



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
GUAUTITLAN

FRECUENCIA DE INHIBIDORES DEL FACTOR VIII
EN UNA POBLACION DE HEMOFILICOS
DEL DISTRITO FEDERAL.

TESIS

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

MARIA EUGENIA ROSALIA POSADA GALARZA

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

MATERIA	PAGINA
Introducción.	1
Planteamiento del Problema	19
Objetivo.	20
Material y Métodos.	21
Resultados.	40
Resumen de Resultados.	49
Discusión.	53
Conclusiones.	57
Resumen.	58
Bibliografía.	60

INTRODUCCION.

Para el estudio de la coagulación sanguínea y su mejor entendimiento, esta puede dividirse en tres fases: a) Fase Vasculat; b) Fase Plaquetaria y c) Fase Plasmática. Estas tres fases están perfectamente coordinadas y relacionadas entre sí, con el fin de llevar a cabo de una manera simultánea, su objetivo común.^{56,73,85.}

En la Fase Vasculat los vasos sanguíneos llevan el papel principal provocando que el flujo sanguíneo sea más lento cerca del lugar lesionado y así, las plaquetas y otras células sanguíneas se adhieran a la porción lesionada del vaso y formen un trombo blando primario.^{56,85.}

Las plaquetas son los constituyentes más importantes de la Fase Plaquetaria y debido a las propiedades particulares que presentan, provocan que el trombo primario aumente de tamaño y sea un poco más fuerte.^{56.}

Respecto a la Fase Plasmática, el esquema más simple que la representa es el propuesto por Morcwitz en 1903, donde se considera únicamente a la trombina como la enzima catalizadora de la reacción de conversión de fibrinógeno a fibrina.^{85.} En la actualidad se conoce una serie de factores plasmáticos de la coagulación

(Cuadro 1),^{8,56,85.} los cuales siguen una serie de transformaciones proenzima-enzima, hasta llegar a la formación de una red de fibrina estable.^{8,73.}

Este proceso se puede esquematizar de la manera que muestra el Esquema 1, teniéndose como factor desencadenante, una superficie de contacto extraña, que en un proceso normal de la coagulación son: el trombo formado en la fase vascular y plaquetaria de la coagulación y la colágena.^{8,56.}

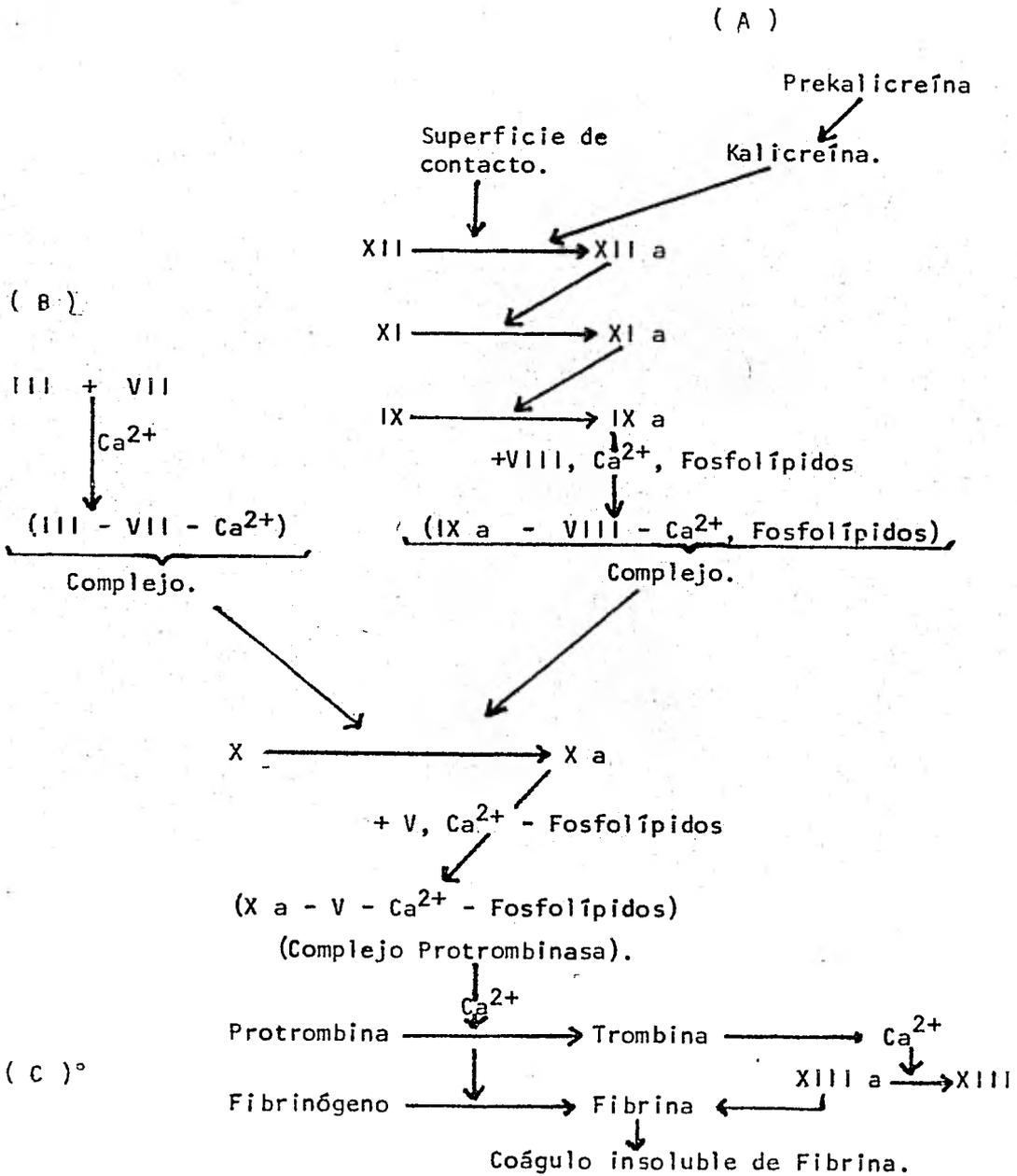
El papel que tiene el factor antihemofílico (Factor VIII) en el proceso de la coagulación está parcialmente definido, pero se cree que el factor X activo consiste en un complejo formado por el factor IX activo, factor VIII, fosfolípidos y calcio; creyéndose que el factor VIII no es una enzima; pero sí una proteína reguladora para la actividad del factor X por el factor IX activo.^{5,35,42,46,67,83.}

CUADRO I

FACTOR	NOMBRE CONOCIDO
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Tromboplastina Tisular
IV	Calcio Iónico
V	Proacelerina
VI	Factor de Desuso
VII	Proconvertina
VIII	Factor o Globulina Antihemofílica (A)
IX	Factor Christams o Factor Anti Hemofilia B
X	Factor Stuart - Prower.
XI	Antecedente de Trombina Plasmática.
XII	Factor Hageman
XIII	Factor Estabilizante de la Fibrina.
Prekalicreína	Factor Fletcher
Kininógeno de alto peso molecular.	Factor Fitzgerald-Williams -Flaujeac.

NOMENCLATURA PARA LOS FACTORES PLASMATICOS DE LA
COAGULACION.

ESQUEMA I



MECANISMO DE LA COAGULACION SANGUINEA EN LA FASE PLASMATICA.

A = Sistema Intrínseco

B ≠ Sistema Extrínseco

C = Sistema o Camino Común.

Aún persisten grandes lagunas que impiden conocer con exactitud y profundidad a la molécula del factor VIII; mas algunos puntos se han podido esclarecer, cuando menos en parte.

El lugar de síntesis del factor VIII está aún indefinido, pero se cree que es producido por el Sistema Retículo Endotelial.^{7,12,26,27,28,53,65,81}. Hay además datos que apoyan la hipótesis de que el factor VIII en su porción coagulante es sintetizado en el hígado, mientras que la fracción antigénica y de Von Willebrand se sintetiza en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.^{7,26,27,28,29,76,84}.

Se tiene como un lugar de almacenaje del factor VIII al bazo^{41,60,61,64,81}. y se cree que el factor VIII antigénico forma en algún lugar un complejo con el factor VIII coagulante.⁸¹.

Se conocen una serie de estímulos capaces de provocar un aumento transitorio de los niveles del factor VIII coagulante en sangre periférica: Stress físico^{58,75,77,78}. Stress neurológico^{6,40}. y Stress farmacológico.^{20,24,30,34,35,50}

No se acepta que la elevación producida por cualquiera de los estímulos citados sea debida a un incremento de la síntesis, sino que se debe más bien a la

liberación del factor VIII de su sitio de almacenaje.^{81.}

Pese a las investigaciones encaminadas a caracterizar al factor VIII desde el punto de vista químico, aún se desconoce mucho de él.

A continuación (Cuadro II) se resúmen los datos del factor VIII más importantes, de los que se tiene conocimiento.

La molécula del factor VIII normal puede ser disociada en dos tipos bien definidos de subunidades: una de alto peso molecular sin actividad coagulable y otra de bajo peso molecular con actividad coagulante.^{21,37,39,44.}

Si se emplean enzimas glicolíticas contra la molécula del factor VIII normal, se observa una pérdida de la actividad coagulante;^{21,37,39.} sin embargo, si se emplean enzimas lipasas contra la molécula del factor VIII normal, se observa una activación o desactivación del factor VIII coagulante.^{37.}

Para la estructura molecular del factor VIII, hay tres hipótesis que intentan definirla:

- a) Una sola molécula,^{16,47,54,56.}
- b) Dos moléculas separadas,^{14,45,67.}
- c) Un complejo molecular.^{11,16,47,54,56,71.}

CUADRO II .

Concentración plasmática:	10 - 20 mg-ml.
Peso molecular: (*)	2×10^6 D.
Peso molecular del monómero de la entidad del F. VIII: (*)	24 000 D.
Naturaleza Bioquímica: (*)	Glucoproteína
Contenido en Carbohidratos: (*)	5 - 11%
Contenido en lípidos: (*)	3 - 11%
Contenido de Aminoácidos: (*)	75%
Temperatura de almacenaje: (*)	-30° C
Ocasiona la pérdida de su actividad coagulante: (*)	Temperatura mayor a 45°C. pH mayor a 9 y menor a 5.
Vida media In Vitro: (4°C y pH 7.35)	9 hrs.
Vida media biológica:	10 \leq 18 hrs.

CUADRO QUE RESUME LAS CARACTERISTICAS DEL FACTOR VIII

(*) Factor VIII normal y hemofílico. 4,21,22,37,39,44,57,59,68.

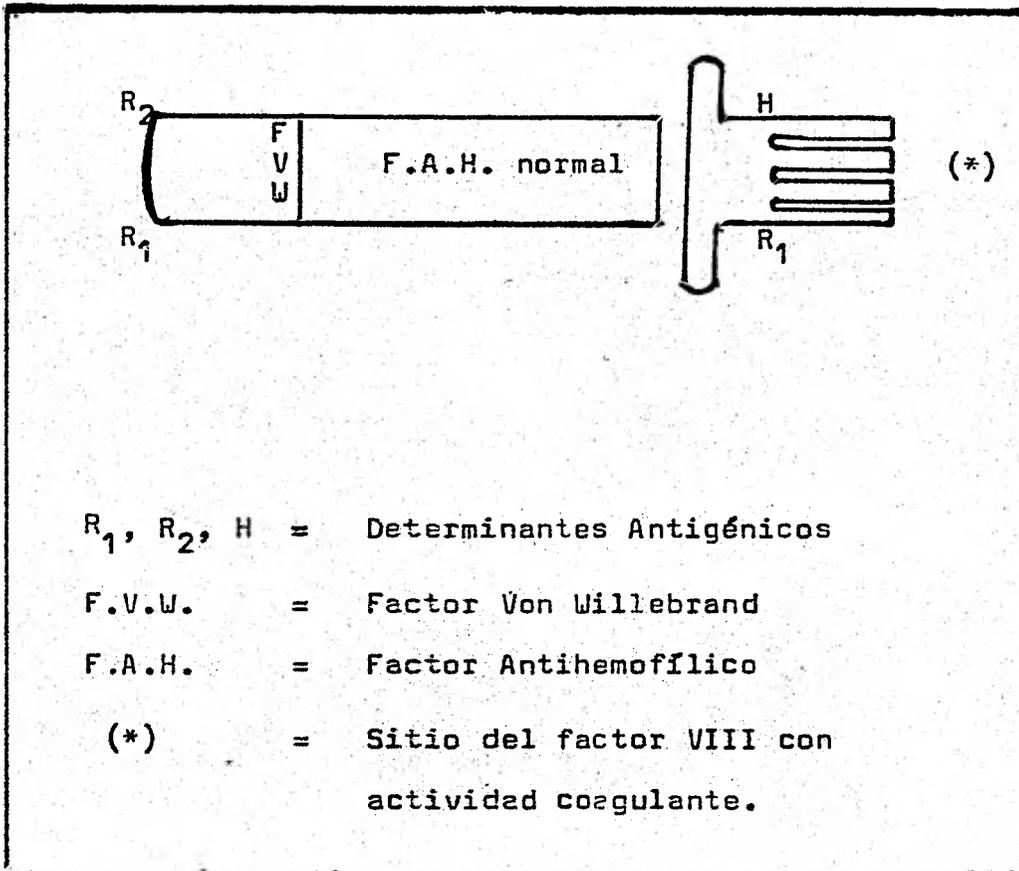
De éstas, la hipótesis que más se acepta es que las distintas actividades del factor VIII están formando un complejo asimétrico o polímero de subunidades repetidas (c), en el plasma normal.^{11,13,49,71.}

El factor VIII presenta tres actividades dentro del organismo:

- a) Actividad procoagulante del factor VIII (VIII:C)
- b) Actividad relacionada al factor VIII de tipo antigénico (VIII:Ag)
- c) Actividad Von Willebrand (VIII:VW).^{30,49.}

Se cree que la molécula del factor VIII se puede representar con el siguiente esquema II:^{30,49.}

ESQUEMA II .



ESQUEMA QUE ILUSTR A LA MOLECULA DEL
 FACTOR VIII .

Clásicamente se ha definido a la hemofilia como "una enfermedad hereditaria recesiva ligada al sexo, la cual se presenta solamente en el hombre y es transmitida por mujeres portadoras que no presentan enfermedad; es decir, que no presentan alteraciones en el proceso de sangrado".³⁰ La enfermedad se manifiesta por sí sola a temprana edad, por una tendencia al sangrado anormal.

Se ha comprobado que la hemofilia por deficiencia del factor VIII es una enfermedad hereditaria de transmisión recesiva ligada al sexo, esto es, que el gen responsable para la manifestación de la enfermedad está contenido en el cromosoma sexual. La enfermedad se manifiesta en el sexo masculino (XY) y la mujer (XX) actúa como portadora de ella, transmitiéndola así.^{30,38}

Los hijos de una mujer portadora pueden ser sanos o hemofílicos. Las hijas de un hombre hemofílico serán portadoras y los hijos sanos.³⁰

La hemofilia también puede presentarse por una mutación en un loci sobre el cromosoma X y como resultado, se origina la alteración en la producción del factor VIII. Este puede ser el caso en donde no

se demuestran antecedentes hereditarios, por lo tanto, puede haber hemofilia de aparición espontánea en algunas familias.^{30.}

La deficiencia del factor VIII varía importante-mente de hemofílico a hemofílico. De acuerdo a su porcentaje se clasifica en tres tipos, considerando como valores normales de factor VIII coagulante el rango de 50 a 150% de actividad. 8,37,49,81.

Clasificación de los Grados de Hemofilia:

- Severa: Actividad coagulante menor a 1%
- Moderada: Actividad del factor VIII entre 1 y 5%
- Leve: Actividad del factor VIII entre 5 y 50%

La hemofilia presenta una frecuencia de 3 a 8 por 100 000 habitantes y constituye el defecto más importante y frecuente de las deficiencias hereditarias de los factores de la coagulación.^{38.}

En términos específicos, la deficiencia del factor VIII es la llamada hemofilia tipo A o Clásica,^{8,38,56.} y el tiempo que tarda en manifestarse en el individuo enfermo puede ser temprano o tardío según el grado de hemofilia A que presente.

Los signos más comúnmente observables en indivi-

duos que padecen este problema son los siguientes: hemorragias que pueden ser a nivel nasal, bucal, muscular, en cualquier parte del cuerpo; cerebral y, principalmente a nivel de articulaciones; estas últimas particularmente, dejando en el individuo serias secuelas articulares. 8,38,49,56.

Para el diagnóstico de la hemofilia, el médico se basa en una historia clínica cuidadosa, aunada a pruebas de laboratorio que comprenden: Tiempo de Sangrado, Cuentas de Plaquetas, Tiempo de Tromboplastina Parcial, Tiempo de Trombina, Tiempo de Protrombina. Normalmente la mayoría de estos exámenes resultan normales, excepto el T.T.P., que se presenta alargado; y la cuantificación de factores permitirá confirmar y clasificar el diagnóstico. 8,38,56,73.

Para el tratamiento de la hemofilia se requiere de un grupo multidisciplinario de especialistas, en el que se incluye a: un hematólogo, psiquiatra y fisioterapeuta entre otros y se puede recurrir, a manera de terapia sustitutiva, al plasma fresco congelado, a los crioprecipitados o al factor VIII liofilizado. 38,56,66,70,79. Sin embargo, también es recomendable el empleo de bloqueadores de la fibrinólisis, para favorecer a una mejor hemostasia. 8,38,56.

La aparición de un inhibidor circulante contra el factor VIII es una complicación muy seria en los pacientes hemofílicos, debido a que estos inhibidores inactivan específicamente y de una manera rápida al factor VIII, haciendo la terapia sustitutiva difícil y a veces imposible. 66,70,79.

Se han definido a estos inhibidores como "componentes anormales de la sangre, endógenos, que inhiben la coagulación de una sangre normal" excluyéndose así a los inhibidores naturales de los factores activados así como a los agentes administrados exógenamente, de tipo anticoagulante. 62,81.

Parece ser que la mayoría de los inhibidores adquiridos son anticuerpos que neutralizan un factor de la coagulación determinado o que interfieren de alguna manera en la secuencia de las interacciones entre los factores. 81,82.

Han sido reconocidos inhibidores del factor VIII en otras situaciones fuera de enfermos hemofílicos, como es el caso de mujeres normales en estado de Post partum, en enfermos con desórdenes inmunológicos varios, 23,69. mas en nuestro caso se estudiarán exclusivamente aquellos inhibidores aparecidos en hemofilia A.

Se ha podido demostrar una predisposición genética en la aparición de inhibidores, concluyéndose que puede existir una tendencia familiar clara de reactividad inmunológica al factor VIII, probablemente debida a formas alotípicas del factor VIII y/o a la expresión de genes que rigen una respuesta específica contra este factor. 32,81.

Recientemente se ha clasificado a los enfermos hemofílicos con inhibidor en dos grupos: a) enfermos de alta respuesta y b) enfermos de baja respuesta, en base al tiempo que tarda un enfermo en presentar inhibidores contra el factor VIII y el título que presente; y se confirma que el grupo de enfermos de alta respuesta inmunológica son pacientes cuyo tratamiento se complica gravemente; en cambio, el grupo de enfermos con baja respuesta inmunológica puede beneficiarse con el tratamiento sustitutivo con factor VIII. 3,81.

En cuanto a las características y propiedades de los inhibidores del factor VIII se sabe poco, debido a que es un tema que está aún en estudio; sin embargo, se sabe ya definitivamente algunas características de ellos, las cuales se resúmen a continuación:

- Los inhibidores del factor VIII son específicos con

- tra la actividad coagulante.
- Son IgG₄ la mayoría y menos comúnmente IgG₃.
- La mayoría tienen cadenas ligeras tipo kappa, aunque una minoría presenta el tipo lambda.
- No fijan el complemento.
- Son anticuerpos de tipo Oligoclonales^{48,55,74,80,81,82.}

En cuanto a los complejos formados entre el inhibidor y el factor VIII, se sabe lo siguiente:

- Son estables en un rango de pH de 6.5 a 8.
- Son estables a temperaturas no mayores de 40°C.
- Pueden ser fácilmente disociados o no, según el grado de complementaridad mutua entre los reactivos.
- In Vitro, incubaciones mayores de dos horas son requeridas para obtener un complejo estable a 37°C^{1,2,3,8,10,48,55,74,81.}
- La reacción entre el inhibidor y el factor VIII puede presentar dos tipos de cinética de reacción:
 - a) Cinética de Segundo Orden.
 - b) Cinética de Orden Complejo.^{2,9,10.}

Actualmente se ha podido observar una mayor frecuencia de inhibidores del factor VIII en niños hemofílicos menores a diez años, en hemofílicos severos y en hemofílicos integrantes de una misma familia, pudiendo

haber una cierta predisposición genética para desarrollar estos inhibidores.^{13,32,81,*.}

Los títulos de inhibidores que se han podido observar en poblaciones de hemofílico que los presentan varían mucho, pues fluctúan entre el 0.5 a 20 unidades Bethesda por mililitro.^{81,*.}

Disponer de un método confiable para cuantificar a los inhibidores del factor VIII es de suma importancia tanto para el diagnóstico, como para el tratamiento de hemofílicos que los presentan.

En el transcurso del tiempo se han practicado una serie de métodos de cuantificación de inhibidores del factor VIII,^{18,81.} en 1974, en los Estados Unidos de Norte América y después de una reunión patrocinada por "The Division of Blood Diseases and Resources of the National Heart and Lung Institute", se habló de lo difícil que resultaba entenderse entre los varios grupos ahí presentes, en lo concerniente a las unidades de los inhibidores, su potencia relativa y las relaciones cuantitativas entre ellos, debido a la gran variedad de unidades que se estaban empleando. Entonces se llegó al acuerdo de "uniformar" la unidad de inhibidores estableciéndose así la descripción de las Unidades -

Bethesda. 10,81.

Es necesario definir claramente lo que es una Unidad Bethesda: "Una unidad Bethesda es la cantidad de inhibidor suficiente y necesaria para dejar el cincuenta por ciento de actividad residual del factor VIII, cuando se hace la mezcla de plasmas y se incuban a 37°C, durante 120 minutos".

Con este método a veces resulta un poco difícil cuantificar inhibidores de poca actividad; por otra parte no implica o correlaciona con el número de unidades del factor VIII que se requieren transfundir para neutralizar un inhibidor circulante.

* Información verbal obtenida de la Dra. Carol Kasper.
Diciembre de 1980.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El problema de hemofílicos en la población de pacientes hematológicos representa un porcentaje bastante alto de la totalidad, debido a ello, se ha avanzado mucho en la terapia y ahora no es solamente la transfusión de sangre total o de plasma, la manera con la que se controlan a estos pacientes; sino que lo más común actualmente es la aplicación de crioprecipitados plasmáticos e inclusive, la administración de factor VIII directamente, en forma altamente purificada. Mas un adelanto de este tipo ha llevado a la clínica un nuevo problema: se han detectado inhibidores contra el factor VIII, que no permiten que la sangre, el plasma, los crioprecipitados o el factor VIII aplicados, lleven a un restablecimiento del paciente, haciendo así más difícil la terapéutica y el control de algunos de ellos.

OBJETIVO.

Por lo expuesto anteriormente, la finalidad del presente trabajo es:

- a) La estandarización de la técnica para cuantificar inhibidores del factor VIII y,
- b) Determinar la frecuencia de inhibidores del factor VIII en una población de hemofílicos del Distrito Federal, ya que para el especialista es de gran utilidad tener en conocimiento ambos puntos.

MATERIAL Y METODOS.

I.- TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA.

Técnica de Pittney.

REACTIVOS:

- 1.- Caolín en polvo. (*)
- 2.- Extracto de placenta o cerebro. (*)
- 3.- Cloruro de calcio 0.025 M.

MATERIAL BIOLÓGICO:

- 1.- Mezcla de plasmas de por lo menos 5 personas sanas.
(Plasma Control)
- 2.- Plasma problema.

APARATO:

- 1.- Fibrómetro. Clotektm. Hyland.

FUNDAMENTO:

La prueba del Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada es el tiempo necesario para que en el plasma se forme un coágulo de fibrina, después de haberle agregado calcio y fosfolípidos. En ésta prueba el agente de contacto será el caolín agregado y los fosfolípidos extraídos de placenta o cerebro sustituirán a los fos

folípidos plaquetarios.

TECNICA:

Se hace la mezcla de caolín (*) con el extracto de placenta o cerebro, para formar una suspensión. Se pone a incubar en baño maría a 37°C, 0.1 ml. de plasma control, se le agrega 0.1 ml. de la suspensión de caolín-fosfolípidos e inmediatamente se toma el tiempo. Cuando se han cumplido dos minutos se agrega 0.1 ml. de cloruro de calcio 0.025 M. y se toma el tiempo hasta que el aparato detecte las fibrillas de fibrina que indican la formación del coágulo.

Se hacen los mismos pasos anteriormente explicados, pero ahora empleando el plasma problema en lugar del plasma control.

VALORES NORMALES:

Los valores normales reportados para esta prueba son: de 35 a 45 seg.

(*) Química Hoechst. PATHROMPTIM, Behring Institute

(**) Dade Diagnostics, Inc. COAGULATION FACTOR VIII DEFICIENT SUSTRATE PLASMA.

II.- CURVA ESTANDAR PARA LA ACTIVIDAD DEL FACTOR
VIII. Técnica de Denson.

REACTIVOS:

- 1.- Buffer Owen's Veronal a pH 7.35, (Diethylbarbituratos 0.587 %)
- 2.- Caolín en polvo. (*)
- 3.- Extracto de placenta o cerebro. (*)
- 4.- Cloruro de calcio 0.025 M.

MATERIAL BIOLÓGICO:

- 1.- Mezcla de plasmas de por lo menos 5 personas sanas.
- 2.- Plasma deficiente en factor VIII. Liofilizado. Con actividad menor a 1%. (**)

APARATOS:

- 1.- Fibrómetro Clotek^{tm.}. Hyland.

TECNICA:

Se hacen cuatro diluciones del plasma control con buffer Owen's Veronal. Las diluciones serán en relación 1/10, 1/20, 1/40, 1/80; plasma control/buffer Owren's Veronal.

Cada una de las diluciones preparadas se ensayan

de la manera siguiente:

Se pone a incubar en baño maría a 37°C, 0.1 ml. de la dilución correspondiente, se le agregan 0.1 ml. de plasma deficiente en factor VIII(**) y 0.1 ml. de mezcla de caolín-fosfolípidos e inmediatamente se toma el tiempo. Al cumplirse dos minutos se le agrega 0.1 ml. de cloruro de calcio 0.025 M. y se toma el tiempo hasta que el aparato detecte el coágulo.

De la misma manera se corre el ensayo para cada una de las diluciones preparadas.

Una vez obtenidos los datos de los tiempos para cada dilución, se construye una gráfica en papel semi logarítmico donde se colocarán: en el eje logarítmico los valores en por ciento, de las diluciones (ver gráfica # 1); y en el eje aritmético el tiempo que tardó el plasma en coagular, en segundos.

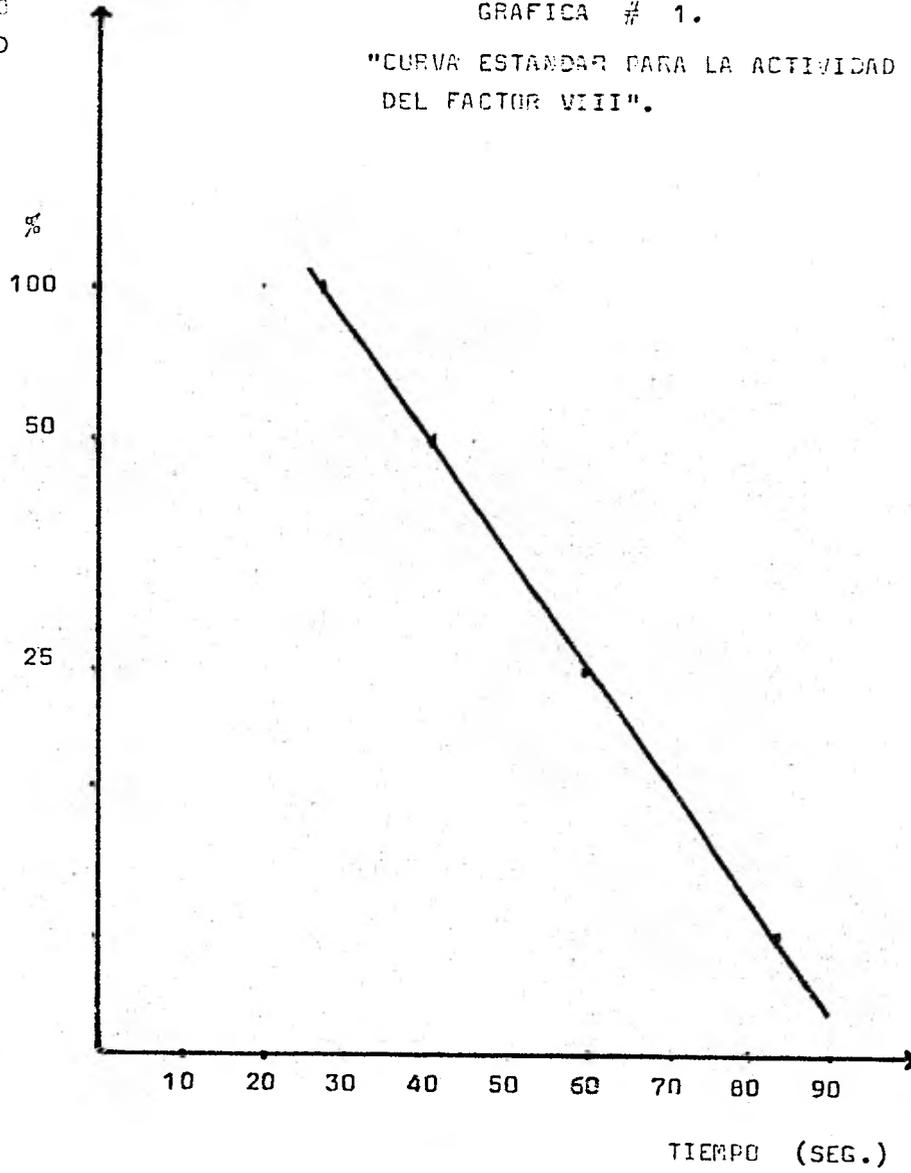
(*) Química Hoechst. PATHROMPTIM, Behring Institute

(**) Dade Diagnostics, Inc. COAGULATION FACTOR VIII
DEFICIENT SUBSTRATE PLASMA.

PORCIENTO
ACTIVIDAD
DEL
FACTOR
VIII

GRAFICA # 1.

"CURVA ESTANDAR PARA LA ACTIVIDAD
DEL FACTOR VIII".



III.- CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR
VIII. Técnica de Biggs.

REACTIVOS:

Los mismos que para la técnica anterior.

MATERIAL BIOLÓGICO:

- 1.- Plasma problema.
- 2.- Plasma deficiente en factor VIII(**). Liofilizado con actividad menor a 1%.

APARATOS:

Los mismos que en la técnica anterior.

FUNDAMENTO:

El T.T.P.A. es sensible a los niveles plasmáticos del factor VIII. Los niveles plasmáticos de este factor pueden ser cuantificados midiendo la facilidad con la que el plasma control corrige el T.T.P.A. del plasma problema al agregarle plasma deficiente del factor VIII. El T.T.P.A. de esta mezcla se compara con una curva estándar hecha con varias concentraciones de plasma control.

TECNICA:

A el plasma problema se le hace una dilución 1/10 con buffer Owen's Veronal a pH 7.35.

Se toma 0.1 ml. de la dilución 1/10 del plasma problema y se pone a incubar a 37°C en baño maría. Se agrega 0.1 ml. de plasma deficiente en factor VIII y 0.1 ml. de suspensión de caolín-fosfolípidos. Se toma el tiempo y al cumplirse dos minutos se le agrega 0.1 ml. de cloruro de calcio 0.025 M. y se toma el tiempo hasta que el aparato detecte el coágulo. El valor (en segundos) obtenido se extrapola de la curva estándar y de esta manera se obtendrá la actividad del factor VIII en por ciento, del plasma problema.

VALORES NORMALES:

Para esta prueba se tienen reportados como valores normales: valores mayores a 50% de actividad de factor VIII.

(**) Dade Diagnostics, Inc. COAGULATION FACTOR VIII
DEFICIENT SUBSTRATE PLASMA.

IV.- IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE INHIBI
DORES DEL FACTOR VIII, EN UNIDADES BETHESDA.
Técnica de Kasper y col.

REACTIVOS:

Los mismos que en la prueba anterior.

MATERIAL BIOLÓGICO:

- 1.- Mezcla de plasmas de por lo menos 5 personas sanas.
- 2.- Plasma problema.
- 3.- Plasma deficiente en factor VIII. Liofilizado y con actividad menor a 1%. (**)

APARATOS:

Los mismos que en la prueba anterior.

FUNDAMENTO:

El plasma problema se mezcla en igual proporción con plasma control. Se incuba esta mezcla por 120 mins. a 37°C. Al finalizar este tiempo se ensaya la técnica para cuantificar factor VIII. En caso de que haya un inhibidor presente en el plasma problema, este va a neutralizar la actividad del factor VIII coagulante y entonces se verá ésta disminuida si se compara con un control. Cuando bajo estas condiciones se observa que

la mezcla problema presenta una actividad residual de factor VIII de 50% o menos, entonces se dice que el inhibidor está presente.

TECNICA:

Se hace una dilución 1/2 de plasma control con buffer Owen's Veronal, poniendo un mínimo de 0.4 ml. de plasma control e igual cantidad de buffer Veronal.

De la misma manera se hace una dilución 1/2 de plasma problema con plasma control, poniendo un mínimo de 0.4 ml. de cada uno.

Ambas mezclas se ponen a incubar a 37°C. en baño maría. A los 30 mins., 60, 120, 180 y 240 mins. se corre el ensayo de cuantificación de la actividad del factor VIII tanto a la mezcla control (plasma control/buffer Veronal), como a la mezcla problema (plasma problema/plasma control), haciéndose la correspondiente dilución 1/10 con el buffer Veronal en cada mezcla.

Los datos obtenidos en cada una de las cuantificaciones del factor VIII, se extrapolan nuevamente de la curva estandar, para obtener así la actividad residual del factor VIII en por ciento.

Para ver la presencia de inhibidores se hace la siguiente relación de actividades:

Actividad de la mezcla problema en por ciento

Actividad de la mezcla control, en por ciento

ambas tomadas a los 120 mins. de incubación.

Esta relación nos dará la actividad residual del factor VIII a los 120 mins. de incubación.

Interpretación de Resultados:

En caso de que la relación obtenida sea mayor o igual a 100%, se podrá decir que no se encuentran presentes inhibidores del factor VIII.

Si la relación obtenida es menor a 100%, indica que hay inhibidores presentes y entonces, se calculará la cantidad de estos por medio de una curva en donde se verá que:

- a) 0.5 unidades Bethesda corresponden al 75% de actividad residual del factor VIII.

- b) 1.0 unidad Bethesda corresponde al 50% de actividad residual del factor VIII.
- c) 2.0 unidades Bethesda corresponden al 25% de actividad residual del factor VIII.

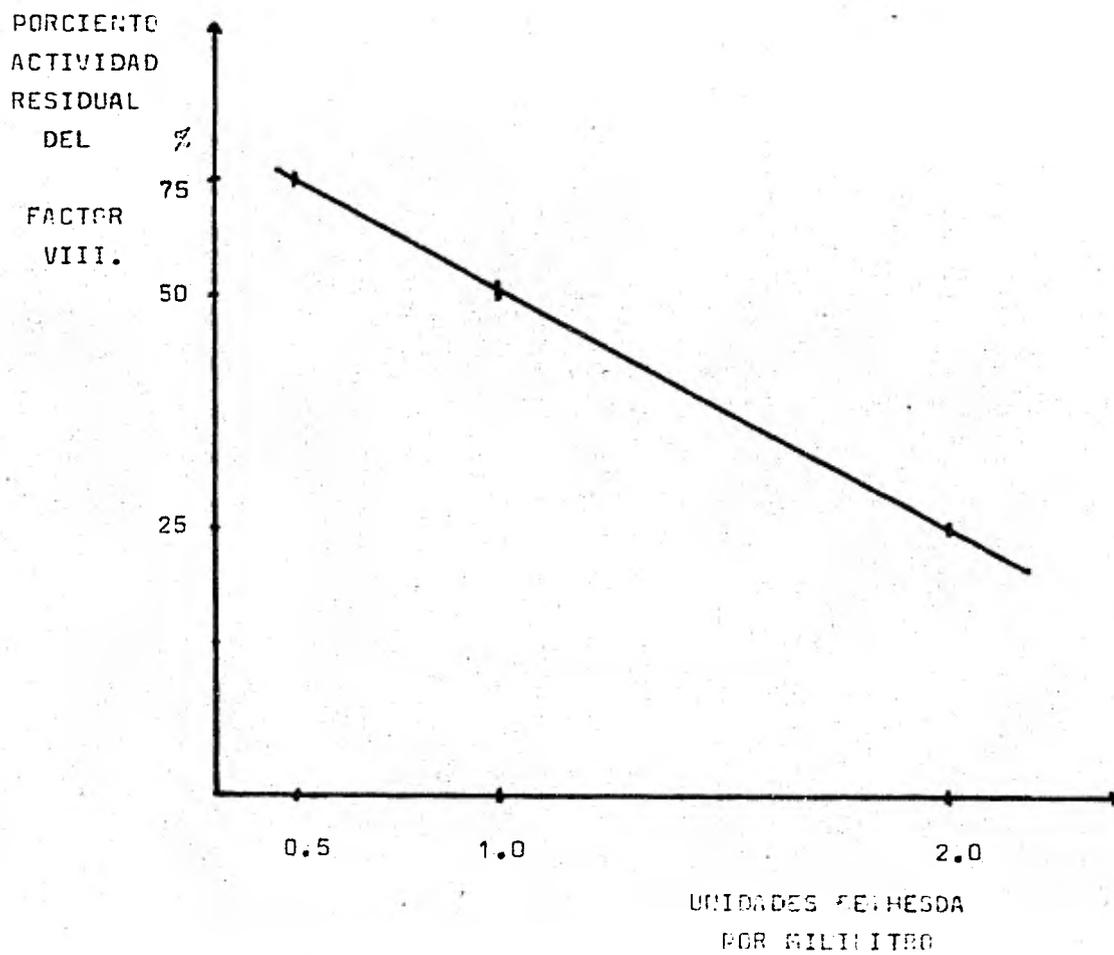
En el caso de que el valor del problema resulte entre los límites de 75 y 25% de actividad residual, se extropolarán los resultados directamente de la curva estandar anteriormente descrita, (ver gráfica # 2) también construida en papel semilogarítmico y teniendo los siguientes parámetros: eje logarítmico: porcentaje de actividad residual del factor VIII; en el eje aritmético: unidades Bethesda por mililitro.

En el caso de que el valor de la relación que nos da la actividad residual del factor VIII resulte entre el 99 y 75%, se harán diluciones tales, que se pueda corregir el valor y de esta manera sea capaz de ser leído en el rango de 75 y 25%; y lo mismo se hace en caso de que la actividad y cantidad de inhibidores sea tan grande que deje una actividad residual menor a 25%.

El fundamento de este ensayo para los inhibidores del factor VIII es el siguiente:

GRAFICA # 2.

"CURVA ESTANDAR PARA CUANTIFICAR
INHIBIDORES DEL FACTOR VIII".



En caso de que esté presente un inhibidor contra el factor VIII en el plasma problema, este se detectará porque la actividad del factor VIII a los 120 mins. de incubación se verá disminuída, cuando se le compare con la actividad obtenida en una mezcla control. Esto es debido a que el inhibidor neutralizará parte del factor VIII que es donado por el plasma normal al hacer la mezcla de plasmas.

En caso de que no esté presente el inhibidor, entonces la actividad del factor VIII residual será igual o mayor a la actividad del factor VIII residual de la mezcla control; lo que hará que la relación del plasma problema entre el plasma control sea mayor o igual a la unidad, lo que equivale a ser mayor o igual al 100%.

En el caso de que la relación de actividades del problema entre el control nos dé como resultado una actividad residual de factor VIII mayor al 75% pero menor al 100%, puede representar dos posibilidades:

- a) que en el plasma problema se encuentre un título bajo de inhibidores; es decir, baja concentración de ellos; o

b) que se trate de la presencia de un inhibidor con poca actividad.

Para poder diferenciar entre uno y otro caso, se sigue el siguiente método:

REACTIVOS:

Los mismos que en el Método II.

MATERIAL BIOLÓGICO:

El mismo que en el método IV.

APARATO:

el mismo que en los anteriores métodos.

TECNICA:

Se hacen las siguientes diluciones:

MEZCLA "A" PROBLEMA		MEZCLA "B" CONTROL	
Plasma problema	Plasma Control	Buffer Veronal	Plasma Control
4 cc.	2 cc.	4 cc.	2 cc.
6 cc.	2 cc.	6 cc.	2 cc.
8 cc.	2 cc.	8 cc.	2 cc.

Se pone a incubar cada muestra, tanto la mezcla problema como la mezcla control, a 37°C, durante 120

mins. para detectar a un inhibidor con bajo título y durante 12 hrs. para detectar un inhibidor con poca actividad.

Una vez cumplidas las 2 (o 12) hrs. de incubación se hace una dilución 1/10 a cada una de las diluciones preparadas y se ensayan para la técnica de cuantificación del factor VIII de la manera anteriormente descrita en la técnica III.

Se obtiene la actividad residual del factor VIII residual correspondiente a cada dilución, tanto de la mezcla control como de la mezcla problema y se hace la relación de actividades del factor VIII ya descrita. El factor VIII residual obtenido así se relaciona en la curva de unidades Bethesda con el fin de obtener el título de inhibidores presentes en el plasma problema.

En caso de ensayar para inhibidores con poca actividad, se siguen exactamente las mismas indicaciones una vez que se hayan cumplido las 12 hrs. de incubación.

Puede darse el caso de que la actividad residual del factor VIII se encuentre menor a 25%. En éste caso significa que la concentración del inhibidor presente en el plasma es muy alta. Aquí se observa que tampoco

se puede leer directamente de la zona confiable de la curva de unidades Bethesda; entonces lo que se hace es lo siguiente:

REACTIVOS:

Los mismos que en la técnica II.

MATERIAL BIOLÓGICO:

El mismo que en la técnica IV.

APARATO:

El mismo que en las técnicas anteriores.

TECNICA:

Se hacen las siguientes diluciones:

MEZCLA "A" PROBLEMA

MEZCLA "B" CONTROL

Plasma problema Plasma control Buffer Veronal Plasma control

2 cc.	4 cc.	2 cc.	4 cc.
2 cc.	6 cc.	2 cc.	6 cc.
2 cc.	8 cc.	2 cc.	8 cc.

Se ponen a incubar cada una de las mezclas, tanto la problema como la control a 37°C, durante 2 hrs. en baño maría. Una vez cumplidas las dos horas se hace el ensayo de cuantificación del factor VIII tanto

en la mezcla problema como en la control y se hace la relación de actividad de factor VIII para obtener el factor VIII residual. Esta actividad se relaciona con la curva estandar de unidades Bethesda con el fin de obtener la cantidad de unidades Bethesda que se encuentra presente en las muestras analizadas. A este resultado se le multiplicará por el factor de dilución correspondiente a cada muestra, para obtener la cantidad de inhibidores presentes en el problema.

Para este trabajo se llevó a cabo el estudio de 50 pacientes con las siguientes características:

Personas con hemofilia A y diferente grado de severidad en su padecimiento, sexo masculino, con edades que variaron entre los 4 y 58 años de edad. Estos enfermos habían sido transfundido con diferentes cantidades de fracciones de sangre (plasma, crioprecipitados o concentrados de factor VIII) e incluso sangre total.

Se efectuó también a manera de control, el estudio de 25 personas sanas, que no presentaban problema hematológico alguno y, menos aún, problemas de coagulación; así como tampoco hubo en este grupo alguna persona que presentara cualquier cuadro de enfermedad autoinmune, con la finalidad de cuantificarles la actividad coagulante del factor VIII y la actividad residual del mismo y obtener un grupo control negativo de inhibidores.

Así mismo, en este estudio se trabajó con tres muestras diferentes de concentración conocida de inhibidores del factor VIII que amablemente nos obsequió la Dra. Kasper, con el fin de tener en ellas un control positivo y evaluar el método de inhibidores que

se estaba estandarizando.

A cada individuo, tanto sano como enfermo, se le practicaron las siguientes pruebas:

- I.- Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada.
- II.- Cuantificación de la Actividad del Factor VIII.
- III.- Identificación y Cuantificación de Inhibidores del Factor VIII.

Los resultados obtenidos se describen posteriormente.

RESULTADOS.

A) AL ESTUDIAR A LAS 25 PERSONAS SANAS:

a) La actividad del factor VIII en este grupo varió en un rango que iba desde 60.5 hasta 130%, siendo el valor promedio de este grupo de 91.84%.

b) La actividad residual del factor VIII, que es la que nos indica el título de unidades Bethesda de inhibidor presente en el paciente, fué medida también en esta población control normal y se obtuvo un rango que varió entre 100 y 200% de actividad residual de factor VIII; siendo el título de unidades Bethesda en todos los casos, de cero.

El promedio del grupo en su actividad residual de factor VIII fué de 147.8%.

B) AL TRABAJAR LOS TRES DIFERENTES PLASMAS CONTROL POSITIVOS, CON UN TITULO CONOCIDO DE UNIDADES BETHESDA:

a) Los estudios se reúnen en los siguientes cuadros:

PRIMER ESTUDIO: Se trabajó la técnica con las condiciones normales. Estudio de sondeo.

NOMBRE			D.R.	R.L.	D.A.
ACTIVIDAD DE CONTROL	FACTOR VIII	CONTROL	30.0%	30.0%	30.0%
		PROBL.	0.65 %	1.5%	7.5%
ACTIVIDAD DE	RESIDUAL DE	FACTOR VIII.	2.16	5.0	25.0
UNIDADES	BETHESDA	POR M.L.	>>2.0	>2.0	2.0

SEGUNDO ESTUDIO: Se trabajó bajo las siguientes condiciones: plasmas control diluidos con buffer Owen's Veronal, para cuantificar inhibidores del factor VIII.

NOMBRE		D. R.		R. L.		D. A.
DILU C I O N		1/100	1/40	1/20	1/10	----
ACTIVIDAD	FACTOR VIII	37.5%	38.0%	37.5%	37.5%	32.3%
	CONT. PROB.	21.0%	9.2%	15.9%	14.0%	8.5%
% ACTIVIDAD	FACTOR VIII	56.0	24.2	42.4	37.3	26.0
UNIDADES	POR M.L.	85.0	84.0	25.0	14.1	1.9

TERCER ESTUDIO: Se trabajó bajo las siguientes condiciones: plasmas control diluidos en solución salina fisiológica, para cuantificar los inhibidores del factor VIII.

NOMBRE		D. R.		R. L.	
DILU C I O N		1/100	1/40	1/20	1/10
FACTO R V I I I	COMPT.	36.25%	36.5%	36.5%	36.0%
	PROBL.	20.1 %	8.5%	22.3%	13.4%
RESID U A L	FACTO R V I I I	55.5	23.4	61.5	36.9
UNID A D E S	PER T H E S D E L.	86.0	84.0	14.8	14.5

CUARTO ESTUDIO: Con las mismas condiciones que el tercero.

NOMBRE		D. R.		R. L.	
CONDICION		1/100	1/40	1/20	1/10
ACTIVIDAD	FACT. CONT.	37.2%	37.0%	37.5%	37.5%
	FACT. PROBL.	20.8%	9.0%	23.1%	14.7%
% ACTIVIDAD	FACTOR VITAL	55.4	24.0	62.0	39.5
UNIDADES	PORTHESEDA	85.2	84.2	14.0	13.5

Los plasmas control tenían los siguientes títulos de inhibidores del factor VIII (datos que nos hizo favor de enviar la Dra. Kasper, junto con los plasmas y que fueron trabajados por ella y posteriormente guardados bajo congelación en las condiciones apropiadas):

NOMBRE	TITULO DE INHIBIDORES
D.R.	87.0 U. Bethesda/ml.
R.L.	18.0 U. Bethesda/ml.
D.A.	2.9 U. Bethesda/ml.

C) AL ESTUDIAR A LOS PACIENTES HEMOFILICOS, RE
TIVO DEL TRABAJO:

Los resultados se pueden reunir en los siguientes
cuadros:

CUADRO # 1.

GRADO DE HEMOFILIA	NO. PACIENTES	%	NO. PACIENTES CON INHIBIDOR	%
SEVERO	20	40	6	30.0
MODERADO	16	32	6	37.5
LEVE	14	28	1	7.1
TOTAL	50	100	13	26.0

CUADRO # 2. Frecuencia de inhibidores del factor
VIII en hemofílicos que pertenecían
a familias y sin parentesco.

TITULO DE INHIBIDOR U. BETHESDA / ml.	FAMILIARES		NO FAMILIARES	
	NO. PACIENTES	%	NO. PACIENTES	%
0 - 1.0	5	83.3	0	00.0
1.1 - 2.0	1	16.7	6	85.7
2.1 - ...	0	00.0	1	14.3
TOTAL	6	27.3	7	25.0

CUADRO # 3.

EDAD(años)	NO. PACIENTES	%	NO. PACIENTES CON INHIBIDOR	%
0 - 9	18	36	7	38.8
10 - 19	12	24	2	16.6
20 - 29	8	16	2	25.0
30 - 39	8	16	1	12.5
40 - 49	3	6	1	33.3
50 - 59	1	2	0	00.0
TOTAL	50	100	13	26.0

CUADRO # 4.

EDAD(años)	GRADO DE HEMOFILIA CON INHIBIDORES	NO. PACIENTES	%
0 - 9	SEVERO	4	57.1
	MODERADO	2	28.6
	LEVE	1	14.3
10 - 19	SEVERO	0	00.0
	MODERADO	2	100.0
	LEVE	0	00.0
20 - 29	SEVERO	1	50.0
	MODERADO	1	50.0
	LEVE	0	00.0
30 - 39	SEVERO	1	100.0
	MODERADO	0	00.0
	LEVE	0	00.0
40 - 49	SEVERO	0	00.0
	MODERADO	1	100.0
	LEVE	0	00.0

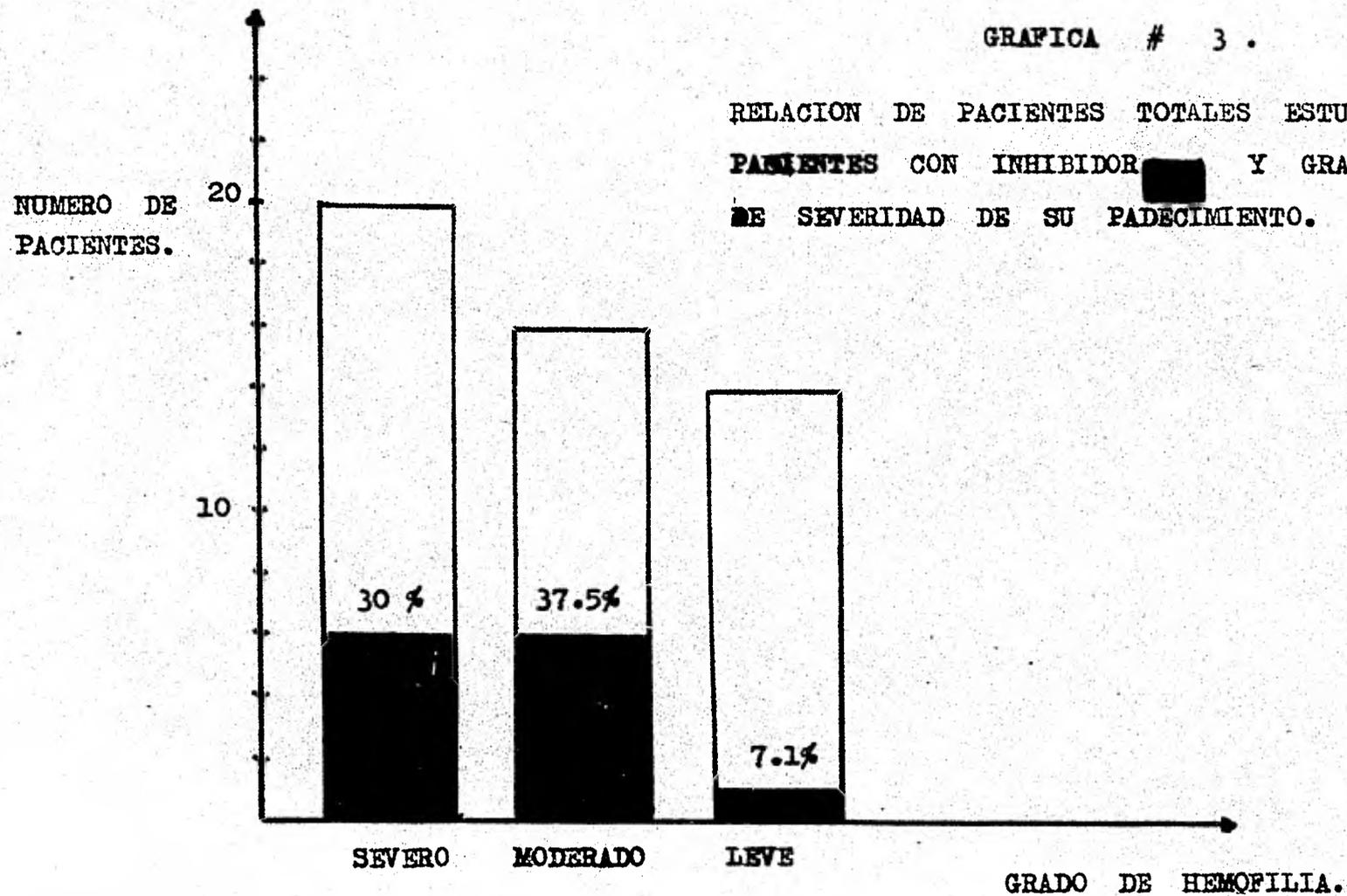
RESUMEN DE RESULTADOS:

Total de pacientes estudiados:	50
Total de hemofílicos con inhibidores:	13
Porcentaje :	26.0%
Total de pacientes familiares:	22
Total de familiares con inhibidores:	6
Porcentaje :	27.3%
Total de hemofílicos familiares menores a 19 años:	10
Porcentaje :	40.9%
Total de hemofílicos familiares menores a 19 años, con inhibidores:	2
Porcentaje :	33.3%
Total de hemofílicos NO familiares:	28
Total de NO familiares con Inhibidores:	7
Porcentaje :	25.0%
Total de hemofílicos NO familiares menores a 19 años:	20
Porcentaje :	71.4%
Total de hemofílicos NO familiares menores a 19 años con inhibidores:	7
Porcentaje :	100.0%

Total de jóvenes hemofílicos (menores a 19 años) :	30
Total de jóvenes hemofílicos con inhibidores:	9
Porcentaje :	60.0
Total de hemofílicos adultos (mayores de 19 años) :	20
Total de hemofílicos adultos con inhibidores:	4
Porcentaje:	40.0%
Total de hemofílicos severos:	20
Total de severos con inhibidores:	6
Porcentaje :	30.0%
Total de hemofílicos moderados:	16
Total de moderados con inhibidores:	6
Porcentaje :	37.5%
Total de hemofílicos leves:	14
Total de leves con inhibidores:	1
Porcentaje :	7.14%

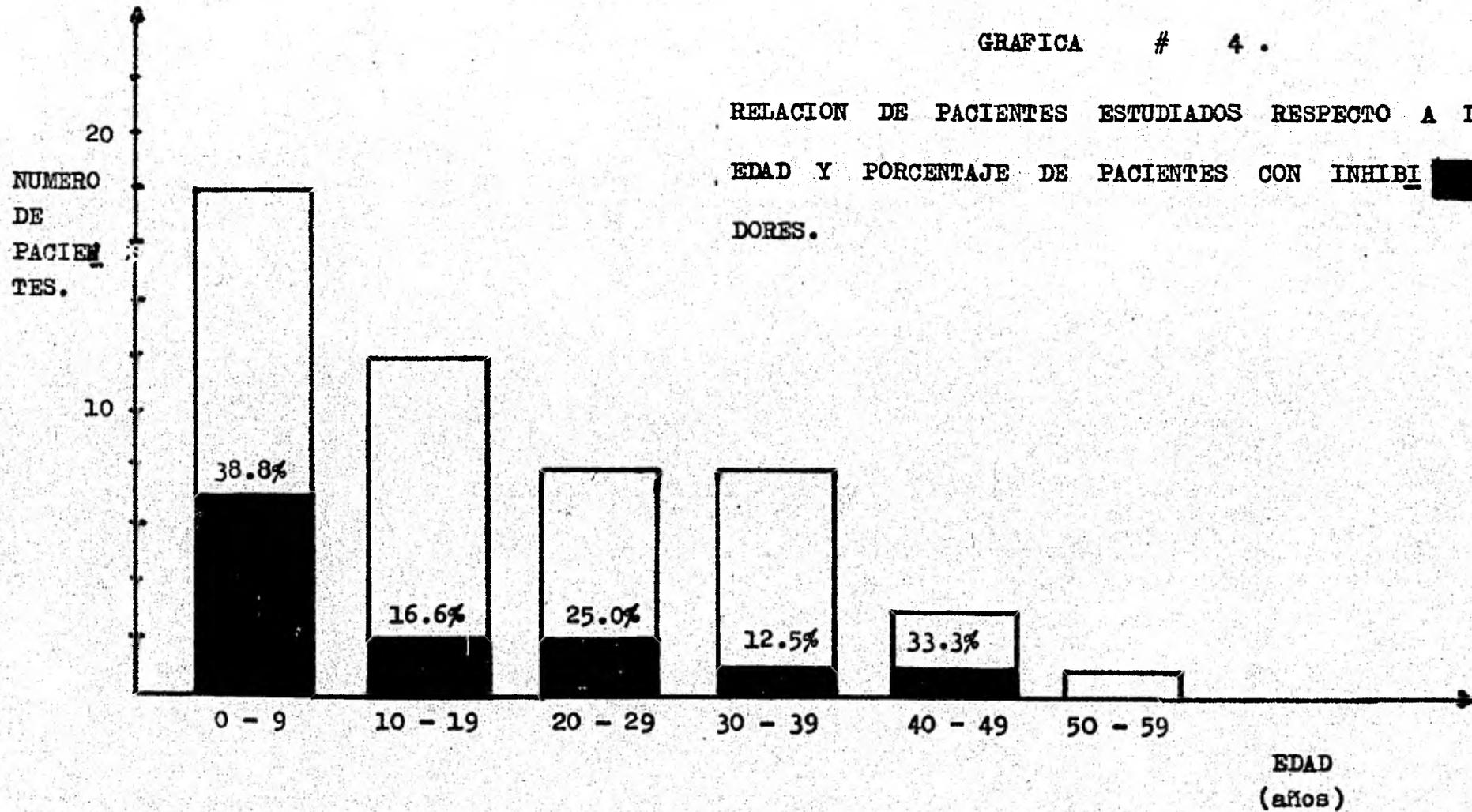
GRAFICA # 3 .

RELACION DE PACIENTES TOTALES ESTUDIADOS,
PACIENTES CON INHIBIDOR [REDACTED] Y GRADO DE
DE SEVERIDAD DE SU PADECIMIENTO.



GRAFICA # 4.

RELACION DE PACIENTES ESTUDIADOS RESPECTO A LA
EDAD Y PORCENTAJE DE PACIENTES CON INHIBI
DORES.



DISCUSION.

Los resultados más sobresalientes en este estudio son: la frecuencia alta de inhibidores y la baja concentración de la mayoría de ellos.

En general, la frecuencia de inhibidores del factor VIII en hemofílicos varía del 5 al 20%.^{37,52,66.} En el estudio longitudinal multicéntrico en los Estados Unidos de Norte América, que incluyó a 1520 hemofílicos y que se informó recientemente, se encontró una frecuencia de inhibidores de 14.2%.

La primera explicación para estas diferencias, podría ser la de tener errores metodológicos, ya que el predominio es a base de inhibidores de baja concentración; pensamos que las variaciones del factor VIII residual de 75 a 99%, después de haber incubado el plasma normal con el plasma enfermo, pudieran ser atribuidas a variaciones en el método. Por ello, en todos los casos en los que el factor VIII residual estuvo dentro de este rango, se repitieron las pruebas aumentando la concentración del inhibidor y además se prolongó el tiempo de incubación; con estas dos modificaciones el efecto del inhibidor fué más objetivo y las

concentraciones del factor FIII residual se ubicaron en la parte más sensible de la curva (75 a 25%). En ausencia de inhibidor, con esta nueva dilución, la concentración de factor VIII residual es del 100%.

Por otra parte, durante el desarrollo del estudio se incluyeron testigos positivos con diferentes concentraciones de inhibidor, que nos facilitó la Dra. Carol Kasper; y los resultados fueron muy similares a los obtenidos por ella.

Finalmente, la trascendencia de los inhibidores de baja concentración se demostró "In Vivo" en pacientes que con 0.5 unidades Bethesda, requirió un exceso de factor VIII para obtener concentraciones plasmáticas adecuadas.

Una explicación posible para la frecuencia alta de los inhibidores en el grupo de hemofílicos que estudiamos, es la alta proporción de sujetos jóvenes (menores de 20 años), que resultó del 60.0%.

El porcentaje acumulativo de inhibidores en los hemofílicos, alcanza aproximadamente un 70.0% en las primeras dos décadas de la vida. De tal manera que si uno estudia una población de hemofílicos jóvenes, ten

drá una mayor probabilidad de encontrar mayor número de inhibidores, que si uno estudia una población de adultos.

La presencia de inhibidores complica la evolución del paciente con hemofilia y determina una morbilidad y mortalidad mayor así, participa un mecanismo de selección natural.

En el cuadro # 3, se analizan las frecuencias de inhibidores relacionadas con la edad y, en este, se aprecia que el grupo con inhibidores tiene una mayor proporción de jóvenes y en el grupo sin inhibidores predominan los adultos. Con la prueba de U-Mannwithney se obtuvo una diferencia significativa de inhibidores en el grupo más joven.

El otro factor que analizamos en relación con la frecuencia alta de inhibidores, fue la relación de familiares y no familiares en el grupo de pacientes estudiados, ya que la mitad aproximadamente, de los hemofílicos estudiados pertenecen a nueve familias y es bien sabido que la probabilidad de desarrollar inhibidores tiene relación, entre otras cosas, con factores genéticos. La frecuencia de inhibidores en los hemofí

licos con relación familiar no tuvo diferencias significativas, con los que no la tenían.

CONCLUSIONES.

1.- Este método de cuantificación de inhibidores del factor VIII hace difícil titular los inhibidores con poca actividad.

2.- La unidad Bethesda no correlaciona con el número de unidades del factor VIII que se requiere transfundir para neutralizar un inhibidor circulante.

3.- Se obtuvo una frecuencia alta de inhibidores en hemofílicos de la ciudad de México.

4.- Se cree que esta frecuencia alta se debe a que la mayoría de los pacientes estudiados eran niños o jóvenes menores de 19 años de edad.

5.- No se observa una influencia significativa en la alta frecuencia de inhibidores del factor VIII, no obstante haber estudiado aproximadamente un 50% de pacientes hemofílicos que pertenecían a nueve familias.

6.- Se hace notar en la importancia que tiene, los títulos bajos de inhibidores del factor VIII en pacientes, cuando requieren terapia sustitutiva.

RESUMEN.

En el presente trabajo se hizo el estudio de pacientes con hemofilia A, sexo masculino y de diferentes edades, los cuales habían sido transfundido con diversas cantidades de sangre o fracciones de esta, con la finalidad de obtener la frecuencia de inhibidores del factor VIII en esta población.

Se efectuó también el estudio de personas sanas para obtener un control negativo de inhibidores y se analizaron tres muestras de plasma que contenían un título conocido de inhibidores, los que sirvieron como controles positivos de ellos.

Se les practicó las siguientes pruebas:

- 1.- Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada.
- 2.- Cuantificación de la Actividad del Factor VIII.
- 3.- Cuantificación de Inhibidores del Factor VIII, con unidades Bethesda,

y se obtuvo una frecuencia alta de inhibidores en nuestra población, observándose una mayor frecuencia de estos en jóvenes menores de 19 años, que en adultos y no

tándose que en esta población es más frecuente encontrar títulos menores a 2 unidades de inhibidor.

- 1.- Allain J.P. y Frommel D.
"Anticuerpos al Factor VIII. Variaciones en la Estabilidad de Complejos Antígeno-Anticuerpo en la Hemofilia A".
Blood 42,(3):437,444,1973.
- 2.- Allain J.P. y Frommel D.
"Anticuerpos al Factor VIII. Especificidad y Cinética de Iso- y Hetero Anticuerpos en Hemofilia A".
Blood 44,(3):313-322,1974.
- 3.- Allain J.P. y Frommel D.
"Anticuerpos al Factor VIII. Patrones de Respuestas Inmunes al Factor VIII en Hemofilia A".
Blood 47,(6):973-981,1976.
- 4.- Austen D.E.G. y Bidwell E.
"Carbohidratos en la Estructura del Factor VIII".
Thromb. Diath. Haemorrh. 28:464-467,1972.
- 5.- Barton P.G.
"Factor Antihemofílico".
Mature (Lond.), 215,(2):1508,1967.
- 6.- Bennett B. y Ratnoff O.D.
"Cambios en la Actividad Procoagulante del Factor Antihemofílico, Posteriores al Ejercicio".
J. Lab. Clin. Med. 80:256-260,1972.
- 7.- Benson R.E. et al.
"Caracterización Parcial de la Estimulación para la Producción del Factor VIII".
Fed. Proc. 33:245-249,1974.

- 8.- Biggs R. y Bidwell J.
"Human Blood Coagulation. Haemostasia and Thrombosis".
Blackwell, 2a, Edición, pp. 143-162, 1978.
- 9.- Biggs R., Austen D.E.G. et. al.
"Modo de Acción de Anticuerpos que Destruyen al Factor VIII. Primera Parte".
Brit. J. Haematol. 23:125-135, 1972.
- 10.- Biggs R. Austen D.E.G. et al.
"Modo de Acción de Anticuerpos que Destruyen al Factor VIII. Segunda Parte".
Brit. J. Haematol. 23:137-155, 1972.
- 11.- Bird P. y Rizza C.R.
"Un Método para Detectar la Actividad Coagulante del Factor VIII Asociado con el Factor VIII Antigenico".
Brit. J. Haematol. 31, (2):5-8, 1975.
- 12.- Blackburn G.L., Joison J., Pegg C.
"Globulina Antihemofílica Liberada por Perfusión de Timo canino".
Circulation 39 (suppl. 3), 47-54, 1969.
- 13.- Bloom A.L.
"Fisiología del Factor VIII".
Rec. Adv. Blood Coag. 2, (1):142-158, 1977.
- 14.- Bloom A.L., Peeke L.R., Giddings J.C.
"Presencia y Reacciones del Factor VIII Coagulante de Alto y Bajo Peso Molecular en Pacientes con Enfermedad de Von Willebrand".
Thromb. Res. 3, (4):389-394, 1975.

- 15.- Boneau P., Arbell M. et al.
"Complejo del Factor VIII en Daño Endotelial".
Lancet 1:1430,1975.
- 16.- Bouma B.N., Sixma J.J. et al.
"Caracterización Inmunológica del Factor Antihe-
mofílico Purificado".
Nature New Biol. 236,(2):104-108,1972.
- 17.- Bowie W.E.J. et al.
"Estabilidad de la Globulina Anti-hemofílica y
Factor Lábil en Sangre Humana".
Clinic. Proc. 39,(1):144-147,1964.
- 18.- Brinkhous K.M. y Himker M.C.
"Handbook of Haemophilia". Ed. Excerpta Médica.
Tomo II, Amsterdam,1975.
- 19.- Britten A., Grove-Rasmussen M.
"Estabilidad del Factor VIII Congelado".
Transfusion 6:230-232,1966.
- 20.- Bruhn H.D. y Heimburger N.
"Factor VIII Antigénico".
Haemostasis 5,(1):189-192,1976.
- 21.- Casillas G. et al.
"Comportamiento Cromatográfico de los Factores
de la Coagulación".
Brith. J. Haematol. 16,(3):363-366,1969.
- 22.- Casillas G. et al.
"Estudios Físicos, Químicos e Inmunológicos del
Factor VIII Bovino".
Haemostasis 5,(1):1-12,1976.

- 23.- Castro O.L., Farber R. y Clyne L.P.
"Anticoagulantes Circulantes Contra los Factores VIII, IX y XI, el Lupus Eritematoso Sistémico".
Ann. Intern. Med. 77,(3):543-547,1972.
- 24.- Cohen R.J., Eptein S.E. et al.
"Alteraciones de Fibrinolisis y Coagulación Sanguínea Indecidas por el Ejercicio".
Lancet 2,(2):1264,1968.
- 25.- Davie E.W., Fujikawa K., Kato H. Legaz M.E.
"Factor Anti-hemofílico".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 240,(1):34-41,1975.
- 26.- Dodds W.J.
"Influencia Hepática Sobre el Bazo para la Liberación de la Actividad Coagulante".
Science 166,(3):882-886,1969.
- 27.- Dodds W.J., Hoyer L.W.
"Actividad Coagulante en Organos Perfundidos".
Brit. J. Haematol. 26,(1):497-502,1974.
- 28.- Dodds W.J., Miller K.D.
"Almacenaje y Síntesis de Factores de la Coagulación en Hígado, Riñón y Bazo Aislados y Perfundidos".
Experimental Biology 27,(1):373-383,1968.
- 29.- Dodds W.J., Raymond S.L., Mayneshan A.C.
"Estimadores Independientes que Regulan la Producción de los Factores VIII y IX de la Coagulación".
J. Lab. Clin. Med. 79,(2):770-774,1972.

- 30.- Dosamantes B.M.C.
"Frecuencia de Mujeres Portadoras de Hemofilia en México".
Tesis Profesional. I.P.N., pp.3-24,1977.
- 31.- Ekberg M. y Nilson J.M.
"Factor VIII y Glomerulonefritis".
Lancet 1:1111,1975.
- 32.- Frommel D. y Allain J.P.
"Predisposición Genética para Desarrollar Anticuerpos Contra el Factor VIII en Hemofilia Clasica".
Clin. Immunol. Immunop. 8,(1):34-42,1977.
- 33.- Furlan M., Jakab T. y Beck E.A.
"Disociación del Factor VIII por una Lipasa de Rhyzopus".
Thrombos. Res.,10:421-427,1977.
- 34.- Gader A.M.A., De Costa J., Cash J.D.
"Respuesta del Factor VIII Coagulante y el Activador del Plasminógeno a la Adrenalina, Noradrenalina en el Hombre".
Thrombos. Res., 2,(1):9-13,1973.
- 35.- Gader A.M.A., Chaeson A.R., Cash J.D.
"El Efecto del Propanolol, Aprenol y Proctolol, Sobre la Respuesta Fibrinolítica y del Factor VIII a la Adrenalina en el Hombre".
Throm. Res., 10:421-427,1977.
- 36.- Gader A.M.A., Parker S.
"Respuesta a la Adrenalina Endovenosa, del Sistema Fibrinolítico y Factor VIII en el Hombre".
Thrombos. Res., 3,(1):137-143,1973.

- 37.- García V., Fonrodona R. Battle J. et al.
"Avances Recientes Sobre el Conocimiento del
Factor VIII".
Rev. Clin. Española., 148,(4):325-338,1978.
- 38.- Gerso R.F.
"Hemofilia".
Actualidades Médicas., 11,(12):76-80,1980.
- 39.- Green D.
"Estudio del Factor VIII Humano/Factor Von Wille
brand".
J. Lab. Clin. Med., 77,(1):153-156,1971.
- 40.- Gunn R. y Rizza C.R.
"Niveles de Actividad Plasmática del Factor VIII".
Elut., 29:241-243,1974.
- 41.- Hathaway W.E., Mull M.M., Githens J.H.
"Transplante de Bazo en Hemofilia Clásica".
Transplantation., 7,(1):73-80,1969.
- 42.- Hemker H.C., Kahn M.J.P.
"Factor VIII".
Nature (Lond.), 215:1201,1967.
- 43.- Hershgold E.J., Davison A.M., Jansen M.E.
"Factor VIII Humano. Activación e Inactivación
por Fosfolipasas".
J. Lab. Clin. Med., 77,(1):206-210,1971.
- 44.- Hershgold E.J. et al.
"Aislamiento y Algunas Propiedades Químicas del
Factor VIII".
J. Lab. Clin. Med., 77,(1):185-189,1971.

- 45.- Hougie C. y Sargent R.
"Relación de Actividad Antigenica y Biológica del Factor VIII".
Lancet.1,(2):616-617,1973.
- 46.- Hougie C.,Denson K.W., Biggs R.
"Factor VIII, sus Actividades Antigenica y Coagulante".
Thrombos. Diathes. Haemorrh.,18,(1):211-214,1967.
- 47.- Hoyer L.W.
"Especificidad de Anticuerpos Precipitantes en la Identificación Inmunológica del Factor Anti-hemofílico".
Nature New Biol.,245,(1):49-57,1973.
- 48.- Hulting M.B. et al.
"Heterogeneidad de los Anticuerpos al Factor VIII. Estudios Inmunoquímicos y Biológicos Posteriores".
Blood,49,(2):807-813,1977.
- 49.- Harvey R. y Gralnick M.D.
"Factor VIII".
Ann. Int. Med.,86:598-623,1977.
- 50.- Ingram G.I.C. et al.
"Actividad y Antígeno del Factor VIII,Conteo Plaquetario y Cambios Bioquímicos Posteriores".
Brith.J.Haematol.,35,(1):81-86,1977.
- 51.- Kasper C. et al.
"Una Medida Más Uniforme de los Inhibidores del Factor VIII"
Thromb. Diath. Haemorrh.,34:869-870,1975.

- 52.- Kasper C.
"Frecuencia y Curso de Inhibidores en Pacientes con Hemofilia A".
Thromb. Diath. Haemorrh.30:263-267,1973.
- 53.- Kelly G., Pechet L., y Eiseman B.
"Síntesis de la Globulina Antihemofílica para Aislación y Perfusión de Bazo".
Surg. Gynec. Obst.131:473-475,1970.
- 54.- Kernoff R.B.A.
"Afinidad del Factor VIII con Actividad Coagulante, por un Antígeno Detectable Inmunológicamente".
Nature New Biol.,244,(1):148-152,1973.
- 55.- Lavergne J.M., Meyer D., Reissner H.
"Caracterización de Anticuerpos Anti Factor VIII Humano".
Blood,48,(2):931-935,1976.
- 56.- Leavell S.B., Thorup L.A., "Hematología Clínica"
4a. Edición. Ed. Interamericana. pp. 604-608,1978.
- 57.- Legaz M.E., Schemer G., Counts R.B. y Davie E.W.
"Aislación y Caracterización del Factor VIII Humano".
J. Biol. Chem,248:3946-3950,1973.
- 58.- Libre E.P., Cowen D.H., Walkins S.F.
"Relación Entre Bazo, Plaquetas y Niveles del Factor VIII".
Blood,31:358-362,1968.
- 59.- Marchesi S.L., Schulman M.R. y Gralnick H.R.
"Estudios Sobre la Purificación y Caracterización del Factor VIII Humano".
J. Clin. Invest.51:2151-2158,1972.

- 60.- Marchioro T.L., Hougie C., Rade H.
"Hemofilia".
Science, 163:188-191, 1969.
- 61.- Marchioro T.L., Hougie C., Rade H.
"Papel de los Organos en la Hemofilia".
Transplant. Proc., 1:316-320, 1969.
- 62.- Margolius A., Jackson D.P., y Ratnoff O.D.
"Anticoagulantes Circulantes".
Medicine (Baltimore), 40:145-161, 1961.
- 63.- McKee P.A., Andersen J.C. y Switzer M.E.
"Estudios de la Estructura Molecular del Factor VIII".
Ann. New York Acad. Sci., 240:8-13, 1975.
- 64.- McKee P.A., Coussons R.T.
"Efectos de Bazo en los Niveles del Factor VIII
Canino".
J. Lab. Clin. Med., 75:391-395, 1970.
- 65.- Norman J.C., Lambilliotte J.P.
"Factor Antihemofílico Liberado por el Bazo y el
Hígado Perfundidos, (Relacionados a la Hemofilia)".
Science, 158:106-113, 1967.
- 66.- Ortega F., Villar J.M., Magallón M.
"Epidemiología, Inmunología y Métodos de Detección
de Inhibidores en la Hemofilia".
Sangre 23(5-B):688-697, 1978.
- 67.- Owen W.G., Wagner R.H.
"Factor Antihemofílico. Un Nuevo Método de Purificación".
Thromb. Diath. Haemorrh. 27:502-506, 1972.

- 68.- Owen W.G. y Wagner R.H.
"Factor Antihemofílico. Separación de un Fragmento Activo".
Thrombos. Res., 1:71-76, 1972.
- 69.- Özsoylu S. y Özer F.L.
"Deficiencia Adquirida de los Factores VIII y IX".
Acta Haematol. (Basel) 50:305-309, 1973.
- 70.- Parry D.H. y Bloom A.L.
"Hemostasia en Pacientes Hemofílicos con Inhibidores".
J. Clin. Pathol. 31:1102-1105, 1978.
- 71.- Peake I.R. y Bloom A.L.
"Disociación del Factor VIII por Agentes Reductores y Sales de Alta Concentración".
Thrombos. Haemost., 35:191-196, 1976.
- 72.- Penick G.D. et al.
"Estabilidad Relativa del Factor Antihemofílico Plasmático Bajo Diferentes Condiciones de Almacenaje".
Am. J. Med. Sci. 232:434-439, 1956.
- 73.- Pooler L. "Recent Advances in Blood Coagulation".
Ed. Churchill Livingstone. Edenburg London and N.Y.
pp. 214-225, 1977.
- 74.- Poon M.Ch., Wine A., Ratnoff O., Bernier G.
"Heterogeneidad de los Anticuerpos Humanos Circulantes Contra el Factor VIII".
Blood, 46:409-415, 1975.

- 75.- Prentice C.R.M., Farbes C.D.
"Medida del Factor VIII Después del Ejercicio y de una Infusión de Adrenalina".
Thromb. Res., 1:493-497, 1972.
- 76.- Rickless F.R., Harden J.A., Pitlick F.A., Hoyer L.W.
"Actividad del Factor VIII en un Cultivo de Linfocitos de Individuos Normales y con Hemofilia A".
J. Clin. Invest. 52:1427-1432, 1973.
- 77.- Rizza C.R.
"Efecto del Ejercicio en los Niveles de Globulina Antihemofílica en Sangre Humana".
J. Physiol. 156:128-134, 1961.
- 78.- Rizza C.R.
"Ejercicio, Factor VIII y el Bazo".
Brith. J. Haemathol. 20:629-634, 1971.
- 79.- Rizza C.R. y Biggs R.
"Tratamiento de Pacientes que Presentan Anticuerpos Contra el Factor VIII".
Brith. J. Haemathol., 24:65-70, 1973.
- 80.- Robboy S.J., Lewis E.J. et al.
"Anticoagulantes Circulantes Contra el Factor VIII".
Am. J. Med., 49:742-745, 1970.
- 81.- Rocha E., Fernández J.M., Solana J., Pérez Val J.A.
"Síntesis, Bioquímica y Estructura Molecular del Factor VIII".
Sangre 23, (5-8):642-666, 1978.

- 82.- Shapiro S.S. y Hulting M.
"Inhibidores Adquiridos Contra los Factores Plasmáticos de la Coagulación".
Semin. Thromb. Haemost.,1:336-341,1975.
- 83.- Vermylen J.
"Propiedades Físicas y Químicas del Factor VIII Normal y Hemofílicos".
Path. Biol.,23(suppl):5-10,1975.
- 84.- Webster W.P.,Zuroski C.F.
"Síntesis y Control del Factor VIII Plasmático, Revelados por Transplante de Organos en Ferros".
Amer. J. Physiol. 220:1147-1156,1971.
- 85.- White, Handler, Smith. "Principios de Bioquímica",
4a. Edición. Ediciones del Castillo. pp. 724-734,1978.