



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PROYECTO PARA OBTENER UN ANTICUERPO  
ESPECIFICO CONTRA GLOBULINA  
ANTIHEMOFILICA HUMANA EN  
CONEJOS.



EXAMENES PROFESIONALES<sup>1</sup>  
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
ALMA ROSA LUNA SILVA



## **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 está 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.

## I N D I C E

	Pag.
I. INTRODUCCION .....	1
II. FUNDAMENTO.....	5
III. MATERIAL Y METODOS .....	7
A) EQUIPO UTILIZADO .....	8
B) REACTIVOS .....	10
C) MATERIAL BIOLÓGICO.....	13
D) PREPARACION DE CRIOPRECIPITADOS .....	14
F) PURIFICACION DE FACTOR VIII CON GLICINA .....	15
F) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR VIII EN EL CONCENTRADO DE GLOBULINA ANTIHEMOFILICA PRECIPITADO CON GLICINA (CGAH-PG) Y EN EL CRIOPRECIPITADO .....	16
G) DETERMINACION DE LA HOMOGENEIDAD DEL CGAH PG .....	16
H) CUANTIFICACION DE FIBRINOGENO EN EL CGAH-PG .....	17
I) METODO PARA OBTENER ANTISUERO DE CONEJO CONTRA EL CGAH-PG (ASC-CGAH) .....	19
J) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA DEL ASC-CGAH .....	20
K) DETERMINACION DE INHIBIDORES DE LA COAGULACION EN EL ASC-CGAH .....	23
L) PURIFICACION DEL ASC-CGAH MEDIANTE ABSORCION CON PLASMA HEMOFILICO .....	24
IV. RESULTADOS .....	27
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	38
VI. APENDICE .....	46
VII. BIBLIOGRAFIA .....	55

## I - I N T R O D U C C I O N

La globulina antihemofílica (GAH) tiene gran interés en patología humana porque su deficiencia causa el 67.4% de las enfermedades hereditarias de la coagulación (1). La enfermedad hemorrágica determinada por esta deficiencia es conocida como hemofilia "A"

De acuerdo a los estudios realizados previamente se ha podido establecer que la GAH circula en el plasma como un complejo con tres entidades medibles: el factor VIII procoagulante (FVIIIc) que se mide por medio de pruebas de coagulación; la fracción de la molécula del factor VIII con actividad antigénica (FVIIIa) que se detecta con antisueros heterólogos (2,3) y una tercera entidad que es la fracción molecular necesaria para la agregación fisiológica de las plaquetas, llamada también factor de von Willebrand cuya presencia se demuestra con la prueba de agregación de las plaquetas con ristocetina (4,5).

Anticuerpos dirigidos contra el FVIIIc se han obtenido de hemofílicos severos que desarrollan inhibidores después de --- transfusiones múltiples, problema que se ha observado en aproximadamente el 10% de estos enfermos (6,7). También pueden encontrarse autoanticuerpos contra factor VIII en pacientes con enfermedades inmunológicas del tipo del Lupus eritematoso sistémico; dichos anticuerpos se han utilizado para estudiar algunas propiedades del FVIIIc. Un método inmunoradiométrico que utilizó anticuerpos isólogos demostró que los hemofílicos severos no presentaban ni actividad procoagulante ni antígeno de la -- fracción procoagulante de la molécula del factor VIII; en cambio, los pacientes con hemofilia leve o moderada pueden tener o bien actividad procoagulante y actividad de antígeno para la -- fracción procoagulante comparables, o niveles relativamente más altos de proteína detectable inmunológicamente (8).

La hemofilia fue probablemente la primera enfermedad hemorrágica de que se tuvo noticia, sin embargo el estudio de su patogenia ha tenido un desarrollo gradual y aún en la actualidad -

la purificación y el estudio de la estructura y función de la GAH presenta serios problemas debido a lo siguiente (9).

- 1) La inestabilidad de la actividad procoagulante de esta proteína.
- 2) La baja concentración del factor VIII en plasma (aproximadamente 10  $\mu$ g/ml).
- 3) La dificultad para separar experimentalmente el fibrinógeno del factor VIII.

Los estudios con respecto a la GAH empezaron a tener importancia cuando Cohn (10) preparó un concentrado de GAH a partir de plasma fresco precipitado con etanol al 8%; a este precipitado le llamó fracción I de Cohn. Posteriormente Blombäck (11) modificó esta fracción logrando una purificación mayor, y a este nuevo concentrado le llamó fracción I-0; sin embargo, en estos dos concentrados la proteína predominante es el fibrinógeno (12).

Más adelante Brinkhous observó que la GAH es una crioglobulina y basándose en este hecho Pool, Hershgold y Pappenhagen lograron obtener una fracción plasmática rica en factor VIII, la cual ha resultado de gran utilidad para propósitos clínicos y se conoce como crioprecipitado (13). Este concentrado resultó ser más potente que la fracción I de Cohn (14), permite recuperar 50% de la actividad de la GAH presente en el plasma original (12), y debido a la sencillez técnica del procedimiento de su preparación constituye un recurso que incrementa de manera significativa la disponibilidad del factor VIII para el tratamiento de los pacientes hemofílicos.

Aproximadamente al mismo tiempo se desarrollaron métodos para preparar concentrados de GAH utilizando como agentes precipitantes -- aminoácidos alifáticos, en especial beta-alanina y glicina (5). Estudios posteriores demostraron que la beta-alanina tiene efectos colaterales adversos cuando es administrada intravenosamente (16), por lo cual se eligió la glicina como agente precipitante en la preparación de los concentrados de GAH para su uso clínico. Inicial

mente los concentrados de GAH precipitados con glicina se preparaban a partir de plasma fresco y posteriormente el método se modificó utilizando crioprecipitados como material inicial (14). A este nuevo precipitado se le llamó precipitado de glicina de alta potencia (17).

El objetivo del presente trabajo es obtener un preparado de GAH purificado que pueda ser utilizado para sensibilizar animales de laboratorio, en nuestro caso conejos, para obtener un antisuero contra la GAH.

La obtención de dicho antisuero sería el primer paso para el desarrollo de métodos de cuantificación de factor VIII de base inmunológica, lo cual ampliaría las perspectivas para detectar deficiencias de este factor y además proporcionaría un método más sensible y específico.

## II. FUNDAMENTO



Las reacciones inmunológicas son altamente específicas y permiten además obtener un grado satisfactorio de sensibilidad y reproducibilidad en los procedimientos "in vitro" -- de que disponemos en la actualidad, de tal manera que pueden utilizarse ventajosamente para identificación y cuantificación de proteínas y otras macromoléculas.

En el caso de las proteínas procoagulantes, el factor VIII llamado también globulina antihemofílica es de gran interés en la patología de la coagulación ya que es el factor deficiente en la hemofilia "A"; existe en cantidades muy pequeñas en el plasma y los métodos de coagulación para detectarlo aunque bastante específicos, son deficientes en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad, aparte de ser más laboriosos.

Se han venido realizando esfuerzos para desarrollar métodos espectrofotométricos, radioisotópicos e inmunológicos para su detección y cuantificación.

Nosotros consideramos de interés iniciar los trabajos para desarrollar un método inmunológico, por lo cual se diseñó un protocolo para obtener un anticuerpo heterólogo en conejos contra la GAH, el cual se utilizaría posteriormente para la determinación cuantitativa del factor VIII en plasma.

El trabajo se divide en 2 partes principales: la primera parte consiste en la obtención de un concentrado de GAH altamente purificado; en la segunda parte se procederá a sensibilizar a un lote de conejos con el purificado de GAH para determinar después la respuesta inmunológica por métodos de inmunoprecipitación, inmunodifusión e inmunolectroforesis.

III - MATERIAL Y METODOS

A) Equipo utilizado

- 1) Centrifuga refrigerada con cabezal de 25 cm de radio.
- 2) Espectrofotómetro con rejilla de difracción y con un intervalo de longitud de onda 325-825 nm. Resolución fotométrica de 0.5% de transmitancia. Fuente de luz: lámpara de tungsteno.
- 3) Potenciómetro con un intervalo de medida de 0-14 unidades de pH.
- 4) Aparato de electroforesis que consta de una cámara con electrodo de platino, soporte para la membrana, una cubierta de seguridad y una fuente de poder de corriente directa.
- 5) Campana de flujo laminar
- 6) Estufa eléctrica de cultivo de temperatura regulable de 0°C a 60°C, controlada por termostato bimetalico y una sensibilidad de 0.5°C.
- 7) Baño María con intervalo de temperatura hasta 60°C, controlada por termostato bimetalico interior.
- 8) Refrigerador con un intervalo de temperatura de 2-8°C.
- 9) Congelador de -20°C
- 10) Licuadora de dos velocidades
- 11) Agitador magnético con un volumen máximo de agitación de dos litros.
- 12) Cronómetro
- 13) Termómetro de mercurio con escala de -20°C a 110°C.
- 14) Mechero de Bunsen.

- 15) Tripie con tela de asbesto.
- 16) Matraces Erlenmeyer de vidrio con capacidad de 100, 200, 500 y 1000 ml.
- 17) Matraces volumétricos de vidrio con capacidad de 100, 200, 500 y 1000 ml.
- 18) Vasos de precipitado de vidrio con capacidad de 100, 250, 500 y 1000 ml.
- 19) Cajas Petri de vidrio de 10 cm. de diámetro.
- 20) Capilares de vidrio de 1 X 75 mm.
- 21) Tubos de ensayo de vidrio de 12 X 75, 13 X 100, y 16 X 150 mm.
- 22) Pipetas de vidrio graduadas de 0.1, 0.2, 1.0, 5.0, y 10 ml.
- 23) Pipetas Pasteur.
- 24) Pipetas automáticas de 10 ml.
- 25) Placas de vidrio para inmunoelectroforesis de 5 X 15 cm.
- 26) Placa de vidrio común de 20 X 20 cm.
- 27) Agitador de vidrio.
- 28) Tubos de plástico de 2 mm de diámetro.
- 29) Tubos de ensayo de polietileno de 13 X 100 y de 12 X 75 mm.
- 30) Pipetas de plástico graduadas de 1.0, 2.0, 5.0 ml.
- 31) Jeringas desechables de 1.0; 5.0, 10 y 20 ml.
- 32) Agujas desechables del número 18, 20, 21, 22 y 26.

- 33) Brocha de 5 cm. de ancho.
- 34) Hoja de bisturí del número 15.
- 35) Hojas de papel filtro Whatman número 1.
- 36) Hojas de papel milimétrico.
- 37) Aplicadores de madera.
- 38) Plastilina.
- 39) Baño de hielo

B) Reactivos.

- 1) Aceite mineral
- 2) Agar-agar agente gelificante para la preparación de medios de cultivo.
- 3) Agarosa.
- 4) Albumina bovina, solución al 22%, pH 7.2.
- 5) Alcohol etílico.
- 6) Barbital (ácido 5,5 dietil barbitúrico) para análisis
- 7) Barbital sódico (ácido 5,5 dietil barbitúrico, sal sódica) para amortiguador.
- 8) Colorante rojo Ponceau.
- 9) Glicina (ácido aminoacético) libre de amonio, para análisis.
- 10) Hielo seco
- 11) Reactivo para tiempo de protrombina de Quick (extracto acuoso de polvo de cerebro de conejo).

- 12) Reactivo para tiempo de tromboplastina parcial (extracto clorofórmico de polvo de cerebro de conejo).
- 13) Reactivo de fenol Folin-Ciocalteu para determinación de proteínas.
- 14) Silicona al 1% preparada a partir de siliclad
- 15) Tirosina. Conforme especificaciones y criterio de NAS/NRC para compuestos bioquímicos.

Los reactivos que se listan a continuación son de grado reactivo, conforme especificaciones A. C. S.

- 1) Acetato de sodio (cristalino)
- 2) Acido clorhídrico concentrado
- 3) Carbonato de sodio anhidro (cristalino)
- 4) Citrato de sodio al 3.8%, preparado a partir de citrato trisódico 2, hidrato (cristalino).
- 5) Cloruro de calcio al 0.025 M y 0.1 M, preparado a partir de cloruro de calcio anhidro (granular).
- 6) Cloruro de sodio al 0.85% preparado a partir de cloruro de sodio (cristalino).
- 7) Dextrosa anhidra (polvo)
- 8) Fenol al 5%, preparado a partir de fenol (cristalino).
- 9) Hidróxido de aluminio (polvo)
- 10) Hidróxido de sodio al 2.5%, 10%, 0.1 N, preparado a partir de hidróxido de sodio (lentejas)
- 11) Oxalato de sodio (polvo)

- 12) Sulfato de bario (cristalino)
- 13) Sulfato de cobre (cristalino)
- 14) Tartrato de sodio y potasio (cristalino)

C) Material biológico

En las técnicas que se listan a continuación, la centrifugación se efectuó a 2900 G por 15 minutos a menos que se indique lo contrario.

- 1) Sangre para crioprecipitados.- La sangre se obtuvo de 5 donadores altruistas clínicamente sanos; dicha sangre se recolectó en bolsas de plástico dobles las cuales están constituidas por una bolsa con capacidad de 500 ml que contiene 75 ml de ACD (dextrosa 2.45 g, ácido cítrico 0.8 g, citrato trisódico 2.2 g, agua destilada c.b.p. 100 ml) y una bolsa piloto para separar el plasma.
- 2) Plasma para pruebas de coagulación.- Se obtuvieron 20 ml de sangre venosa anticoagulada con oxalato de sodio 0.1 M o citrato de sodio al 3.8% por medio de la técnica de doble jeringa, en proporción 1:9 con respecto a la sangre, en tubos siliconizados o de plástico; se centrifugó y se separó el plasma en este mismo tipo de tubos.
- 3) Suero humano para pruebas de coagulación.- Se obtuvieron 20 ml de sangre venosa en tubos de vidrio de 13x100 mm; esta sangre se incubó 4 horas a 37°C, se centrifugó y se separó el suero, el cual junto con el plasma del inciso anterior se almacenó a -20°C (la incubación de 4 horas se hizo con el propósito de inactivar los residuos de trombina en el suero).
- 4) Plaquetas para pruebas de coagulación.- Se recolectaron 40 ml de sangre citratada, la cual se centrifugó a 320 G por 20 minutos; el plasma sobrenadante se separó y se centrifugó a 2900 G por 15 minutos. El sobrenadante se separó y el precipitado obtenido se lavó



tres veces con dextrosa al 5%, y se diluyó con esta misma solución a un tercio de su volumen inicial.

- 5) Plasma normal humano (PNh)..- Se preparó una mezcla de 10 plasmas humanos normales a partir de sangre colectada en tubos de plástico, los cuales contenían citrato de sodio al 3.8% en proporción 1:9 con respecto a la sangre; después de separar el plasma por centrifugación se mezcló y se repartió en alícuotas de un ml en tubos de plástico y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 6) Plasma hemofílico..- Se obtuvo a partir de 20 ml de sangre de una persona con deficiencia severa de factor VIII, sin antecedentes recientes de transfusión, y se procesó de manera similar a como se describe en la sección C-2.
- 7) Conejos para la obtención del antisuero contra el concentrado de GAH..- Se eligió un grupo de tres conejos blancos, dos de sexo femenino y uno de sexo masculino, raza Nueva Zelanda, de alrededor de cuatro Kg. de peso.

D) Preparación de crioprecipitados..- Se efectuó por el método de Pool y Col. (15,18). El método se basa en la propiedad que tienen ciertos factores de coagulación de actuar como crioglobulinas, como es el caso del factor VIII y del fibrinógeno. Esta propiedad permite que estas proteínas se precipiten después de un congelamiento rápido seguido de un descongelamiento lento a la temperatura del refrigerador. - El procedimiento se hizo de la siguiente manera:

Se colectaron 5 unidades de sangre venosa las cuales se centrifugaron por 20 minutos. El plasma obtenido se trasladó a las bolsas piloto las cuales se separaron y se introdujeron a una mezcla de hielo seco y alcohol etílico, lo cual permite tener una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  para efectuar -

una congelación rápida.

Posteriormente se descongeló dicho plasma a la temperatura del refrigerador durante 18 horas al cabo de las cuales se obtuvo un precipitado que fue separado por medio de centrifugación. Se trasvasó la mayor parte del plasma sobrenadante a otra bolsa de plástico. El crioprecipitado se resuspendió en un pequeño volumen de su propio plasma ( $\approx 20$  ml), y a continuación se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

E) Purificación del factor VIII con glicina. - Se efectuó por el método de Hershgold y cols. (14), de la siguiente manera.

Los crioprecipitados se descongelaron a temperatura ambiente por 18 horas; se mezclaron las 5 unidades y se les añadió 100 ml de agua destilada. Esta suspensión se homogenizó en una licuadora por 10 segundos a velocidad media, enseguida se agregó agua destilada hasta un volumen de 350 ml y se agitó suavemente por 20 minutos. El pH de la mezcla (generalmente entre 7.6 y 7.9) se bajó a 7.1 con adición de ácido clorhídrico 0.1 N. A continuación la mezcla anterior se centrifugó por 15 minutos recolectando el sobrenadante I al cual se le hizo cuantificación de proteínas (19). Al sobrenadante obtenido se le agregó hidróxido de aluminio a razón de 0.01 mg por cada mg de proteína, se agitó manualmente durante 5 minutos, se centrifugó por 15 minutos y se separó el sobrenadante II, el cual se permitió que reposará a la temperatura del refrigerador por 24 horas; pasado este tiempo se observó la formación de un precipitado, el cual fue descartado por centrifugación quedando el sobrenadante III. Este sobrenadante se enfrió a  $0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en una mezcla de hielo y cloruro de sodio, se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 0.1 N y ambos parámetros (pH y temperatura) se mantuvieron constantes en todo el subsecuente procedimiento de adición de la glicina;

el aminoácido se añadió lentamente y con agitación continua hasta completar 2.2 moles por litro de extracto: después de que se disolvió completamente la glicina se dejó reposar a la temperatura del refrigerador por 7 horas, lo cual fue seguido de centrifugación por 15 minutos; el sobrenadante se descartó y el precipitado obtenido se resuspendió en 20 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85%, se distribuyó en alícuotas de 2 ml y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  (cuadro I y II).

CUADRO I  
CONDICIONES PARA LA PRECIPITACION DE LA GAH

Agente precipitante	pH	Concentración de glicina mol/l	temperatura
Glicina	7.0	2.2	$0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

- F) Determinación de la actividad del factor VIII en el concentrado de GAH precipitado con glicina (CGAH-PG) y en el crioprecipitado. - Se utilizó la prueba de generación de tromboplastina para determinar la actividad del factor VIII en el CGAH-PG y en el crioprecipitado (20). Para titular la actividad del factor VIII en el CGAH-PG se hicieron diluciones del mismo de acuerdo al método descrito en el apéndice y se introdujeron como fuente de factor VIII en la prueba de generación de tromboplastina.
- G) Valoración de la homogeneidad del CGAH-PG. - Se efectuó una electroforesis al CGAH-PG y al PNH usando como sostén tiras de acetato de celulosa de 5X13 cm, con una corriente de 5 mA, amortiguador de barbital sódico, pH 8.6, 0.05 M (21), en un lapso de 40 minutos. Pasando este tiempo la

tira se retiró del aparato de electroforesis y se sumergió en una solución colorante de rojo Ponceau por 10 minutos, después la tira se pasó por 3 recipientes que contenían una solución de ácido acético al 5% para quitar el exceso de colorante.

- H) Quantificación de fibrinógeno en el CGAH-PG.- Se realizó la cuantificación por el método de Van Slike modificado por QuicK (22), el cual se basa en la conversión de fibrinógeno a fibrina seguido de remoción, lavado e hidrólisis alcalina del coágulo obtenido y subsecuente determinación de proteínas con el reactivo de fenol.

Sangre recién extraída  
(5 unidades de 500 ml)

Centrifugar

GRE  
(descartar)

Plasma

Congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$

Descongelar entre  
 $2-8^{\circ}\text{C}$  x 18 horas

Centrifugar

Crioprecipitado

Sobrenadante  
(descartar)

añadir 100 ml  
de agua dest.

Homogeneizar en licuadora 10 seg.

añadir agua dest.  
hasta un volumen de 350 ml

Agitación suave x 20 minutos

Centrifugar

Sobrenadante I

Precipitado  
(descartar)

absorber con  $\text{Al}(\text{OH})_3$   
0.01 mg/mg de proteína,  
agitar por 5 minutos

Centrifugar

Sobrenadante II

Precipitado  
(descartar)

reposar entre  $2-8^{\circ}\text{C}$  x 24 horas

Centrifugar

Sobrenadante III

Precipitado  
(descartar)

enfriar a  $0^{\circ}\text{C}$  +  $0.5^{\circ}\text{C}$ , pH 7.0, adicionar  
glicina 2.2 moles/litro de extracto,  
reposar 7 horas entre  $2-8^{\circ}\text{C}$

Centrifugar

Precipitado

resuspender en 20 ml  
de solución de NaCl al 0.85%

Sobrenadante  
(descartar)

CGAN-Pg

CUADRO II

Diagrama de flujo de la purificación  
de factor VIII con glicina

I) Método para obtener antisuero de conejo contra el CGAH-PG

Se seleccionaron conejos con las características señaladas en material biológico y se llevo a cabo el siguiente esquema de inmunización de acuerdo a una técnica previamente descrita (23).

	Dosis	Cantidad de proteínas (mg)	Vía de Administración
1er día	0.5 ml de CGAH-PG 0.5 ml de aceite mineral	3.45	Subcutánea
8 día	1.0 ml de CGAH-PG 1.0 ml de aceite mineral	6.9	"
15 día	0.2 ml de CGAH-PG diluido 1:10 en una solución de NaCl al 0.85%.	0.138	Intravenosa
16 día	0.5 ml de CGAH-PG diluido 1:10 en una solución de NaCl al 0.85%.	0.345	"
20 día	1.0 ml de CGAH-PG diluido 1:10 en una solución de NaCl al 0.85%.	0.69	"
22 día	0.2 ml de CGAH-PG	1.38	"
23 día	0.5 ml de CGAH-PG	3.45	"
24 día	1.0 ml de CGAH-PG	6.9	"

Las inyecciones intravenosas se hicieron en las venas marginales de las orejas comenzando a inyectar por la punta del pabellón auricular.

Al término del esquema de inmunización se dejó descansar a los conejos durante una semana, al cabo de la cual se extrajeron 2 ml de sangre por punción de una de las venas marginales de las orejas, las muestras se incubaron a 37°C por 4 horas para su coagulación y posteriormente se centrifugaron por 15 minutos y el suero se separó. En el suero de cada muestra extraída se investigó la presencia de anticuerpos contra las proteínas del CGAH-PG por medio de una técnica de precipitación en tubo capilar. A los conejos que dieron una respuesta positiva se les efectuó una sangría de cosecha con lo cual se colectaron 25 ml de sangre por punción cardíaca de cada conejo; la sangre se procesó en la misma forma descrita anteriormente.

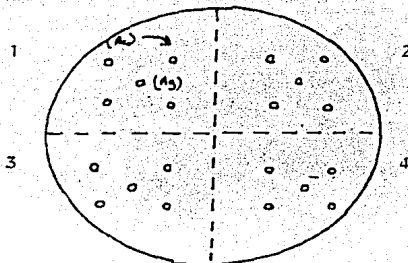
J) Determinación de la actividad inmunológica del antisuero contra el CGAH-PG (ASC-CGAH). - La determinación de la actividad inmunológica del ASC-CGAH se realizó por 3 métodos: uno, empleando una técnica de inmunoprecipitación en tubo capilar, otro por inmunodifusión en placa de agar y un tercero por inmunoelectroforesis.

1) Inmunoprecipitación en tubo capilar (25). - El CGAH-PG y el ASC-CGAH se centrifugaron por 15 minutos para eliminar las partículas en suspensión que pudieran interferir con la prueba. Se tomó un tubo capilar y se introdujo en el CGAH-PG y se permitió que ascendiera 3 cm., enseguida se limpió perfectamente el exterior del tubo y se introdujo en el ASC-CGAH permitiendo que ascendiera otros 3 cm más; se vació el contenido del tubo capilar a un portaobjetos para mezclarlo y después se volvió a llenar y se selló por uno de sus extremos con plastilina, dejando un espacio de 2 mm entre la mezcla y la plastilina para

evitar que ésta quedara en contacto con el reactivo: en seguida se colocó el capilar en posición vertical y se incubó durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se dejó toda la noche a temperatura ambiente; al día siguiente, en un fondo oscuro y con iluminación lateral, se observó la formación del precipitado y se valoró de manera semicuantitativa de 1 a 4 cruces. La prueba se efectuó por duplicado y paralelamente se procesó, también por duplicado, un control con suero de conejo no inmunizado.

- 2) Inmunodifusión en placa de agar (técnica de Ouchterlony) (23,24).- Se tomaron las cajas Petri necesarias, las cuales habían sido preparadas previamente como se señala en el apéndice, se dividieron en cuadrantes los que se numeraron del 1 al 4 en cada caja, a la vez en cada cuadrante se hicieron 5 horadaciones en forma de roseta, siendo cada horadación de 2 mm. de diámetro; para que la distancia fuera uniforme entre las horadaciones se colocó una hoja de papel milimétrico debajo de la caja de Petri y se extrajo el gel de los cortes mediante un aplicador de madera con la punta rota (consultar apéndice) - (figura 1).

FIGURA 1





Posteriormente se preparó una serie de diluciones progresivas del CGAH-PG y del ASC-CGAH de acuerdo al método descrito en el apéndice y la aplicación de las muestras se realizó con la distribución siguiente.

Primera caja Petri.- Cuadrante 1 y 2. Horadaciones: central CGAH-PG sin diluir; periféricas diluciones progresivas del ASC-CGAH siguiendo el sentido de las manecillas del reloj.

Cuadrante 3 y 4. Horadaciones: central CGAH-PG diluido 1:2; periféricas diluciones progresivas del ASC-CGAH siguiendo el sentido de las manecillas del reloj.

Segunda caja Petri.- Cuadrante 1 y 2. Horadaciones: central CGAH-PG diluido 1:4; periféricas diluciones progresivas del ASC-CGAH siguiendo el sentido de las manecillas del reloj.

Cuadrante 3 y 4. Horadaciones: central CGAH-PG diluido 1:8; periféricas diluciones progresivas del ASC-CGAH siguiendo el sentido de las manecillas del reloj.

De manera similar se procesó el ASC-CGAH frente a plasmas normal humano (PNH) y además se substituyó el ASC-CGAH por el suero de un conejo no inmunizado como control negativo.

A las tapas de las cajas Petri se les colocó un círculo de papel filtro impregnado con fenol al 5% para evitar que el agar se contaminara, posteriormente se colocaron las cajas Petri en un lugar libre de vibraciones durante 48 horas a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se observaron los resultados.

- 3) Inmunolectroforesis (23,24).- El método de inmunolectroforesis identifica a las proteínas tanto por sus propiedades electroforéticas como antigénicas y consta básicamente de 2 pasos: primero las proteínas son separadas por electroforesis y subsecuentemente se les hace reaccionar con su correspondiente anticuerpo por medio de inmunodifusión. lo que

da como resultado la formación de líneas de precipitación individuales.

El procedimiento se inició seleccionando una placa para inmunolectroforesis y una plantilla de cartón previamente preparadas de acuerdo a la técnica descrita en el apéndice; se colocó sobre la placa la plantilla de cartón y con un tubo de plástico de 2 mm de diámetro se hicieron los cortes circulares y con una hoja de bisturí se hicieron los cortes paralelos de los canales; a continuación se retiró la plantilla de cartón y mediante un aplicador de madera con la punta rota se quitó el gel de las horadaciones. Los compartimentos de la cámara de inmunolectroforesis se llenaron con el amortiguador de barbital sódico, pH 8.6, 0.05 M, hasta un cm arriba de los electrodos, a continuación se colocó la placa de agarosa en la cual se numeraron las horadaciones del 1 al 3 con números arábigos y los canales como 1 y 2 con números romanos. Mediante una pipeta automática se depositaron 10  $\mu$ l de CGAH-PG en las horadaciones 1 y 2 y en la número 3, 10  $\mu$ l de PNH (figura 8). Se colocó en las orillas de la placa, papel filtro doblado en ángulo recto para establecer contacto con el amortiguador y se verificó que no hubiera burbujas de aire entre el papel filtro y la superficie del gel, se tapó la cámara y se conectó la fuente de poder, se ajustó la intensidad de corriente a 150 voltios y se hizo pasar la corriente por dos horas.

Se destapó la cámara y se retiró el gel de los canales de la placa mediante la hoja de bisturí y con una pipeta graduada se colocó en cada canal 0.1 ml de ASC-CGAH; se volvió a tapar la cámara sin conectarla para tener una atmósfera húmeda y se permitió que el ASC-CGAH difundiera por 48 horas al cabo de las cuales se observaron los resultados.

K) Determinación de inhibidores de la coagulación en el ASC-CGAH.- El ASC-CGAH se puso en contacto con plasma normal -

humano (PNh) para determinar si era capaz de inhibir la actividad coagulante de este último. Para ello se colocaron en un tubo de ensayo el ASC-CGAH y el PNh volumen a volumen, se mezcló el contenido del tubo, se incubó a 37°C por dos horas y al mismo tiempo se pusieron dos controles: uno con PNh y suero de conejo no inmunizado y el otro con PNh y solución de cloruro de sodio al 0.85%. Al cabo de este tiempo se les realizó un tiempo parcial de tromboplastina y se reportaron los resultados (cuadro III).

- L) Purificación del ASC-CGAH mediante absorción con plasma hemofílico.- El ASC-CGAH se absorbió con el plasma de un hemofílico severo con el propósito de eliminar los anticuerpos ineficaces y probar posteriormente si en el suero absorbido quedaba algún anticuerpo contra la GAH capaz de ser demostrado por método inmunológico y/o métodos de coagulación.

El sistema consistió en colocar en un tubo de ensayo 1.0 ml de ASC-CGAH y 1.0 ml de plasma hemofílico, se incubó a 37°C durante 2 horas, se centrifugó y se descartó el precipitado; el sobrenadante (suero absorbido) se procesó de la siguiente manera.

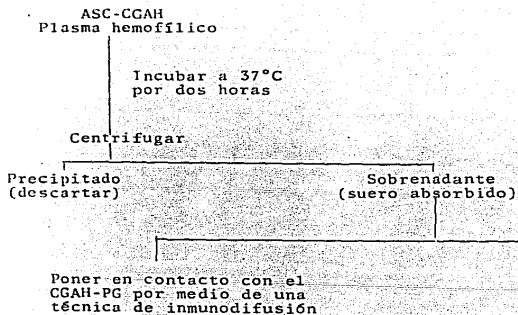
Para la demostración de la actividad inmunológica se puso en contacto el suero absorbido y el CGAH-PG por medio de la técnica de inmunodifusión en placa de agar.

Para demostración de la actividad anticoagulante se colocaron en un tubo de ensayo 0.4 ml de suero absorbido y 0.4 ml de PNh, se agitó suavemente, se incubó a 37°C por dos horas y después se incluyó como fuente de factor VIII en una mezcla de generación de tromboplastina. Paralelamente se procesaron dos controles; uno con amortiguador de VBis y otro con suero de un hemofílico con título alto de anticuerpo contra el factor VIII como control positivo (cuadro IV).



CUADRO IV

ABSORCION DEL ASC-CGAH CON PLASMA HEMOFILICO



Tubo	1	2	3
	0.4 ml	-	-
Suero hemofilico con anticuerpos contra la GAH	-	0.4 ml	-
Amortiguador VBis	-	-	0.4 ml
PNh	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
Incubar a 37°C por dos horas			
Utilizar cada tubo en mezcla de generación de tromboplastina como fuente de factor - VIII.			

#### IV - RESULTADOS

Se obtuvo un antisuero contra el CGAH-PG en conejos de acuerdo a la técnica señalada en material y métodos. De los tres conejos inoculados se logró una respuesta más satisfactoria en 2 de ellos, por lo cual se eligieron dichos conejos para hacer la sangría de cosecha y obtener el antisuero.

Característica del antisuero.- Este antisuero es polivalente y pudieron demostrarse en el mismo, 4 bandas de precipitación por inmunodifusión y por inmunoelectroforesis; contiene precipitinas que dan positiva la prueba de precipitación en tubo capilar (figura 2). Por medio de la técnica de inmunodifusión en placa de agar, se observó el desarrollo de 4 bandas de precipitación cuando el ASC-CGAH se puso en contacto con el CGAH-PG diluido 1:2 y con el plasma de una persona normal diluido 1:2 (figura 3-7). Por inmunoelectroforesis se obtuvo también la separación de 4 bandas (figura 8) lo cual probó además que las bandas de precipitación tienen diferente movilidad electroforética.

FIGURA 2

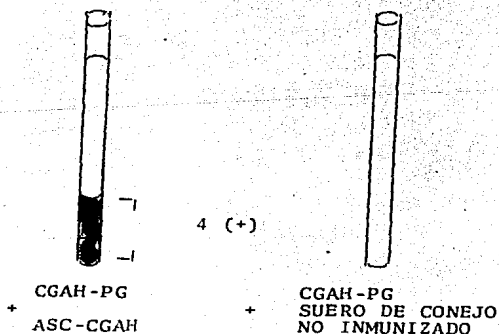
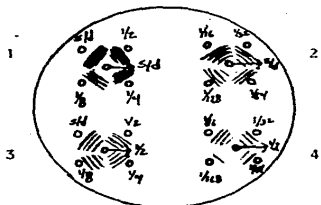


FIGURA 3



CUADRANTE 1 y 2

Horadaciones :

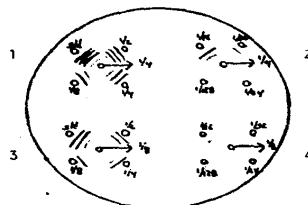
Central.- CGAH-PG sin diluir  
Periféricas.- Diluciones progresivas del ASC-CGAH.

CUADRANTE 3 y 4

Horadaciones:

Central.- CGAH-PG Diluido 1:2  
Periféricas.- Diluciones progresivas del ASC-CGAH.

FIGURA 4



CUADRANTE 1 y 2

Horadaciones

Central.- CGAH-PG diluido 1:4  
Periféricas.- Diluciones progresivas del ASC-CGAH.

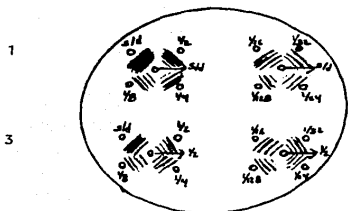
CUADRANTE 3 y 4

Horadaciones:

Central.- CGAH-PG diluido 1:8  
Periféricas.- Diluciones progresivas del ASC-CGAH.



FIGURA 5



CUADRANTE 1 y 2

Horadaciones:

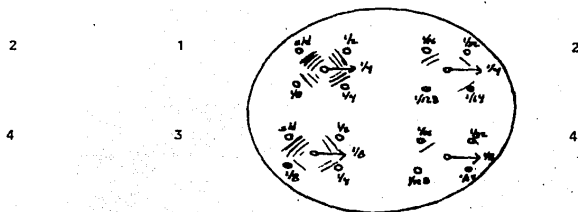
Central.- PNh sin diluir  
 Periféricas.- Diluciones  
 progresivas del ASC-CGAH.

CUADRANTE 3 y 4

Horadaciones

Central.- PNh diluido 1:2  
 Periféricas.- diluciones  
 progresivas del ASC-CGAH.

FIGURA 6



CUADRANTE 1 y 2

Horadaciones

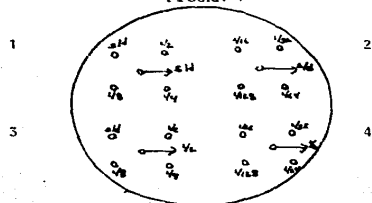
Central.- PNh diluido 1:4  
 Periféricas.- diluciones  
 progresivas del ASC-CGAH.

CUADRANTE 3 y 4

Horadaciones

Central.- PNh diluido 1:8  
 Periféricas.- Diluciones  
 progresivas del ASC-CGAH.

FIGURA 7



CUADRANTE 1 y 2

Horadaciones:

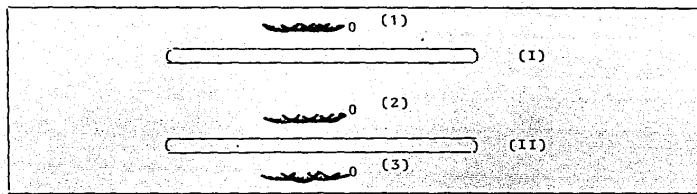
Central.- CGAH-PG sin diluir  
Periféricas.- Diluciones progresivas  
del suero de conejo no inmunizado.

CUADRANTE 3 y 4

Horadaciones:

Central.- CGAH-PG diluido 1:2  
Periféricas.- Diluciones progresivas  
del suero de conejo no inmunizado.

FIGURA 8



Horadaciones 1 y 2: 10  $\mu$ l de CGAH-PG

Horadación 3: 10  $\mu$ l de PNH

Canal I y II 0.1 ml de ASC-CGAH

Se diseñó un experimento para determinar si el ASC-CGAH contenía inhibidores de la coagulación para lo cual se procedió de acuerdo con el protocolo del cuadro III. Se observó que la incubación previa del plasma diluido alarga los tiempos de coagulación, con una prolongación adicional cuando se incubaba el PNH con el ASC-CGAH previamente.

Se absorbió el ASC-CGAH con plasma hemofílico (suero absorbido) y se le realizaron pruebas inmunológicas y pruebas de actividad anticoagulante dando los siguientes resultados:

Demstración inmunológica.- El suero absorbido, al ponerse en contacto con el CGAH-PG por medio de la técnica de inmunodifusión en placa de agar, no formó ninguna banda de precipitación.

Demstración de la actividad anticoagulante.- El suero absorbido, al agregarse al PNH e incluirse como fuente de factor VIII en mezcla de generación de tromboplastina, dió los siguientes resultados:

- |    |  |   |
|----|--|---|
| 1) | Generación de tromboplastina del PNH + ASC-CGAH absorbido con plasma hemofílico.                               | 20-17-17-17-17-17- seg<br>17-16-15-16-16-16 " |
| 2) | Generación de tromboplastina del PNH + suero de un hemofílico con anticuerpos contra la GAH (control positivo) | 36-34-32-32-32-32- seg<br>37-37-33-33-33-33 " |
| 3) | Generación de tromboplastina de PNH+ VBis  | 31-28-24-23-24-23 seg<br>25-27-24-23-23-23- " |

De acuerdo a los resultados anteriores, el ASC-CGAH absorbido con plasma hemofílico no contiene inhibidores demostrables con prueba de generación de tromboplastina.

Características del CGAH-PG utilizado para la obtención del ASC-CGAH.- La actividad del CGAH-PG, al determinarse por mezcla de generación de tromboplastina, dió los siguientes resultados:

1)	Generación de tromboplastina control	8-9-9-9-9-9 9-9-9-8-9-9	Seg "
2)	Generación de tromboplastina del crioprecipitado	6-5-5-5-5-5 6-5-5-5-5-6	" "
3)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG sin diluir	9-8-9-9-9-9 9-9-8-10-8-9	" "
4)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:2	10-9-9-10-8-9 9-8-9-8-9-8	" "
5)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:4	9-9-9-9-9-8 9-9-9-8-9-8	" "
6)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:8	10-9-10-9-10-10 10-9-9-9-9-10	" "
7)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:16	10-9-9-9-9-8 10-9-10-9-9-10	" "
8)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:32	12-11-11-11-11-11- 11-11-12-11-12-11-	seg "
9)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:64	13-12-11-12-11-12 13-11-12-12-12-11	" "
10)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:128	13-12-11-12-11-12 13-11-12-12-12-11	" "
11)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:256	16-14-14-14-14-15 16-14-14-14-14-14	" "
12)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:512	16-14-14-14-14-15	"

13)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:1024	19-17-15-15-15-15 10-17-17-17-17-16	Seg "
14)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:2048	17-16-16-16-16-16 18-16-16-16-16-16	" "
15)	Generación de tromboplastina del CGAH-PG diluido 1:4096	18-17-16-17-16-16 18-17-17-17-17-16	" "

En base a estos resultados se obtuvo la actividad del factor VIII, la cual fue de 16 U/ml lo cual significaba que está purificado 102 veces con respecto al plasma (cuadro V).

La concentración de fibrinógeno en el CGAH-PG fue de 150 mg/100 ml.

La electroforesis realizada al CGAH-PG mostró la aparición de varias bandas, de las cuales la correspondiente a la albúmina fue la de mayor tamaño (figura 9).

CUADRO V

CARACTERISTICAS DEL CGAH-PG CON RESPECTO AL PLASMA

	Conc. de Proteínas g/100 ml	Actividad del CGAH-PG U/ml	Número de veces purificado	Actividad específica U/mg de proteína	Conc. de fibrinógeno g/100 ml
Plasma fresco	4.39	1.0	-	0.023	0.4
CGAH-PG	0.69	16	102	2.31	0.15

FIGURA 9



ELECTROFORESIS DEL CGAH-PG y DEL PNH



## V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La GAH es una glicoproteína polimérica con un peso molecular superior a los dos millones de daltons (25,26). Está formada por subunidades de peso molecular de alrededor de 240,000. El análisis de la fracción de carbohidratos ha dado una composición que incluye ácido siálico 1%, hexosamina 2.8%, manosa, galactosa y fucosa 1-2%, además se encontró una fracción de lípidos que es inferior al 5% del contenido de proteínas.

El factor VIII procoagulante (FVIII<sub>C</sub>) se asocia al factor de von Willebrand circulante y tiene una vida media de aproximadamente 9 horas, pero administrado a animales con deficiencia del factor de von Willebrand, el factor VIII procoagulante se elimina rápidamente del plasma con una vida media de aproximadamente una hora (27), por lo que aparentemente se requiere del factor de von Willebrand para estabilizar la fracción procoagulante en circulación.

Los métodos de purificación de la GAH se basan principalmente en la precipitación con agentes tales como el etanol, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polietilenglicol o por crioprecipitación; estos métodos precipitan GAH junto con fibrinógeno. Nosotros purificamos GAH con un método de doble precipitación efectuando primero crioprecipitación seguido de resuspensión y subsecuente precipitación con glicina para obtener lo que se ha llamado concentrado de alta potencia (17). Es evidente que esta fracción preteica con tiene una alta concentración de fibrinógeno y albúmina como se demuestra en los resultados obtenidos.

En el trabajo ulterior se deberán separar estos dos componentes con el objeto de obtener un antisuero más específico. La separación de fibrinógeno puede efectuarse por filtración en gel de agarosa (28,29), también puede ser removido por absorción con bentonita o tierra de Fuller (30,31) pero estos dos últimos procedimientos remueven también cantidades significativas de factor VIII. Otro procedimiento es por digestión de fibrinógeno con veneno de -

serpiente (veneno de *Crotalus terrificus*) (32), pero ésto también es acompañado de pérdida de actividad del factor VIII, lo mismo sucede con la digestión por otras enzimas proteolíticas tales como plasmina y tripsina (9).

Se ha utilizado la digestión limitada con quimotripsina seguido de filtración en gel de sefaroza (9), procedimiento que convierte al fibrinógeno en grandes fragmentos no coagulables sin afectar la actividad del factor VIII.

Por otro lado se ha preparado un purificado de factor VIII mediante partículas de vidrio de porosidad constante (CPG) (33,34,35); este método permite obtener un producto de alta pureza, pero con la desventaja de ser poco estable en solución.

Se ha reportado un concentrado de GAH purificado 350,000 veces con respecto al plasma; estos autores encontraron una concentración plasmática del factor VIII de aproximadamente 200 ng/ml. El método incluye cromatografía en gel, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en sefaroza y como último paso filtración a través de una columna de QAE celulosa (36).

Recientemente un nuevo procedimiento ha permitido el aislamiento del F VIII<sub>c</sub> libre del factor de von Willebrand, la actividad específica del factor VIII<sub>c</sub> en este concentrado es de aproximadamente 7000 U/mg, lo cual representa una purificación de 500,000 veces con respecto al plasma (37).

La utilización de crioprecipitados como material inicial para la obtención de un purificado de la GAH ha sido reportado por varios autores (ejem; 9,13,26,29,32,38). Las ventajas que ofrece el uso de dicho concentrado incluye las siguientes: se manejan volúmenes pequeños, se elimina una gran cantidad de sustancias indeseables, se tiene un concentrado purificado alrededor de 10 veces con respecto al plasma (17), además se puede preparar en cualquier laboratorio o banco de sangre.

Los métodos para sensibilizar conejos con fracciones del plasma han sido numerosos; uno de los primeros esfuerzos por obtener un antisuero contra la GAH lo realizó Richards (39), quien inyectó a conejos la fracción I de Cohn la cual es rica en esta proteína. Posteriormente al irse desarrollando nuevos métodos de purificación de la GAH se hizo posible la obtención de un antisuero más específico (2,7,9,10,38). Los procedimientos de sensibilización en dichos trabajos mostraron cierta similitud, encontrándose algunas variaciones en lo que respecta a la utilización de adyuvantes como auxiliares en la respuesta inmunológica, en la cantidad de antígeno inoculado y en el período de inoculación.

Los adyuvantes utilizados han sido: adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund o la combinación de ambos; también se ha utilizado hidróxido de aluminio. En todos ellos los resultados fueron satisfactorios.

El esquema que se siguió en este trabajo mostró resultados satisfactorios en lo referente a la respuesta inmunológica, lo cual nos permite recomendarlo para trabajos posteriores con respecto a la obtención de un antisuero contra la GAH.

Se sensibilizó a un grupo de 3 conejos con el CGAH-PG y se logró obtener un antisuero que contiene anticuerpos precipitantes; dicho antisuero es tetravalente ya que formó 4 bandas de precipitación por métodos de inmunodifusión e inmunoelectroforesis al ponerse en contacto con el CGAH-PG y el plasma humano. Además se observó lo que se llama en inmunología fenómeno de zona (40,41), ya que no se lograron separar las bandas de precipitación de manera clara cuando se utilizaron antígeno y anticuerpo sin diluir, por lo cual se hicieron diluciones de ambos para determinar la dilución óptima en la cual la separación de las 4 bandas fuera la adecuada.

Al absorber el ASC-CGAH con plasma de un paciente hemofílico severo y efectuar el ensayo inmunológico se observó la desaparición

de las cuatro bandas de precipitación. Debido a esto se tendrá que buscar otro tipo de absorbente; se podría pensar en el uso del plasma que queda después de precipitar la GAIH por alguno de los métodos ya mencionados, pues en dicho plasma está prácticamente ausente la GAIH.

Al determinar la actividad anticoagulante del suero absorbido por medio de la técnica de generación de tromboplastina no se encontró ninguna inhibición de la coagulación; sin embargo, cuando el ASC-CGAIH sin absorber se puso en contacto con el plasma normal humano se observó un alargamiento de los tiempos de coagulación en la prueba de tromboplastina parcial.

La generación de tromboplastina con el crioprecipitado da tiempos muy cortos, lo cual sugiere la existencia de un activador de la coagulación que desaparece después de la reprecipitación con glicina.

De acuerdo a estos resultados se podría deducir que el plasma hemofílico utilizado para la absorción contiene una proteína relacionada con el factor VIII, inactiva en coagulación pero que conserva sus propiedades antigénicas de manera similar a lo observado por Zimmerman y otros autores (2,6,7,12,43,44,45).

Las conclusiones a las que han llegado dichos autores han sido que el antisuero contra la GAIH obtenido a través de animales de experimentación tales como los conejos, tiene especificidad para uno o varios sitios de la GAIH, en cambio los anticuerpos obtenidos en humanos (ejem; hemofílicos politransfundidos) son específicos para otros sitios antigénicos de la misma molécula.

Si se combina el uso de un concentrado de GAIH más puro y un absorbente más adecuado para el ASC-CGAIH se podrían obtener resultados más cercanos a los esperados; además se deberán eliminar completamente las huellas de trombina que permanecen en el suero, ya que está reportado que incrementan la actividad del factor VIII y que,

al contrario, grandes cantidades la inhiben (46,47,48,49).

Otro aspecto que se deberá revisar en trabajos ulteriores es la técnica para determinar la actividad inhibitoria de la coagulación en el antisuero contra GAH, ya que cabe la posibilidad de que la técnica de generación de tromboplastina adaptada en este trabajo para determinar dicha actividad no fuera lo suficientemente sensible.

Otras posibilidades para preparar un antisuero monoespecífico anti GAH incluye métodos de elución de las bandas de precipitación de los antisueros polivalentes, material que se utilizaría para inmunizar nuevos lotes de conejos en los cuales puede inducirse la formación de anticuerpos específicos.

Los anticuerpos contra la GAH se identificaron inicialmente en pacientes hemofílicos que no se beneficiaban a la transfusión de plasma fresco. Posteriormente se demostró que también podían encontrarse anticuerpos contra el factor VIII en el postparto, en individuos con ciertas enfermedades inmunológicas o alérgicas, especialmente reacciones recientes a penicilina o vasculitis autoinmunes, así como en individuos de edad avanzada aparentemente sanos (50,51, 52).

En 1956 se demostró que es posible inducir en conejos la formación de anticuerpos antiGAH (39) lo cual ha sido confirmado posteriormente en múltiples trabajos (2,43,44,46,53,54,55,56,57,58,59,60).

Inicialmente los antisueros obtenidos tenían anticuerpos contra muchas proteínas del plasma, por lo que no se podían utilizar como reactivos específicos. Recientemente, al mejorar los métodos de purificación de la GAH, se ha dispuesto de material más puro que ha permitido obtener antisueros que pueden purificarse por absorción para remover anticuerpos contra contaminantes menores. Se ha demostrado también que los anticuerpos contra GAH obtenidos en patos y cabras, tienen propiedades más parecidas a los obtenidos en humanos que los anticuerpos de conejo (61,62).

La capacidad de los anticuerpos contra GAH para inactivarla -- varía de una especie a otra, por ejemplo; la antiGAH humana tiene - capacidad reducida para inactivar las GAH porcina y bovina, lo cual permite el empleo de estas fuentes de factor VIII para el tratamiento de hemofílicos sensibilizados (63,64,65,66,67,68,69,70).

Durante los años recientes se han desarrollado varias técnicas para la determinación del antígeno del factor VIII procoagulante - por medio de métodos radioisotópicos, la mayor parte utilizando anticuerpos marcados con elementos radioactivos obtenidos de pacientes hemofílicos politransfundidos (71,45,8,72,73,74,75,76,77,78); últimamente también se ha descrito un método de determinación del antígeno del factor VIII procoagulante con inmuoabsorbente ligado a - una enzima (ELISA) usando anticuerpos obtenidos de pacientes hemofílicos politransfundidos (79), además se han desarrollado métodos basados en el empleo de anticuerpos murinomonoclonales específicos para el antígeno del factor VIII procoagulante (80,81,82).

La clonación molecular del gen que codifica para el factor VIII (83) ha constituido un avance importante ya que ha permitido obtener cantidades suficientes de esta proteína para determinar su secuencia de aminoácidos total; así, se ha encontrado que la proteína madura - contiene 2332 aminoácidos con peso molecular calculado de 264,763; que la molécula posee un núcleo de aminoácidos hidrofóbicos con estructura similar a la mayor parte de proteínas secretoras (84); que la porción A de la estructura tiene 30% de homología con la seruloplasmina; que la porción C tiene 20% de aminoácidos homólogos con algunas lectinas obtenidas de *Dicystostelium* (85) y que la porción B no tiene homología con ninguna otra secuencia.

La homología del factor VIII con seruloplasmina sugiere la posible participación de otros iones metálicos diferentes del calcio en la función del factor VIII en hemostasis (86).

Este trabajo constituye la iniciación de una línea de desarrollo de métodos de estudio de diversos aspectos fisicoquímicos e inmu-

nológicos de las proteínas de la coagulación en los hospitales de la ciudad de México donde hasta ahora sólo se han empleado métodos clínicos y métodos basados en procedimientos de coagulación de plasma recalcificado.

El concentrado de GAH purificado con glicina no permite obtener un antisuero específico antiGAH cuando es inyectado a conejos, sino que se obtiene un preparado con cuando menos cuatro antígenos potentes capaces de sensibilizar a nuestros animales de experimentación.

Se requieren otros procedimientos de purificación para obtener un concentrado más puro y procedimientos de absorción del antisuero para remover anticuerpos contra contaminantes menores.



**VI - A P E N D I C E**

Los procedimientos de centrifugación se efectuaron en la mayoría de los casos a 2897 G y la fuerza centrífuga se calculó con la siguiente fórmula.

$$G = (n^2) (1.11 \times 10^{-5}) (r)$$

n= revoluciones por minuto

r= radio de la centrifuga

G= fuerza centrífuga

#### Determinación de la actividad y pureza del CGAH-PG

Actividad específica del CGAH-PG = (1 U/ml) (16) = 16 U/ml

Donde 1 U/ml corresponde a la actividad de la GAH en el plasma normal humano y 16 corresponde al recíproco de la dilución del CGAH-PG en la cual presenta la misma actividad que el plasma normal humano.

NOTA: La actividad de la GAH está definida de la siguiente manera:

Una unidad de GAH equivale a la cantidad presente en un mililitro de plasma normal humano.

La actividad específica en U/mg de proteína del plasma normal humano y del CGAH-PG se expresa como sigue:

Actividad específica del plasma normal humano =  $\frac{\text{Actividad de la GAH U/ml}}{\text{Concentración de proteínas del plasma normal humano mg/ml}}$

Actividad específica del CGAH-PG =  $\frac{\text{Actividad del CGAH-PG U/ml}}{\text{Concentración de proteínas del CGAH-PG mg/ml}}$

Concentración de proteínas del plasma normal humano = 4.39 g/100 ml ó 43.9 mg/ml

Concentración de proteínas =  $0.69 \text{ g}/100 \text{ ml}$  ó  $6.9 \text{ mg/ml}$   
del CGAH-PG

Entonces el cálculo quedaría de la siguiente manera:

$$\text{Actividad específica del plasma normal humano} = \frac{1 \text{ U/ml}}{43.9 \text{ mg/ml}} = 0.023 \text{ U/mg de proteína}$$

$$\text{Actividad específica del CGAH-PG} = \frac{16 \text{ U/ml}}{6.9 \text{ mg/ml}} = 2.31 \text{ U/mg de proteína}$$

$$\text{Número de veces purificado} = \frac{\text{Actividad específica del PNH}}{\text{Actividad específica del CGAH-PG}}$$

$$\text{Número de veces purificado} = \frac{2.31 \text{ U/mg de proteína}}{0.023 \text{ U/mg de proteína}} = 102$$

NOTA: Se consideró como "plasma normal humano" el que se obtuvo a través de personas aparentemente sanas; - sin antecedentes de enfermedades hematológicas.

Soluciones de trabajo1) Amortiguador VBis

Barbital sódico 0.1 M -----	20 ml
Acido clorhídrico 0.1 M -----	14.4 ml
Cloruro de sodio 0.15 M c.b.p. -----	100 ml

2) Amortiguador de barbital 0.05 M, pH 8.6

Barbital sódico -----	10.3 g
Acido dietil barbitúrico -----	1.83 g

La sal de sodio se disuelve en 500 ml de agua destilada fría, el ácido dietil barbitúrico se disuelve en 100 ml de agua destilada caliente y se lleva a un aforo de 1000 ml con agua destilada.

3) Reactivos usados en la técnica de Lowry

## Reactivo A

Hidróxido de sodio 0.1 N -----	500 ml
Carbonato de sodio -----	10 g

Disolver y aforar el carbonato de sodio con la solución de hidróxido de sodio a 500 ml

## Reactivo B

Tartrato de sodio y potasio al 1% -----	500 ml
Sulfato de cobre -----	2.5 g

Disolver y aforar el sulfato de cobre con la solución de tartrato de sodio y potasio a 500 ml.

## Reactivo C

Reactivo A -----	40 ml
Reactivo B -----	1.0 ml
Reactivo de fenol folin - Ciocalteu	

4) Dextrosa al 5%

Dextrosa ----- 5 g  
 Acetato de sodio ----- 0.2 g  
 Agua destilada c.b.p. ----- 100 ml

5) Solución estandar de tirosina

Tirosina ----- 0.2 g  
 Acido clorhídrico 0.1 N c.b.p. ----- 100 ml

6) Preparación de las diluciones del CGAH-PG y del ASC-CGAH.

El CGAH-PG y el ASC-CGAH se diluyeron de manera progresiva en una solución de cloruro de sodio al 0.85% de la manera siguiente:

Se numeraron 13 tubos; se colocó a partir del segundo tubo 0.5 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85%, al primero y segundo tubo se les agregó 0.5 ml de la sustancia a diluir, el segundo tubo se mezcló por inversión y se tomó 0.5 ml y se pasó al tercer tubo y así de manera consecutiva.

Las diluciones que se obtuvieron fueron las siguientes:

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Dilución	s/d	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64

Tubos	8	9	10	11	12	13
Dilución	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096

7) Preparación de las placas de agar para la técnica de inmunodifusión (23).

Se prepararon diluciones del agar-agar a dos concentraciones 0.2% y 0.9% en solución de cloruro de sodio al 0.85%. La placa para la inmunodifusión se preparó en dos capas; la primera capa se hizo con agar-agar al 0.2% el cual se vertió sobre la caja Petri hasta obtener una capa delgada que cubriera el fondo de la caja, se dejó solidificar y a continuación se agregó el agar-agar al 0.9% hasta obtener una capa de 3.0 mm de espesor ( $\approx$  12 ml), se dejó solidificar y después se colocó por 30 minutos a la temperatura del refrigerador.

La temperatura del agar líquido fue de aproximadamente 45°C en el momento de vertir a las cajas Petri. La estratificación de las capas de agar tuvo por objeto que los reactivos difundieron entre las capas de agar y no entre el agar y el fondo de la caja Petri.

8) Preparación de las placas de agarosa para la técnica de inmunoelectroforesis (23,24).

Se preparó una solución selladora de agarosa al 1.5% disuelta en agua destilada, aparte se preparó una solución de agarosa al 1.5% disuelta en amortiguador de barbital, 0.05 M, pH 8.6; ambas soluciones se introdujeron a un baño de agua hirviendo para su total dilución. Se desengrasó y limpió perfectamente la placa de inmunoelectroforesis y con ayuda de una brocha se cubrió dicha placa con la solución selladora caliente para formar una capa fina la cual se dejó solidificar, a continuación se colocó la placa de inmunoelectroforesis sobre una placa común de vidrio bien nivelada y con una pipeta de 10 ml se vertió la solución de agarosa al 1.5% caliente empezando de los bordes hacia el centro hasta dejar una capa de 3.0 mm de espesor, se dejó solidi-

ficar sobre la superficie nivelada y luego se colocó en el refrigerador por 20 minutos.

NOTA: La preparación de las placas de inmunodifusión y de inmunolectroforesis se debe realizar un poco antes de montar la técnica para evitar que se sequen.

9) Preparación de la plantilla de cartón para la placa de inmunolectroforesis (24).

La plantilla se preparó en papel cartón de 5.1 cm de ancho y 15 cm de largo, se hicieron 3 cortes circulares de 3 mm de diámetro cada uno y dos cortes paralelos de 8 cm de longitud por 3 mm de ancho cada uno; la distancia entre canal y canal fue de 1.4 cm (figura 10).

10) Técnica de Ouchterlony (24, 87)

Se prepara agar al 0.8-1.5% disuelto en una solución de Na Cl al 0.8%. En una caja de vidrio se vierte un cierto volumen de agar caliente para formar una capa delgada selladora; después de que se enfria dicha capa se colocan los moldes para las horadaciones en la superficie de la capa selladora, se vierte agar caliente para formar una segunda capa de alrededor de 2-3 mm de espesor, se enfria y se retiran los moldes.

Se pueden reemplazar los moldes por un cortador y proceder de la siguiente manera; se hacen los cortes del agar con el cortador después de verter la segunda capa de agar y de enfriarla, a continuación se aspira el agar de cada horadación con una pipeta conectada a un sistema de vacío. Si se emplea este último método no se necesita poner la capa selladora, pero si se recomienda sellar el

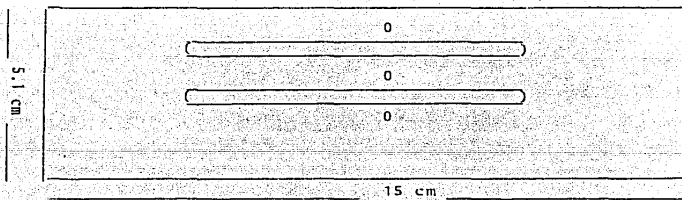
fondo de la horadación con una cantidad mínima de agar - caliente para evitar que los reactivos difundan entre el gel y el fondo de la caja.

La forma, tamaño y distancia de las horadaciones de be ser escogido de acuerdo al sistema serológico a analizar.

Para la prueba de inmunodifusión se llenan las horadaciones con las respectivas soluciones antígeno y anticuerpo, a continuación se cubren y se colocan en una atmósfera húmeda a la temperatura adecuada.



FIGURA 10



## VII - BIBLIOGRAFIA

- 1) Dorantes Meza S: Diagnóstico de enfermedades hemorrágicas en pediatría. México: Asociación Médica del Hospital Infantil de México, 1970: p. 100
- 2) Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powel AB: Immunologic differentiation of classic haemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. With observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. J. Clin. Invest. 1971b; 50: 244.
- 3) Paulissen MMP, van de Graaf-Wilschut M, Kolborn A, Planje MC: Radioimmunoassay of antihemophilic factor (factor VIII) antigen. Clin. Chim. Acta. 1975; 63: 349.
- 4) Howard MA, Firkin BG: Ristocetin-A new tool in the investigation of platelet aggregation. Thromb. et Diath. haemorrh. 1971; 26: 302.
- 5) Weiss HJ, Rogers J, Brand H: Defective ristocetin induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and its correction by factor VIII. J. Clin. Invest. 1973; 52: 2697.
- 6) Hoyer LW, Breckenridge RT: Immunologic studies of antihemophilic Factor (AHE, factor VIII): cross-reacting material in a genetic variant of haemophilia A. Blood. 1968; 32: 962.
- 7) Denson SWR, Biggs R, Hadden ME, Borret R, Cobb K: Two Types of haemophilia (A<sup>+</sup> and A<sup>-</sup>): a study of 48 cases. Br. J. Haematol. 1969; 17: 163.
- 8) Lazarchick J, Hoyer LW: Immunoradiometric measurement of the factor VIII procoagulant antigen. J. Clin Invest. 1978; 62:1048.
- 9) Marchesi SL, Shulman NR, Gralnick HR: Studies on the purification and characterization of human factor VIII. J. Clin. Invest. 1972; 51: 2151.

- 10) Cohon EJ, Strong LE, Hughes WL Jr, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL: Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J. Am. Chem. Soc. 1946; 68: 459.
- 11) Blombäck B, and Blombäck M: Purification of human and bovine fibrinogen. Ark Kem. 1957; 10: 415.
- 12) Aronson MD: Factor VIII (antihemophilic globulin). Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 1979; VI (1): 12.
- 13) Pool JG, Hershgold EJ, Pappenhagen AR: High potency antihemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. Nature. 1964; 203: 312.
- 14) Hershgold EJ, Pool JG, Pappenhagen AR: The Potent antihemophilic globulin concentrate derived from a cold insoluble fraction of human plasma. Characterization and further data on preparation and clinical trial. J. Lab. Clin. Med. 1966; 67: 23.
- 15) Wagner RH, McLester WD, Smith M, Brinkhous KM: Purification of antihemophilic factor (factor VIII) by aminoacid precipitation. Thromb. Diath. Haemorrhah. 1964; 11:64.
- 16) Roberts HR, et al: Plasma transfusion therapy in hemophilia, in Brinkhous KM. The hemophilias, Chapel Hill NC. University of North Carolina Press. 1964; 323.
- 17) Brinkhous KM, Shanbrom E, Roberts HR, Webster WP, Fekete L, Wagner RH: A new high-potency glycine-precipitated antihemophilic factor (AHF). Concentrate: treatment of classical -- haemophilia and hemophilia with inhibitors. JAMA. 1968; 205 (9): 67.
- 18) Pool JG, Shannon AE: Production of high potency concentrate of antihemophilic globulin in a closed-bag system. Assay in vitro and in vitro and in vivo. N. Engl. J. Med. 1965; 273: 1443.

- 19) Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193:265.
- 20) Biggs R, Douglas AS: The tromboplastin generation test. J. Clin. Path. 1953; 6:23
- 21) Smith I: Chromatographic and electrophoretic techniques. Chicago: Year Book Medical Publishers Inc., 1976; 2:23,95.
- 22) Quick AJ: Hemorrhagia disease. Philadelphia: Lea and Febser, - 1957: 436.
- 23) Acosta SM: Ejercicios de laboratorio de inmunologia general. - México: Facultad de Química U.N.A.M. 1980: 37,59.
- 24) Weir DM: Handbook of experimental immunology. 3; Oxford Blackwell Scientific Publications, 1978; 19,16.
- 25) Kass L, Ratnoff OD, Leon MA: Studies on the purification of anti-hemophilic factor (factor VIII) I: precipitation of antihemophilic factor by concanavalin A. J. Clin. Invest. 1969, 48:351.
- 26) Hershgold EJ, Sprawls S: Native and purified factor VIII: molecular and electron microscopical properties and a comparison with hemophilic plasma. Fed. Proc. 1967; 26: 488.
- 27) Brinkhous KM, Sandberg H, Garris B, Mattsson C, Palm M, Griggs T: Purified human factor VIII procoagulant protein: Comparative -- hemostatic response after infusions into hemophilic and von -- Willebrand disease dogs. Proc. Natl Acad Sci. USA. 1985; 82 (24): 8752
- 28) Paulssen MMP, Wouterlood ACMGB, Scheffers HLMA: Purification of antihemophilic factor by gel filtration on agarosa. Thromb. -- Diath. Haemorrh. 1969; 22: 557.
- 29) Ratnoff OD, Kass L, Lang PD: Studies on the purification of anti-hemophilic factor (factor VIII): separation of partially purified antihemophilic factor by gel filtration of plasma. J. Clin. Invest. 1969; 48: 957.

- 30) Hurt JP, Wagner RH, Brinkhous KM: Human antihemophilic factor - (AHF) purification a comparison of two procedures. Thromb. Diath. Haemorrh. 1966; 15: 327.
- 31) Hershgold EJ, Davison AM, Janszen ME: Isolation and some chemical properties of human factor VIII (antihemophilic factor). J. Lab. Clin. Med. 1971; 77: 185.
- 32) Rizza CR, Chan KE, Henderson MP: Separation of factor VIII (anti-hemophilic factor) activity from fibrinogen by means of a snake venom. Nature. 1965; 207: 90.
- 33) Margolis J, Rhoades P, Preparations of hig-purity F-VIII by controlled pore glass chromatography. Lancet. 1981; 29: 446.
- 34) Perote P, Altamirano P, Camacho Y, Aperador R, Acosta J: Métodos de preparación de factor VIII. I. Preparación y características de un concentrado de mediana pureza. Sangre. 1984; 29(3): 321.
- 35) Perote P, Altamirano P, Aperador P, Camacho Y, Acosta J: Métodos de preparación de factor VIII. II. Preparación de un concentrado de alta pureza mediante CPG. Sangre. 1984; 29(4-A): 457.
- 36) Fay PJ, et al: Purification and characterization of a highly purified human factor VIII consisting of a single type of polypeptide chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982; 79(23): 7200.
- 37) Sandberg H, Andersson L-O, Forsman N, Huang K, Larsen K, Lundin A, Pavlu B, Sewerin K, Smart J: Thromb. Haemostasis. 1985; 54: 79. (No se encontró el título de esta referencia).
- 38) Sgouris JT, Wickerhauser M: Use of frozen cryoprecipitate for - the preparation of clinical factor VIII concentrate. Transfusion. 1973; 13(6): 399.
- 39) Richards MD, Spaet TH: Immunization of rabbit against human anti-hemophilic factor (AHF). Blood. 1956; 11: 473.

- 40) Bach JF: Immunología. México: Limusa. 1984; 271.
- 41) Davidsohn I, Henry JB: Tood Sanford. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Barcelona; Salvat editores S.A. 1968; 396.
- 42) Shanberge JN, Gore L: Studies on the immunologic and physiologic activities of antihemophilic factor (AHF). J. Lab. Clin. Med. -- 1957; 50: 954.
- 43) Berglund G: Studies of the inhibitory activity of specific antisera to some clotting factors in human plasma. Brit. J. Haematol. 1962; 8: 204.
- 44) Uszynski L: The immunologic properties of factor VIII. I. Studies on the inhibitory activity of specific antisera to human antihemophilic globulin. Thromb. Diath. Haemorrh. 1966; 16: 559.
- 45) Counts RB: Solid phase immunoradiometric assay of factor VIII - protein. Br. J. Haematol. 1975; 31: 429.
- 46) Quick AJ, Hussey CV, Epstein E: Activation of thromboplastinogen by thrombin. Amer. J. Physiol. 1953; 174: 123.
- 47) Therriault DG, Gray JL, Jensen H: Influence of thrombin on rate of prothrombin conversion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1957; 95: 207.
- 48) Rapaport SI, Schiffman S, Patch MJ, Ames SB: The importance of activation of antihemophilic globulin and proaccelerin by traces of thrombin the generation of intrinsic prothrombinase activity. Blood. 1963; 21: 221.
- 49) Legaz ME, Schmen G, Counts RB, David EW: Isolation and characterization of human factor VIII (antihemophilic factor). J. Biol. Chem. 1973; 248: 3946.
- 50) Bidwell E: Acquired inhibitors of coagulants. Ann. Rev. Med. 1969; 20: 63.

- 51) Feinstein DI, Rapaport SI: Acquired inhibitors of blood coagulation in spaet. TH(ed). Progress in hemostasis and thrombosis. New York: Grune and Stratton. 1972; 1: 75.
- 52) Robboy SJ, Lewis EJ, Schur PH et al: Circulating anticoagulants to factor VIII: Immunochemical studies and clinical response to factor VIII concentrates. Am. J. Med. 1970; 49: 742.
- 53) Adelson E, Rheingold JJ, Parker O et al: The survival of factor VIII (antihemophilic globulin) and factor IV (plasma thromboplastin component) in normal humans. J. Clin. Invest. 1963; 42: 1040.
- 54) Benett E, Huchns ER: Immunological differentiation of three types of haemophilia and identification of some female carriers. Lancet. 1970; 2: 956.
- 55) Bouma BN, Wiegerinck Y, Sixma JJ, et al: Immunological characterization of purified antihemophilic factor A (factor VIII) which corrects abnormal platelet retention in von Willebrand's disease: Nature. New Biology. 1972; 236: 104.
- 56) Denson KWE: The use of antibodies in the study of blood coagulation. Philadelphia: FA Davis CO. 1967.
- 57) Hoyer LW: Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF factor VIII). III. Comparative binding properties of human and rabbit antiAHF. Blood. 1972; 39: 481.
- 58) Meyer D, Larrieu MJ: Factor VIII and IX variants. Relationship between haemophilia B<sub>M</sub> and haemophilia B<sub>F</sub>. Europ. J. Clin. Invest. 1971; 1: 425.
- 59) Piper W, Shreier MH: Überden immunologischen nachweis von faktor-VIII-protein in blutplasma und seine bedeutung für das vers-tändnis der haemophilie A. Thromb. Diath. Haemorrh. 1964; 11: 423.
- 50) Stites DP, Hershgold ES, Perlman JD et al: Factor VIII detection by hemagglutination inhibition hemophilia A and von Willebrand's



disease. Science. 1971; 171: 196.

- 61) Gralnick HR, Abrell E, Bagley J: Immunological studies of factor VIII (antihemophilic globulin) in haemophilia A. Nature. New Biology. 1971; 230: 16.
- 62) Hoyer LW, Breckenridge RT: Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). II. Properties of cross-reacting material. Blood. 1970;35: 809.
- 63) Abilgard CF, Vanderheiden J, Lindley A et al: Studies of cross-reactivity of acquired factor VIII inhibitor activity in hemophilia plasma.
- 64) Bloom AL, Davies AJ, Rees JK: A clinical and laboratory study of a patient an unusual factor VIII inhibitor. Thromb. Diath. Haemorrh. 1966; 15: 12.
- 65) Hougie C: Studies on an acquired anticoagulant directed against factor VIII. J. Lab. Clin. Med. 1967; 70: 384.
- 66) Kernoff PBA: The relevance of factor VIII inactivation characteristics in the treatment of patients with antibodies directed against factor VIII. Br. J. Haematol. 1972; 22: 735.
- 67) Osterud B, Rapaport SI: Synthesis of intrinsic factor X activator. Inhibition of the function of formed activator by antibodies to factor VIII. Br. J. Haematol. 1972; 9: 1854.
- 68) Rizza CR, Edgcumbe JOP; Pitney WR et al: The treatment of patients having spontaneously occurring antibodies to antihemophilic factor (factor VIII). Thromb. Diath. Haemorrh. 1972; 28: 120.
- 69) Roberts HR, Scales MB, Madison JT, et al: A clinical and experimental study of acquired inhibitors to factor VIII. Blood. 1965; 26: 805.
- 70) Shulman NR, Cowan DH, Libre EP et al: The physiological basis for therapy of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and rela--

- ted disorders. Ann. Int. Med. 1967; 67: 856.
- 71) Hoyer LW: Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). IV. Radioimmunoassay of AHF antigen. J. Lab. Clin. Med. 1972; 80: 822.
- 72) Brown JE, Baugh RF, Hougie C: Effect of exercise on the factor -- VIII complex: a correlation of the von Willebrand antigen and factor VIII coagulant antigen increase. Thromb. Res. 1979; 15: 61.
- 73) Holmberg L, Borge L, Ljung R, Nilsson IM: Measurement of antihemophilic factor A antigen (VIII:C Ag) with a solid phase immunoradiometric method based upon homologous non-haemophilic antibodies. Scand. Haematol. 1979; 23: 17.
- 74) Peake IR, Bloom AL, Giddings JC, Ludlam CA: Immunoradiometric assay for procoagulant factor VIII antigen: results in haemophilia, von Willebrand's disease and fetal plasma and serum. Br. J. Haematol. 1979; 42: 269.
- 75) Muller HP, van Tilburg NH, Bertina RM, Terwiel JPH, Veltkamp JJ: Immunoradiometric assay of procoagulant factor VIII antigen (VIII CAg). Clin. Chim. Acta. 1980; 107: 11.
- 76) Girma J-P, Lavergne J-M, Meyer D, Larrieu M-J: Immunoradiometric assay of factor VIII: coagulant antigen using four human antibodies: Study of 27 cases of haemophilia A. Br. J. Haematol. 1981; 47: 269.
- 77) Rotblat F, Tuddenham EGD: Immunologic studies of factor VIII coagulant activity (VIII:C): assays based on a haemophilic and an acquired antibody to VIII:C. Thromb. Haemostasis. 1981; 1: 336.
- 78) Thomas KB, Howard MA, Koutts J, Firkin BG: Simplified immunoradiometric assay for factor VIII coagulant antigen. Br. J. Haematol. 1982; 51: 47.
- 79) Ingerslev J, Stener S: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

for the measurement of factor VIII coagulant antigen (CAg) using haemophilic antibodies. Br. J. Haematol. 1986; 62: 325.

- 80) Muller HP, van Tilburg NH, Derks J, Klein-Breteler E, Bertina RM: A monoclonal antibody to VIII:C produced by a mouse hybridoma. - Blood. 1981; 58: 1000.
- 81) Rotblat F, Goodall AH, O'Brien DP, Rawlings E, Middleton S, Tuddenham EGD: Monoclonal antibodies to human procoagulant factor VIII. J. Lab. Clin. Med. 1983; 101: 736.
- 82) Brown JE, Thuy LP, Carton CL, Houghle C: Studies on a monoclonal-antibody to human factor VIII coagulant activity, with a description of a facile two-site factor VIII coagulant antigen assay. J. Lab. Clin. Med. 1983; 101: 793.
- 83) Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, -- Seeburg PH, Smith DH, Hollinghead P, Wion KL et al: Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. Nature. -- 1984; 312(5992): 330.
- 84) Perlman D, Halvorson HO: A putative signal peptidase recognition - site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. J. Mol. Biol. 1983; 167(2): 391.
- 85) Poole S, Firtel RA, Lamur E, Rowekamp W: Sequence and expression of the discoidin I gene family in Dictyostelium discoideum. J. - Mol. B. 1981; 153(2): 275.
- 86) Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, -- Opperman H, Rodney K, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon DJ: Structure of human factor VIII. Nature. 1984; 312: 337.
- 87) Ouchterlony O: Diffusion in gel methods for immunological analysis In Progress in Allergy. 1958; 5: 1.