

Hemofilia II. Aspectos moleculares y de genética poblacional

Hemophilia II. Molecular and population genetics

Dra. Dunia Castillo-González

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

La prevalencia de la hemofilia esporádica fue estimada hace más de 40 años y se demostró que aproximadamente un tercio de los casos son *de novo*. La mayoría de las mutaciones que ocurren en la hemofilia se producen durante la espermatogénesis masculina; en otros casos, los cambios ocurren en los estadios tempranos de desarrollo del embrión o una mutación germinal en la madre. El proceso de inactivación del cromosoma X es al azar. Extensos estudios han evidenciado que son más frecuentes las mutaciones en las meiosis masculinas que en las femeninas, con una proporción global de 3,5/1, especialmente las inversiones de los intrones 22 y 1. Se revisaron aspectos moleculares y bioquímicos de los factores VIII y IX. Destacamos la importancia del dominio B del factor VIII que contribuye a múltiples funciones esenciales, como el control de la calidad de la síntesis, la secreción, la unión con los fosfolípidos plaquetarios, la inactivación y el aclaramiento de la molécula completa.

Palabras clave: Hemofilia, capacidad reproductiva, mutaciones, factor VIII, factor IX.

ABSTRACT

The sporadic hemophilia prevalence was estimated more than 40 years ago and it was shown that approximately a third of the cases are *novo*. Most of the mutations that occur in hemophilia are produced during the male spermatogenesis; in other cases, they occur in early stages of the embryo development or in the mother a germinal mutation. The X-chromosome inactivation process is at random. Extended studies have shown that male meiosis are more frequent than female ones, with a global proportion of 3,5/1, specially introns inversions 22 and 1. There were revised molecular and biochemical aspects of factors VIII and IX. We ruled out the importance of B domain in factor VIII, which

contributes to multiple essential functions, as the quality control of synthesis, secretion, union with platelet phospholipids, inactivation and complete clearance of the molecule.

Key words: Hemophilia, reproductive capacity, mutations, factor VIII, factor IX.

ORIGEN DE LA HEMOFILIA Y PERPETUACIÓN. CAPACIDAD REPRODUCTIVA

El surgimiento de la hemofilia se remonta al final de la era Cretácea, hace más de 65 millones de años, y se observa en diferentes especies de mamíferos.¹

En un tercio de los casos, la enfermedad se describe como esporádica, lo que fue estimado hace más de 40 años y corroborado en la actualidad por diferentes estudios.² Posiblemente, la mayoría de los casos eventuales detectados en una familia sin este antecedente, sean mutaciones nuevas, ya que es poco probable que la mutación haya persistido durante varias generaciones sin expresarse.

La mayoría de las mutaciones en la hemofilia ocurren durante la espermatogénesis masculina, generalmente en el abuelo materno del caso esporádico. Otras variantes se deben a cambios que suceden en los estadios tempranos del embrión o que la madre haya tenido una mutación germinal.^{3,4}

En la primera mitad del siglo XX se postularon diferentes teorías que explican por sí solas estas variaciones poblacionales. Para mantener el acervo de genes en una población es necesario que se establezca un equilibrio entre los genes que desaparecen como consecuencia de la selección, y la tasa de mutación. En la hemofilia, la capacidad reproductiva era muy baja debido a las complicaciones de la enfermedad; los varones no llegaban a la edad reproductiva y por lo tanto, no transmitían sus genes a las hijas portadoras. Por esta razón, la tasa mutacional debió aumentar para mantener el equilibrio génico.⁵

En la actualidad, al mejorar la supervivencia de personas con hemofilia severa, su capacidad reproductiva también mejora cada día y se acerca al 100 %. Los progresos en la atención integral (diagnóstico temprano, terapéutica adecuada, atención a las complicaciones, entre otras) a este grupo de pacientes, permite que alcancen perfectamente la edad reproductiva y más.

En un futuro se estima que la tasa mutacional disminuya como consecuencia de una perpetuación mayor de los genes mutados que dan origen a esta enfermedad. En un estudio realizado en poblaciones alemanas y finlandesas, la tasa de mutaciones calculada para la hemofilia A (HA) fue de $5,7 \times 10^{-5}$; y para la hemofilia B (HB), en 3×10^{-6} .^{1,5}

INACTIVIDAD DEL CROMOSOMA X. MOSAICISMO EN HEMOFILIA

El proceso de inactivación del cromosoma X es al azar. En los primeros estadios de desarrollo embrionario ambos cromosomas tiene igual probabilidad de ser inactivados en una célula. Este proceso de silenciación transcripcional en todas las células mamíferas

compensa la dosis de genes entre las mujeres XX y los varones XY.⁶ Una vez que ocurre, el cromosoma X inactivado se conserva así para las siguientes generaciones celulares. Como resultado, cada mujer es un mosaico de células, en las que uno de los cromosomas X heredados de la madre o el padre está inactivado. Generalmente, esto ocurre en el cromosoma que porta la mutación; si no es así, la mujer se convierte en portadora sintomática con niveles subnormales o disminuidos del factor involucrado.

Los genes Xist y Tsix son los responsables de esta inactivación al azar; estos inicialmente se transcriben en todas las células. Una vez que comienza la inactivación, estos genes serán regulados diferenciadamente en la X que será activa y en la que será inactivada.

Existen causas de inactivación no relacionadas con el azar. Por ejemplo, una mutación en Xist conllevará a una X activa y en Tsix la X se convertirá en inactiva. Se postula que la base de estas regulaciones está en los procesos de metilación del ADN.⁶ Existen evidencias de mujeres en las que ocurrió una inactivación desfavorable del cromosoma X y permaneció el mutado. En estos casos la portadora presenta la sintomatología hemorrágica.⁷

Existen varios factores que contribuyen al predominio de mutaciones en la línea germinal masculina; una de ellas es el gran número de replicaciones involucradas. Las células germinales masculinas sufren hasta la pubertad 30 divisiones, además de las necesarias para la formación del esperma. El número de divisiones que requieren los gametos en un hombre de 25 años es de aproximadamente 265, y para un hombre de 50 años es 840. En contraste, el número de divisiones celulares en la hembra desde el cigoto hasta el huevo maduro son aproximadamente 24.

Otro factor involucrado es que muchas mutaciones ocurren en áreas específicas, llamadas sitios calientes, como es el dinucleótido CpG. La metilación del ADN ocurre principalmente en el residuo del C de este dinucleótido, donde una C se transforma fácilmente en una T a través del proceso de desaminación. Las metilaciones ocurren en mayor proporción en el ADN del espermatozoido que en el ADN del ovocito. Por último, las mutaciones complejas ocurren con más frecuencia en la meiosis; por ejemplo, en los estadios tardíos de la formación del espermatozoido o del ovocito maduro. Las inversiones suelen ocurrir en la meiosis masculina y las grandes deleciones en las femeninas.⁷

Extensos estudios en pacientes con HB han evidenciado que son más frecuentes las mutaciones en las meiosis masculinas que en las femeninas, de ahí que la proporción global sea de 3,5/1. Las mutaciones puntuales son 5-10 veces más frecuentes en varones en el dinucleótido CpG. Las inversiones son igualmente 10 veces superiores, solo las deleciones son 5 veces más frecuentes en hembras que en varones.⁷

Por lo general, la edad de los padres no constituye un factor de riesgo para mutaciones nuevas en la hemofilia, a diferencia de las observaciones existentes en enfermedades como la acondroplasia, donde se plantea que la edad del padre parece ser un factor de riesgo para nuevas mutaciones.⁸ Algunos investigadores han comunicado cierta tendencia a aparecer estas mutaciones en hijos de madres con edad avanzada con respecto a los hijos de madres jóvenes, aunque este aspecto no está ampliamente reconocido.⁷

ASPECTOS MOLECULARES DE LOS FACTORES VIII y IX

Los factores VIII y IX son esenciales para una generación eficaz, explosiva y mantenida de trombina en el mecanismo de coagulación. El factor VIII (FVIII) es un cofactor no enzimático que junto al factor IX (FIX), los fosfolípidos plaquetarios y los iones de calcio

forman el complejo tenasa que activa al factor X (FX) y da lugar a una serie de procesos enzimáticos que concluyen con la formación de un coágulo firme. En el caso de los pacientes con hemofilia, este mecanismo está severamente afectado y es la causa de las manifestaciones hemorrágicas que se presentan.^{9,10}

Los genes que portan la información de ambas proteínas se encuentran cercanos, a solo 35 centimorgans (cM) de distancia, ubicados en la región distal del brazo largo del cromosoma X. Hasta el momento no se ha descrito ligamiento entre ambos genes. Cada enfermedad, por lo general, se describe de forma independiente, aunque se han comunicado algunas familias con coexistencia de ambos tipos de hemofilia y con otras enfermedades hemorrágicas.^{11,12}

El gen del FVIII es uno de los más grandes y complejos que existen dentro del reino de los mamíferos. Fue clonado en 1984, consta de 186 kilobases (kb), distribuidas en 26 exones que se transcriben como un ARNm de 9 kb, y codifica para una proteína de cerca de 300 kD.^{13,14} Se encuentra ubicado a 1,5 Mb del telómero, en el brazo largo del cromosoma X, en la región Xq28.

El intrón 22 tiene características que lo hacen diferente del resto de los intrones: es el mayor, con una longitud de 40 kb; contiene una isla CpG que actúa como un promotor bidireccional para 2 genes adicionales F8A y F8B con una extensión de 2,5 y 1,8 kb, respectivamente, cuya función no es muy conocida; la isla CpG y el F8A están contenidos dentro de una zona de ADN de 9,5 kb, que es repetida idénticamente, al menos 2 veces dentro del cromosoma X muy cerca del telómero, y es conocido como int22h-1 copia intragénica y los homólogos int22h-2 y int22h-3, que son copias extragénicas.^{10,15} Esta es la zona donde ocurre una torsión del extremo del brazo largo del cromosoma X para permitir el encuentro de las 2 regiones homólogas para facilitar la recombinación y reordenamiento del material génico por entrecruzamiento desigual entre las regiones duplicadas homólogas antes mencionadas.

Se describen 3 tipos de recombinaciones F8A/A' proximal, que ocurre en el 78 % de los casos; F8A/A'' distal, en el 19 %; y el tercero, menos frecuente. F8A/A''' solamente en 3 % de los casos.¹⁰ (Fig.). Este reordenamiento es una inversión del intrón 22 que conduce a la formación de una proteína truncada e inestable. Las mutaciones en este sitio se relacionan con la gravedad de la enfermedad, la formación de inhibidores y se observan aproximadamente entre el 45 y 50 % de los hemofílicos severos. Otro dato que merece destacarse es que este tipo de mutación casi siempre se ha observado relacionada con la meiosis masculina, como se comentó previamente.^{10,15}

Otra inversión descrita es la del intrón 1 que origina aproximadamente el 1,5-5 % de los casos de HA severa en poblaciones caucásicas. Este re-arreglo, es también ocasionado por la recombinación homóloga entre una región del intrón 1 dentro del gen FVIII y otra región repetida en el telómero; esto provoca una orientación invertida de ese segmento en el gen original y la imposibilidad de traducción para la generación del producto proteico.¹⁶⁻¹⁸

El producto proteico del gen del FVIII es una proteína de 2 351 aminoácidos (aa) donde se distingue un péptido señal de 19 aa y una proteína madura de 2 332 aa, que circula en concentraciones muy bajas en el plasma, aproximadamente 0,5 µg/mL. Por su inestabilidad es necesario que circule unida por fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas con el factor von Willebrand (FvW).¹⁹

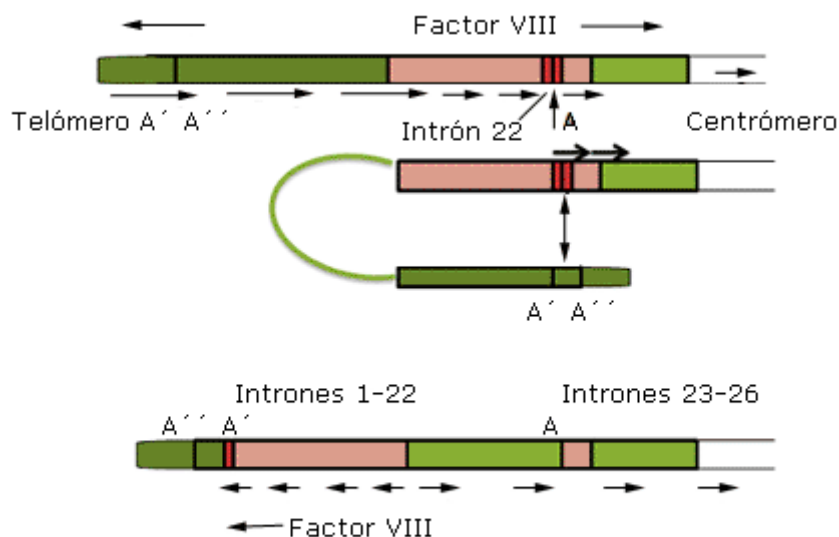


Fig. Inversión del intrón 22.

El sitio primario de producción de FVIII es el hígado. Las evidencias actuales muestran que su síntesis ocurre en las células endoteliales de los sinusoides hepáticos y en los hepatocitos. Además, puede existir producción en otras estructuras como pulmón, cerebro, ganglios linfáticos y riñón. No existen estudios actuales que demuestren que el FvW y el FVIII se sintetizan en conjunto; sin embargo, estudios de expresión han mostrado que la cosíntesis, transporte y almacenamiento puede observarse *in vivo*.¹⁹

La molécula del FVIII es sintetizada como una cadena única con los dominios A1-a1-A2-a2-B-A3-a3-C1-C2. Después de la activación por la trombina se convierte en un heterodímero con una cadena pesada (A1-A2-B) y una ligera (A3-C1-C2), con porciones remanentes del dominio B. Los dominios A tienen una homología del 30 % con el resto de los dominios y con otras proteínas como la ceruloplasmina y el factor V, ya que están rodeados por espacios cortos a1, a2, a3, que son regiones ácidas ricas en Tyr, Asp y Glu que intervienen en mecanismos de sulfatación, estabilización de la molécula, y contribuyen a la unión con el factor X (FX).²⁰ Los dominios C están relacionados estructuralmente con el factor V.

El dominio B está codificado por el exón 14, se extiende entre los aa 741-1 648, presenta muchas características que lo distinguen del resto. Siempre se pensó que este dominio, que se pierde casi en su totalidad durante la activación del FVIII, apenas tenía alguna función importante. En la actualidad se sabe que su presencia contribuye a múltiples funciones esenciales, como el control de la calidad de la síntesis, la secreción, la unión con los fosfolípidos plaquetarios, la inactivación y el aclaramiento de la molécula completa.²¹

La trombina activa al FVIII en la posición Arg 1689, 372 y 740 de la cadena pesada; posterior a este momento, en la molécula se pierden las regiones ácidas y la afinidad por el FvW.²⁰ La secreción de esta molécula se produce a través de mecanismos complejos donde se involucra el dominio B, el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi.¹⁹⁻²³

Se ha postulado que la inactivación del FVIII ocurre por uno de estos 2 mecanismos: la disociación espontánea del dominio A2, o a través de degradaciones proteolíticas por la trombina, FIXa, FXa y el principal inactivador de los cofactores activados: la proteína C activada (PCA). Esta última escinde a la molécula en las posiciones Arg 336 en el dominio A1 y en la Arg 562 del dominio A2.^{21,22}

El aclaramiento del FVIII se produce a través del receptor endocítico hepático, una proteína relacionada con el receptor con la lipoproteína de baja densidad (LRP), mediante un mecanismo muy novedoso mediado por el receptor de asialoglicoproteína ASGPR 1 y 2, abundantes en el tejido hepático.¹⁹⁻²³

El gen del FIX se clonó en 1982 y se secuenció en 1985.^{24,25} Este gen es más pequeño y estructuralmente simple que el gen del FVIII. Se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma X, en la región Xq27-1,2, a solo 35 cM del *locus* del gen FVIII. Consta de 34 kb y está compuesto por 8 exones que se transcriben como un ARNm de 2,8 kb, de los que 1,4 kb son traducidos. El producto del gen es una serinproteína de 415 aa, vitamina K dependiente que interviene junto con su cofactor no enzimático FVIII en la activación del factor X de la coagulación.^{26,27}

El exón 8 es el mayor, con 1,9 kb de longitud, representa casi la mitad de la región codificadora del FIX; el 50 % de las mutaciones se localizan en este exón. Las mutaciones descritas en el promotor se relacionan con las variantes de HB Leyden y Branderburg.²⁶ La regulación de la transcripción del FIX ha sido estudiada por diversos grupos de trabajo.

Aproximadamente un tercio de las mutaciones que ocurren en la HB se han observado en los dinucleótidos CpG, como ocurre en la HA. Alrededor de un tercio aparecen *de novo*, consistente con la hipótesis de Haldane y contrario a la HA, se observa entre el 20-30 % de casos con HB con un número pequeño de mutaciones debidas al efecto fundador.^{10,28}

El FIX está presente en la circulación en una concentración de 4-5 µg/mL con un tiempo de vida media de aproximadamente 18-24 horas. Una variación de 3 veces en la actividad del FIX en el plasma, es normal. Es una molécula más pequeña que la albúmina y se distribuye fácilmente al espacio extravascular e intravascular.²⁶

Para lograr su actividad funcional, el FIX requiere de modificaciones postraduccionales en el hígado, antes de la secreción del hepatocito. Ellas son: gamma-carboxilación, beta-hidroxilación, remoción del péptido señal y propéptidos, adición de carbohidratos, sulfatación y fosforilación.²⁶

Esta molécula es sintetizada en el hepatocito, primero como una proteína acarboxi (en ausencia de la vitamina K); posteriormente, a través de modificaciones bioquímicas, se convierte en un zimógeno gamma carboxilado que es secretado al plasma. La enzima inactiva tiene un péptido señal con un extremo amino (NH₂) terminal, que dirige la proteína al retículo endoplásmico en el interior del hígado. Después se encuentra la secuencia guía que es reconocida por la gamma-glutamylcarboxilasa, responsable de las modificaciones posteriores a la transducción. Estas 2 partes de la molécula son removidas antes de que la proteína sea secretada a la circulación.²⁶

El FIX inactivo es una molécula monocatenaria que tiene un dominio Gla (12 residuos de ácidos gamma-carboxiglutámico) y un extremo aminoterminal. Esta es una característica de todos los factores vitamina K dependientes. La región Gla está seguida por 2 dominios tipo factor de crecimiento epidérmico, un péptido de activación y por último, presenta un dominio catalítico responsable de la actividad enzimática del factor. La gamma-carboxilación requiere vitamina K reducida, oxígeno y dióxido de carbono. El número exacto de residuos Gla varía en cada proteína de este grupo. Después de estas modificaciones, la región carboxiterminal (C-terminal) es reconocida por los procesos de secreción hepática.

Las mutaciones que incrementan la carga de estas regiones resultan en disminución de la secreción hepática, con las consecuentes deficiencias de los factores dependientes de la vitamina K.²⁷

Como se observa, las regiones Gla son esenciales para la unión al Ca^{2+} ; esta unión resulta en un cambio conformacional de la molécula que permite la exposición de residuos hidrofóbicos y su anclaje a la membrana fosfolipídica de la plaqueta. De este modo, el FIX se convierte en una molécula bicatenaria unida por puentes disulfuros. El FVIIIa es el cofactor para que el FIXa exprese su actividad completamente y se produzca una coagulación eficiente.

El avance de los últimos 25 años en los estudios moleculares y bioquímicos relacionados con la hemofilia, ha permitido conocer las características intrínsecas de los factores VIII/IX, el mecanismo etiopatogénico de las complicaciones observadas y desarrollar terapéuticas menos inmunogénicas para el tratamiento de estos pacientes. Estos aspectos en combinación con el desarrollo de programas de atención integral al hemofílico, han mejorado progresivamente la supervivencia, capacidad reproductiva y la expectativa de vida de estos pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ingram GI. The history of haemophilia. *J Clin Pathol*. 1976 June;29(6):469-79.
2. Kasper CK, Lin JC. Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia*. 2007 Jan;13(1):90-2.
3. Becker J, Schwaab R, Möller-Taube A, Schwaab U, Schmidt W, Brackmann HH, et al. Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am J Hum Genet*. 1996 Apr;58(4):657-70.
4. Ranjan R, Biswas A, Meena A, Akhter MS, Yadav BK, Ahmed RH, et al. Importance of investigating somatic and germline mutations in hemophilia A: a preliminary study from All India Institute of Medical Sciences, India. *Clin Chim Acta*. 2008 Mar;389(1-2):103-8.
5. Vogel F, Motulsky AG. Human genetics. Problems and approaches. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1997.
6. Panning B. X-chromosome inactivation: the molecular basis of silencing. *J Biol*. 2008 Oct 27;7(8):30.
7. Kasper CK, Buzin CH. Mosaics and haemophilia. *Haemophilia*. 2009 Nov;15(6):1181-6.
8. Dakouane-Giudicelli M, Bergère M, Albert M, Sérazin V, Rouillac-Le-Sciellour C, Vialard F, et al. Late paternity: spermatogenetic aspects. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006 Sep;34(9):855-9.
9. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia*. 1998;Jul 4(4):331-4.
10. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol*. 2002 Feb;55(1):1-18. Corrected and republished in: *Mol Pathol*. 2002 Apr;55(2):127-44.
11. Siddiq S, Morse C, Goodeve A, Panayi M, Tait RC, Mumford A. F8 and F9 mutations fail to co-segregate in a family with co-incident haemophilia A and B. *Haemophilia*. 2011 Jan;17(1):e230-4. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02396.x.

12. Shetty S, Ghosh K, Parekh S, Mohanty D. Combined factor VIII and IX deficiency in a family. *Clin Lab Haematol.* 2001;Jun 23(3):201-4.
13. Giannelli F, Green PM. The molecular basis of haemophilia A and B. *Baillières 's Clin Haematol.* 1996 Jun;9(2):211-28.
14. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* 1984 Nov 22-28;312(5992):326-30.
15. Lakic D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet.* 1993 Nov;5(3):236-41.
16. James P, Di Paola J. The application of genetics to inherited bleeding disorders. *Haemophilia.* 2010;16(S5):35-9.
17. Ragittall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood.* 2002 Jan 1;99(1):168-74.
18. Pio SF, Muhle C, De Oliveira GC, Rezende SM. Detection of int1h-related inversion of the factor VIII gene. *Haemophilia.* 2010 Sep 22. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02392.x.
19. Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia.* 2010 Jan;16(1):3-13.
20. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation Factor VIII in view of its structure and function. *Blood.* 1998 Dec 1;92(11):3983-96.
21. Pipe SW. Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia.* 2009 Nov;15(6):1187-96.
22. Dasgupta S, Repessé Y, Bayry J, Navarrete AM, Wootla B, Delignat S, et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):610-2.
23. Cao W, Krishnaswamy S, Camire RM, Lenting PJ, Zheng XL. Factor VIII accelerates proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 May 27;105(21):7416-21.
24. Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG. Molecular cloning of the gene for human anti haemophilic factor IX. *Nature.* 1982 Sep 9;299(5879):178-80.
25. Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982 Nov;79(21):6461-4.
26. Schwartz RA, Klujso E, Gascon P, Mc Kenna R. Factor IX. [citado 18 noviembre 2010]. *Medscape Reference.* Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/199088-overview>

26. Reitsma PH, Bertina RM, Ploos van Amstel JK, Riemens A, Briet E. The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden. *Blood*. 1988 Sep;72(3):1074-6.

27. Sharathkumar A, Hardesty B, Greist A, Salter J, Kerlin B, Heiman M, et al. Variability in bleeding phenotype in Amish carriers of haemophilia B with the 31008 C to T mutation. *Haemophilia*. 2009 Jan;15(1):91-100.

Recibido: 28 de noviembre del 2011.

Aprobado: 4 de enero del 2012.

Dra. *Dunia Castillo-González*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800. La Habana, Cuba. Tel (537) 643 8695, 8268, Fax (537) 644 2334. Correo electrónico: ihidir@hemato.sld.cu Website: <http://www.sld.cu/sitios/ih>