

Avances y controversias más relevantes en las diátesis hemorrágicas

COORDINADORES: F.J. BATLLE. *La Coruña*
J.M. HERMIDA. *Pamplona*

Resumen del simposio

A pesar de la intensa investigación realizada estos últimos años en el campo de la enfermedad de von Willebrand (EVW), siguen existiendo importantes dificultades diagnósticas, particularmente en el tipo 1 de esta enfermedad. Precisamente por ello han surgido algunos proyectos que tratan de esclarecer los principales problemas relativos a este tipo en particular. La primera ponencia se centra en el Proyecto de la Unión Europea titulado *Marcadores clínicos y moleculares en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EVW) tipo 1 (Proyecto MCMDM-1VWD)*, y los desafíos futuros. El doctor Giancarlo Castaman (del Hospital San Bortolo, en Vicenza, Italia), uno de los miembros más activos de este proyecto, expone los principales resultados del mismo en sus diferentes vertientes. Ante la duda de si realmente existe el tipo 1 de EVW señala que su existencia es real, pero que sin duda con una mucho menor prevalencia que la considerada previamente. Ello es debido a que, por problemas metodológicos, se han venido incluyendo en este tipo numerosas alteraciones que corresponden más a formas variantes de EVW.

Precisamente los estudios fenotípicos, de una forma muy especial el análisis multimérico del factor von Willebrand (FVW), las diferencias en la respuesta al DDAVP en relaciones con las mutaciones encontradas, y los estudios de expresión de nuevas mutaciones, han permitido distinguir los casos que pueden encuadrarse adecuadamente en la EVW tipo 1. Otro aspecto de gran interés es la demostración de pacientes con claro fenotipo 1 en los que no se descubre mutación en el gen del FVW, dejando entrever el papel de otros genes moduladores, todavía no bien conocidos. Este estudio está siendo decisivo en iluminar un campo tan oscuro como venía siendo la EVW tipo 1. Hay que resaltar que ha supuesto una verdadera “puesta a punto” en aspectos conceptuales y metodológicos de todos los que venimos colaborando en este proyecto.

El valor de la profilaxis en pacientes con hemofilia se acepta ampliamente, aunque quedan por definir diversos aspectos. Las mayores incógnitas y controversias surgen en la hemofilia con inhibidor, en la que se están llevando a cabo estudios preliminares que tratan de demostrar la utilidad de la profilaxis, y cuáles son las mejores pautas terapéuticas en este grupo de pacientes, abocados a una inevitable artropatía hemofílica. La doctora Carme Altisent de la Unitat d'Hemofilia del Hospital Universitari Vall d'Hebrón de Barcelona analiza con notable claridad y acierto este controvertido tema, valorando los recursos disponibles, los concentrados del complejo protrombínico activados y el factor VII activo recombinante (FVIIar), y su aplicación, que, lejos de ser excluyente, puede ser complementaria si se emplean de forma secuencial. La posible monitorización de estos productos con nuevos métodos de laboratorio puede facilitar su empleo en cada caso de una forma más eficiente.

La doctora M.^a Fernanda López Fernández, del Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, en A Coruña, expone minuciosamente la utilidad del factor VII activo recombinante (FVIIar) en la hemorragia crítica, centrándose en la escasa evidencia científica disponible, valorando su eficacia y su riesgo beneficio, y asomándose muy preliminarmente a los escasos estudios coste/beneficio de este acercamiento terapéutico. No cabe duda de que el efecto espectacular del FVIIar en hemorragias graves ha propiciado un incremento de su empleo en los hospitales, no siempre utilizado de forma racional. Ello puede generar un elevado coste, una menor eficacia y un aumento de los efectos adversos, como son las complicaciones trombóticas, que pueden acontecer si se emplea indiscriminadamente. En este sentido, se evidencia la necesidad de elaborar y cumplir guías de actuación hospitalarias consensuadas, liderados por hematólogos conocedores de este problema, lo que propicia una mayor eficiencia y un mejor coste/beneficio en su empleo.

El doctor José Félix Lucía, del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, aborda la última ponencia sobre “Nuevas moléculas hemostáticas en el tratamiento de la hemofilia. Resultados preliminares”. Ante el retraso sustancial que está experimentando el desarrollo de la terapia génica en hemofilia, actualmente el mayor interés se centra en el diseño y desarrollo de nuevas moléculas, con un efecto biológico mayor o más prolongado, así como con menor inmunogenicidad. Resulta espectacular el ingenio humano que, aprovechando los conocimientos biológicos y fisiológicos de los factores de la hemostasia, es capaz de modificar moléculas que pueden mejorar la eficiencia y calidad del tratamiento de los pacientes con trastornos hemorrágicos, y de una forma especial de los pacientes con hemofilia. En unos casos las proteínas mutantes o “muteínas” ofrecen ventajas claras sobre las moléculas silvestres, sin aparentemente conllevar mayores efectos secundarios. En otros casos la asociación de moléculas diferentes facilitan el efecto biológico deseado, como es el ejemplo del FVIII recombinante unido a liposomas pegilados. Esta asociación propicia un efecto biológico del FVIII más prolongado, hecho que abre la perspectiva de una profilaxis que permita distanciar las dosis a emplear. Sin duda, todas estas moléculas de “diseño” precisarán de estudio y seguimiento muy rigurosos para comprobar la bondad de las mismas, demostrando que no suponen un incremento de los efectos secundarios.

Deseamos expresar nuestro más profundo agradecimiento y reconocimiento a tan distinguidos ponentes.

PROFILAXIS EN PACIENTES HEMOFÍLICOS CON INHIBIDOR

C. ALTISENT

Unitat d'Hemofilia. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona

Introducción

El desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el factor VIII (inhibidores) aparece en el 20-30% de los pacientes con hemofilia A grave y es la complicación más importante derivada del tratamiento sustitutivo. Se desarrollan con las primeras exposiciones al concentrado de factor VIII y complican el tratamiento de las hemorragias. Generalmente aparecen en niños de corta edad, lo que comporta un notable incremento de la morbilidad si no se consigue su erradicación.

La artropatía hemofílica es una complicación a largo plazo de la hemofilia grave y se ha demostrado que se correlaciona con el número de hemorragias articulares anuales. Las hemartrosis representan el 70-80% de todas las hemorragias y el 90% de los niños presentan su primera hemartrosis antes de los 5 años. En la década de los sesenta, en Suecia se inició el tratamiento profiláctico para convertir una hemofilia grave en moderada y disminuir el número de hemorragias¹. Numerosos estudios retrospectivos y no aleatorizados han demostrado que si la profilaxis se inicia en edades muy tempranas, existe un descenso muy importante del número de hemorragias y se preserva mejor la integridad articular². Además de la prevención de la artropatía, el tratamiento profiláctico reduce la incidencia de otros tipos de hemorragia (intracraneal) y permite mejorar la calidad de vida.

En pacientes con títulos de inhibidor superior a 5 unidades Bethesda, el tratamiento sustitutivo generalmente es inefectivo, por lo que se requiere la utilización de agentes denominados 'sorteadores' (*by-pass*). El concentrado de complejo protrombínico activado y el factor VII activado recombinante son los dos agentes registrados en nuestro país. Ambos fármacos han demostrado su eficacia para el tratamiento de las hemorragias y la prevención del sangrado intra y posoperatorio³. La diferencia entre ambos, además de su origen, es su vida media plasmática: aproximadamente de 12 horas el primero y de 2-3 horas el segundo. No existe la posibilidad de controlar la eficacia de ambos productos mediante técnicas de laboratorio.

En los pacientes con inhibidor, el tratamiento de las hemorragias con estos fármacos presenta mayor dificultad al no ser un tratamiento sustitutivo y, aunque el número de sangrados no sea mayor, sí lo es el grado de artropatía en comparación con los pacientes sin inhibidor. Soucie *et al.*⁴ publicaron una serie amplia de 2.378 niños de 2-19 años con hemofilia grave; los 186

que habían desarrollado inhibidor tenían una pérdida de función articular mayor que los que no tenían inhibidor. El estudio ESOS (*European Study Orthopaedic Status*) también ha demostrado en sus resultados preliminares que la afectación clínica y radiológica es mucho mayor en pacientes con inhibidor⁵.

El tratamiento de inducción a la inmunotolerancia para la erradicación del inhibidor es la mejor alternativa terapéutica en pacientes con alto título de inhibidor. Aunque no existe un consenso en cuanto a las dosis óptimas, se recomienda iniciarlo cuando el título de inhibidor es inferior a 10 unidades Bethesda. Este periodo preinmunotolerancia, en espera del descenso del título del inhibidor, puede ser de varios meses. Cuando se inicia la inmunotolerancia suelen ser necesarios más de 6 meses antes de conseguir la erradicación del inhibidor.

En pacientes con inhibidor, el tratamiento profiláctico con agentes sorteadores es muy reciente y los resultados aún no se han contrastado suficientemente, aunque el concentrado de complejo protrombínico activado se utilizó asociado al tratamiento de inmunotolerancia, según el protocolo Bonn⁶. El tratamiento profiláctico con agentes inhibidores podría ser una buena estrategia para prevenir las hemartrosis desde el diagnóstico del inhibidor hasta el inicio de la inmunotolerancia, durante la inmunotolerancia y una alternativa en pacientes en los que fracasara ésta.

Concentrado de complejo protrombínico activado y profilaxis

Este complejo es un derivado plasmático que contiene los factores procoagulantes II, IX y X (mayoritariamente no activado) y el factor VII (mayoritariamente activado). Actúa en varios lugares de la cascada de la coagulación generando trombina mediante activación directa del factor X, sin necesidad de factor VIII o IX⁷. Diversos estudios han demostrado un descenso del número de hemorragias cuando se utiliza de forma profiláctica, aunque no detiene el deterioro articular en pacientes que ya lo tenían previamente⁸.

En un estudio retrospectivo en cuatro centros de Estados Unidos se revisó el número de pacientes con inhibidor que habían recibido este tipo de tratamiento durante más de seis meses⁹. Cinco pacientes con hemofilia A recibieron tratamiento profiláctico durante una media de 15 meses; sus edades oscilaban desde los 3 años del más joven hasta los 16 del mayor. La dosis administrada varió desde 50 UI por kg de peso tres veces a la semana hasta 100 UI por kg de peso diariamente. Las dosis recomendadas se basaban en las que habían conseguido la hemostasia en cada paciente en los tratamientos previos. En todos los pacientes hubo

una reducción del número de hemorragias y no se detectaron complicaciones trombóticas en ningún caso. También se constató una respuesta anamnésica (incremento del título del inhibidor de 33 a 1.085 unidades Bethesda) en uno de cinco pacientes, sin modificación de la eficacia del concentrado administrado.

Kreuz *et al.*¹⁰ han reportado en 22 niños la eficacia y seguridad del concentrado de complejo de protrombina activado, utilizado en profilaxis durante la inmunotolerancia, en dosis de 50 UI/kg/día; han constatado la incidencia de una hemartrosis por año (rango: 0-6) y no han habido complicaciones trombóticas ni hemorragias graves.

Por otra parte, actualmente está en curso un estudio clínico internacional (PRO-FEIBA)¹¹ para valorar la eficacia de 85 UI por kg de peso tres veces a la semana durante 6 meses y otros 6 en demanda, comparando el número de hemorragias en ambos periodos. Los objetivos secundarios del estudio son la seguridad, calidad de vida y evaluación farmacoeconómica de ambos periodos.

Profilaxis con factor VIIa recombinante

Estudios recientes han demostrado la eficacia de este fármaco como profiláctico, a pesar de su corta vida media. Su mecanismo de acción es la generación de trombina a partir de las plaquetas activadas, que forman un coágulo más estable y resistente a la lisis. Su eficacia en profilaxis se relaciona con la reciente hipótesis de que el FVIIa recombinante puede tener una difusión extravascular y estar disponible en las zonas de lesión¹². Las dosis utilizadas son muy variables, desde 90 hasta 240 µg por kg y día. La duración del tratamiento también es muy variable. Ha demostrado su eficacia en cirugía mayor y ortopédica y se ha utilizado en periodos de fisioterapia para la rehabilitación articular de actitudes en flexión o contracciones musculares.

Un reciente estudio prospectivo y aleatorizado¹³ ha reportado 37 pacientes con más de dos hemorragias mensuales en dos ramas de tratamiento profiláctico con 90 o 270 µg por kg y día durante tres meses. En los pacientes que recibieron la dosis baja se consiguió una reducción del 45% del número de hemorragias, mientras que fue del 59% en los que recibieron la dosis alta. Tres meses después de finalizar la profilaxis, el número de hemorragias continuaba siendo menor que en el periodo previo a la inclusión.

Otra reciente publicación registra 13 pacientes en profilaxis secundaria con FVIIa recombinante en un estudio retrospectivo y multicéntrico¹⁴. Las dosis administradas han sido muy variables, desde 200-250 µg/kg de peso semanales a 200 µg/kg diarios. En 12 de

13 casos hubo un descenso del número de hemorragias comparado con el periodo previo a la profilaxis. La gran variación de dosis dificulta extraer conclusiones sobre cuál es la dosis mínima efectiva y la máxima dentro del margen de seguridad.

Teniendo en cuenta que este tratamiento va a utilizarse generalmente en niños pequeños (por la mayor incidencia de inhibidores), debe tenerse en cuenta la gran variabilidad de respuesta en edades tempranas. Es imprescindible, pues, en la mayoría de pacientes individualizar la dosis con el fin de optimizar la eficacia, teniendo en cuenta también el coste.

Efectos secundarios

La complicación más seria derivada de la utilización de agentes sorteadores es la trombosis y sus consecuencias: infarto de miocardio, embolismo pulmonar, etc. Inicialmente se consideró que el riesgo trombótico con factor VIIa recombinante era menor. Estudios de farmacovigilancia han probado que el riesgo con ambos productos es similar¹⁵. La utilización de estos fármacos en profilaxis comporta, en general, dosis más bajas que las utilizadas como terapéuticas y, hasta la actualidad, no se han descrito complicaciones trombóticas.

Debe prestarse una atención especial cuando se administra a pacientes a través de un dispositivo de acceso venoso implantable (Port-a-Cath®), ya que se han descrito complicaciones trombóticas¹⁶.

Conclusión

El término *profilaxis* aplicado a pacientes con hemofilia e inhibidor puede entenderse como prevención de la artropatía o descenso del número de hemorragias. La posibilidad de disponer de un tratamiento profiláctico con agentes sorteadores antes y durante el periodo de inmunotolerancia ofrece la posibilidad de prevenir la artropatía. La mayoría (80%) de los pacientes que reciben tratamiento de inmunotolerancia erradicarán el inhibidor y podrán continuar el tratamiento profiláctico administrando el factor deficitario. Con ello se consigue un estado articular y una calidad de vida similar a la de los pacientes sin inhibidor. En esta situación clínica, el factor VIIa recombinante es el recomendable, al ser obtenido por ingeniería genética y no producir respuesta anamnésica. Sin embargo, no puede recomendarse una dosis concreta dado el escaso número de estudios y comunicaciones disponibles.

La profilaxis con concentrado de complejo protrombínico activado no es recomendable en pacientes en periodo de espera de descenso del título de inhibidor

para iniciar la inmunotolerancia, ya que pueden existir respuestas anamnésicas que incrementen el título de inhibidor, debido a la presencia de pequeñas cantidades de factor VIII en el concentrado protrombínico administrado y en niños a los que se les recomiende tratamiento con factor VIII de origen recombinante, por su origen plasmático.

A tenor de la bibliografía y los estudios actuales, no se puede afirmar que el tratamiento profiláctico sea más efectivo que el tratamiento a demanda, como tampoco conocer la dosis óptima en profilaxis y si esta modalidad terapéutica podrá prevenir la aparición de una articulación diana o el progreso de la artropatía. Solamente los estudios prospectivos y aleatorizados podrían dar respuesta a estas preguntas, pero la baja prevalencia de esta enfermedad dificulta la posibilidad de disponer de recomendaciones con un buen grado de evidencia.

Bibliografía

1. Nilsson IM, Berntorp E, Lofqvist T, et al. Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. *J Intern Med* 1992; 232: 25-32.
2. Panicker J, Warrior I, Thomas R, et al. The overall effectiveness of prophylaxis in severe haemophilia. *Haemophilia* 2003; 9: 272-8.
3. Teitel J, Berntorp E, Collins P, et al. A systematic approach to controlling problem bleeds in patients with severe congenital haemophilia A and high-titre inhibitors. *Haemophilia* 2007; 13: 256-63.
4. Soucie J, Cianfrini C, Janco R, et al. Joint range-of-motion limitations among young males with hemophilia: prevalence and risk factors. *Blood* 2004; 103: 2467-73.
5. Morfini M, Haya S, Pollmann H et al. Preliminary observations from the European Study on Orthopedic Status (ESOS) in hemophilia patients with inhibitors. *Blood* 2006; 108: abstract 1.037.
6. Brackmann HH, Oldenburg J, Schwaab R. Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitor-twenty years "Bonn protocol". *Vox Sang* 1996; 70: 30-5.
7. Turecek PL, Varadi K, Gritsch H et al. FEIBA: mode of action. *Haemophilia* 2004; 10 Suppl 2: 3-9.
8. Hilgartner MW, Makiperna A, DiMichele DM. Long-term FEIBA prophylaxis does not prevent progression of existing joint disease. *Haemophilia* 2003; 9: 261-8.
9. Leissinger CA, Becton DL, Ewing NP et al. Prophylactic treatment with activated prothrombin complex concentrate (FEIBA®) reduces the frequency of bleeding episodes in paediatric patients with haemophilia A and inhibitors. *Haemophilia* 2007; 13: 249-55.
10. Kreuz W, Escuriola-Ettinghausen C, Martinez I et al. Efficacy and safety of factor VIII inhibitor bypass activity (Feiba) for long-term prophylaxis in patients with high-responding inhibitors. *Blood* 2000; 96: 265a.
11. Gringeri A. A prospective, randomized, cross-over study of an activated prothrombin complex concentrate for secondary prophylaxis in patients with hemophilia A and inhibitors. XVth Annual Hemophilia Research Study Update Meeting; January 21-24, 2005. San Juan. Puerto Rico.
12. Hedner U. Potential role of recombinant factor FVIIa in prophylaxis in severe hemophilia patients with inhibitors. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2.498-500.
13. Konkle B, Friedrich U, Abrans X. Secondary prophylactic treatment with rFVIIa in patients with haemophilia A or B and inhibitors with high requirements for on-demand treatment. *Haemophilia* 2006; 12: abstract 14 PO 363.
14. Morfini M, Auerswald G, Kobelt RA et al. Prophylactic treatment of haemophilia patients with inhibitors: clinical experience with recombinant factor VIIa in European Haemophilia Centres. *Haemophilia* 2007 (Epub ahead of print).
15. Ehrlich HJ, Henzl MJ, Gomperts DE. Safety of factor VIII inhibitor bypass activity (FEIBA): 10-year compilation of thrombotic adverse events. *Haemophilia* 2002; 8: 83-90.
16. Carcao MD, Connolly BJ, Chait P et al. Central venous catheter-related thrombosis presenting as superior vena cava syndrome in a haemophilic patient with inhibitors. *Haemophilia* 2003; 9: 578-83.

MAIN RESULTS OF THE EUROPEAN UNION PROJECT "MOLECULAR AND CLINICAL MARKERS FOR THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF TYPE 1 VON WILLEBRAND DISEASE" (MCMDM-1 VWD)

G. CASTAMAN, A. TOSETTO, F. RODEGHIERO AND THE MCMDM-1 VWD STUDY GROUP
Department of Hematology and Hemophilia and Thrombosis Center. San Bortolo Hospital. Vicenza (Italy)

Introduction

Von Willebrand disease (VWD) is an inherited bleeding disorder caused by the deficiency or abnormal function of von Willebrand factor (VWF), a multimeric protein which promotes platelet adhesion to the sub-endothelium and carries factor VIII in circulation¹. The last decade has witnessed an extraordinary interest in VWD, since its high prevalence in the general population^{2,3}, its intriguing heterogeneity and the elucidation of the role of VWF in several diseases⁴.

VWD is classified into three main categories: partial quantitative deficiency (Type 1), qualitative deficiency (Type 2), and total quantitative deficiency (Type 3). The most common variant of VWD is represented by type 1 (about 60-70% of all cases), a partial quantitative deficiency of VWF without apparent structural abnormalities. The diagnosis of type 1 VWD is complicated by incomplete penetrance of the disease and by the influence of several genetic and environmental factors on VWF levels⁵. The phenotype of type 1 VWD is very heterogeneous, ranging from cases with clear-cut, recurrent bleeding symptoms and very low VWF to cases with mild symptoms and mildly reduced VWF. Thus, for a significant proportion of type 1 VWD cases, there could be an overlap of clinical and laboratory

phenotype with normal subjects⁶. Provisional criteria for type 1 VWD diagnosis have been recently proposed in an attempt of discriminating true VWD cases from normal individuals with dubious bleeding symptoms⁷. These criteria rest on the presence of a “significant” bleeding history and reduced VWF levels in the patient, together with an autosomal dominant inheritance of the phenotype⁷.

Several attempts have been made at assessing the usefulness of the bleeding history in different inherited bleeding disorders⁸⁻¹⁰, but no standard criteria for the evaluation of bleeding in VWD has been available until recently. Recently, a quantitative bleeding score (BS), related to the number and the severity of bleeding symptoms, has been employed to validate clinical criteria for the diagnosis of type 1 VWD in selected families within an international multicenter study¹¹.

Mutation analysis of the VWF could potentially contribute to the diagnosis, but, because of the size and complexity of the VWF gene (52 exons, 181 kb)¹, complete gene analysis has been conducted in only a limited number of patients with type 1 VWD (see the VWF database at www.vwf.group.shef.ac.uk/). Furthermore, systematic linkage analysis has been carried out only in a limited number of families.

To systematically study the value of clinical, phenotypic and molecular markers for the diagnosis of type 1 VWD a multicenter, European study has been carried out: “Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD)” (www.shef.ac.uk/euvwd/). The main aims of the Project were: identification and validation of the diagnostic criteria for type 1 VWD; the proportion of cases linked to a VWF haplotype; the diagnostic role of bleeding history; the elucidation of the pathophysiology of type 1 VWD (identification of mutations, their relationships with clinical and laboratory phenotype, expression studies), and the identification of predictive parameters in the biological response to desmopressin.

The project

The MCMDM-1VWD study is a multicenter, EU funded, survey on type 1 VWD (see also <http://www.shef.ac.uk/euvwd/> for further details). In the study 12 Centers recruited a total of 154 unselected families with type 1 VWD from 9 European countries with extensive evaluation of phenotype, linkage and mutation analysis. The study intentionally included also milder cases of type 1 VWD, historically diagnosed at each center, with the presence within a family of at least two subjects classified as affected, and possibly including at least two generations. In addition, approximate-

ly 100 normal controls were recruited at each Center, for a total of 1166 normal individuals. Normal controls were defined as subjects that never sought medical attention for a bleeding symptom before enrollment. Within the families, subjects were classified by the enrolling Center as index case (IC, subject who led to investigation) and affected or unaffected family member (AFM and UFM respectively), on the basis of VWF levels and bleeding symptoms at time of investigation of the IC and according to the enrolling institutional criteria. A total of 154 IC, 278 AFM and 312 UFM were enrolled into the study.

Bleeding questionnaire and score

A bleeding questionnaire was administered by a physician to each enrolled family member and to 195 of the 1,166 normal controls. All clinical information was entered in a centralized database maintained in Sheffield. From the database, a symptom-specific score for each bleeding symptom, according to the grading criteria reported in Table 1, was computed. The questionnaire was essentially similar to that used for a previous investigation¹¹, with an additional grade of bleeding severity included for each bleeding symptom. A -1 grade was also introduced to account for circumstantial situations associated with a high bleeding risk (e.g., tooth extraction), in which nonetheless bleeding did not occur despite the fact that no anti-hemorrhagic prophylaxis was given. For each individual, a summative BS was computed as the sum of the each symptom-specific grading, and could theoretically range from -3 (no spontaneous bleeding symptom, no bleeding after surgeries, teeth extractions, deliveries) to +45 (major bleeding for all symptoms). Since diagnosis may influence the severity of bleeding symptoms by introducing anti-hemorrhagic prophylaxis, the BS was computed using symptoms that occurred before diagnosis of VWD or in subjects who did not receive prophylaxis. The full bleeding questionnaire and criteria used to compute the bleeding score are available at http://www.shef.ac.uk/euvwd/bleed_score.htm.

A total of 712 subjects belonging to 144 families and 195 controls were investigated¹². The BS was higher in index cases than in affected family members (BS 9 vs. 5, $p < 0.0001$), while having similar levels of either VWF:RCo, VWF:Ag or FVIII:C, and in unaffected family members than in controls (BS 0 vs. -1, $p < 0.0001$). This finding is certainly suggestive for the presence of a selection bias for IC, but perhaps of inheritance of additional pro-hemorrhagic defects, with a multigenic pattern of inheritance, could also play a role, as recently reported in a small group of patients enrolled

Table 1. The Bleeding score of the MCMDM-1VWD¹²

Symptom	SCORE					
	-1	0	1	2	3	4
Epistaxis	-	No or trivial (less than 5)	> 5 or more than 10'	Consultation only	Packing or Cauterization or Antifibrinolytics	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin
Cutaneous	-	No or trivial (<1 cm)	> 1 cm and no trauma	Consultation only		
Bleeding from minor wounds	-	No or trivial (less than 5)	> 5 or more than 5'	Consultation only	Surgical hemostasis	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin
Oral cavity	-	No	Referred at least one	Consultation only	Surgical hemostasis or Antifibrinolytics	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin
Gastro intestinal bleeding	-	No	Associated with ulcer, portal hypertension., hemorrhoids, angiodysplasia	Spontaneous	Surgical hemostasis, Blood transfusion, Replacement therapy, Desmopressin, Antifibrinolytics	
Tooth extraction	No bleeding in at least 2 extraction	None done or no bleeding in 1 extraction	Referred in <25% of all procedures	Referred in >25% of all procedures, no intervention	Resuturing or packing	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin
Surgery	No bleeding in at least two surgeries	None done or no bleeding in 1 surgery	Referred in <25% of all surgeries	Referred in >25% of all procedures, no intervention	Surgical hemostasis or Antifibrinolytics	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin
Menorrhagia	-	No	Consultation only	Antifibrinolytics, Pill use	Dilatation & Curettage, Iron therapy	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin or Hysterectomy
Post-partum hemorrhage	No bleeding in at least two deliveries	No deliveries or no bleeding in 1 delivery	Consultation only	Dilatation & Curettage, Iron therapy, Antifibrinolytics	Blood transfusion or Replacement therapy or Desmopressin	Hysterectomy
Muscle hematomas	-	Never	Post trauma no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Desmopressin or Replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Surgical intervention or blood transfusion
Hemarthrosis	-	Never	Post trauma no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Desmopressin or Replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Surgical intervention or blood transfusion
Central Nervous System bleeding	-	Never	-	-	Subdural, any intervention	Intracerebral, any intervention

in the MCMDM-1VWD¹³. BS showed a strong significant inverse relation with either VWF:RCo, VWF:Ag or FVIII:C measured at time of enrollment, even after adjustment for age, sex and blood group ($p < 0.001$). Furthermore, there was a clear trend for increasing likelihood ratios of VWD with an increasing BS (Table 2), a BS ≥ 2 being the threshold for significance. This

result confirms a previous report in selected obligatory carriers for type 1 VWD¹¹. A mucocutaneous BS (computed from spontaneous, mucocutaneous symptoms) was strongly associated with bleeding after surgery or tooth extraction. The symptoms that were mostly associated with VWD within these families were bleeding after minor wounds and cutaneous bleed-

Table 2. Likelihood ratios for VWD at different levels of bleeding score¹²

<i>Bleeding score</i>	<i>Likelihood ratio (95% Confidence Interval)</i>
-3	0.0000
-2	0.0350
(0.011 - 0.113)	
-1	0.103
(0.060 - 0.176)	
0	0.129
(0.076 - 0.219)	
1	1.590
(0.771 - 3.270)	
2	2.240
(1.010 - 4.960)	
3	3.000
(1.290 - 6.960)	
4	15.70
(2.160 - 114.0)	

ing, whereas post-partum bleeding, bleeding from the gastrointestinal tract and oral bleeding had the same frequency observed in UFM. This finding is basically in keeping with those of the above mentioned multicenter study comparing obligatory type 1 VWD carriers and healthy subjects¹¹ and with those of Silwer, who also found that bleeding after minor wounds was the most distinctive feature of VWD¹⁴. There was also a clear tendency for clustering of bleeding symptoms in VWD patients, in particular for epistaxis with post-surgical or oral bleeding and for cutaneous bleeding with menorrhagia.

A key question in VWD diagnosis and treatment is whether laboratory or clinical data could be useful for the prediction of bleeding under circumstantial situations (e.g., surgery or tooth extraction). To address this issue, a mucocutaneous BS, formed by summing only spontaneous bleeding symptoms, was compared to the VWF and FVIII:C levels in the prediction of bleeding after surgery or tooth extraction in a ROC analysis. Clinical assessment proved to be at least as effective as laboratory testing for the prediction of bleeding after tooth extraction, but it was superior in the prediction of bleeding after surgery. Although this finding comes from a retrospective assessment, it suggests that adults with a VWD diagnosis but without a clear-cut history of bleeding could be possibly at lower risk of bleeding. This hypothesis should be prospectively validated.

In conclusion, a quantitative analysis of bleeding symptoms disclosed significant differences in bleed-

ing severity among IC and AFM and between UFM and controls. Likelihood ratios for type 1 VWD rose significantly with an increasing BS. There was a close correlation of severity of bleeding symptoms with VWF levels, and AFM with more severe mucocutaneous symptoms had more bleeding complications after invasive procedures (tooth extraction or surgery). Thus, use of a standardized BS is potentially useful to further dissect the association between VWF function and bleeding, to establish an optimal diagnosis of type 1 VWD and to evaluate the bleeding risk in VWD patients.

Impact of VWF levels on diagnosis

Other than bleeding symptoms, the levels of VWF are relevant for an appropriate diagnosis of VWD. Unfortunately, a single cut-off value is used for diagnostic purposes (usually set at the lower 2.5 percentile) and this approach could result in a loss of information, since the probability of having VWD is clearly higher in subjects with lower VWF levels. This has been appreciated by a quantitative evaluation of VWF in the diagnosis of VWD¹⁵. In this study, likelihood ratio for VWD as a function of plasma VWF were computed for those subjects that in addition to having been diagnosed as VWD by the enrolling Center (either IC or AFM) belonged to a family showing clear linkage of the VWD phenotype with the VWF locus. ABO blood group was the variable most influencing VWF levels, but adjustment of the lower reference limit for the ABO group did not improve sensitivity and specificity of VWF:Ag or VWF:RCo. The lower reference limit (2.5th percentile) was 47 IU/dL for both VWF:Ag and VWF:RCo and showed similar diagnostic performance (ROC area: 0.962 and 0.961 for VWF:Ag and VWF:RCo, respectively; $p=0.81$). The probability of VWD was however markedly increased only for values below 40 IU/dL (positive LR: 95.1 for VWF:Ag), whereas intermediate values (40 to 60 IU/dL) of VWF only marginally indicated the probability of VWD. Taken together, these findings indicate that more stringent laboratory criteria should be adopted, possibly considering as a "significant" VWF reduction only for values below 40 IU/dL.

Linkage analysis

Two papers showed in a limited number of families that a personal and family bleeding history and persistently mildly low VWF levels, the usual criteria of type 1 VWD, may not co-segregate with genetic markers in the VWF^{16,17}.

Table 3. Association between co-segregation of the “clinical practice diagnosis” and categories of VWF in index cases¹⁸

VWF level in Index Case	Complete Co-segregation	Incomplete Co-segregation	OR (95% CI)*
VWF:Ag (IU/dL)			
0-15	15	6	1 [†]
16-30	18	9	0.73 (0.20-2.68)
31-45	18	10	0.67 (0.19-2.32)
>45	12	18	0.24 (0.07-0.82)
VWF:RCO (IU/dL)			
0-15	29	9	1 [†]
16-30	10	5	0.61 (0.15-2.54)
31-45	17	12	0.47 (0.16-1.38)
>45	7	17	0.13 (0.04-0.42)

*OR: odds ratio; CI: confidence interval; adjusted for blood group (0 versus non-0).

[†]Reference category.

In the MCMDM-1VWD, three highly polymorphic short tandem repeat (STR) polymorphisms were selected for linkage studies: one (GT)_n repeat within the promoter region of the VWF gene (VWP) and two (TCTA)_n repeats within intron 40 of the VWF gene (VNTR2 and VNTR3)¹⁸.

Different phenotypic definitions were used for separate analyses: 1. affected status as indicated by the recruiting center, referred to as “clinical practice diagnosis”; 2. affected status defined by VWF:Ag or VWF:RCO below 2.5 percentile of the ABO blood group specific normal distribution in combination with a bleeding score >3, referred to as “stringent diagnosis”; 3. affected status defined by a bleeding score >3, referred to as “bleeding diathesis”. For subgroup analyses these diagnosis groups were further divided: families with all family members having normal multimer pattern versus families with individuals with abnormal multimer patterns; families with an index case with VWF:RCO/VWF:Ag ratio < 0.70 versus ≥ 0.70; families with an index case with VWF:Ag ≤ 30 IU/dL versus > 30 IU/dL.

When families with and without abnormal multimers were analyzed separately, it was clear that the subgroup with abnormal multimers showed the highest lod score and linkage proportion. Overall, the proportion of linkage was comparable to the paper by Casaña et al.¹⁷, but higher than observed in the study by Castaman et al.¹⁶, where the patients were identified through a population based study and not through referral.

The diagnosis of type 1 VWD is influenced to a large extent by the presence of blood group O, since carrying blood group O increases the risk for being diagnosed with type 1 VWD by 3.5. Even in families with complete co-segregation, where the disease is primarily determined by the VWF, the prevalence of blood group O is higher than in the general population and thus blood group O is an additional risk factor for type 1 VWD (OR 2.1). Finally, the more severe the phenotype, the more likely it is that the disease is linked to the VWF (Table 3).

In conclusion, about 70% of the families enrolled showed linkage between the disease phenotype and the VWF, but this figure dropped to 50% after exclusion of possible qualitative defects.

Mutation analysis

The results of genetic characterization of the patients enrolled in the MCMDM-1VWD have been recently published¹⁹. Candidate mutations were identified in 105/150 (70%) IC. 87 IC had one mutation, 17 had two and one had three. A total of 124 mutations were identified, of which 75 were different and of which 55 were novel. The results of multimeric analysis allowed the separation of IC in three groups based on multimers and mutations. Group 1 comprised all 57 IC with subtle abnormality of multimeric pattern (mutations were identified in 54/57), group 2 comprised 51 IC with normal multimers and at least one candidate mutation detected, whilst group 3 comprised 42 IC with normal multimers and no mutation detected.

Table 4. Number of mutations identified and median phenotype in 150 index cases with type 1 VWD¹⁹

Group*	Multimer pattern (n° of cases)	No. of Mutations per group	FVIII:C IU/dL	VWF:RCO IU/dL	VWF:Ag IU/dL	VWF:RCO/Ag	% Blood Group O	Bleeding score
1	AbM (57)	65	34	10	19	0.50	60	10.0
2	NM(51)	59	66	42	45	0.98	60	8.0
3	NM(42)	0	77	51	49	1.05	76	8.0
All	150	124	58	35	38	0.92	65	9.0

The groups represent categories of IC: 1, abnormal multimers (AbM); 2, normal multimers (NM) with a mutation; 3, normal multimers (NM) without a mutation.

P values using unpaired, 2 tailed t test.

VWF:RCO group 1 v 2 and 1 v 3, $p < 0.001$, group 2 v 3, $p = 0.0255$.

VWF:Ag group 1 v 2 and 1 v 3, $p < 0.001$, group 2 v 3, $p = NS$ (0.0610).

Table V. Association between the presence of mutations and VWF level in index Cases¹⁹

VWF level in IC	Mutation	No. Mutation	OR (95% CI)*
VWF:Ag (IU/dL)			
>45	27	27	1 [†]
31-45	24	11	2.2 (0.90-5.3)
16-30	30	6	5.0 (1.8-14.0)
0-15	23	1	23.0 (2.9-182.6)
VWF:RCO (IU/dL)			
>45	23	25	1 [†]
31-45	24	12	2.2 (0.89-5.3)
16-30	17	6	3.1 (1.04-9.2)
0-15	40	2	21.7 (4.7-100.3)

* OR: odds ratio; CI: confidence interval; [†] Reference category.

Interestingly, while FVIII and VWF were clearly lower in IC with abnormal multimers, there was no difference as to the severity of BS (Table 4), again suggesting the presence of a referral bias. However, the likelihood of finding a mutation was clearly related to the plasma levels of VWF (Table 5).

The pattern of mutation observed in type 1 VWD in this study differs from that observed previously in type 3 VWD²⁰, where about 80% of mutations are predicted to lead to null alleles, resulting from non-sense, splice, deletion and insertion mutations. Only a small proportion of such mutations were identified in this cohort (14/124 mutations, 11%). Thus, heterozygosity for a “type 3” VWD allele is not the main cause of type 1 VWD, as also suggested on the basis of the results of a multicenter study on heterozygous carriers of type 3 VWD²¹.

The results of gene screening, along with the results of the Canadian²² and UK studies²³ in type 1 VWD, has significantly enlarged our comprehension of the molecular basis of type 1 and demonstrated that mis-sense mutations scattered over the entire gene are the main responsible for a “quantitative” defect.

Conclusions and perspectives

The results of the MCMDM-1VWD study has significantly contributed to the understanding of the clinical and genetic basis of type 1 VWD. Further efforts will focus on the role of polymorphisms and other genes in inducing a “VWD-like” phenotype in patients without a mutation in the VWF gene, the relationships between mutations and response to desmopressin, the diagnostic role of PFA-100 and of VWF:RCO/VWF:Ag ratio, the expression of novel mutations.

Appendix

The MCMDM-1VWD Study

Peake I^a, Goodeve A^a, Rodeghiero F^b, Castaman G^b, Federici AB^c, Batlle J^d, Meyer D^e, Mazurier C^f, Goudemand J^g, Eikenboom J^h, Schneppenheim Rⁱ, Budde Uⁱ, Ingerslev J^k, Habart D^l, Vorlova Z^l, Holmberg L^m, Lethagen Sⁿ, Pasi J^o, Hill F^p

- The Academic Unit of Haematology, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom.
- Department of Hematology, San Bortolo Hospital, Vicenza, Italy.
- Hemophilia and thrombosis Centre, Foundation IRCCS Maggiore Policlinico Hospital, Mangiagalli Regina Elena and University of Milan, Milan, Italy.
- Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Teresa Herrera, La Coruña, Spain.
- Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U143, Paris, France.
- Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, Lille, France.
- University of Lille, France.
- Department of Hematology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands.
- University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hamburg, Germany.
- Coagulation Laboratory, Hamburg, Germany.
- Centre for Hemophilia and Thrombosis, University Hospital Skejby, Aarhus, Denmark.
- Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic.
- Department of Pediatrics, University of Lund, Lund, Sweden.
- Department for Coagulation Disorders, University of Lund, Malmö, Sweden.
- Department of Pathology, Leicester Royal Infirmary, Leicester, United Kingdom.
- Department of Hematology, Children's Hospital, Birmingham, United Kingdom.

References

1. Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica* 2003; 88: 94-108.
2. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69: 454-9.
3. Werner EJ, Broxson EH, Tucker EL, Giroux DS, Shults J, Abshire TC. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. *J Pediatr* 1993; 123: 893-8.
4. Mannucci PM. von Willebrand factor: a prima ballerina on two different stages. *Semin Hematol* 2005; 42: 1-4.
5. Rodeghiero F, Castaman G. Congenital von Willebrand disease type I: definition, phenotypes, clinical and laboratory assessment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001; 14: 321-35.
6. Sadler JE. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 2003; 101: 2089-93.
7. Sadler J, Rodeghiero F. Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1; on behalf of the SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 775-7.
8. Bolton-Maggs PH, Patterson DA, Wensley RT, Tuddenham EG. Definition of the bleeding tendency in factor XI-deficient kindreds—a clinical and laboratory study. *Thromb Haemost* 1995; 73: 194-202.
9. Sramek A, Eikenboom JC, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Usefulness of patient interview in bleeding disorders. *Arch Intern Med* 1995; 155: 1409-15.
10. McKay H, Derome F, Haq MA, Whittaker S, Arnold E, Adam F, et al. Bleeding risks associated with inheritance of the Quebec platelet disorder. *Blood* 2004; 104: 159-65.
11. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Battle J, Baudo F, Cappelletti A, et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of von Willebrand disease type 1: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost* 2005; 3:2619-26.
12. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Battle J, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 766-73.
13. Kunicki TJ, Federici AB, Salomon DR, Koziol JA, Head SR, Mondala TS, et al. An association of candidate gene haplotypes and bleeding severity in von Willebrand disease (VWD) type 1 pedigrees. *Blood* 2004; 104: 2359-67.
14. Silwer J. Von Willebrand's disease in Sweden. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1973; 238: 1-159.
15. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. Impact of plasma von Willebrand factor levels in the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost*. 2007; 5: 715-721.
16. Castaman G, Eikenboom JCJ, Bertina RM, Rodeghiero F. Inconsistency of association between type 1 von Willebrand disease phenotype and genotype in families identified in an epidemiological investigation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1065-70.
17. Casana P, Martinez F, Haya S, Espinos C, Aznar JA. Significant linkage and non-linkage of type 1 von Willebrand disease to the von Willebrand factor gene. *Br J Haematol* 2001; 115: 692-700.
18. Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, Goodeve A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. Linkage analysis in families diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD. *J Thromb Haemost* 2006;4: 774-82.
19. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Battle J, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood* 2007; 109: 112-121.
20. Eikenboom JCJ. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 365-79.
21. Castaman G, Rodeghiero F, Tosetto A, Cappelletti A, Baudo F, Eikenboom JCJ, et al. Hemorrhagic symptoms and bleeding risk in obligatory carriers of type 3 VWD: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1-6.
22. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *Blood* 2007; 109: 145-54.
23. Cumming A, Grundy P, Keeney S, Lester W, Enayat S, Guilliatt A, et al. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2006; 96: 630-41.

RELACIÓN RIESGO/BENEFICIO DEL TRATAMIENTO DE LA HEMORRAGIA CRÍTICA CON FACTOR VIIA RECOMBINANTE

M.F. LÓPEZ FERNÁNDEZ¹, J. BATLLE²

¹Responsable de la Unidad de Hemostasia y Trombosis.

²Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. A Coruña

Introducción

El factor FVII activado recombinante (rFVIIa) fue autorizado hace una década para el tratamiento de las complicaciones hemorrágicas de pacientes hemofílicos con inhibidor, y más recientemente en el defecto congénito del factor VII y en la enfermedad de Glanzmann¹. Durante estos años, investigadores y médicos que tratan a pacientes con hemorragias severas han utilizado, mediante uso compasivo, el rFVIIa en diversos escenarios por su eficacia potencial como “agente hemostático universal”².

Una revisión sistemática de la literatura médica y científica hasta marzo de 2006 recogía un total de 948 publicaciones en las que el rFVIIa figuraba en el título o en las palabras clave. Más de la mitad (483) de estos estudios corresponden a trabajos en los que el rFVIIa se utilizó fuera de las indicaciones aprobadas. Tal magnitud de publicaciones viene a demostrar la necesidad de disponer de un agente hemostático eficaz, y de la escasez de estudios clínicos aleatorizados prospectivos que demuestren su eficacia.

A pesar de que las publicaciones de series cortas de pacientes y casos anecdóticos tienden a seleccionar

los éxitos terapéuticos, el hecho de que existan tantas publicaciones favorables sugiere que el rFVIIa aporta ventajas adicionales sobre el tratamiento sustitutivo convencional.

Efectividad del rFVIIa

La eficacia del rFVIIa para reducir los requerimientos transfusionales³ y controlar la hemorragia en diferentes condiciones clínicas o quirúrgicas, tales como prostatectomías, cirugía cardíaca, trasplantes, polipectomías, hepatectomías, hemangiomas gigantes, traumatismos diversos, hemorragias intracraneales, postparto, hemorragias alveolar difusa, gastrointestinales o en complicaciones obstétricas, sugiere que posee propiedades hemostáticas, incluso en pacientes sin alteración demostrable en los mecanismos de la coagulación. En la mayoría de estos pacientes la hemorragia se controla con dosis de rFVIIa convencionales, o incluso inferiores a las recomendadas en pacientes hemofílicos con inhibidor.

Dada la diversidad de las complicaciones hemorragias mencionadas, es difícil diseñar estudios clínicos que profundicen en la eficacia del rFVIIa. Sin embargo, es necesario documentar este hecho con datos objetivos para confirmar en qué indicaciones es eficaz, diseñar guías de actuación e indicar las dosis más idóneas en cada situación. En este sentido se han efectuado algunos estudios, y otros se encuentran en fase de desarrollo.

Estudios prospectivos⁴

El primer estudio controlado, aleatorizado frente a placebo se efectuó en pacientes sometidos a prostatectomía, y demostró que una dosis única de rFVIIa de 20 o 40 µg/kg reducía significativamente ($p = 0,001$) las necesidades transfusionales en comparación con el grupo placebo⁵.

En pacientes con traumatismos severos, se han realizado dos estudios paralelos, prospectivos y aleatorizado, diseñados con el fin de valorar si el rFVIIa, administrado conjuntamente con la terapia convencional, reducía los requerimientos transfusionales en pacientes con traumatismos. Entre los pacientes con traumatismo cerrado, el porcentaje de pacientes que precisaron ≥ 20 unidades de concentrados de hematíes (CH) fue del 10% en el grupo tratado con rFVIIa, en comparación al 20% en el grupo control ($p = 0,019$). No se observaron diferencias significativas en los pacientes con traumatismo penetrante⁶.

El primer estudio multicéntrico controlado en fase II, diseñado para evaluar si el rFVIIa disminuía la morta-

lidad, se efectuó en pacientes con hemorragia intracraneal (HIC) de menos de 4 h de evolución. Se incluyeron 399 pacientes aleatorizados en 4 grupos, tres de los cuales recibieron rFVIIa a dosis de 40, 80 y 160 µg/kg, respectivamente. Las dosis 80 y 160 µg/kg redujeron significativamente la mortalidad a los 90 días (del 29% al 18%), en comparación con el grupo tratado con dosis bajas y el grupo control ($p = 0,02$). La dosis más alta reducía también el volumen del hematoma a las 24 h; sin embargo, la incidencia de complicaciones trombóticas se incrementó más de 3 veces (7 vs. 2%)⁷. Actualmente se encuentra en desarrollo un estudio en fase III, en pacientes con HIC aguda (estudio FAST), diseñado con el fin de conocer si el rFVIIa a dosis de 20 o 80 µg/kg es superior al placebo, tanto en la reducción de la mortalidad como de la discapacidad a los 90 días. Entre los criterios de exclusión se incluyen: el infarto agudo de miocardio, la angina inestable y el ACV agudo⁴. Aunque los resultados de este estudio sean favorables, si se tienen en cuenta los factores de riesgo trombótico y otras situaciones inherentes al proceso –como la presencia de malformaciones vasculares– se puede estimar que sólo se beneficiaron del tratamiento un 13% de los pacientes.

Otro estudio realizado en un grupo heterogéneo de pacientes sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos con hemorragias severas o moderadas, no mostró diferencias, en relación con el grupo placebo, en cuanto a la reducción de hemorragias o de los requerimientos transfusionales⁸.

En otro estudio, no controlado y con placebo, en pacientes con hepatopatía avanzada sometidos a biopsia hepática por laparoscopia, el rFVIIa administrado de forma profiláctica permitía una hemostasia eficaz durante el procedimiento⁹. En un estudio europeo controlado con placebo en pacientes cirróticos con hemorragia gastrointestinal, el rFVIIa reducía el sangrado por varices esofágicas en los pacientes con hepatopatía severa¹⁰. Lodge *et al.*¹¹ observaron una reducción de las pérdidas sanguíneas en el posoperatorio de pacientes sometidos a hepatectomía tratados con el producto.

Seguridad del rFVIIa

El efecto adverso más temido son las complicaciones tromboembólicas. Estas son raras en pacientes hemofílicos con inhibidor tratados con rFVIIa, habiéndose observado 18 episodios tras más de 400.000 infusiones. En estos pacientes, las trombosis se producían al utilizar el rFVIIa en combinación o en la proximidad de otros productos con actividad procoagulante (como, por ejemplo, los concentrados del complejo protrombínico activado).

Por el contrario, el riesgo de complicaciones trombóticas en el programa de uso compasivo no se conoce en profundidad, aunque se estima superior. O'Connell¹² revisando las complicaciones comunicadas en estudios y casos clínicos, entre 1999 y el 2004, observa un total de 165 episodios trombóticos de los cuales 151 correspondían a pacientes con hemorragia crítica. El 54% de las trombosis se localizaron en el territorio arterial, el 40,4% en el venoso y un 5,5% estaban relacionados a catéteres. En la mayoría de los casos el efecto adverso ocurría en pacientes con unas condiciones clínicas que predisponían a la trombosis, como por ejemplo la edad elevada, diabetes, arteriosclerosis, obesidad o cáncer. Ello sugiere que el estado pretrombótico de estos pacientes puede potenciarse con el rFVIIa. En otros casos se relacionó con dosis muy elevadas del producto. El estudio pone también en evidencia un incremento de la incidencia de las trombosis espontáneas de 5 a 35 episodios/año (incremento de unas 7 veces), en probable relación con la expansión del uso del rFVIIa en pacientes con hemorragia crítica.

Con estos datos, y siguiendo las recomendaciones de utilización para todos los nuevos productos biológicos que se introducen en la práctica clínica, debería efectuarse un seguimiento estrecho de este posible efecto adverso. Cuando se indique este producto deben tenerse en cuenta las posibles interacciones entre el rFVIIa y las alteraciones de la coagulación subyacentes, los factores de riesgo trombótico del paciente y el uso simultáneo de otros productos con potencial procoagulante.

Coste del tratamiento

El coste del tratamiento con rFVIIa no puede ignorarse. Si a un paciente adulto de 72 kg con HIC se le prescribe una dosis única de 80 µg/kg, se le administran un total de 5,76 mg, lo que supone en nuestro país unos 2.989 €. Sin embargo, no es menos cierto que la HIC es una complicación costosa y discapacitante que requiere importantes recursos médicos. Con el fin de conocer si el rFVIIa es superior al tratamiento convencional en relación con la calidad de vida de los pacientes y al coste global, se ha efectuado un estudio de rentabilidad clínica entre el grupo de pacientes incluidos en el ensayo clínico en fase II con HIC⁶. El análisis demostró que el coste de las dosis iniciales de rFVIIa suponía entre un 1,5% y 6% del coste médico global, y que la dosis de 80 µg/kg reducía el coste global de 163.730 a 153.264 dólares. Según este estudio la dosis de 80 µg/kg en pacientes con HIC de menos de 4 h de evolución es una estrategia eficaz, que ahorra recursos en comparación con el tratamiento convencional. No obstante,

se precisan más estudios para confirmar estos resultados¹³.

Valoración del riesgo/beneficio

El rFVIIa potencia la hemostasia y es eficaz en una amplia variedad de complicaciones hemorrágicas, en muchas de las cuales el tratamiento convencional es insuficiente o ineficaz. Sin embargo, no es efectivo en el 100% de los pacientes con hemorragias críticas. Este hecho, conjuntamente con su potencial riesgo trombótico y el elevado coste, que puede incrementarse notablemente cuando se utilizan dosis repetidas, debería concienciar a los médicos que tratan pacientes de la necesidad de efectuar rigurosos balances del riesgo hemorrágico y trombótico antes de establecer su indicación.

A la espera de disponer de más estudios controlados –y siendo conscientes de que, dada la gran variabilidad de situaciones en las que debe ser investigada su eficacia, puede que nunca lleguen a realizarse–, muchas instituciones están diseñando estrategias y guías de actuación más o menos específicas.

Dado que este producto es utilizado por múltiples servicios clínicos, se recomienda para la elaboración de las guías de actuación que los expertos que vayan a participar en su desarrollo reúnan los siguientes criterios: 1) poseer conocimientos sobre la farmacología y fisiopatología de la hemostasia; 2) tener experiencia en el uso de rFVIIa; 3) conocer otros posibles tratamientos alternativos; 4) saber diferenciar entre otras posibles causas de las hemorragias; 5) realizar una evaluación de los posibles efectos adversos, especialmente del riesgo trombótico del paciente; 6) supervisar el tratamiento; y 7) indicar la dosis más ajustada para cada paciente^{14,15}.

En el 2002 se puso en marcha en nuestro complejo hospitalario un protocolo consensuado con diferentes servicios sobre la utilización de rFVIIa en pacientes con hemorragia crítica. Un análisis de los resultados de los pacientes incluidos ha puesto en evidencia una eficacia global del 69%, que se incrementaba hasta un 78% en aquellos casos en que la indicación del tratamiento se ajustaba a los criterios definidos en el protocolo. Por el contrario, en los casos en que utilizó sin una adecuada valoración del riesgo/beneficio, la eficacia disminuyó al 37%¹⁶.

Conclusión

En aquellas situaciones en las que se encuentre comprometida la vida del paciente por una hemorragia crí-

tica, sobre todo si no se ha observado una respuesta satisfactoria al tratamiento convencional, debe utilizarse el rFVIIa tras efectuar una cuidadosa valoración del riesgo/beneficio. A la espera de una mayor evidencia clínica, los diferentes hospitales deben diseñar guías de actuación en las que participe un grupo multidisciplinar de especialistas, pero lideradas por hematólogos, con el fin de garantizar el apropiado uso del producto, minimizar los efectos adversos y facilitar su rentabilidad clínica.

Bibliografía

1. Batlle FJ, López Fernández MF. Enseñanzas de factor VII activo recombinante. Diez años desde su autorización en hemofilia con inhibidor. *Medicina Clínica* 2007 (en prensa).
2. Hedner U. Recombinant factor VIIa: its background, development and clinical use. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 225-9.
3. Leal-Noval R, Muñoz M, Páramo JA; for the Spanish Expert Panel on Alternatives to Allogeneic Blood Transfusion. Spanish consensus statement on alternatives to allogeneic transfusions: the "Seville document". J Compilation. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine* 2006; 8: 178-202.
4. Stanworth SJ, Birchall J, Doree CJ, Hyde C. Recombinant factor VIIa for the prevention and treatment of bleeding in patients without haemophilia (review). *The Cochrane Library* 2007; 2: 1-57.
5. Friedrich PW, Henny C, Messelink EJ, et al. Effect of recombinant activated factor VII on perioperative blood loss in patients undergoing retropubic prostatectomy: a double-blind placebo-controlled randomised trial. *Lancet* 2003; 361: 201-5.
6. Boffard KD, Piou B, Warren B, et al.; for the NovoSeven Trauma Study Group. Recombinant factor VIIa as adjunctive therapy for bleeding control in severely injured trauma patients: two parallel randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trials. *J Trauma* 2005; 59: 8-18.
7. Mayer SA, Brun N, Begtrup K, et al.; for the Recombinant Activated Factor VII Intracerebral Haemorrhage Trial Investigators. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral haemorrhage. *N Engl J Med* 2005; 352: 777-85.
8. Pihusch M, Bacigalup A, Szer J, et al., for the F7BMT-1360 trial Investigators. Recombinant activated factor VII in the treatment of bleeding complications following hematopoietic stem cell transplantation. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1935-44.
9. Jeffereers L, Chalasani N, Balart L, et al. Safety and efficacy of recombinant factor FVIIa in patients with liver disease undergoing laparoscopic liver biopsy. *Gastroenterology* 2002; 123: 118-26.
10. Bosch J, Thabut D, Bendtsen F, et al.; on behalf of The European Study Group on rFVIIa in UGI haemorrhage. Recombinant factor VIIa for upper gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a randomized, double blind trial. *Gastroenterology* 2004; 127: 1123-30.
11. Lodge JPA, Jonas S, Oussoultzoglou E, et al. Recombinant coagulation factor VIIa in major liver resection. *Anesthesiology* 2005; 102: 269-75.
12. O'Connell KA, Wood J, Wise RP, et al. Thromboembolic adverse events after use of recombinant factor VIIa administration. *JAMA* 2006; 295: 293-8.
13. Earnshaw SR, Joshi AV, Wilson MR, Rosand J. Cost-effectiveness of recombinant factor VII in the treatment of intracranial hemorrhage. *Stroke* 2006; 37: 2751-8.
14. Hoots WK. Challenges in the therapeutic use of a "so-called" universal hemostatic agents: recombinant factor VIIa. *Hematology* 2006; 426-31.
15. Rusdisill CN, Hockman RH, DeGregory KA, et al. Implementing guidelines for the institutional use of factor VIIa (recombinant): a multidisciplinary solution. *AM J Health-Syst Pharm* 2006; 63: 1641-6.
16. Otero M, López-Fernández MF, Saavedra C, Batlle J. Factor VIIa recombinant in the treatment of critical haemorrhage. Experience in a single centre. *ISTH Congress, Geneva, Julio 2007*.

NUEVAS MOLÉCULAS HEMOSTÁTICAS Y PRIMEROS RESULTADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA

J.F. LUCÍA¹, C. AGUILAR², V. RECASENS¹, A. RUBIO¹

¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza

²Servicio de Hematología. Hospital Santa Bárbara. Soria

Introducción

La terapéutica génica será sin duda la curación de la hemofilia. Estamos asistiendo a avances sorprendentes en la estrategia del tratamiento de los genes defectuosos. Desde los sistemas de transfección no transportados por virus, pasando por el empleo de vectores víricos categorizados como integrantes o no integrantes, lo que limita el tipo de célula de diana¹, hasta la corrección de la hemofilia A usando la reparación de RNA con el método de "trans-splicing RNA mediado por el espliceosoma" (SMaRT) existe una serie de líneas de investigación sólidas pero cuyos resultados fenotípicos son actualmente desalentadores².

El tratamiento de los hemofílicos hoy por hoy depende esencialmente de los factores derivados plasmáticos y de los obtenidos por tecnología recombinante. La esperanza de vida de estos pacientes en los países desarrollados es de 65 años; las infecciones graves asociadas a la sangre no se han vuelto a observar desde el año 1990 y la enfermedad articular se ha borrado en los niños menores de 15 años. Estas consecuencias, fruto de la administración temprana y continuada del factor correspondiente, lo son a costa de un esfuerzo económico notable³. Estos enfermos son unos afortunados si se tiene en cuenta que el 80% de la población hemofílica mundial no tiene acceso a ningún tipo de terapéutica sustitutiva y que las expectativas de una elaboración ilimitada de factores hemostáticos se han visto cercenadas por el descenso de las donaciones de sangre y los cierres temporales de plan-

tas de producción⁴. Por otra parte, los elevados costes en la elaboración del factor VIII (FVIII) pueden dividirse a partes iguales entre la expresión y purificación del obtenido por las células clonadas, el proceso de liofilización y el envasado final. Como sólo se puede actuar en las primeras fases, la comunidad científica se ha puesto a trabajar en la modificación del ritmo de producción de moléculas hemostáticas, de su estructura o de sus interacciones bioquímicas para conseguir prolongar su vida media, lo que, en teoría, redundaría sobre su precio.

Características bioquímicas del FVIII

El FVIII es una proteína cuya estructura primaria consiste en 2.332 aminoácidos (AA) y posee tres dominios homólogos A, dos homólogos C y un único dominio B y cuyo orden es: A1-A2-B-A3-C1-C2. Antes de su liberación al plasma la proteína recién elaborada sufre una serie de modificaciones que conducen a su estructura terciaria con una cadena pesada (CP) de 90-200 kDa formada por los dominios A1 (1-336) — A2 (373-719) y B (741-1648) y la cadena ligera (CL) (80 kDa) por el dominio A3 (1690-2019) y los dominios C, C1 (2020-2172) y C2 (2173-2332). Los extremos C-terminales de A1 (337-372) y A2 (720-740) y el extremo N-terminal de A3 (1649-1689) tienen una proporción significativa de residuos cargados negativamente y se conocen como *regiones ácidas*: a1, a2 y a3, respectivamente. Los dominios A y C poseen funciones de coagulación destacables en lo que se refiere a su interacción con el factor IX activado (FIXa), factor X activado (FXa), factor von Willebrand (FvW) y superficies fosfolipídicas. El dominio B, que constituye el 38% del cADN, es codificado por un solo exón y contiene un amplio número de oligosacáridos unidos a N o S/T.

Métodos celulares para mejorar el rendimiento del FVIII

Mayor expresión del ARNm del FVIII

1. Se ha observado que el FVIII recombinante sin dominio B (FVIIIrBDD) tiene una expresión traslacional veinte veces superior al factor VIII nativo (WTFVIII) y parece ser debido a una mayor expresión del mRNA. Este factor es el conocido ReFacto, con el que no se han descrito grandes diferencias en cuando a resultados clínicos y generación de inhibidores frente a otros recombinantes⁵.
2. Otra forma de incrementar la expresión del FVIII mRNA ha sido la inserción del intrón 1 truncado del

factor IX (FIX) en sustitución de los intrones 1, 12 o 13 del FVIIIr BDD cADN; al parecer el intrón 1 del FIX mejora la expresión del FIX (y por extensión de la proteína en cuyo ADN está insertado). Los intrones 12 y 13 del gen del FVIII actúan como silenciadores transcripcionales y reprimen la expresión del FVIII. Por esto las sustituciones de los intrones 1 y 13 por la forma truncada del intrón 1 del FIX induce una secreción del FVIII hasta 13 veces superior por la consiguiente acumulación de mRNA en la célula⁶.

Mayor secreción del factor VIII

1. *Reducción de la influencia de las chaperoninas en el retículo endoplasmático.* La secreción del FVIII del retículo endoplasmático (RE) precisa de su separación de una chaperonina –BiP– que controla el transporte hasta el aparato de Golgi (AG). La disociación es ATP dependiente. Se ha identificado una región de 110 AA en el dominio A1 en donde el lugar de unión a la BiP parece estar localizado en una hoja beta en la que 7 de 11 AA son L o F. También el factor V (FV) tiene la misma región pero se secreta 20 veces más eficientemente. Cuando se sustituyen estos 110 AA (entre los residuos 226-336) por los homólogos del FV, el híbrido FV/FVIII se libera cinco veces mejor. Sin embargo, este constructo no posee capacidad de cofactor. El logro definitivo ha sido una simple mutación: F309A, o con el residuo homólogo del FV (S), que induce una secreción 3 veces superior; se obtienen todavía mejores resultados con la doble mutación F309S y L303E ya que el producto resultante retiene además capacidad de cofactor⁷.
2. *Transporte mejorado del RE al AG.* El FVIIIr BDD se expresa veinte veces más que su forma nativa; sin embargo, su secreción es apenas dos veces superior. La razón de este fenómeno se vincula a la etiología del defecto congénito y asociado de los FV y VIII descrito por Oeri en 1954. Este trastorno está producido por un gen que codifica una proteína que sirve de marcador para un compartimento intermedio entre el RE y el AG, denominado ERGIC-53. Esta última es una lectina homo-hexamérica que muestra afinidad por los residuos manosa y actúa como receptor de transporte de glicoproteínas, fijándolas a las vesículas recubiertas por COPII que brotan constantemente del RE hacia el AG. Se pudo comprobar que la interacción del dominio B con ERGIC-53 es, al menos en parte, dependiente de su concentración hidrocarbonada. El contenido oligosacárido mínimo para la secreción óptima se ha conseguido con la incorporación al constructo FVIIIr BDD de 226 AA de la región N-terminal del dominio B, de alta afinidad a los azúcares, lo que finalmente le confiere un in-

cremento en la secreción de 10 veces con respecto a la molécula anterior².

Métodos extracelulares para mejorar el rendimiento del FVIII

Moléculas de biodiseño

1. *Mejora de la eficiencia de activación.* La activación del FVIII se produce por sus principales activadores biológicos: trombina y FXa. La activación depende de la escisión de la CP y de la CL. El corte de la CP a nivel de la R740 produce un polipéptido de 90 kDa. Un corte posterior en R372 origina dos fragmentos: A1 (50 kDa) y A2 (43 kDa), concomitantemente, la CL es escindida a nivel de R1689 para formar el fragmento A3-C1-C2 (73 kDa). Durante la fase de activación del FVIII, los dominios A1 y A3 se mantienen asociados por acción del cobre iónico, mientras que el A2 se une débilmente por interacciones electrostáticas al heterodímero formado por los dominios A1-A3-C1-C2. Woerberg observó que la activación eficiente del FVIII dependía de la secuencia de AA D713-R740 y la sustituyó por otra del gen del cofactor II de la heparina que tiene importancia en la inhibición de la trombina: I51-L80; de este modo, el constructo muestra más avidez por la trombina y se activa más rápidamente⁹.
2. *Resistencia a la desactivación.* El FVIII activado por la trombina (FVIIIa) es un heterotrímero (HT) inestable que se puede desactivar proteolíticamente por la acción de la proteína C activada (PCa), FIXa o FXa. No obstante, parece ser que la desaparición de su actividad procoagulante depende más de la disociación reversible de la subunidad A2 del HT que ocurre a pH fisiológico. Se han descrito mutaciones en las que la plasmación fenotípica de la inestabilidad de HT es una hemofilia A^{10,11}. A pesar de las modificaciones practicadas para prevenir la pronta desactivación del FVIIIa por la PCa, existe evidencia experimental de que la pérdida de la actividad procoagulante del FVIIIa depende esencialmente de la disociación de la subunidad A2. Para diseñar una molécula no susceptible a esta separación se retiraron del dominio B los AA 794-1689, y se sustituyó la R740 por A con lo que la trombina no puede escindir la molécula en los lugares R740 y R1689 y sólo acontece en la R372; el resultado neto es que se retiene el dominio A2 covalentemente unido a la cadena ligera previniendo su disociación espontánea. Su actividad es 5 veces superior a la forma nativa¹². El 38% de la actividad máxima se retiene aun a las 4 horas *in vitro*; en las mismas condiciones, toda actividad de la molécula original ha desaparecido a los 10 minutos.

3. *Alargamiento de la vida media del FVIII.* Uno de los mecanismos que regulan el nivel de FVIII en la circulación es su aclaramiento. El catabolismo del FVIII está mediado por dos receptores: la proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (PRL) y por el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (RLDL). Ambas cooperan en este proceso¹³. La PRL se expresa predominantemente en el hígado, mientras que el RLDL es ubicua aunque está más prominentemente en ese órgano. Mientras que la PRL reconoce más de 35 ligandos estructuralmente distintos, el RLDL tiene restringida su actividad a las lipoproteínas que contienen ApoB y ApoE. El aclaramiento del FVIII por sus receptores está facilitado por los proteoglicanos heparán sulfato (PGHS) de la matriz extracelular.

La interacción del FVIII con la PRL compromete, al menos, tres lugares: en el dominio A2 de la CP, y en el A3 y C2 de la CL. El dominio de alta afinidad se ha hallado en el dominio A3, y concretamente entre los residuos 1811-1818. En contraste con los dominios A2 y A3, el dominio aislado C2 parece exhibir una baja afinidad por la PRL¹⁴, por lo que los lugares A2 y A3 son los que más contribuyen a la interacción FVIII/PRL. El lugar de unión a los PGHS se localiza en la región 558-565 del dominio A2 y es distinto a la de unión a la PRL, también en la A2. Considerando que la región 1811-1818 del dominio A3 representa el lugar de gran afinidad para el FIXa y que la 484-509 del dominio A2 contribuye a la actividad de cofactor del FVIIIa, la estrategia consistirá en seleccionar las mutaciones que reducen la interacción con la PRL y no afectan a las propiedades funcionales del FVIII.

Como no se han realizado mutagénesis en el lugar de unión a la PRL en A3 y al PGHS en A2, la manipulación se ha dirigido a la región 484-509 de A2 y a los residuos espacialmente próximos a ella según el modelo en tres dimensiones de A2¹⁵. En estudios basados en competición y resonancia de plasmón superficial (RPS), las afinidades de los mutantes K466A, R471A, R484A, S488A, R489A, R490A, H497A y K499A para la PRL estuvo disminuida significativamente. Este hallazgo se correlaciona con un menor internamiento de estos mutantes en cultivos celulares. Si se combinan estas mutaciones en pares (K466A/R489A, R471A/R484A, S488A/R499A y R490A/H497A) se consigue un efecto acumulativo con descenso de la afinidad por la PRL hasta de 10 veces, y de dos en cuanto a la endocitosis. Basados en estos resultados, los residuos de A2: K466, R471, R484, S488, R489, R490, H497 y K499 son los mayores determinantes de lugar de unión a la PRL. Se sugiere que cuatro residuos cargados positivamente (K466, R471, R489, R490) y dos hidrofílicos (Y487 y S488) forman el marco de unión a la PRL. Las mu-

taciones R484A, S488A, R489A, R490A producen proteínas con afinidad reducida a la PRL reteniendo actividad de cofactor. Estas mutaciones pueden ser buenos candidatos para la elaboración de FVIII completo de vida media más larga¹⁶.

4. *Reducción de la antigenicidad del FVIII*. Los inhibidores en hemofilia A aparecen en el 25% de los pacientes tras infusiones repetidas. Los blancos de los inhibidores se sitúan en los dominios A2 y C2 del FVIII. Como los inhibidores humanos tienen escasa reacción cruzada con el factor VIII porcino, si se obtiene un híbrido en el que se sustituyan los principales epítomos por secuencias porcinas, es posible que se tengan menos interacciones. Barrow realizó sustituciones en los AA 484-508 de A2, 1649-1687 de a3, 1694-2017 de A3 y 2181-2321 de C2 observando una reducción significativa de su antigenicidad frente a 23 plasmas con anticuerpos¹⁷.

Moléculas de FVIII conjugadas

1. *FVIII asociado a polietilenglicol (PEG)*. Los polímeros de PEG son anfipáticos, atóxicos e inmunológicamente inertes. La unidad básica es óxido de etileno que forma estructuras lineales (5-30 kDa) o ramificadas (40-60 kDa) a través de uniones entre los grupos hidroxilo terminales. La pegilación fue descrita en los años setenta y actualmente se ha plasmado en varios productos terapéuticos. Los polímeros de PEG incorporan numerosas moléculas de agua en su estructura hidrofílica adquiriendo un volumen desproporcionadamente elevado respecto a su peso molecular intrínseco; por eso, la molécula pegilada supera el umbral de la filtración renal y, como consecuencia, expande su vida media. En el medio acuoso, las cadenas de PEG son muy móviles y pueden ocultar ciertos determinantes antigénicos a las células inmunocompetentes. También evita la proteólisis al crear barreras estéricas o conjugaciones en lugares específicos que dificultan la acción de las proteasas.

La pegilación del FVIII parece ser la progresión natural en el avance de la terapéutica en hemofilia. Sin embargo, no todo son luces en esta estrategia. El inconveniente más importante es que, aunque la molécula conjugada le confiere una mayor vida media, se acompaña de una disminución de su actividad específica y esto es debido a que el PEG puede unirse a AA hidrofílicos como la K e impedir el acceso a las proteasas para su activación biológica. Este último efecto va en detrimento de su eficacia ya que la molécula nativa precisa de la trombina para su activación y su interacción posterior con los fosfolípidos, el FIXa y el FX para ejercer su función de cofactor. Por otra parte, el FVIII es de por sí una molécula lo

suficientemente grande como para escapar al filtro renal y su vida media está naturalmente condicionada a su unión con el FvW que podría estar dificultada. La restricción de su actividad sería aceptable si se compensara con una farmacocinética de vida media larga y una acción sostenida. La experiencia con el FVIII pegilado y carente del dominio B (PEG/r-VIII SQ) ha permitido comprobar ciertos aspectos: a) cuando el PEG se asocia a AA hidrofílicos, especialmente K, la consecuencia es una pérdida de actividad proporcional al grado de modificación, por lo que se precisa gran selectividad para la conjugación; b) los métodos empleados para proteger los sitios funcionales con el máximo de polímeros (hasta 4 por mol de FVIII) no consiguen preservar más del 50% de su actividad y además la unión del FvW supone sólo de un 26 a un 43% del total posible. La estrategia de la pegilación debe pasar por la adhesión del polímero a grupos no esencialmente funcionantes como los C u oligosacáridos o protegiendo los esenciales con un inhibidor o sustrato específico; en una molécula como el FVIII es posible, pero requiere intervenir numerosos lugares clave¹⁸.

La estrategia que parece que va a rendir frutos en un futuro próximo tiene que ver con el empleo del dominio B como lugar de aplicación de estos polímeros basándose en que juega un escaso papel tras la activación por la trombina. Su modificación molecular introduciendo residuos C, que crean lugares tiol-reactivos, parece ofertar una gran esperanza de éxito. La casa Baxter, en asociación con Nectar Therapeutics (experta en tecnología de pegilación selectiva), ha iniciado un ensayo clínico.

Una preocupación añadida es el destino metabólico del PEG ya que no es biodegradable. Se han descrito posibles rutas de degradación no relacionadas con las desintoxicantes y que operan lentamente; por ello se sugiere que acabará en tejidos que participen en su incorporación celular y, concretamente, en sus lisosomas. Los efectos adversos potenciales de cantidades importantes de PEG durante largos periodos de tiempo, como es el caso de los tratamientos profilácticos en hemofilia, son desconocidos¹⁹.

2. *Liposomas pegilados*. Los liposomas son vesículas lipídicas capaces de albergar fármacos, bien en su fase acuosa o en la bicapa lipídica, y se han utilizado como vehículo para aplicaciones terapéuticas. Lamentablemente, se retiran de la circulación por el sistema reticulohistiocitario. Al incorporar PEG a su superficie, su aclaramiento disminuye y su vida se prolonga. Estos liposomas modificados se describen como "liposomas estabilizados estéricamente" (LEE) y se han empleado con éxito asociados a ciertos fármacos como la deoxirrubicina y la IL-2. Una de las estrategias de formulación con relación al WTFVIII ha sido la preparación de LEE conte-

niendo distearoil fosfatidiletanolamina (DEFA) conjugado con PEG. Esta preparación, designada como PEGLip-FVIII, no se halla encapsulada en la fase acuosa (intraliposoma), ni insertada entre la bicapa lipídica, sino asociada al liposoma por su alta afinidad con el PEG-DEFA. Los estudios de ligamiento usando la RPS han demostrado que no existe resistencia a su unión con el FvW y la actividad coagulante del PEGLip-FVIII es similar al WTFVIII medido en uno o dos tiempos²⁰. Esta nueva formulación experimentada con éxito en el animal de laboratorio está en ensayo clínico en fases I-II por los laboratorios Zilip-Pharma y Bayer.

3. *Polímeros de ácidos polisialícos (APS)*. Los APS son polímeros lineales de ácido siálico (N-acetil neuramínico), que se halla abundantemente en la superficie de las células y en muchas proteínas. Los APS son extremadamente hidrofílicos y pueden formar una “nube acuosa” en torno a la molécula terapéutica protegiéndola de los enzimas proteolíticos, de los receptores de aclaramiento e incluso de anticuerpos. Los APS son biodegradables, lo que supone una ventaja frente a la pegilación. Se han aplicado a una serie de fármacos como la asparraginasa, el interferón y la insulina. La polisialización del FVIII se estima prometedora, ya que parece prolongar su vida media, evita su degradación enzimática e impide la formación de anticuerpos²¹. Está demostrado que conserva su acción biológica pero no la conservación de la afinidad por el FvW o la activación adecuada por la trombina. Los laboratorios Baxter, en colaboración con Lipoxen Technologies, están trabajando en este campo.

Elaboración de FVIII de animales transgénicos

Una molécula de factor VIII que aportara una profilaxis efectiva con una administración semanal, sin duda sería un hallazgo notable. Lamentablemente parece improbable que se asociara a una reducción significativa del costo de tratamiento. La experiencia con otros productos biológicos de larga duración, como el PEG-G-CSF, muestra que el precio no se modifica³.

Dos de las razones de la carestía del factor VIII son su escasa concentración en plasma y las limitaciones de su producción en biorreactores con células modificadas genéticamente por cualquiera de los métodos descritos. Básicamente, el problema de una elaboración limitada reside en el escaso progreso que se ha realizado para elevar la concentración de células en el medio de cultivo. Ni que decir tiene que el precio se va elevando con los procesos de concentración y purificación, las inversiones económicas, los servicios de manufacturación y el cumplimiento de las reglamen-

taciones sanitarias en todo el proceso de producción. Cuando se consideran como biorreactores, los tejidos mamarios pueden producir concentraciones elevadas de proteínas secretadas debido a que la densidad celular glandular es de 10^9 células por mL^{-1} frente a la concentración máxima de un biorreactor de 5×10^6 células por mL^{-1} . Este aspecto justifica la notable producción de proteína de alrededor de $1\text{-}15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Las razones para elegir al cerdo como animal de producción de factor VIII frente a otro animal de estabulación es el alto volumen de leche que puede recogerse por día (1-3 L) y la calidad del proceso postranslacional de las células del tejido mamario del cerdo con relación a otros animales; en muchos aspectos bioquímicos y fisiológicos este animal es muy parecido al humano. Los cerdos pueden ser ordeñados hasta 5 veces al día durante periodos de dos lactancias de 50 días, lo que supone entre 100 y 300 L al año²². Se ha demostrado la presencia de FVIII maduro de dos cadenas en su leche. Además, los N-glicanos se expresan mejor que en los rumiantes.

La producción de una proteína recombinante a través de la leche de un animal transgénico se consigue generando inicialmente un vector que contenga el gen que codifica la proteína deseada unida a elementos reguladores específicos de la leche, generalmente el promotor del gen de la betacaseína. Posteriormente se realiza una microinyección pronuclear en un embrión de una célula o, alternativamente, una transfección en una población de células susceptible de transferencia nuclear somática (óvulos). Después se seleccionan aquellos animales que expresan la proteína en su leche y se genera la cabaña adecuada.

La seguridad de estos productos se ha demostrado en ensayos clínicos por Genzyme Transgenic Corporation. Para reducir los riesgos de transmisión de enfermedades se establecen las mismas barreras que con otros factores purificados, plasmáticos o recombinantes (cromatografía, solvente/detergente, nanofiltración). En este caso es igualmente de primordial importancia mantener los rebaños en un ambiente libre de patógenos. El modelo de referencia puede ser el factor VIII bovino Hyate:C[®] cuya producción hubo que detenerse porque el producto estaba contaminado con parvovirus porcino (PVP). En un estudio retrospectivo se concluyó que no había existido evidencia de que los pacientes a los que se había infundido este producto hubieran estado en contacto con el PVP, el virus de la encefalomiocarditis, o el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. Otro motivo de inquietud son las encefalopatías espongiiformes transmisibles, frente a las que los suidos son especialmente resistentes como se ha demostrado tras su exposición a nutrientes altamente contagiosos²³, y además son alimentados exclusivamente con productos de origen vegetal.

Métodos celulares para mejorar el rendimiento del FIX

La hemofilia B, también heredada de forma recesiva ligada al cromosoma X, presenta unas manifestaciones clínicas que remedan a la A. La clonación del FIX por dos grupos de modo independiente permitió la elaboración de FIX recombinante (FIXr), libre, en principio, de los contaminantes de la sangre o sus componentes.

La producción de FIXr requiere de células de mamífero ya que su síntesis precisa de una compleja serie de modificaciones postraslacionales. Sólo existe un producto aprobado para su uso en hemofilia B, BeneFIX™, producido por Wyeth/Genetics Institute y se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO) en un medio de cultivo sin proteínas de origen humano. La proteína de BeneFIX presenta tres isoformas según su unión a los fosfolípidos, a las células endoteliales y a la activación del FX y tienen propiedades hemostáticas semejantes. Las modificaciones postraslacionales se han realizado actuando sobre la N-glicosilación. Sin embargo, la recuperación del FIX ha sido más baja que la del original plasmático lo que ha constituido un escollo importante en la generación de nuevos FIXr. Sin embargo, su producción puede incrementarse hasta 8 veces incluyendo tres tripletes ATG como señal de inicio de la traslación. También se mejora incluyendo la forma truncada del intrón 1 del FIX en el cADN de su forma nativa. Este intrón parece inducir una acumulación de mRNA FIX en el núcleo, muy probablemente como consecuencia de una mejor protección de los transcritos frente a su degradación y consiguiéndose un incremento en la producción de FIX de 8 a 15 veces²⁴.

Nautilus Biotech y Wyeth han firmado un acuerdo para alargar la vida media del FIXr, lo que redundará en un menor número de infusiones.

Debido al avance importante que se está observando en la terapéutica génica con la hemofilia B, las mejoras en este campo se están relegando porque en el futuro no serán la mejor oferta.

Métodos extracelulares para mejorar el rendimiento del FIX

No todas las células de mamíferos son capaces de realizar las complicadas modificaciones postraslacionales en la síntesis del FIX como, aparte de la glicosilación, la carboxilación gamma para el correcto funcionamiento del mismo. En los biorreactores se consiguen isoformas de FIX, pero el problema de poseer una mezcla de poblaciones de FIX biológicamente activas e inactivas se resuelve con un proceso de

purificación cromatográfica en cuatro pasos para concentrar y seleccionar el FIX gammacarboxilado. En conclusión, BeneFIX contiene una mezcla de subpoblaciones de 10, 11 y 12 gamma carboxiglutamatos lo que es debido a la limitación de las CHO en carboxilar las moléculas completamente. BeneFIX, por otro lado, no exhibe una fosforilación de la S158 y sólo un 15% de sulfatación de la Y155; estas modificaciones serían las responsables de la menor recuperación del fármaco administrado por vía intravenosa. La presencia de ácido siálico en posición terminal de los N-oligosacáridos mejora la vida media de las proteínas, BeneFIX tiene esta configuración de modo similar al derivado plasmático.

En la producción del FIX a través de animales transgénicos rigen los mismos principios, se obtienen los mismos resultados y se precisan los mismos niveles de seguridad. Si las predicciones de Garber son ciertas, bastaría una piara de 60 cerdos para cubrir las necesidades de FIX de los 3.000 hemofílicos B de Estados Unidos, con un consumo medio de 200.000 UI por paciente y año, que de otro modo precisarían el equivalente al obtenido de un millón de litros de plasma o de 600.000 L de sobrenadante de los biorreactores por año²⁵.

Nuevas moléculas de factor VII recombinante activado (FVIIra)

El FVIIra se obtiene en biorreactores por manipulación genética de células de riñón de hámster neonato. Su solvencia en el tratamiento de los pacientes afectados de hemofilia A o B con inhibidores es bien patente. Existen lagunas de conocimiento en lo que hace referencia a la dosis indicada, inicio de tratamiento y modo de control. Se ha propuesto su forma de acción como dependiente del factor tisular o independiente, a través de su unión a los monocitos y a las plaquetas activadas. Reconoce un efecto antifibrinolítico a través del inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina.

Se han realizado mutaciones genéticas para conseguir productos como un mayor efecto proteolítico sobre el FX. Así, una combinación de mutaciones de "sentido erróneo" (V158D/E296V/M298Q/K337A-rVIIq) ha mostrado una actividad cincuenta veces superior sobre el FX que la molécula inicial. Este efecto se ha comprobado en los ratones con hemofilia inducida por anticuerpos, en los que la potencia del nuevo producto fue cuatro veces más eficaz determinada por la hemorragia del corte de cola. Recientemente, Maxygen ha anunciado el desarrollo de estudios en animales con varias moléculas de FVIIra que muestran mayor eficacia y vida media²⁶.

Bibliografía

1. Hugh C, Lillicrap D. Gene therapy for hemophilia: an imperative to succeed. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1196-05.
2. Chao H, Mansfield SG, Bartel RG, Hirianna S, Mitchell LG, García-Blanco MA, et al. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med* 2003; 9: 1015-9.
3. Saenko EI, Pipe SW. Strategies towards a longer acting factor VIII. *Haemophilia* 2006; 12 (Suppl. 3): 42-51.
4. Van Cott KE, Monahan PE, Nichols, Velander WH. Haemophilic factors produced by transgenic livestock: abundance that can enable alternative therapies worldwide. *Haemophilia* 2004; 10 (Suppl. 4): 70-6.
5. Courtier SG, Bedrosian CL. Clinical evaluation of B-domain deleted recombinant factor VIII in previously untreated patients. *Semin Hematol* 2001; 38: 52-9.
6. Plantier JL, Rodriguez MH, Enjolras N, Attali O, Negrier C. A factor VIII minigene comprising the truncated intron I of factor IX highly improves the in vitro production of factor VIII. *Thromb Haemost* 2001; 86: 596-603.
7. Swaroop M, Mousalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 1997; 272: 24121-4.
8. Pipe W, Miao H, Tendulkar R, Kaufman RJ. Asparagine-linked glycosylation sites within the B domain of coagulation factor VIII improve secretion efficiency. *Blood* 2001; 98: 705a (Abstract No. 2947).
9. Voorberg J, van Stempwoort G, Boss JM, Mertens K, van Mourik JA, Donath MJ. Enhanced thrombin sensitivity of a factor VIII-heparin cofactor II hybrid. *J Biol Chem* 1996; 271: 20985-8.
10. Goodeve AC, Peake IR. The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin Thromb Haemost* 2003; 29: 23-30.
11. Lucía JF, Aguilar C, Dobon M, Aznar JA, Tizano E, Bores C, et al. Discrepant factor VIII activity in a family with mild haemophilia A and Arg531 mutation using various FVIII assays and APTT reagents. *Haemophilia* 2005; 11: 561-4.
12. Pipe SW, Kaufman RJ. Characterization of a genetically engineered inactivation-resistant coagulation factor VIII. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 94: 11851-6.
13. Saenko EL, Yakhyayev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 1999; 274: 37685-92.
14. Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, Mertens K, Ter Maat H, Pannekoek H, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1999; 274: 23734-9.
15. Stoilova-McPhie S, Villotrex BO, Mertens K, Kemball-Cook G, Holzenburg A. Three-dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII heterodimer within a three-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood* 2002; 99: 1215-23.
16. Sarafanov AG, Makogonenko EM, Pechik IV, Radtke KP, Khrenov AV, Ananyeva NM, et al. Identification of coagulation factor VIII A2 domain residues forming the binding epitope for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Biochemistry* 2006; 45: 1829-40.
17. Barrow RT, Healey JF, Gailani D, Scandella D, Lollar P. Reduction of the antigenicity of factor VIII toward complex inhibitory antibody plasmas using multiply-substituted hybrid human/porcine factor VIII molecules. *Blood* 2000; 95: 564-8.
18. Rostin J, Smeds AL, Akerblom E. B-Domain deleted recombinant coagulation factor VIII modified with monomethoxy polyethylene glycol. *Bioconj Chem* 2000; 11: 387-96.
19. Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1261-77.
20. Baru M, Carmel-Goren L, Barenholz Y, Dyan I, Ostroplets S, Slepoy I, et al. Factor VIII efficient and specific non-covalent binding to PEGylated liposomes enables prolongation of its circulation time and haemostatic efficacy. *Thromb Diat Haemost* 2005; 93: 1061-8.
21. Gregoriadis, G, Jain S, Papaioannou I, Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids. *Int J Pharm* 2005; 300: 125-30.
22. Lubon H, Paleyanda RK, Velander WH, Drohan WN. Blood proteins from transgenic animal bioreactors. *Transfus Med Rev* 1996; 10: 131-43.
23. Wells GA, Hawkins SA, Austin AR, Ryder SJ, Done SH, Green RB, et al. Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *J General Virol* 2003; 84: 1021-31.
24. Zheng B, Qiu XY, Tan M, Xing YN, Lo D, Xue JL, et al. Increment of HFIX expression with endogenous intron 1 in vitro. *Cell Res* 1997; 7: 21-9.
25. Garber K. Biotech industry faces new bottleneck. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 184-5.
26. Tranholm M, Kristensen K, Kristensen AT, Pyke C, Rojkaer R, Persson E. Improved hemostasis with superactive analogs of factor VIIa in a mouse model of hemophilia A. *Blood* 2003; 102: 3615-20.