones en el tratamiento, como la ausencia de protocolos específicos para la profilaxis de inhibidores, lo que incrementa la morbilidad en un 30 a 40 %. En contraste, los pacientes con acceso a tratamiento pueden enfrentar dificultades adicionales, como el difícil acceso venoso, lo que complica aún más su manejo (Balkaransingh y Young, 2018).

El inhibidor de FVIII es una inmunoglobulina tipo G policlonal de alta afinidad que neutraliza la actividad procoagulante del factor correspondiente. Este inhibidor puede clasificarse según su respuesta en alta o baja, en función de su título o concentración después de la infusión del factor de reemplazo (Witmer y Young, 2013). Los factores que influyen en su aparición pueden ser genéticos. Se

ha observado una mayor probabilidad en familias con antecedentes de hemofilia, con un riesgo de 3.2 de que, si un hermano presenta inhibidores, otro hermano también pueda desarrollarlos (Villarreal-Martínez et al. 2020). Además, los pacientes con mutaciones nulas tienen un alto riesgo de desarrollar inhibidores en algún momento de su vida. La etnia también influye en su aparición, así como factores no genéticos como el tiempo de administración del tratamiento (Villarreal-Martínez et al. 2020). En hemofilia grave, se ha demostrado que, después de las 50 primeras exposiciones al factor, el riesgo de desarrollar inhibidores disminuye (Pratt et al. 2021). Los pacientes que reciben tratamiento profiláctico por largo tiempo se exponen a más unidades de FVIII durante períodos determinados a diferencia de los que tienen tratamiento a demanda, con mayor riesgo en la formación de inhibidores y el origen de los productos elaborados de FVIII podrían ser más inmunógenos que otros, facilitando la formación de inhibidores (Villarreal-Martínez et al. 2020).

El desarrollo de inhibidores de FVIII es uno de los mayores problemas en el tratamiento de los pacientes con hemofilia A (HA), ya que estos no controlan los procesos hemorrágicos con la dosis usual de factor liofilizado. Esto complica significativamente tanto el tratamiento como el control de las hemorragias (MSP, 2018). El tratamiento de un paciente con hemofilia A que ha desarrollado inhibidores depende de la respuesta del inhibidor. En casos de inhibidores de baja respuesta, el tratamiento consiste en un proceso de inmunotolerancia (ITI), que implica la administración de dosis elevadas durante algunos meses de concentrados de FVIII recombinante o plasmático para neutralizar el inhibidor y es efectiva en el 65 y 70 % de los pacientes (Meijer et al. 2023). Sin embargo, la erradicación de inhibidores se vuelve más compleja en pacientes con inhibidores de alta respuesta y títulos elevados. Para estos casos, se recomienda el uso de agentes de desvío, como FVIIa recombinante y/o concentrados de complejo protrombínico activado (Meijer et al. 2023). Un tratamiento alternativo que ha mostrado buenos resultados es el anticuerpo monoclonal humanizado emicizumab, utilizado como profilaxis de rutina para evitar o reducir hemorragias, aunque también se menciona el riesgo de eventos trombóticos (Pratt et al. 2021).

El inhibidor de FVIII representa uno de los mayores desafíos para los pacientes, sus familias, los médicos tratantes y, en general, para los sistemas de salud, que deben afrontar los altos costos asociados con el tratamiento y el seguimiento de esta enfermedad (Carcao y Goudemand 2018). A esta problemática se añade la falta de estandarización en las pruebas de inhibidores. Ciertas técnicas de laboratorio, como la prueba Bethesda, es la más utilizada para detectar inhibidores, sin embargo, presenta una variación entre el 20 y 30% entre los laboratorios en los programas de calidad externos (Meijer et al. 2023). El estudio de Valke et al. (2023), menciona un coeficiente de variación (CV) de 24.2 % en la prueba realizada con la modificación con Nijmegen, basada en la directriz EP17A del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), que menciona como criterio un CV menor al 25 % en la prueba. Los controles de calidad externo mencionan falsos positivos en las pruebas hasta 32 % y falsos negativos hasta 5 %, por esta razón en la estandarización de la prueba se deberá utilizar pool de plasma normal bufferado (Carcao y Goudemand 2018). El objetivo de esta modificación es que el pH permita mantener la prueba estable por las dos horas de incubación y evitar interferencias de patologías como lupus eritematoso que puede provocar falsos positivos para el inhibidor (Arias 2016; Meijer et al. 2023).

En esta investigación se propuso la modificación validada de la prueba de Bethesda, conocida como la modificación Nijmegen, con el objetivo de mejorar la sensibilidad en la detección de inhibidores en cantidades bajas (Carcao y Goudemand 2018). Esta modificación incluye el uso de un buffer de imidazol y plasma deficiente de FVIII comercial, lo que permite sensibilizar la prueba y detectar títulos bajos de inhibidor. La técnica ha sido aprobada por el Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISTH). Antes de correr las pruebas de los pacientes (y como una manera de estandarizar) se realizaron pruebas de pacientes normales con diluciones y se corrieron pruebas conocidas con inhibidores. Una implementación estandarizada busca proporcionar un tratamiento oportuno, mejorar las condiciones de los pacientes y reducir los problemas asociados. La detección temprana de inhibidores también tiene el potencial de disminuir los costos del tratamiento, lo que a su vez beneficia la inversión en salud que realiza el Estado.

Es importante tener en cuenta que la prueba de Bethesda puede presentar resultados falsos negativos y positivos en pacientes con títulos bajos de inhibidor, lo que dificulta una detección temprana y un tratamiento adecuado (Meijer et al. 2023). Además, la concentración y la respuesta a los inhibidores pueden variar a lo largo del tiempo, aumentando o disminuyendo, e incluso desapareciendo en algunos casos. Por esta razón, es crucial realizar un seguimiento continuo para erradicar los inhibidores de manera efectiva sin comprometer la salud del paciente (Peyvandi et al. 2022). En este contexto, la detección temprana de inhibidores y la evaluación de la respuesta de los pacientes al tratamiento con FVIII son esenciales. Por ello, el estudio busca determinar la frecuencia de inhibidores al FVIII en pacientes con hemofilia A que reciben tratamiento con FVIII liofilizado mediante la modificación de Nijmegen. Asimismo, se pretende relacionar el grado de severidad de la hemofilia y la presencia de los inhibidores. Según lo mencionado por Lim M et al. (2020), en la mayoría de las publicaciones señalan que el desarrollo de inhibidores se encuentra en pacientes con hemofilia A severa, de esta manera se pretende orientar el tratamiento oportuno que deben tener los pacientes con esta enfermedad al presentar inhibidores.

## **Materiales y Métodos**

El método de estudio fue observacional, descriptivo y transversal.

**Población.** - La muestra estuvo conformada por 118 hombres con hemofilia A en edades comprendidas de 1 y 65 años, que recibieron de manera constante como tratamiento FVIII liofilizado y no presentaban lupus eritematoso. La toma de muestra fue en la Fundación Hemofílica Ecuatoriana (FUNDHEC) - Núcleo Pichincha en Quito (ubicado en la Av. Colón y Pinzón). Las muestras de estudio se recolectaron de acuerdo con los siguientes grupos de edad: 24 niños en etapa preescolar (1 - 4 años), 13 niños en etapa escolar (5 - 11 años), 19 adolescentes (12 - 18 años), 42 adultos (18 - 65 años) y 20 adultos mayores (más de 65 años) (Tabla 1). Según la gravedad de la patología asistieron pacientes con hemofilia severa (< 1 % de FVIII), hemofilia moderada (1 - 5 %), y leve (5 - 40 %). Todos los pacientes recibieron profilaxis y terapia a demanda en los hospitales públicos avalados por el MSP para su tratamiento. El FVIII exógeno interviene en la prueba de inhibidores, provocando falsos negativos. Por tal razón, se solicitó que el paciente asista sin colocarse el factor, 72 horas antes, otra alternativa, realizada en el laboratorio fue calentar el plasma a 56 °C por 30 min. para desnaturalizar el FVIII y que se evidencien los inhibidores, como una forma de estandarizar las muestras que serán procesadas.

**Tabla 1.** Clasificación de pacientes positivos para inhibidor con modificación Nijmegen según respuesta del inhibidor, severidad de la enfermedad y el tiempo de exposición al factor.

Categoría de edad	N	Pacientes positivos						Tiempo de exposición en años
		Respuesta al inhibidor n (%)	Bajo		Severidad de la enfermedad			
			Alto	Leve	Moderado	Severo		
Preescolar 1 - 4 años	24	4 (16.66)	3	1	0	2	2	1 - 5
Escolar 5 - 11 años	13	3 (23.07)	1	2	0	2	1	1 - 10
Adolescentes 12 - 18 años	19	5 (26.31)	3	2	0	1	4	10 - 18
Adultos 18 - 65 años	42	2 (4.76)	2	0	1	0	1	> 18 años
> 65 años	20	-	-	-	-	-	-	> 18 años
<b>TOTAL</b>	<b>118</b>	<b>14 (11.84)</b>	<b>9 (64.28)</b>	<b>5 (35.71)</b>	<b>1 (7.14)</b>	<b>5 (35.71)</b>	<b>8 (57.14)</b>	

N=número de pacientes; n (%)= número de pacientes positivos (porcentaje de de pacientes positivos para el inhibidor según la edad).

El estudio tuvo la aprobación del CEISH, código 2018-20MB y la encuesta se realizó una vez aceptado y firmado el consentimiento informado de cada individuo o a su representante legal. Los datos recolectados fueron: edad, grado de severidad de la enfermedad, inicio de tratamiento con FVIII, y si se ha realizado la prueba de inhibidores, manteniendo confidencialidad en el tratamiento de los datos obtenidos.

**Colección y análisis de muestras.** - Las muestras sanguíneas fueron de pacientes con hemofilia A recolectadas en tubos con citrato de sodio al 3.2 % en una relación sangre/anticoagulante 9:1, se las centrifugó a 3 500 rpm durante 15 minutos para la obtención de plasma pobre en plaquetas, según las recomendaciones de la FMH (Kitchen et al. 2010). Se calentaron los plasmas a 56 °C por 30 min. (Meijer et al. 2023). Las variables cualitativas fueron edad del paciente, la presencia o ausencia del inhibidor, si su resultado fue alto o bajo respondedor, si recibieron tratamiento con FVIII y el tiempo de las terapias recibidas. Las variables cuantitativas fueron el título del inhibidor por cada paciente y el nivel de FVIII.

Para la determinación de los inhibidores mediante la técnica Nijmegen se rotularon dos tubos: el tubo control y el tubo del paciente. El tubo control estuvo conformado por plasma normal (pool de plasma de 20 muestras con valores normales de TTP, TP y FVIII) más buffer imidazol pH 7.4 y plasma deficiente de FVIII con niveles normales de factor de von Willebrand (vWF), en partes iguales. Por otro lado, el tubo paciente estuvo conformado por el plasma del paciente más buffer imidazol pH 7.4, en proporciones equivalentes. Se incubaron los tubos a 37 °C por dos horas. Finalmente, se realizó la lectura de los tubos en el equipo coagulométrico CA 660 Siemens para la cuantificación de FVIII. Se calculó el FVIII residual = FVIII mezcla paciente x 100/FVIII mezcla control.

El resultado superior a 75 % indicó un nivel de FVIII residual, negativo para inhibidor y, si el valor obtenido fue inferior al 25 % el paciente presentó inhibidores, entonces el plasma del paciente fue sometido a diferentes diluciones para establecer el título del inhibidor, seguido el resultado se cuantifica dentro de los porcentajes mencionado y finalmente se multiplica por el grado de dilución. En la cuantificación del inhibidor, se establece que la unidad Bethesda (UB) es la cantidad del inhibidor capaz de destruir el 50 % del FVIII (Kitchen et al. 2010), esto significa que entre 25 y 75 %, se obtiene el título del inhibidor sin requerir diluciones. Para el cálculo del inhibidor se obtuvo la cantidad FVIII residual vs. Unidades Nijmegen Bethesda (UNB) por ml (Kitchen et al. 2010). El comité científico y de normalización en Hemostasia y Trombosis (2024), indicó considerar las pruebas positivas a partir de un valor  $\geq 0.6$  UNB/ml. Los inhibidores se clasifican en inhibidores bajos respondedores cuando los resultados son  $\leq 5$  UNB y altos respondedores cuando los resultados son  $\geq 5$  UNB (Rezende et al. 2024). Todas las pruebas fueron realizadas en el laboratorio de hematología de la Facultad de Medicina, carrera de Laboratorio Clínico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador-sede Quito (PUCE).

Todos los procedimientos realizados en el laboratorio cumplieron un riguroso control de calidad tanto en la recolección, transporte y conservación de la muestra, así como en su análisis. Para el control de calidad del equipo se siguió la norma CLSI EPI 5A3 y se corrieron controles normales y patológicos del FVIII para la obtención de resultados confiables. Para el análisis de la información de la encuesta y los resultados del laboratorio se utilizó la versión 25.0 del programa estadístico SPSS. En la información de las variables cualitativas y cuantitativas se elaboraron frecuencias absolutas y relativas, se calcularon las medidas de tendencia central y dispersión, para la asociación de variables, grado de severidad de la HA vs. respuesta al inhibidor al FVIII; asimismo, la asociación de tiempo de exposición al tratamiento vs. la respuesta al inhibidor al FVIII se utilizó tablas de contingencia y se aplicó la prueba de chi cuadrado, para un alfa del 0.05.

## Resultados

Las muestras recolectadas en el estudio fueron de 118 pacientes con hemofilia A, quienes recibieron tratamiento con FVIII liofilizado en hospitales públicos y fueron inscritos en la FUNDHEC - Núcleo-Pichincha. Para evitar interferencias con la terapia recibida, los pacientes no fueron expuestos a concentrados de FVIII liofilizado durante al menos 72 horas antes de la toma de muestras. De los 118 pacientes, 14 (11.9 %) presentaron inhibidores de FVIII y 104 (88.1 %) fueron negativos para la prueba.

La distribución de los 14 pacientes positivos en relación con el grupo etario fue la siguiente: en etapa preescolar de 1 a 4 años, se detectaron cuatro pacientes (16.66 %), de los cuales tres presentaron inhibidores de baja respuesta y uno de alta respuesta. En etapa escolar de 5 a 11 años, se identificaron tres pacientes (23.07 %) uno con inhibidor de baja respuesta y dos de alta respuesta. En la adolescencia de 12 a 18 años, se detectaron cinco pacientes (26.31 %) tres presentaron inhibidores de baja respuesta y dos de alta respuesta. Finalmente se detectaron dos adultos (4.76 %), entre 18 a 65 años, ambos con inhibidores de baja respuesta. No se detectaron pacientes con inhibidores en las muestras de individuos de  $> 65$  años. En cuanto a la gravedad de la hemofilia, el 57.14 % de los pacientes con hemofilia A fueron clasificados como severos, el 35.71 % moderado y el 7.14 % leve. Del total de pacientes positivos para inhibidores, el 64.28 % presentaron inhibidores de baja respuesta, mientras que el 35.71 % tuvieron inhibidores de alta respuesta (Tabla 1).

Se realizó la asociación entre el grado de severidad de la hemofilia y los resultados obtenidos del inhibidor. En los pacientes con hemofilia severa (57.1 %), cuatro (50 %) presentaron inhibidores altos respondedores y cuatro (50 %) fueron bajos respondedores. En los pacientes con hemofilia moderada (35.7 %), uno (20 %) presentó inhibidor alto respondedor y cuatro (80 %) bajo respondedores. El paciente con hemofilia leve (7.14 %) fue bajo respondedor. No se encontró una asociación significativa  $< 0.05$  ( $p = 0.34$ ), entre la severidad de la enfermedad y la respuesta a los inhibidores, la razón podría ser el porcentaje bajo de pacientes con resultados positivos para el inhibidor. Uno de los factores que incrementa la probabilidad de presentar inhibidores es el tiempo de exposición al FVIII, esto podría suceder en niños que utilizan terapia a demanda o después de iniciada la profilaxis. En el estudio los cinco pacientes que resultaron altos respondedores ( $> 5$  UNB) se reportaron en etapa preescolar hasta la adolescencia, un factor determinante sería la frecuencia con la que recibieron la profilaxis y la terapia a demanda (Tabla 1).

El estudio presentó algunas limitaciones que deben considerarse como la imposibilidad de determinar el tiempo exacto de exposición al FVIII, además la falta de información sobre el origen del plasma utilizado en el tratamiento, así como el escaso registro sobre el monitoreo de los pacientes en los hospitales, son factores que influyeron y que deberán tomarse en cuenta en próximos estudios.

## Discusión

El desarrollo de inhibidores es una complicación grave para los pacientes con hemofilia y su detección temprana permite un tratamiento adecuado, mejorando tanto la expectativa como la calidad de vida del paciente. El manejo de los inhibidores dependerá del grado de severidad de la enfermedad y de la respuesta al inhibidor (Peyvandi et al. 2022); Da Silva Pinto María et al. 2022). En pacientes con hemofilia leve o moderada, la exposición prolongada a los concentrados de FVIII aumenta el riesgo de desarrollar inhibidores, lo que se complica aún más con enfermedades relacionadas con la edad. Si esta situación no se resuelve adecuadamente, podría convertirse en una carga significativa en el tratamiento de la hemofilia (Eckhardt et al. 2013).

En hemofilia severa, la presencia de inhibidores es prevalente, alcanzando hasta un 30 %. En estos pacientes, especialmente niños, los inhibidores suelen desarrollarse entre los 20 y 50 días de exposición al FVIII, ya sea con terapia a demanda o profilaxis, esto se debe a que su sistema inmunológico aún está en desarrollo y puede ser más propenso a la producción de anticuerpos. La prueba de inhibidores se realiza cuando el paciente no responde a la terapia habitual, siendo la prueba de Bethesda la más utilizada para su confirmación (Carcao y Goudemand 2018; Gandhi et al. 2020). Desde 1970, se han implementado modificaciones a la prueba de Bethesda, como es la técnica de Nijmegen, recomendada por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH), que incluye plasma normal bufferado y mejora la sensibilidad de la prueba (Ketteler et al. 2022). En este estudio, la modificación técnica, realizada con Nijmegen permitió detectar inhibidores en pacientes con títulos bajos, lo que, con tratamiento, puede eliminar los anticuerpos y reducir la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Gandhi et al. (2020) sugieren que el precalentamiento de las muestras de plasma de los pacientes podría ser un método potencial para eliminar el FVIII y permitir una mejor monitorización de los inhibidores mediante la modificación Nijmegen (mNBA).

En 2020, la FMH reportó 21 casos de pacientes en Ecuador con inhibidores de alta respuesta que no respondieron al tratamiento habitual. Un estudio de Villarreal M et al. (2020) recopiló datos de Latinoamérica y señaló una frecuencia de inhibidores en hemofilia A de entre el 12 % y el 35 %. En Guatemala, un estudio Álvarez (2015), reportó una frecuencia del 20 %, reflejando una correlación con otros estudios, aunque esta cifra puede variar según la población estudiada. Además, investigaciones han demostrado que la población hispana tiene el doble de probabilidad de desarrollar inhibidores en comparación con la población caucásica (Villarreal et al. 2020). Los factores que influyen en la aparición de inhibidores incluyen mutaciones en el gen F8, antecedentes familiares de inhibidores y la raza (Dou et al. 2021). También se ha señalado que el tipo de producto administrado, el tiempo de exposición, la intensidad del tratamiento y una monitorización insuficiente pueden contribuir a la formación de inhibidores (Young 2019).

La prevención y erradicación de los inhibidores en niños es importante debido a su asociación con sangrados persistentes, que pueden dejar secuelas de por vida. Los estudios demuestran que del 20 - 25 % de estos pacientes con inhibidores presentan hemorragias intracraneales, las cuales pueden causar secuelas neurológicas permanentes, de ahí radica la importancia de su detección (Chalmers et al. 2018). La FMH ha indicado que los niños que reciben tratamiento con FVIII por períodos breves son más propensos a desarrollar inhibidores, mientras que la probabilidad en adultos que reciben tratamiento a largo plazo es menor. En el estudio realizado con la modificación de Nijmegen, las muestras recolectadas entre 1 y 18 años evidenciaron 12 pacientes con inhibidores al FVIII, de los cuales cinco fueron de alta respuesta ( $> 5$  UNB/ml) y siete de baja respuesta ( $< 5$  UNB/ml). Estos resultados resaltaron la importancia de realizar evaluaciones de rutina sin limitarlas únicamente a los casos de falta de respuesta al tratamiento. En cambio, la frecuencia de inhibidores en pacientes adultos fue baja, se encontró 2 pacientes con inhibidores de baja respuesta.

El estudio realizado por Mardones et al. (2017) identificaron mediante la prueba Bethesda en un grupo etario promedio de 21 años, 11.90 % con inhibidor alto respondedor ( $> 5$ UB). En este estudio realizado con la modificación de Nijmegen, 35.71 % de los individuos fueron positivos para inhibidor alto respondedor, esto indica la importancia de tener un seguimiento en pruebas de inhibidores de manera temprana y rutinaria y no solo cuando el paciente no responde al tratamiento, ya que la presencia de inhibidores limita la calidad de vida del paciente, aumenta la morbilidad y mortalidad asociada a hemorragias, y es inefectivo el tratamiento en las artropatías con dolor e incapacidad. Según la guía clínica del Ministerio de Salud Pública (MSP), La primera línea de tratamiento es la profilaxis y se debería continuar hasta su madurez física, sin limitaciones, para mejorar su calidad de vida a largo plazo. La guía menciona necesario realizar estas pruebas antes de una cirugía, cuando los análisis de recuperación no son satisfactorios, o si la respuesta clínica a los tratamientos de hemorragia es insuficiente durante el periodo postoperatorio (MSP 2016), no menciona la importancia de realizar las pruebas entre seis meses y un año para el control de aparición de estos inhibidores.

En relación con la severidad de la enfermedad, el estudio realizado con la modificación de Nijmegen, detectaron cinco pacientes con hemofilia severa e inhibidores de alta respuesta que requirieron tratamiento inmediato debido a la alta probabilidad de hemorragias espontáneas. De los 14 pacientes positivos para inhibidores, el 7.14 % fue clasificado con hemofilia leve, el 35.71 % con hemofilia moderada y el 57.14 % con hemofilia severa. Aunque existieron variaciones en las frecuencias obtenidas en este estudio en comparación con investigaciones previas, se observa que los pacientes con hemofilia

severa presentan una mayor frecuencia de inhibidores. La hemofilia al ser una enfermedad hereditaria tiene menos de la proteína (FVIII), que cumpla con su función correctamente, uno de los factores de riesgo según la gravedad de la enfermedad será la formación de inhibidores que, entre otros factores predisponentes, es importante el factor genético. Key (2004) y Lim et al. (2020), destacan que la hemofilia A severa como un factor predictivo de riesgo para el desarrollo de inhibidores, especialmente en pacientes con delección del intrón 22, presente en el 35 % de los casos, en comparación con otros tipos de mutaciones, que solo representan el 5 %.

Cuando hay la presencia de inhibidores en pacientes hemofílicos, lo inmediato será el tratamiento indicado por el médico especialista y prevenir las hemorragias y, a largo plazo, la erradicación permanentemente el inhibidor. La estrategia terapéutica puede variar según el título del inhibidor. Para títulos bajos, se emplean dosis altas de FVIII, mientras que para títulos altos se requieren agentes de desvío (Haya 2019). En este estudio, utilizando la modificación de Nijmegen, se identificaron nueve pacientes (64.28 %) con inhibidor de título bajo entre los 14 individuos que fueron positivos para el inhibidor. Aunque estos anticuerpos pueden ser transitorios y suelen desaparecer en un lapso de seis meses, requieren monitoreo cada cuatro semanas, debido al riesgo de evolucionar a inhibidores de alta respuesta (Carcao y Goudemand 2018).

Witmer y Young (2013) señalan que un tratamiento intensivo o una exposición inicial y prolongada a los concentrados de FVIII, conlleva el riesgo de desarrollar inhibidores. Pacientes que reciben tratamiento intensivo tiene un riesgo de 3.3 veces mayor si el paciente recibió tratamiento al menos durante cinco días, o es más factible presentar los inhibidores si recibió tratamiento a demanda, a diferencia de los que reciben el tratamiento profiláctico (MSP 2016). Será importante determinar, en próximos estudios si el paciente presentó intervenciones quirúrgicas mayores o traumatismos que hayan aumentado la demanda del uso de factor, o una exposición intensa a tempranas edades del factor, o el uso de diferentes tipos de concentrados de FVIII utilizado como terapia, queda como interrogante en los pacientes que presentaron inhibidores de alta respuesta. La presencia de inhibidores se asocia con un alto riesgo para los pacientes, especialmente en la población joven. Es crucial priorizar las pruebas de laboratorio con metodologías sensibles que aseguren la calidad de los resultados y un seguimiento adecuado de los pacientes con inhibidores de alta o baja respuesta.

## **Conclusiones**

La prueba de Nijmegen es una herramienta importante en la detección de inhibidores en pacientes con hemofilia A, al proporcionar información sobre la presencia y la respuesta del inhibidor lo que permite mejorar resultados con inhibidores de baja respuesta y al especialista le permite tomar medidas acertadas en el tratamiento del paciente.

## **Agradecimientos**

Las autoras agradecen al fondo Públícalo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador para la realización práctica de esta investigación en el laboratorio de la Carrera de Laboratorio Clínico y un agradecimiento especial a la Fundación Hemofílica Ecuatoriana y sus pacientes por la apertura de generar esta investigación como tema importante para la salud de la población con hemofilia.

## Contribuciones de los autores

KMM: diseño experimental del estudio, colección de datos, análisis e interpretación de datos obtenidos. Redacción de la primera versión del artículo científico, gestión del financiamiento

WGV: diseño experimental del estudio, colección de datos, análisis e interpretación de datos obtenidos. Redacción de la primera versión del artículo científico, gestión del financiamiento.

MMM: concepción y diseño de estudio. Escritura y revisión del manuscrito con una actualización total en versión final del artículo científico. Gestión del financiamiento. Autor de correspondencia.

## Conflicto de intereses

Las autoras declaran no tener conflicto de intereses.

## Referencias

- Álvarez de León, LM, López, MJ. 2015. Determinación de inhibidores de factor VIII en pacientes con hemofilia A. *Guatemala pediátrica* 1(1):47-52.
- Arias M. 2016. Actualización en el diagnóstico inhibidor de factor VIII. (simposio). Disponible: <https://www.sah.org.ar/revistasah/numeros/24-vol-20-congre-2016.pdf>
- Balkaransingh P, Young G. 2018. Novel therapies and current clinical progress in hemophilia A. *Ther Adv Hematol.* 9(2):49-61. doi:10.1177/2040620717746312
- Carcao M, Goudemand J. 2018. Los inhibidores de la hemofilia: información básica. 5ª ed. Tratamiento de la hemofilia No. 7. Montreal (QC): Federación Mundial de Hemofilia.
- Chalmers EA, Alamelu J, Collins PW, Mathias M, Payne J, Richards M, Tunstall O, Williams M, Palmer B, Mumford A. 2018. Intracranial haemorrhage in children with inherited bleeding disorders in the UK 2003-2015: A national cohort study. *Haemophilia.* 24(4):641-647. doi:10.1111/hae.13461
- Dou X, Liu W, Poon MC, Zhang X., Wu J, Zeng X, Wu R, Hu Q, Li C, Wang X *et al.* 2021. Patients with haemophilia A with inhibitors in China: a national real-world analysis and follow-up. *Br J Haematol.* 192(5):900-908. doi:10.1111/bjh.17322
- Eckhardt CL, van Velzen AS, Peters M, Astermark J, Brons PP, Castaman G, Clossen MH, Dors N, Escuriola-Ettingshausen C, Hamulyak K, *et al.* 2013. Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood.* doi:10.1182/blood-2013-02.
- FMH [Federación Mundial de Hemofilia]. 2021. El informe del sondeo mundial anual 2020. Montreal (QC): Federación Mundial de Hemofilia.
- Gandhi T, Lawler P, Foxton E, Chowdary P, Riddell A. 2020. Clinical utility of sample preheat treatment in a modified Nijmegen-Bethesda assay (mNBA) for inhibitor monitoring in congenital and acquired haemophilia A: A single-centre four-year experience. *Haemophilia.* 26(6): e300-e307. doi:10.1111/hae.14090
- Gouw SC, Van Den Berg H, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, Hervé H, Chambost H, Kurnik K, Liesner R, *et al.* 2013. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood.* 121(20):4046-4055. doi:10.1182/blood-2012-09.
- Haya S. 2019. Prophylactic treatment in hemophilic patients with inhibitors. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 30(1S): S14-S18. doi:10.1097/MBC.0000000000000823
- Hwang SH, Lim JA, Kim MJ, Kim HC, Lee HW, Yoo KY, You CW, Lee KS, Kim HS. 2012. Profiling of differentially expressed genes in haemophilia A with inhibitor. *Haemophilia.* 18(3). doi:10.1111/j.1365-2516.2011.02702.x
- Iorio A, Stonebraker JS, Chambost H, Makris M, Coffin D, Herr C, Germini F, Stonebraker JS, Byams V, El-Ekiaby M, *et al.* 2019. Establishing the prevalence and prevalence at birth of hemophilia in males: a meta-analytic approach using national registries. *Ann Intern Med.* 171(8):542-546. doi:10.7326/M19-1208

- Ketteler C, Hoffmann I, Davidson S, Chen D, Tiede A, Richter N. 2022. Impact of different factor VIII inhibitor kinetic profiles on the inhibitor titer quantification using the modified Nijmegen–Bethesda assay. *Res Pract Thromb Haemost.* 6(8). doi:10.1002/rth2.12799.
- Key NS. 2004. Inhibitors in congenital coagulation disorders. *Br J Haematol.* 127(4):379–391. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05168.x
- Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. 2010. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: manual de laboratorio. 2ª ed. Montreal (QC): Federación Mundial de Hemofilia.
- Lim MY, Cheng D, Recht M, Kempton CL, Key NS. 2020. Inhibitors and mortality in persons with nonsevere hemophilia A in the United States. *Blood Adv.* 4(19):4739–4747. doi:10.1182/bloodadvances.2020002626.
- Mardones M, Pérez Pazmiño F, Pino Bedón M. 2017. Detección de inhibidores de factor VIII y IX en pacientes que reciben factores de coagulación liofilizados como profilaxis o tratamiento. *Rev Ecuat Med Cienc Biol.* 38(2):121–126. doi:10.26807/remcb.v38i2.545
- Meijer P, Peyvandi F, Young G, Pruthi R, de Lima Montalvão S, Kitchen S. 2023. International Council for Standardization in Haematology recommendations for laboratory measurement of factor VIII and FIX type I inhibitors. *Int J Lab Hematol.* 45(4):413–424. doi:10.1111/ijlh.14109
- MSP [Ministerio de Salud Pública]. 2012. Criterios de inclusión de enfermedades consideradas catastróficas, raras y huérfanas para beneficiarios del bono Joaquín Gallegos Lara. Acuerdo Ministerial No. 00001829. Quito (Ecuador): Ministerio de Salud Pública.
- MSP [Ministerio de Salud Pública]. 2016. Diagnóstico y tratamiento de la hemofilia congénita: guía práctica clínica. 1ª ed. Quito (Ecuador): Dirección Nacional de Normatización, Ministerio de Salud Pública.
- MSP [Ministerio de Salud Pública]. 2018. Pacientes con hemofilia destacan mejoras en atención sanitaria. MSP Noticias Destacadas [Internet]. [consultado 2024 Nov 14] Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/pacientes-con-hemofilia-destacan-mejoras-en-atencion-sanitaria/#>
- MSP [Ministerio de Salud Pública]. 2022. MSP realiza nueva adquisición de medicamentos para hemofilia. MSP Noticias Destacadas [Internet]. [consultado 2024 Nov 14] Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/msp-realiza-nueva-adquisicion-de-medicamentos-para-hemofilia/>
- Müller J, Pekrul I, Pötzsch B, Berning B, Oldenburg J, Spannagl M. 2019. Laboratory monitoring in emicizumab-treated persons with hemophilia A. *Thromb Haemost.* 119(9):1384–1393. doi:10.1055/s-0039-1692427
- Peyvandi F, Kavakli K, El-Beshlawy A, Rangarajan S. 2022. Management of haemophilia A with inhibitors: A regional cross-talk. *Haemophilia.* 28(6):950–961. doi:10.1111/hae.14638
- Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. 2021. Inhibitors—Recent insights. *Haemophilia.* 27(S3):28–36. doi:10.1111/hae.14077
- Rezende SM, Neumann I, Angchaisuksiri P, Awodu O, Boban A, Cuker A, Curtin JA, Fijnvandraat K, Gouw SC, Gualtierotti R, et al. 2024. International Society on Thrombosis and Haemostasis clinical practice guideline for treatment of congenital hemophilia A and B based on the Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation methodology. *J Thromb Haemost.* 22(9):2629–2652. doi:10.1016/j.jth.2024.05.026
- Da Silva Pinto María, da Silva Liliana, Ferreira De Carvalho F. 2022. Hemofilia A congénita con inhibidores e inducción de inmunotolerancia en niños y adolescentes jóvenes: ¿podría Brasil ser un ejemplo para otros países? *Rev Hematol* 26(1)-10. <https://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/article/view/413>
- Valke LLFG, Verhagen MJA, Mulders BPM, Polenewen R, Blijlevens NMA, Jansen JH, Mansouritorghabeh H, Elsheikh E, Reipert BM, Turecek PL, et al. 2023. The Nijmegen ultra-sensitive Bethesda Assay detects very low-titer factor VIII inhibitors in patients with congenital and acquired hemophilia A. *Thromb Res.* 231:112–120. doi:10.1016/j.thromres.2023.10.007

- Villarreal-Martínez L, García-Chávez J, Sánchez-Jara B, Moreno-González AM, Soto-Padilla J, Aquino-Fernández E, Paredes-Aguilera R, Maldonado-Silva K, Rodríguez-Castillejos C, González-Ávila AI, et al. 2020. Prevalence of inhibitors and clinical characteristics in patients with haemophilia in a middle-income Latin American country. *Haemophilia*. 26(2):290-297. doi:10.1111/hae.13951
- Witmer C, Young G. 2013. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: Rationale and latest evidence. *Ther Adv Hematol*. 4(1):59-72. doi:10.1177/2040620712464509.
- Young G. 2019. How I treat children with haemophilia and inhibitors. *Br J Haematol*. 186(3):400-408. doi:10.1111/bjh.15942.