

1 **Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante la metodología de Nijmegen en pacientes**
2 **con hemofilia**

3
4 **Frequency of factor VIII inhibitor using the Nijmegen methodology in patients with**
5 **hemophilia**

6
7 Karla Molina Maldonado¹, Wendy Guerrero Vinueza¹, Marcela Mardones Montanares^{1,2*}

8
9 ¹ Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica del
10 Ecuador, Quito, Ecuador.

11 ² Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL), Pontificia Universidad
12 Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

13
14 Autor de correspondencia: mmardones382@puce.edu.ec

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

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

33 **Abstract.** - One of the greatest complications in hemophilic patients is the development of
34 inhibitors. It is also one of the most significant challenges for treating physicians. Therefore, early
35 detection and the search for a test to support the diagnosis are of great importance for the proper
36 treatment of patients with hemophilia. The presence of inhibitors is associated with this morbidity,
37 which is accompanied by bleeding complications and low quality of life. The objective of this study
38 was to determine inhibitors in hemophilic patients using the Nijmegen test, a technique that allows
39 the detection of low levels of inhibitors. The methodology was descriptive and cross-sectional. The
40 frequency of FVIII inhibitors was 11.84 % of 118 patients who underwent the test. 64.28 % were
41 low responders with a titer below 5 (Nijmegen Bethesda Units) NBU, and 35.71 % were high
42 responders with a response greater than 5 BUN. The age group with inhibitors included
43 preschoolers (16.66 %), schoolchildren (23.07 %), adolescents (26.31 %), and finally, adults
44 (4.76 %). The presence of inhibitors is associated with a high risk for patients, especially young
45 people. It is crucial to prioritize laboratory testing with sensitive and reliable methodologies for
46 results. Further research is recommended in the community with this pathology to study other
47 variables involved in developing inhibitors.

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

49 **Introducción**

50 La hemofilia es una enfermedad genética recesiva ligada al cromosoma X. Los estudios más
51 recientes estiman una prevalencia de 25 casos por cada 100 000 nacimientos masculinos (Iorio et al.
52 2019) . Esta enfermedad es causada por diversas mutaciones heterogéneas en el gen F8, como
53 inversiones, mutaciones puntuales que producen el reemplazo de aminoácidos, mutaciones sin
54 sentido, defectos en los sitios de empalme del ARN, duplicaciones e inserciones (Hwang et al.
55 2012) . Como resultado, se generan deficiencias cuantitativas o funcionales en la proteína y se
56 incrementa la probabilidad de formación de inhibidores a lo largo de la vida del paciente, lo que
57 puede dar lugar a complicaciones graves, algunas de las cuales pueden ser fatales. En pacientes con
58 hemofilia severa, la presencia de inhibidores se observa en un 20 a 30 % de los casos, lo que, en
59 muchos casos, reduce la esperanza de vida (Gouw et al. 2013).

60 El Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) clasifica la hemofilia como una enfermedad
61 catastrófica, incluyéndola en el grupo de enfermedades raras o huérfanas y catastróficas (MSP
62 2012). En 2018, el MSP reportó 799 casos de hemofilia, siendo la hemofilia A la más frecuente, con
63 584 casos, causada por la disminución o ausencia del factor VIII (FVIII) (MSP, 2018). En 2020, el
64 informe anual de la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) indicó que el tratamiento de elección
65 para pacientes con hemofilia fue la administración de concentrado de FVIII liofilizado derivado del
66 plasma, con 34 943 250 unidades utilizadas, seguido por el FVIII recombinante de vida media
67 prolongada, con 6 174 000 unidades. Esto implica un uso per cápita de 2 331 unidades de FVIII
68 (FMH, 2020). A nivel nacional, en ese mismo año, se diagnosticaron 21 pacientes con inhibidores
69 activos (FMH 2020; MSP 2022).

70 Si bien, la administración de FVIII derivado del plasma es útil, se estima que, alrededor de un 20 a
71 30 % de pacientes con hemofilia severa y del 5 % a 10 % con hemofilia moderada o leve,
72 desarrollan inhibidores (Hwang et al. 2012) . La presencia de estos inhibidores en personas con
73 hemofilia A dependerá de varios factores que influyen en su aparición como el genotipo de F8, la
74 historia familiar, el inicio temprano de la terapia de reemplazo, la genética principalmente por la
75 inversión de intrón 22 y otras mutaciones menos frecuentes, lo que resulta una complicación grave
76 de la enfermedad, porque disminuye la calidad de vida del paciente hemofílico (Müller et al. 2019).

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

86 El inhibidor de FVIII es una inmunoglobulina tipo G policlonal de alta afinidad que neutraliza la
87 actividad procoagulante del factor correspondiente. Este inhibidor puede clasificarse según su
88 respuesta en alta o baja, en función de su título o concentración después de la infusión del factor de
89 reemplazo (Witmer y Young, 2013). Los factores que influyen en su aparición pueden ser genéticos.
90 Se ha observado una mayor probabilidad en familias con antecedentes de hemofilia, con un riesgo
91 de 3.2 de que, si un hermano presenta inhibidores, otro hermano también pueda desarrollarlos

92 (Villarreal-Martínez et al. 2020). Además, los pacientes con mutaciones nulas tienen un alto riesgo
93 de desarrollar inhibidores en algún momento de su vida. La etnia también influye en su aparición,
94 así como factores no genéticos como el tiempo de administración del tratamiento (Villarreal-
95 Martínez et al. 2020) . En hemofilia grave, se ha demostrado que, después de las 50 primeras
96 exposiciones al factor, el riesgo de desarrollar inhibidores disminuye (Pratt et al. 2021) . Los
97 pacientes que reciben tratamiento profiláctico por largo tiempo se exponen a más unidades de FVIII
98 durante períodos determinados a diferencia de los que tienen tratamiento a demanda, con mayor
99 riesgo en la formación de inhibidores y el origen de los productos elaborados de FVIII podrían ser
100 más inmunógenos que otros, facilitando la formación de inhibidores (Villarreal-Martínez et al.
101 2020).

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

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

131 En esta investigación se propuso la modificación validada de la prueba de Bethesda, conocida como
132 la modificación Nijmegen, con el objetivo de mejorar la sensibilidad en la detección de inhibidores
133 en cantidades bajas (Carcao y Goudemand 2018). Esta modificación incluye el uso de un buffer de
134 imidazol y plasma deficiente de FVIII comercial, lo que permite sensibilizar la prueba y detectar
135 títulos bajos de inhibidor. La técnica ha sido aprobada por el Sociedad Internacional de Hemostasia
136 y Trombosis (ISTH). Antes de correr las pruebas de los pacientes (y como una manera de
137 estandarizar) se realizaron pruebas de pacientes normales con diluciones y se corrieron pruebas
138 conocidas con inhibidores. Una implementación estandarizada busca proporcionar un tratamiento

139 oportuno, mejorar las condiciones de los pacientes y reducir los problemas asociados. La detección
140 temprana de inhibidores también tiene el potencial de disminuir los costos del tratamiento, lo que a
141 su vez beneficia la inversión en salud que realiza el Estado.

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

156 **Materiales y Métodos**

157 El método de estudio fue observacional, descriptivo y transversal.

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

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

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

185 Para la determinación de los inhibidores mediante la técnica Nijmegen se rotularon dos tubos: el
186 tubo control y el tubo del paciente. El tubo control estuvo conformado por plasma normal (pool de

187 plasma de 20 muestras con valores normales de TTP, TP y FVIII) más buffer imidazol pH 7.4 y
188 plasma deficiente de FVIII con niveles normales de factor de von Willebrand (vWF), en partes
189 iguales. Por otro lado, el tubo paciente estuvo conformado por el plasma del paciente más buffer
190 imidazol pH 7.4, en proporciones equivalentes. Se incubaron los tubos a 37 °C por dos horas.
191 Finalmente, se realizó la lectura de los tubos en el equipo coagulométrico CA 660 Siemens para la
192 cuantificación de FVIII.

193 Se calculó el FVIII residual = FVIII mezcla paciente x 100/FVIII mezcla control.

194 El resultado superior a 75 % indicó un nivel de FVIII residual, negativo para inhibidor y, si el valor
195 obtenido fue inferior al 25 % el paciente presentó inhibidores, entonces el plasma del paciente fue
196 sometido a diferentes diluciones para establecer el título del inhibidor, seguido el resultado se
197 cuantifica dentro de los porcentajes mencionado y finalmente se multiplica por el grado de dilución.
198 En la cuantificación del inhibidor, se establece que la unidad Bethesda (UB) es la cantidad del
199 inhibidor capaz de destruir el 50 % del FVIII (Kitchen et al. 2010), esto significa que entre 25 y
200 75 %, se obtiene el título del inhibidor sin requerir diluciones. Para el cálculo del inhibidor se
201 obtuvo la cantidad FVIII residual vs. Unidades Nijmegen Bethesda (UNB) por ml (Kitchen et al.
202 2010) . El comité científico y de normalización en Hemostasia y Trombosis (2024), indicó
203 considerar las pruebas positivas a partir de un valor ≥ 0.6 UNB/ml. Los inhibidores se clasifican en
204 inhibidores bajos respondedores cuando los resultados son ≤ 5 UNB y altos respondedores cuando
205 los resultados son ≥ 5 UNB (Rezende et al. 2024). Todas las pruebas fueron realizadas en el
206 laboratorio de hematología de la Facultad de Medicina, carrera de Laboratorio Clínico de la
207 Pontificia Universidad Católica del Ecuador-sede Quito (PUCE).

208 Todos los procedimientos realizados en el laboratorio cumplieron un riguroso control de calidad
209 tanto en la recolección, transporte y conservación de la muestra, así como en su análisis. Para el
210 control de calidad del equipo se siguió la norma CLSI EP5A3 y se corrieron controles normales y
211 patológicos del FVIII para la obtención de resultados confiables. Para el análisis de la información
212 de la encuesta y los resultados del laboratorio se utilizó la versión 25.0 del programa estadístico
213 SPSS. En la información de las variables cualitativas y cuantitativas se elaboraron frecuencias
214 absolutas y relativas, se calcularon las medidas de tendencia central y dispersión, para la asociación
215 de variables, grado de severidad de la HA vs. respuesta al inhibidor al FVIII; asimismo, la
216 asociación de tiempo de exposición al tratamiento vs. la respuesta al inhibidor al FVIII se utilizó
217 tablas de contingencia y se aplicó la prueba de chi cuadrado, para un alfa del 0.05.

218

219 **Resultados**

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

226 La distribución de los 14 pacientes positivos en relación con el grupo etario fue la siguiente: en
227 etapa preescolar de 1 a 4 años, se detectaron cuatro pacientes (16.66 %), de los cuales tres
228 presentaron inhibidores de baja respuesta y uno de alta respuesta. En etapa escolar de 5 a 11 años,
229 se identificaron tres pacientes (23.07 %) uno con inhibidor de baja respuesta y dos de alta respuesta.
230 En la adolescencia de 12 a 18 años, se detectaron cinco pacientes (26.31 %) tres presentaron
231 inhibidores de baja respuesta y dos de alta respuesta. Finalmente se detectaron dos adultos (4.76 %),
232 entre 18 a 65 años, ambos con inhibidores de baja respuesta. No se detectaron pacientes con
233 inhibidores en las muestras de individuos de > 65 años. En cuanto a la gravedad de la hemofilia, el
234 57.14 % de los pacientes con hemofilia A fueron clasificados como severos, el 35.71 % moderado y

235 el 7.14 % leve. Del total de pacientes positivos para inhibidores, el 64.28 % presentaron inhibidores
236 de baja respuesta, mientras que el 35.71 % tuvieron inhibidores de alta respuesta (Tabla 1).

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

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

254 **Discusión**

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

263 En hemofilia severa, la presencia de inhibidores es prevalente, alcanzando hasta un 30 %. En estos
264 pacientes, especialmente niños, los inhibidores suelen desarrollarse entre los 20 y 50 días de
265 exposición al FVIII, ya sea con terapia a demanda o profilaxis, esto se debe a que su sistema
266 inmunológico aún está en desarrollo y puede ser más propenso a la producción de anticuerpos. La
267 prueba de inhibidores se realiza cuando el paciente no responde a la terapia habitual, siendo la
268 prueba de Bethesda la más utilizada para su confirmación (Carcao y Goudemand 2018; Gandhi et al.
269 2020). Desde 1970, se han implementado modificaciones a la prueba de Bethesda, como es la
270 técnica de Nijmegen, recomendada por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH), que incluye
271 plasma normal bufferado y mejora la sensibilidad de la prueba (Ketteler et al. 2022). En este estudio,
272 la modificación técnica, realizada con Nijmegen permitió detectar inhibidores en pacientes con
273 títulos bajos, lo que, con tratamiento, puede eliminar los anticuerpos y reducir la morbilidad y
274 mortalidad de los pacientes. Gandhi et al. (2020) sugieren que el precalentamiento de las muestras
275 de plasma de los pacientes podría ser un método potencial para eliminar el FVIII y permitir una
276 mejor monitorización de los inhibidores mediante la modificación Nijmegen (mNBA).

277 En 2020, la FMH reportó 21 casos de pacientes en Ecuador con inhibidores de alta respuesta que no
278 respondieron al tratamiento habitual. Un estudio de Villarreal M et al. (2020) recopiló datos de

279 Latinoamérica y señaló una frecuencia de inhibidores en hemofilia A de entre el 12 % y el 35 %. En
280 Guatemala, un estudio Álvarez (2015), reportó una frecuencia del 20 %, reflejando una correlación
281 con otros estudios, aunque esta cifra puede variar según la población estudiada. Además,
282 investigaciones han demostrado que la población hispana tiene el doble de probabilidad de
283 desarrollar inhibidores en comparación con la población caucásica (Villarreal et al. 2020) . Los
284 factores que influyen en la aparición de inhibidores incluyen mutaciones en el gen F8, antecedentes
285 familiares de inhibidores y la raza (Dou et al. 2021) . También se ha señalado que el tipo de
286 producto administrado, el tiempo de exposición, la intensidad del tratamiento y una monitorización
287 insuficiente pueden contribuir a la formación de inhibidores (Young 2019).

288 La prevención y erradicación de los inhibidores en niños es importante debido a su asociación con
289 sangrados persistentes, que pueden dejar secuelas de por vida. Los estudios demuestran que del 20-
290 25 % de estos pacientes con inhibidores presentan hemorragias intracraneales, las cuales pueden
291 causar secuelas neurológicas permanentes, de ahí radica la importancia de su detección (Chalmers
292 et al. 2018) . La FMH ha indicado que los niños que reciben tratamiento con FVIII por períodos
293 breves son más propensos a desarrollar inhibidores, mientras que la probabilidad en adultos que
294 reciben tratamiento a largo plazo es menor. En el estudio realizado con la modificación de
295 Nijmegen, las muestras recolectadas entre 1 y 18 años evidenciaron 12 pacientes con inhibidores al
296 FVIII, de los cuales cinco fueron de alta respuesta (> 5 UNB/ml) y siete de baja respuesta (< 5
297 UNB/ml). Estos resultados resaltaron la importancia de realizar evaluaciones de rutina sin limitarlas
298 únicamente a los casos de falta de respuesta al tratamiento. En cambio, la frecuencia de inhibidores
299 en pacientes adultos fue baja, se encontró 2 pacientes con inhibidores de baja respuesta.

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

314 En relación con la severidad de la enfermedad, el estudio realizado con la modificación de
315 Nijmegen, detectaron cinco pacientes con hemofilia severa e inhibidores de alta respuesta que
316 requirieron tratamiento inmediato debido a la alta probabilidad de hemorragias espontáneas. De los
317 14 pacientes positivos para inhibidores, el 7.14 % fue clasificado con hemofilia leve, el 35.71 % con
318 hemofilia moderada y el 57.14 % con hemofilia severa. Aunque existieron variaciones en las
319 frecuencias obtenidas en este estudio en comparación con investigaciones previas, se observa que
320 los pacientes con hemofilia severa presentan una mayor frecuencia de inhibidores. La hemofilia al
321 ser una enfermedad hereditaria tiene menos de la proteína (FVIII), que cumpla con su función
322 correctamente, uno de los factores de riesgo según la gravedad de la enfermedad será la formación
323 de inhibidores que, entre otros factores predisponentes, es importante el factor genético. Key (2004)
324 y Lim et al. (2020), destacan que la hemofilia A severa como un factor predictivo de riesgo para el

325 desarrollo de inhibidores, especialmente en pacientes con delección del intrón 22, presente en el
326 35 % de los casos, en comparación con otros tipos de mutaciones, que solo representan el 5 %.

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

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

348 **Conclusiones**

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

354 **Agradecimientos**

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

360 **Contribuciones de los autores**

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

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

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

368 **Conflicto de intereses**

369 Las autoras declaran no tener conflicto de intereses.

371 **Referencias**

372
373 Álvarez de León, LM, López, MJ. 2015. Determinación de inhibidores de factor VIII en pacientes
374 con hemofilia A. *Guatemala pediátrica* 1(1):47–52.
375 Arias M. 2016. Actualización en el diagnóstico inhibitor de factor VIII. (simposio). Disponible:
376 <https://www.sah.org.ar/revistasah/numeros/24-vol-20-congre-2016.pdf>
377 Balkaransingh P, Young G. 2018. Novel therapies and current clinical progress in hemophilia A.
378 *Ther Adv Hematol.* 9(2):49–61. doi:10.1177/2040620717746312
379 Carcao M, Goudemand J. 2018. Los inhibidores de la hemofilia: información básica. 5ª ed.
380 Tratamiento de la hemofilia No. 7. Montreal (QC): Federación Mundial de Hemofilia.
381 Chalmers EA, Alamelu J, Collins PW, Mathias M, Payne J, Richards M, Tunstall O, Williams M,
382 Palmer B, Mumford A 2018. Intracranial haemorrhage in children with inherited bleeding disorders
383 in the UK 2003-2015: A national cohort study. *Haemophilia.* 24(4):641–647.
384 doi:10.1111/hae.13461
385 Dou X, Liu W, Poon MC, Zhang X., Wu J, Zeng X, Wu R, Hu Q, Li C, Wang X *et al.* 2021.
386 Patients with haemophilia A with inhibitors in China: a national real-world analysis and follow-up.
387 *Br J Haematol.* 192(5):900–908. doi:10.1111/bjh.17322
388 Eckhardt CL, van Velzen AS, Peters M, Astermark J, Brons PP, Castaman G, Crossen MH, Dors N,
389 Escuriola-Ettingshausen C, Hamulyak K, *et al.* 2013. Factor VIII gene (F8) mutation and risk of
390 inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood.* doi:10.1182/blood-2013-02.
391 FMH [Federación Mundial de Hemofilia]. 2021. El informe del sondeo mundial anual 2020.
392 Montreal (QC): Federación Mundial de Hemofilia.
393 Gandhi T, Lawler P, Foxton E, Chowdary P, Riddell A. 2020. Clinical utility of sample preheat
394 treatment in a modified Nijmegen-Bethesda assay (mNBA) for inhibitor monitoring in congenital
395 and acquired haemophilia A: A single-centre four-year experience. *Haemophilia.* 26(6): e300–e307.
396 doi:10.1111/hae.14090
397 Gouw SC, Van Den Berg H, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, Herv' H, Chambost
398 H, Kurnik K, Liesner R, *et al.* 2013. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in
399 children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood.* 121(20):4046–4055.
400 doi:10.1182/blood-2012-09.
401 Haya S. 2019. Prophylactic treatment in hemophilic patients with inhibitors. *Blood Coagulation and*
402 *Fibrinolysis.* 30(1S): S14–S18. doi:10.1097/MBC.0000000000000823
403 Hwang SH, Lim JA, Kim MJ, Kim HC, Lee HW, Yoo KY, You CW, Lee KS, Kim HS. 2012.
404 Profiling of differentially expressed genes in haemophilia A with inhibitor. *Haemophilia.* 18(3).
405 doi:10.1111/j.1365-2516.2011.02702.x
406 Iorio A, Stonebraker JS, Chambost H, Makris M, Coffin D, Herr C, Germini F, Stonebraker JS,
407 Byams V, El-Ekiaby M, *et al.* 2019. Establishing the prevalence and prevalence at birth of
408 hemophilia in males: a meta-analytic approach using national registries. *Ann Intern Med.*
409 171(8):542–546. doi:10.7326/M19-1208
410 Ketteler G, Hoffmann I, Davidson S, Chen D, Tiede A, Richter N. 2022. Impact of different factor
411 VIII inhibitor kinetic profiles on the inhibitor titer quantification using the modified Nijmegen–
412 Bethesda assay. *Res Pract Thromb Haemost.* 6(8). doi:10.1002/rth2.12799.
413 Key NS. 2004. Inhibitors in congenital coagulation disorders. *Br J Haematol.* 127(4):379–391.
414 doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05168.x
415 Kitchen S, Mccraw A, Echenagucia M. 2010. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la
416 coagulación: manual de laboratorio. 2ª ed. Montreal (QC): Federación Mundial de Hemofilia.
417 Lim MY, Cheng D, Recht M, Kempton CL, Key NS. 2020. Inhibitors and mortality in persons with
418 nonsevere hemophilia A in the United States. *Blood Adv.* 4(19):4739–4747.
419 doi:10.1182/bloodadvances.2020002626.
420 Mardones M, Pérez Pazmiño F, Pino Bedón M. 2017. Detección de inhibidores de factor VIII y IX
421 en pacientes que reciben factores de coagulación liofilizados como profilaxis o tratamiento. *Rev*

422 Ecuat Med Cienc Biol. 38(2):121–126. doi:10.26807/remcb.v38i2.545
423 Meijer P, Peyvandi F, Young G, Pruthi R, de Lima Montalvão S, Kitchen S. 2023. International
424 Council for Standardization in Haematology recommendations for laboratory measurement of factor
425 VIII and FIX type I inhibitors. *Int J Lab Hematol*. 45(4):413–424. doi:10.1111/ijlh.14109
426 MSP [Ministerio de Salud Pública]. 2012. Criterios de inclusión de enfermedades consideradas
427 catastróficas, raras y huérfanas para beneficiarios del bono Joaquín Gallegos Lara. Acuerdo
428 Ministerial No. 00001829. Quito (Ecuador): Ministerio de Salud Pública.
429 MSP [Ministerio de Salud Pública]. 2016. Diagnóstico y tratamiento de la hemofilia congénita: guía
430 práctica clínica. 1ª ed. Quito (Ecuador): Dirección Nacional de Normatización, Ministerio de Salud
431 Pública.
432 MSP [Ministerio de Salud Pública]. 2018. Pacientes con hemofilia destacan mejoras en atención
433 sanitaria. MSP Noticias Destacadas [Internet]. [consultado 2024 Nov 14] Disponible en:
434 <https://www.salud.gob.ec/pacientes-con-hemofilia-destacan-mejoras-en-atencion-sanitaria/#>
435 MSP [Ministerio de Salud Pública]. 2022. MSP realiza nueva adquisición de medicamentos para
436 hemofilia. MSP Noticias Destacadas [Internet]. [consultado 2024 Nov 14] Disponible en:
437 <https://www.salud.gob.ec/msp-realiza-nueva-adquisicion-de-medicamentos-para-hemofilia/>
438 Müller J, Pekrul I, Pötzsch B, Berning B, Oldenburg J, Spannagl M. 2019. Laboratory monitoring
439 in emicizumab-treated persons with hemophilia A. *Thromb Haemost*. 119(9):1384–1393.
440 doi:10.1055/s-0039-1692427
441 Peyvandi F, Kavakli K, El-Beshlawy A, Rangarajan S. 2022. Management of haemophilia A with
442 inhibitors: A regional cross-talk. *Haemophilia*. 28(6):950–961. doi:10.1111/hae.14638
443 Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. 2021. Inhibitors—Recent insights. *Haemophilia*.
444 27(S3):28–36. doi:10.1111/hae.14077
445 Rezende SM, Neumann I, Angchaisuksiri P, Awodu O, Boban A, Cuker A, Curtin JA, Fijnvandraat
446 K, Gouw SC, Gualtierotti R, et al. 2024. International Society on Thrombosis and Haemostasis
447 clinical practice guideline for treatment of congenital hemophilia A and B based on the Grading of
448 Recommendations Assessment, Development, and Evaluation methodology. *J Thromb Haemost*.
449 22(9):2629–2652. doi:10.1016/j.jtha.2024.05.026
450 Da Silva Pinto María, da Silva Liliana, Ferreira De Carvalho F. 2022. Hemofilia A congénita con
451 inhibidores e inducción de inmunotolerancia en niños y adolescentes jóvenes: ¿podría Brasil ser un
452 ejemplo para otros países? *Rev Hematol* 26(1)–10.
453 <https://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/article/view/413>
454 Valke LLFG, Verhagen MJA, Mulders BTM, Polenewen R, Blijlevens NMA, Jansen JH,
455 Mansouritorghabeh H, Elsheikh E, Reipert BM, Turecek PL, et al. 2023. The Nijmegen ultra-
456 sensitive Bethesda Assay detects very low-titer factor VIII inhibitors in patients with congenital and
457 acquired hemophilia A. *Thromb Res*. 231:112–120. doi:10.1016/j.thromres.2023.10.007
458 Villarreal-Martínez J, García-Chávez J, Sánchez-Jara B, Moreno-González AM, Soto-Padilla J,
459 Aquino-Fernández E, Paredes-Aguilera R, Maldonado-Silva K, Rodríguez-Castillejos C, González-
460 Ávila AI, et al. 2020. Prevalence of inhibitors and clinical characteristics in patients with
461 haemophilia in a middle-income Latin American country. *Haemophilia*. 26(2):290–297.
462 doi:10.1111/hae.13951
463 Witmer C, Young G. 2013. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: Rationale and latest evidence.
464 *Ther Adv Hematol*. 4(1):59–72. doi:10.1177/2040620712464509. Deleted[Bolivar Lucio]: ,
465 Young G. 2019. How I treat children with haemophilia and inhibitors. *Br J Haematol*. 186(3):400–
466 408. doi:10.1111/bjh.15942. Deleted[Bolivar Lucio]: ,
467