

11
2ej.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

H E M O F I L I A S

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A N :

**JUAN MANUEL CARRETON PIÑA
EMETERIO GUSTAVO MARTINEZ GONZALEZ**

Director de Tesis :

Q. B. P. Antonio Sánchez Ortega



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.- TITULO	1
II.- OBJETIVOS	2
III.- INTRODUCCION	3
IV.- HEMOFILIA A(DEFICIENCIA DE FACTOR VIII)ANTECEDENTES	24
IV.1.- ESTRUCTURA	27
IV.2.- PROPIEDADES BIOQUIMICAS	33
IV.3.- PROPIEDADES INMUNOLOGICAS	37
IV.4.- SINTESIS	40
IV.5.- FUNCION	41
IV.6.- ASPECTOS GENETICOS	46
IV.7.- MANIFESTACIONES CLINICAS	56
IV.8.- DIAGNOSTICO	59
IV.9.- METODOS INMUNOLOGICOS UTILES EN EL DIAGNOSTICO DE LA HEMOFILIA A O CLASICA	67
IV.10.- APLICACION DE LA GENETICA MOLECULAR AL DIAGNOSTICO PRENATAL Y LA DETECCION DE PORTADORES EN LA HEMOFILIA A	79
IV.11.- ENSAYO DEL FACTOR VIII:C CON UN SUSTRATO CROMOGENICO	93
IV.12.- TRATAMIENTO	108
IV.13.- HISTORIA NATURAL DE LOS ANTICUERPOS EN PERSONAS CON HEMOFILIA	116

	PAG.
V.- HEMOFILIA VASCULAR (ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND) DEFICIENCIA DE FACTOR VIII (ANTECEDENTES)	122
V.1.- ESTRUCTURA (PROTEINA ASOCIADA AL FACTOR VIII FACTOR VON WILLEBRAND)	127
V.2.- PROPIEDADES BIOQUIMICAS	129
V.3.- PROPIEDADES INMUNOLOGICAS	132
V.4.- FUNCION	133
V.5.- SINTESIS	138
V.6.- INTERACCION DEL FACTOR VIII : C Y EL VIII R EN EL COMPLEJO FACTOR VIII/VW	139
V.7.- INCIDENCIA	142
V.8.- CLASIFICACION Y GENETICA	143
V.9.- VARIANTES DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND	146
V.10.- ANTIGENO II DE VON WILLEBRAND PLAQUETARIO VIII	149
V.11.- VARIACION DE LOS NIVELES PLASMATICOS DEL FACTOR Y DEL FACTOR VON WILLEBRAND	156
V.12.- SINDROME DE VON WILLEBRAND ADQUIRIDO	157
V.13.- DIAGNOSTICO	161
V.14.- TRATAMIENTO	164
VI.- HEMOFILIA B (DEFICIENCIA FACTOR IX)	168
VI.1.- ESTRUCTURA Y FUNCION	168
VI.2.- GENETICA	173
VI.3.- MANIFESTACIONES CLINICAS	186
VI.4.- METODOS DE DIAGNOSTICO	187
VI.5.- TRATAMIENTO	196

VII.- HEMOFILIA C (DEFICIENCIA DEL FACTOR XI)	PAG. 197
VII.1.- ESTRUCTURA Y FUNCION	197
VII.2.- PROPIEDADES BIOQUIMICAS	198
VII.3.- GENETICA	202
VII.4.- MANIFESTACIONES CLINICAS	204
VII.5.- METODOS DE LABORATORIO PARA SU DETERMINACION	207
VII.6.- RESULTADOS	213
VII.7.- TRATAMIENTO	220
VIII.- DISCUSION	221
IX.- RESUMEN	234
X.- BIBLIOGRAFIA	240

INDICE DE ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS

	PAG.
ESQUEMA 1.- CASCADA DE LA COAGULACION	17
ESQUEMA 2.- MECANISMO PLASMINOGENO-PLASMINA Y SU RELACION CON LA COAGULACION	18
ESQUEMA 3.- MUESTRA EL PASO PLASMINOGENO A PLASMINA, EL ACTIVADOR DESDOBLA AL PLASMINOGENO EN SU EXTREMO AMINOTERMINAL EN EL ENLACE ARG-VAL	19
ESQUEMA 4.- DEGRADACION DEL FIBRINOGENO	21
ESQUEMA 5.- ILUSTRA LA MOLECULA DEL FACTOR VIII	39
ESQUEMA 6.- ESQUEMA PARA LA FORMACION DE ACTIVADOR INTRINSICO DE PROTOMBINA	169
ESQUEMA 7.- ESQUEMA DE LA FORMACION DE ACTIVADOR EXTRINSICO DE PROTOMBINA	169
FIGURA 1.- ESTRUCTURA ARTERIOLAR	6
FIGURA 2.- ESTRUCTURA PLAQUETARIA	10
FIGURA 3.- REPRESENTA UNA FAMILIA NORMAL SIN DEFICIENCIA DE FACTOR VIII. TODOS LOS HIJOS SON NORMALES	48
FIGURA 4.- REPRESENTA LA UNION DE UN VARON NORMAL CON UNA MUJER PORTADORA	50
FIGURA 5.- INDICA LOS RESULTADOS DE UNION, DE UN VARON CON DEFICIENCIA DE FACTOR VIII Y UNA MUJER NORMAL	51
FIGURA 6.- SE INDICAN LOS RESULTADOS DE LA UNION DE UN VARON CON DEFICIENCIA DE FACTOR VIII Y UNA HEMBRA PORTADORA	52
FIGURA 7.- INDICA EL RESULTADO DE LA UNION DE UN VARON NORMAL CON UNA MUJER QUE SUFRE DEFICIENCIA DE FACTOR VIII	53
FIGURA 8.- INDICA LA UNION DE UN VARON Y UNA MUJER, AMBOS CON DEFICIENCIA DE FACTOR VIII	54

	PAG.
FIGURA 9.- COMPONENTES DEL COMPLEJO FACTOR VIII/VW	29
FIGURA 10.- TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DEL DNA	41
FIGURA 11.- CURVA ESTANDAR PARA RANGOS A=15-100% B=20-150% DE FACTOR VIII:C	104
FIGURA 12.- CURVA ESTANDAR PARA 1-20% DE FACTOR VIII:C	105
FIGURA 13.- CURVA ESTANDAR OBTENIDA CON EL FACTOR VIII:C CONCENTRADO OCTONATIV	106
FIGURA 14.- INDICA LA ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS EN FRIO	107
FIGURA 15.- REPRESENTA UNA FAMILIA NORMAL	175
FIGURA 16.- REPRESENTA LA UNION DE UN VARON NORMAL CON UNA MUJER PORTADORA	176
FIGURA 17.- INDICA LOS RESULTADOS DE LA UNION DE UN VARON CON DEFICIENCIA DEL FACTOR IX CON UNA MUJER NORMAL	177
FIGURA 18.- INDICA LOS RESULTADOS DE LA UNION DE UN VARON CON DEFICIENCIA DEL FACTOR IX Y UNA PORTADORA	178
FIGURA 19.- EL RESULTADO DE LA UNION DE UN VARON NORMAL CON UNA MUJER QUE SUFRE DEFICIENCIA DEL FACTOR IX	179
FIGURA 20.- LA UNION DE UN HOMBRE CON UNA MUJER AMBOS CON DEFICIENCIA DE FACTOR IX	180
FIGURA 21.- FRAGMENTOS DE DNA DE PACIENTES CON HEMOFILIA A, HEMOFILIA B, Y PACIENTES NORMALES	192
FIGURA 22.- MODELO DE TAP I	194
FIGURA 23.- CURVA DE UNION PARA EL 125-J FACTOR XI	208

	PAG.
TABLA 1.- NOMENCLATURA PARA LOS FACTORES DE LA COAGULACION	14
TABLA 2.- INHIBIDORES DE LA COAGULACION	23
TABLA 3.- CLASIFICACION DE LOS GRADOS DE HEMOFILIA	25
TABLA 4.- NOMENCLATURA DEL COMPLEJO FACTOR VV VIII/VW	30
TABLA 5.- REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DEL FACTOR VIII:C	97
TABLA 6.- INTERVALOS UTILIZADOS PARA OBTENER UNA MAXIMA RESOLUCION EN EL ENSAYO DEL FACTOR VIII:C	98
TABLA 7.- DILUCIONES DE TRABAJO EN LA DETERMINACION DEL FACTOR VIII:C	99
TABLA 8.- METODO DEL PUNTO FINAL	100
TABLA 9.- COMPARACION DE TITULOS ANTI-IX	188
TABLA 10.- COMPOSICION DEL FACTOR XI HUMANO	199
TABLA 11.- EFECTO DE LA PURIFICACION SOBRE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR XI	212
TABLA 12.- EFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE EL FACTOR XI	216
TABLA 13.- EFECTO DE LA TROMBINA SOBRE EL FACTOR XI	218
TABLA 14.- EFECTO DEL CAOLIN F-XII Y F-XIIa SOBRE EL FACTOR XI	218
TABLA 15.- EFECTO DEL PLASMA DEFICIENTE EN FACTOR DE FLETCHER EN UNA MEZCLA DE CAOLIN F-XII Y FACTOR XI	219

RESUMEN

Dentro de las alteraciones hemorrágicas más importantes se encuentran principalmente, aquellos factores que por un defecto estructural o a falta de una síntesis correcta producen cierta tendencia a sangrar. Estos trastornos son conocidos como Hemofilias, las cuales se clasifican de la siguiente manera:

HEMOFILIA A ó Clásica	deficiencia factor VIII
HEMOFILIA B ó enfermedad de CHRISTMAS	deficiencia factor IX
HEMOFILIA C	deficiencia factor XI
Enfermedad Von Willebrand ó HEMOFILA vascular	deficiencia factor VIII

Pese a las investigaciones encaminadas a caracterizar los factores VIII, IX, y XI desde un punto de vista bioquímico, aún falta mucho sobre su conocimiento.

A continuación se presenta un estudio detallado de cada hemofilia, con el fin de integrar los conocimientos actuales en lo que respecta a estructura, función genética y métodos de diagnóstico, así como lo nuevo en tratamiento de las hemofilias.

TITULO

H

E

M

O

F

I

L

I

A

S

II.- OBJETIVOS

- 1.- Realizar una revisión bibliográfica detallada y actualizada de los diferentes tipos de Hemofilias, así como de los factores de la coagulación que afectan a cada una de ellas y con el fin de integrar los conocimientos que se tienen de cada Hemofilia para su mejor comprensión.
- 2.- Investigar los Factores de la coagulación que intervienen en los diferentes tipos de Hemofilia así como su nomenclatura y participación en la Hemostasis.
- 3.- Integrar los conocimientos actuales de los Factores de la coagulación en los diferentes tipos de Hemofilia, investigando aspectos como son:
 - a).- Propiedades Bioquímicas.
 - b).- Propiedades Inmunológicas.
 - c).- Síntesis.
- 4.- Establecer la función de cada uno de Factores de la coagulación que afecta a cada una de las Hemofilias.
- 5.- Conocer los aspectos Genéticos de las Hemofilias principalmente:
 - a).- Posibilidades Genéticas para su transmisión.
 - b).- Tipo de portadores.
- 6.- Investigar las manifestaciones clínicas que se presentan en los diferentes tipos de pacientes Hemofilicos.
- 7.- Es importante conocer los métodos para el diagnóstico de las Hemofilias como son:
 - a).- Pruebas de coagulación.
 - b).- Métodos Inmunológicos.
 - c).- Métodos Genéticos.
- 8.- Consideramos que este trabajo es de suma importancia ya que cerca del 95% de las enfermedades hereditarias de la coagulación plasmática, se conocen como Hemofilias y su tratamiento es a base de productos sanguíneos, por lo cual es vital conocer su manejo y obtención ya que es una de las formas de contraer la enfermedad más importante de la última década o sea el "SIDA".

III.- INTRODUCCION

La sangre considerada el líquido vital para el buen funcionamiento del organismo, se encuentra mantenida en condiciones normales por dos sistemas fisiológicos, propios del organismo, estos son: el sistema hemostático y el sistema fibrinolítico, los cuales se hallan en equilibrio dinámico.^{23,28,120}

La hemostasis es una serie de mecanismos o fases responsables de mantener, y prevenir el derrame sanguíneo por una reparación rápida de cualquier ruptura vascular.^{28,32}

La hemostasis involucra la interacción de las siguientes fases:

- 1.- Fase vascular.
- 2.- Fase plaquetaria.
- 3.- Fase plasmática.

Estas tres fases están perfectamente coordinadas entre sí, con el fin de llevar a cabo un sello mecánico bien localizado y que subsiguientemente sea destruido por el sistema fibrinolítico, para una reparación final de la lesión.^{12,23,55}

1.- F A S E V A S C U L A R .

Los vasos sanguíneos proporcionan una superficie inerte de células endoteliales, y provoca que el flujo sanguíneo sea más lento cerca del lugar lesionado.³²(fig. 1)

Estas células están dispuestas en forma de mosaico, estando separadas, aunque suficientemente adherentes para funcionar como una barrera eficaz para macromoléculas. La función del intercambio metabólico de la sangre depende de los capilares de circulación lenta y de la pared delgada de los mismos.^{23,32}

Los capilares están formados principalmente por células endoteliales planas (endotelio) y por una estructura fibrar diversa (fibroblastos). Las venas y las arterias tienen una estructura más compleja, están formadas por:^{23,28,32,55}

- a) Túnica interna, que incluye el endotelio formado por una membrana basal, tejido elástico y colágena.
- b) Túnica media, compuesto por células y fibroblastos ocasionales.
- c) Túnica adventicia, que consiste en fibroblastos y fibras de colágena.

Conforme aumenta el tamaño de los vasos aparecen microfibrillas no colágenas en el subendotelio, y los componentes elásticos se condensan en una lámina elástica interna bien definida que separa la túnica interna de la media. La nutrición de la pared del vaso

grande a través de la pared del mismo se torna inadecuado, por lo que el aporte sanguíneo adicional para la media y adventicia esta dado por una red de capilares llamados " vasa vasorum ". El daño vascular activa directamente a todos los componentes del sistema hemostático. Vasoconstricción, comprende una respuesta del vaso lesionado y estimulación refleja de vasos adyacentes. La disminución de la velocidad del flujo sanguíneo aumenta la mayor eficacia para la adhesividad plaquetaria y una acción eficiente de los factores de la coagulación.^{23, 28, 32, 55}

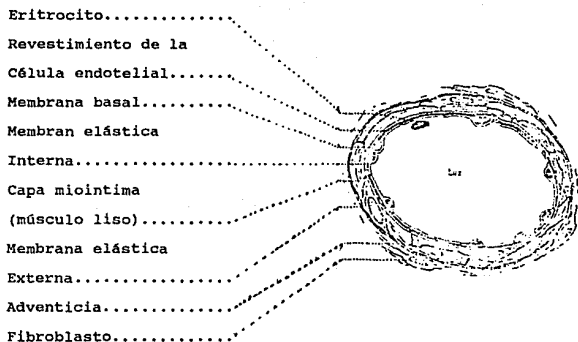


Figura 1. Estructura arteriolar

Aunque la vasoconstricción, no es necesaria para que ocurra la hemostasis, es crítica para prevenir desangramientos después de la ruptura de grandes vasos especialmente arterias.^{23, 28, 32}

En la función plaquetaria, los vasos intervienen proporcionando colágena fibronectina y factor Von Willebrand que se ponen en contacto con las plaquetas para dar la adhesividad.^{23, 28, 32}

En la coagulación plasmática, el sistema vascular interviene en la formación del coágulo por activación de los factores de coagulación, estimulando tanto al sistema intrínseco como al sistema extrínseco. Interviene en el sistema intrínseco en la activación del factor XII o HAGEMAN, por exposición de las cargas negativas de los grupos carboxilo libres de los aminoácidos glutámico y aspártico de la colágena.^{23, 28, 32}

En el sistema extrínseco proporciona Factor Hístico o Factor III. El sistema vascular también intervienen en la fibronolisis estimulandola por activación del plasminógeno por la liberación de proactivadores de este.^{23, 28, 32}

Las alteraciones vasculares se caracterizan por presentar anomalías de los vasos capilares que pueden ser de tres tipos:^{23,28}
32

a) Aumento de la fragilidad vascular.

Puede ser asociada a una deficiencia de la vitamina C que se

manifiesta en forma de hematoma al menor traumatismo con posibles equimosis y hemorragia franca en el seno de los músculos.

En los adultos, las encías sangrantes y blandas son una manifestación frecuente.

b) Permeabilidad aumentada por una anomalía del endotelio.

En este grupo de trastornos se encuentra la púrpura vascular, los síntomas son los de una diatesis hemorrágica caracterizada por una tendencia a los hematomas, equimosis y a las hemorragias petequiales.^{23, 28, 32}

c) Malformaciones vasculares de tipo telangiectásico.

Existe una enfermedad familiar caracterizada por una tendencia a sangrar por las superficies mucosas donde existen anomalías vasculares, a pesar de que las hemorragias pueden ser masivas, las plaquetas y los factores plasmáticos de la coagulación son normales, a parecer, este trastorno es transmitido como un rasgo somático dominante, estos trastornos tienen una característica discreta y aparecen clínicamente como telangiectasia, en cara, lengua o en la mucosa oral.^{23, 28, 32}

2.- F A S E P L A Q U E T A R I A

Las plaquetas son fragmentos de células gigantes denominadas Megacariocitos, tienen forma de disco con diametro de 2 μ m, pero pueden adquirir fácilmente formas irregulares, la estructura plaquetaria consta de 3 zonas principales. Figura (2) (9,12,33,55, 92)

Zona periférica, cubierta externa que es importante en la recepción de estímulos y en la adhesividad y agregación plaquetaria. En ella también, se distinguen, la zona de membrana que esta formada como cualquier otra membrana de proteínas y fosfolípidos (factor 3 plaquetario) y la zona de submembrana que es un sistema canalicular que esta en contacto con el exterior, interviniendo en el intercambio de sustancias durante la reacción de liberación. En esta zona se encuentran todas las enzimas necesarias para la síntesis de prostaglandinas y además, es sitio de almacenamiento de Ca.¹⁹, 12, 33, 55

Zona Sol-Gel, constituida por diversas fibras, microtubulos que forman el citoesqueleto que la rodea y microfilamentos que es el sistema contractil formado por proteínas contractiles como la Actin-Miocina.



- SMF Filamentos especializados
- EC Membrana exterior
- CM Unidad de membrana
- MT Microtubulos
- DB Cuerpos densos
- G Gránulos
- Gly Glucógeno
- DTS Sist. Tub. Denso
- M Mitocondria
- CS Sistema Canalicula

Figura 2. Estructura plaquetaria

Zona de organelos, en donde se encuentra una gran cantidad de cuerpos, como mitocondrias, gránulos de glucogeno, gránulos alfa, donde se hallan factores como el V, I, VIII-R, BETA-Tromboglobulinas, factor mitogénico, factor IV plaquetario.

Gránulos o cuerpos densos donde se encuentra el ADP, AMP, Ca, Serotonina y epinefrina entre otras sustancias.^{9,12,33,55}

Las plaquetas desempeñan una función muy importante en la hemostasis que consiste en ; mantenimiento continuo de la integridad vascular, paro inicial del sangrado por formación del tapón plaquetario y estabilización de dicho tapón por la contribución de un fosfolípido (F3P) al proceso de la coagulación. (12, 33)

Adhesividad que se lleva a cabo entre el sistema vascular y la plaqueta existiendo un puente de unión entre ambos formado por el factor Von Willebrand, fibronectina y GPIb, un cambio de forma que se efectua por un proceso de relajación-contracción en el cuál se involucra los microfilamentos, agregación que se lleva a cabo entre plaqueta y plaqueta y que para que ocurra se requiere de fibrinógeno, calcio, y glucoproteínas IIB - IIIA.

Para explicar la agregación existen tres teorías :^{9,12,33}

1a. Que la agregación se lleva a cabo por glucoproteínas de una plaqueta que tiene receptores específicos en la otra plaqueta.

2a. Que se lleva a acabo entre la unión de la glucoproteína de una plaqueta con la glucoproteína de otra plaqueta.

3a. Que existe una sustancia intermedia que es fibrinógeno, que sirve de puente de enlace entre las glucoproteínas de cada plaqueta. Reacción de liberación es una consecuencia de la contracción-relajación que produce una desgranulación y salida del contenido de dichos gránulos.^{9,12,33}

Se pueden producir deficiencias de las plaquetas en los siguientes casos:

Deficiencia cualitativa de las plaquetas: (32, 55, 92)

Trombastenia hemorrágica hereditaria de Glanzman. Esta enfermedad, se acompaña de pequeñas plaquetas redondas que carecen de poder adherente, no forman conglomerados, incluso en presencia de un gran exceso de ADP.

Deficiencia de factor III de plaquetas, algunas variedades de trombastenia se deben a la falta de este factor plaquetario.

Enfermedad de Von Willebrand.- En este caso hay falta de poder adherente y además tiene asociación con una disminución del factor VIII, conocida esta enfermedad como hemofilia vascular.

Deficiencias cuantitativas de plaquetas.^{55,92}

Trombocitopenia. Existe una tendencia a sangrar clínicamente evidente, donde quiera que el número de plaquetas circulante disminuya a $70,000/\text{mm}^3$ o menos. Las manifestaciones clínicas consisten en la facilidad para hacerse hematomas y en las hemorragias excesivas por laceraciones mínimas.^{55,92}

La púrpura Trombocitopenica Idiopática. Es una enfermedad trombocitopenica, esta enfermedad se da predominantemente en adultos jóvenes, aunque también afecta a niños y viejos.

Se considera en general que la púrpura trombocitopenica idiopática es una enfermedad autoinmunitaria, pero desencadenada por una infección viral o una hipersensibilidad a farmacos actuando las plaquetas como organo blanco para la respuesta alérgica.^{55,92}

3.- F A S E P L A S M A T I C A.

Aunque las plaquetas son la causa primaria de la formación del Trombo este depende de la indole física del polimero de fibrina que se forma como producto terminal de una serie compleja y controlada de reacciones llevada a cabo por varias sustancias denominadas factores de coagulación.^{32,120}

La nomenclatura de dichos factores de coagulación han sufrido varias reviciones en el curso de los años y actualmente se conocen los que se muestran en la tabla (1).^{32,120}

TABLA No. 1
FACTORES DE LA COAGULACION

FACTOR	NOMBRE CONOCIDO
I	FIBRINOGENO
II	PROTROMBINA
III	TROMBOPLASTINA TISULAR
IV	CALCIO IONICO
V	PROACELERINA
VII	PROCONVERTINA
VIII	FACTOR O GLOBULINA ANTIHEMOFILICA (A)
IX	FACTOR CHRISTMAS O FACTOR ANTIHEMOFILIA (B)
X	FACTOR STUART-PROWER
XI	ANTECEDENTE DE TROMBINA PLASMATICA .
XII	FACTOR HAGEMAN
XIII	FACTOR ESTABILIZANTE DE LA FIBRINA
PREKALICREINA	FACTOR FLETCHER
KININOGENO DE ALTO PESO MOLECULAR.	FACTOR FITZGERALD-WILLIAMS-FLAUJEAC.

Por acuerdo internacional los factores son designados con numeros romanos y cada uno indica el órden de su descubrimiento y nose-
cuencia en la reacción.

Las reacciones entre los factores que conducen a la formación de
fibrina se le conoce como cascada de la coagulación. Esquema (1)
12,13,15,33

Es una serie de reacciones que envuelven en general la conversión
de una proteina precursora que se encuentra en circulación en
forma inactiva (proenzima) a una forma activa (enzima).

La clásica división en dos vias del sistema de coagulación nos da
la via intrínseca que da inicio con el contacto con una super-
ficie y por el otro lado la via extrínseca que inicia con la
liberación de factor III.12,13

El esquema esta basado en la clásica cascada propuesta por
Macfarlane (1964) y por Davie y Ratnoff (1964).

El mecanismo de la coagulación esta dado por tres fases:
12,13,33

Fase inicial o activación por contacto que esta dada en la via
intrínseca por los factores XII, XI, HMWK (factor fitzgeral),
KALIKREINAS (factor fletcher).13,15,33

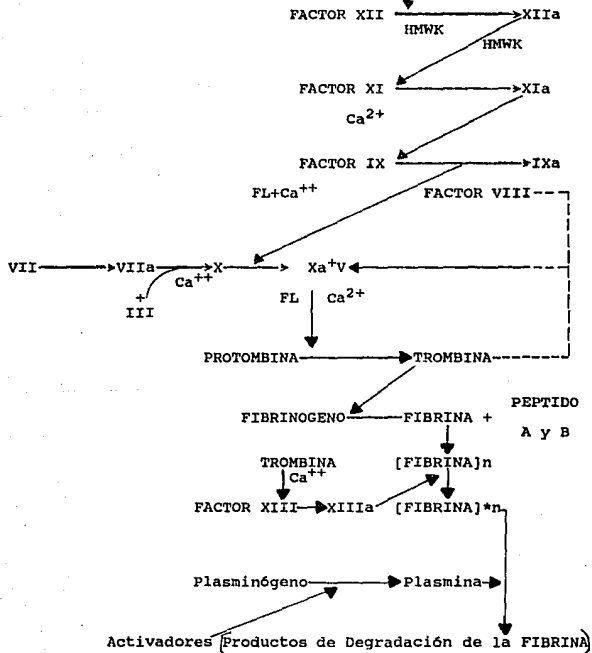
Fase intermedia o formación de trombina que esta dada en la via
intrínseca por los factores IX, X, VIII, V, protrombina y Ca
iónico y en la via extrínseca con los factores VII, III, V, X,

protrombina y Ca^{++} y por último tenemos la fase final o formación y estabilización de la fibrina que esta dada por los factores fibrinogeno XIII y Ca^{++} .^{12,13,33}

ESQUEMA 1 (MECANISMO DE LA COAGULACION)

SISTEMA EXTRINSICO

SISTEMA INTRINSICO
Contacto con una superficie
Vidrio / Caliceína
Carga neg.

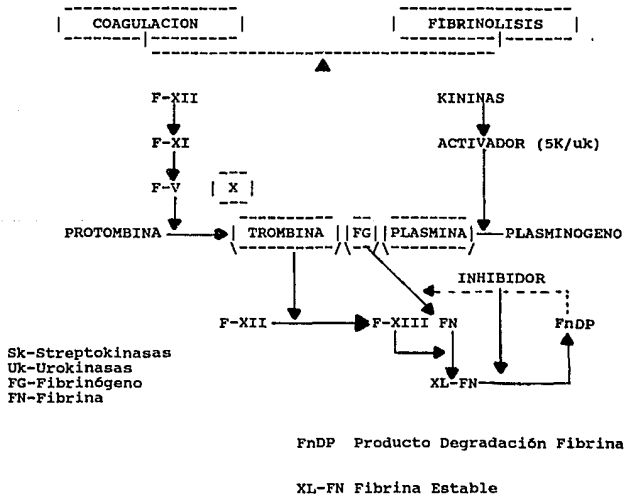


S I S T E M A F I B R I N O L I T I C O

Es una serie de mecanismos enzimáticos encargados de degradar los polímeros de fibrina que han formado el coágulo, en fragmentos de diferente peso molecular que son fácilmente eliminados por el sistema endotelial.

Este sistema depende del mecanismo plasminogenoplasmina y su relación con la coagulación se ilustra en el esquema 2^{12,120}

ESQUEMA 2 MECANISMO PLASMINOGENO-PLASMINA



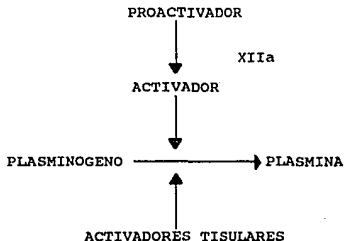
El plasminógeno puede ser activado por diferentes vías. 12,72,120

Intrínseca por factor XII, extrínseca por factores tisulares y exógenos por estreptoquinasas y ubrobinasas esquema (3). La activación por contacto requiere la presencia de por los menos 4 proteínas plasmáticas: factor XII precalicreinas, cininógenos y plasminógeno. Sin embargo se ha demostrado que la activación del plasminógeno medida por contacto es dañada en plasmas deficientes en factor XI (pta), Hadeito Saito, 1980. 62

En el esquema se muestra el paso de plasminógeno a plasmina. El activador desdobra al plasminógeno en su extremo aminoterminal en el enlace arg-val dando lugar así a la plasmina.

ESQUEMA (3)

PASO DE PLASMINOGENO A PLASMINA



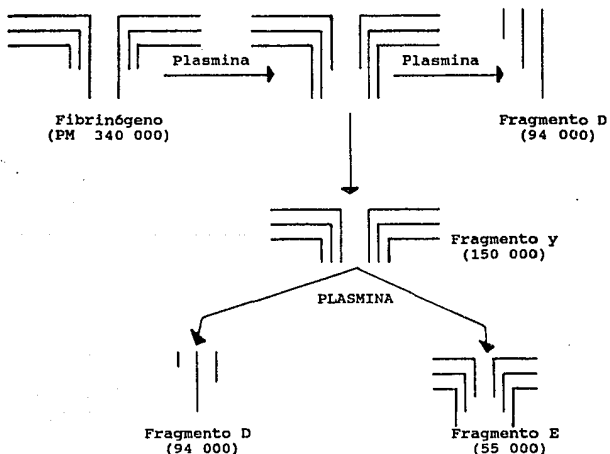
La plasmina o fibrinolisisina es una enzima que se parece en mucho a la tripsina por su amplitud de acción como endopeptidasa que rompe los enlaces lis-arg de la fibrina. Ataca al fibrinógeno de la misma intensidad que la fibrina. En la degradación inicial el fibrinógeno disminuye su peso molecular de 340,000 a 270,000 con la liberación de fragmentos de bajo peso molecular a partir de los extremos carboxiterminales de las cadenas Alfa y de los extremos amino-terminales de las cadenas BETA.^{12,71,110}

La estructura molecular que permanece llamada fragmento x (peso molecular aproximado 270,000) retiene la propiedad de participar en la formación del coagulo, cuando se expone a la trombina. Sin embargo coagula con lentitud y su presencia debilita la estructura del coagulo. El fragmento X tiene todavía más divisiones por la acción de la plasmina, hasta derivados llamados fragmentos (peso molecular aproximado de 150,000) y fragmento d (peso molecular aproximado 94,000), ambos son no coagulables, aunque interfieren en la formación de hilos de fibrina y son anticoagulantes potentes. Conforme se completa la degradación, el fragmento X se reduce hasta dos fragmentos más: D y E. Este último contiene el nudo disulfuro-N terminal, con peso molecular aproximado de 55,000 y es relativamente menos activo en relación al efecto coagulante.^{12,71,110}

Cada molecula o monomero de fibrina (fibrinógeno) da origen a dos moleculas de fragmento D y una molecula de fragmento E, mas un número de peptidos de peso molecular pequeño esquema 4. Estos

productos de degradación son eliminados de la circulación por el sistema reticulo endotelial en un tiempo medio aproximado de 9 horas, tiene funciones de inhibidor en la formación de fibrina por bloqueo competitivo de la polimerización del monomero de fibrina, además, alteran la agregación plaquetaria. Esquema 4

ESQUEMA 4 DEGRADACION DEL FIBRINOGENO
Fragmento X (270 000)



INHIBIDORES NATURALES DE LA HEMOSTASIS

La coagulación sanguínea y fibrinólisis es un sistema enzimático multicomplejo formado por proenzimas, cofactores e inhibidores.

El control-regulación de estos sistemas ocurre por:

a) control de la activación de las proenzimas similares a la tripsinserin proteasas, o de la liberación de estas enzimas a la sangre.

b) Por neutralización de estas enzimas, activadas por inhibidores. Estos inhibidores con la excepción de la ALFA² acroglobulina, forman una relación estequiométrica I:I con las proteasas, el mecanismo de reacción de los inhibidores de proteasas, exactamente no ha sido bien establecido, pero las evidencias acumuladas muestra que el mecanismo de interacción puede ser de naturaleza similar al establecido entre proteasas e inhibidores de bajo peso molecular de origen animal o vegetal; a saber, formación de enlaces covalentes entre un centro reactivo del inhibido y el centro de serina de la proteasa. Tabla²(12,110)

TABLA 2.- INHIBIDORES NATURALES DE LA COAGULACION

INHIBIDOR	CONCENTRACION mg/100mil	PESO mole cula	CONTENIDO aminoáci dosφ	CONTENIDO carbohidr adasφ	NUMERO cadena	PROTEINAS INHIBIDAS
ALFA ¹ ANTITRIP- SINA	290±45	54, 000	86	12	1	Xia, Trom Plasmina, Tripsina.
ALFA ¹ ANTIQUI- MIOTRIP- SINA	49±7	69, 000	73	25	1	Plasmina, Qumiotrip sina.
INHIBIDOR INTER- ALTA TRIP SINA	50	160, 000	90	8		Plasmina
ANTITROM- BINA 111	24±2	65, 000	85	13	1	Trombina, Xia, Ika, Xa, X11a.
C ¹ INHIBIDOR	24±3	104, 000	65	35	1	C ¹ S, Kalikrli- na, Plas- mina, Xia X11a.
ALFA ² MACROGLU- BULINA	260± 70	725, 000	92	8	4	Plasminó- genoacti- vado, Plas mina, Kali kreina.
ALFA ² ANTIPLAS- MINA	7±2	70, 000	87	13	1	Plasmina
INHIBIDOR DEL PLASMINO- GENO		80, 000				Plasminó

IV.- H E M O F I L I A "A"

ANTECEDENTES

Clásicamente se ha definido a la hemofilia A como una enfermedad hereditaria recesiva ligada al sexo, la cuál se presenta solamente en el hombre y es transmitida por mujeres portadoras que no manifiestan la enfermedad; es decir que no presentan procesos hemorrágicos.³⁶

La enfermedad se manifiesta 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 esta contenido en el cromosoma sexual.³⁶

La enfermedad se manifiesta en el sexo masculino (XY) y la mujer (XX) actúa como portadora y transmisora.

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

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 espontanea en algunas familias.

La deficiencia del factor VIII varia importantemente 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. Tabla no.3 9,47,60,102

TABLA No. 3 Clasificación de los grados de Hemofilia

s e v e r a :	actividad coagulante menor a 1 %
m o d e r a d a :	actividad del factor VIII entre 1 y 5 %
l e v e :	actividad del factor VIII entre 5 y 50 %

La hemofilia A se presenta con una frecuencia de 3 a 8 casos por 100,000 habitantes y constituye el defecto más importante y frecuente de las deficiencias hereditarias de los factores de la coagulación. En terminos específicos, la deficiencia del factor VIII, es llamada hemofilia A o clásica; y el tiempo que tarda en manifestarse en el individuo, puede ser temprana o tardía, según el grado de severidad que presente.^{9,23,48,60}

Los signos más comunmente observables en individuos que padecen este problema son los siguientes : hemorragias que pueden ser a nivel nasal, bucal, muscular, cerebral y principalmente a nivel de articulaciones ; estas últimas particularmente dejan en el individuo serias secuelas articulares.^{9,23,48}

Para el diagnóstico de la hemofilia, el médico se basa en una historia clínica cuidadosa, aunada a los estudios de laboratorio que comprenden tiempo de sangrado, cuenta de plaquetas, tiempo de tromboplastina parcial, tiempo de trombina, tiempo de protrombina y la cuantificación del factor VIII, estas pruebas de laboratorio son importantes ya que permitira confirmar y clasificar el tipo de hemofilia.^{9,23,48}

Para el tratamiento de la hemofilia se requiere un grupo multidisciplinario de especialistas en el que se incluye, un Hematólogo, Psiquiatra y Fisioterapeuta, entre otros y se pueda reunir, a manera de terapia sustitutiva, al plasma fresco congelado a los crioprecipitados o al factor VIII leofilizado.^{9,23,48}

IV.1 E S T R U C T U R A

durante las últimas 3 décadas se ha hecho intensa investigación de interés sobre la hemofilia clásica y la enfermedad de Von Willebrand, los dos desórdenes hemorrágicos más comunes.

Estos estudios han conducido a una mejor comprensión de la estructura y función del factor VIII.

El concepto de que el factor VIII tiene dos funciones biológicas distintas, actividad coagulante y un papel en la hemostasis primaria fué sugerida en principio como una explicación del defecto dual en la enfermedad de Von Willebrand. La interferencia lógica de que el factor VIII es una molécula bifuncional fué reforzada al reportarse que las proteínas purificadas de plasma humano y bovino tenían ambas la actividad procoagulante del factor VIII y la capacidad de interactuar con las plaquetas de tal forma que puedan reflejar un papel en vivo, en la hemostasis primaria.^{14,77}

Estudios subsecuentes han sugerido una interpretación alternativa, la cual es ya generalmente aceptada y postula, que el factor VIII un complejo de dos componentes que tienen funciones distintas al igual que las propiedades bioquímicas e inmunológicas y control genético. Las propiedades de esos componentes se resumen en la tabla cuatro y su formación se ilustra en la fig.^{9,66,67}

Un componente del complejo factor VIII/VW, tiene actividad procoagulante de factor antihemofílico se designa como VIII:c este es inactivado por anticuerpos humanos y puede medirse como VIII:CAg, cuando es usado para inmunoensayo.⁸⁰

El otro componente mayor, comprende la mayoría de la masa proteica, e interactua con las plaquetas de forma tal que promueve la hemostasis primaria y puede ser inmunoprecipitado por antisueros heterólogos.⁸⁰

Este generalmente se designa proteína emparentada con el factor VIII (o proteína relacionada con el factor VIII) (VIII:r) o factor Von Willebrand puesto que esta se encuentra reducida en cantidad o es cualitativamente anormal en la enfermedad de Von Willebrand.⁽⁸⁰⁾ Aunque se a sugerido que los dos componentes tienen propiedades de una molécula simple, varias series de datos ha demostrado las diferencias esenciales de las dos proteínas.

30,109

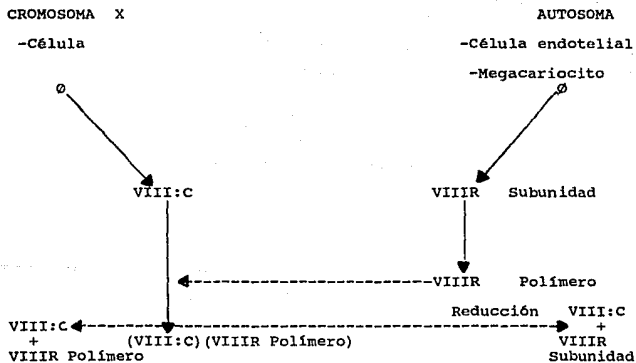


FIGURA 9 FORMACION DEL COMPLEJO FACTOR VIII

- VIII:C Proteína procoagulante factor VIII; factor antihe-
mofílico identificado como:
factor VIII procoagulante activo (VIII:C)
la propiedad procoagulante del plasma normal que
es medida en pruebas de coagulación estándar.
- VIII:CAg Determinante antigénico asociado estrechamente con
el VIII:C, medido por inmunoensayos con anticuerpos
humanos.
- VIII:RWF proteína ligada al factor VIII:
factor Von Willebrand
una proteína polimérica grande que es necesaria pa-
ra la adhesión normal de las plaquetas y tiempo de
sangrado in vivo.
- VIII R:Ag determinante antigénico del factor de Von Willebrand
detectado por anticuerpos heterólogos.
- VIII:RCo Cofactor de la ristocetina, actividad necesaria para
que la ristocetina induzca la aglutinación plaqueta-
ria.

Tabla no. 4

Nomenclatura para describir las diferentes propiedades del com-
plejo FVIII/vw

DIFERENCIAS DEL FACTOR VIII Y DEL FACTOR VIII:R VW

1.- la proteína procoagulante factor VIII y la proteína emparentada con el factor VIII son controladas por diferentes genes. La deficiencia aislada del VIII:C es característica de la hemofilia clásica, una enfermedad que transmitida por herencia ligada al cromosoma X. En contraste el VIII:R reducido o anormal se encuentra en la enfermedad de Von Willebrand y el patrón de herencia es el de un gen autosómico.¹⁰⁹

2.- Las dos proteínas pueden separarse por cromatografía o centrifugación en buffer de gran fuerza iónica (NaCl 1 m. o CaCl² 0.24 m).^{117,118}

En muchos estudios, la inclusión de proteasas inhibidoras en los buffers no afecta la separación.^{96,108}

3.- La concentración de las dos proteínas en el plasma, medida por función o métodos inmunológicos, varían independientemente bajo ciertas condiciones, lo más sorprendente es el periodo de postransfusión en pacientes con enfermedad de Von Willebrand.⁶⁶

4.- Las dos proteínas poseen diferentes determinantes antigénicos. El factor VIII procoagulante activo es inactivado por anticuerpos humanos de hemofílicos multitransfundidos y pacientes con inhibidores espontáneos; cofactor Ristocetina activo (VIII:RC) y el tiempo de sangrado son característicamente normales en estos pacientes. Cada una de las proteínas puede ser

medida por inmunoensayo debido a su independencia una de la otra.
64,75

En el anti VIII:C humano unido a sefarosa remueve el VIII:C y (VIII:C_{Ag}) del plasma, pero sin cambios en los niveles de VIII_RAg
121

5.- Las propiedades biológicas de las proteínas son independientes, la proteína procoagulante retiene todo el VIII:C activo en ausencia virtual de VIII:RVW (una VIII:C/VIII_R:Ag relación de 12,600:1) y la proteína relacionada con el factor VIII puede tener actividad de VIII_R:RC en ausencia de VIII:C detectable.^{113,118}

Los dos componentes del complejo factor VIII/VW interactúan, sin embargo, sus concentraciones varían bajo situaciones normales, de estrés y patológicas y los métodos de purificación estándar separan intacto (dos componentes) el complejo factor VIII/VW de otras proteínas plasmáticas.¹⁰

Esta interacción será considerada con más detalle después de la descripción de las propiedades de los dos componentes.

IV.2 Proteína procoagulante: factor VIII: factor antihemofílico

Propiedades Bioquímicas

Hasta el momento, existe poca información acerca de las propiedades bioquímicas de la proteína procoagulante factor VIII con pocas excepciones, los estudios de la función del VIII:C se han efectuado con el complejo factor VIII intacto y sólo recientemente la proteína procoagulante factor VIII ha sido caracterizado después de la separación del VIII:R al igual que de otras proteínas plasmáticas.^{64,113,114}

El VIII:C bovino ha sido purificado aproximadamente 300,000 veces del plasma por vehar y davie.¹¹⁴

Aunque las propiedades de filtración del gel G-200 de la proteína VIII:C activo sugirieron un peso molecular de 250,000 - 300,000,D el análisis electroforético en gel con dodecil sulfato de sodio/ urea-poliacrilamida identifico un triplete de bandas de proteínas con pesos moleculares de 85,000, 88,000 y 93,000. Las propiedades electroforéticas no cambiaron cuando el VIII:C fué reducido con 2- mercaptoetanol, pero el rompimiento proteolítico a pequeñas proteínas podría efectuarse por incubación con trombina, factor Xa purificado o proteína C activada, el VIIIC bovino purificado no posee actividad de agregante plaquetario.^{10,114}

Los anticuerpos para la proteína VIII:C elevados en conejos inhibieron el VIII:C procoagulante bovino activo pero no afecta-

ron la actividad agregante plaquetaria del plasma bovino. Esta observación sugiere fuertemente que la proteína coagulante es separada de la proteína responsable de la actividad agregante plaquetaria.^{10,114}

La proteína procoagulante factor VIII:C humana no fué purificada con homogenidad y puede ser difícil obtener el volumen necesario de plasma humano que tiene que ser colectado de manera que se reduzca la probabilidad de modificación del VIII:C in vitro.^{10,114}

Un problema mayor que resulto en la purificación del VIII:C es el pobre rendimiento con todos los metodos estandar. Por ejemplo, solamente 0.4 mg. De proteína VIII:C bovina ha sido obtenida por cada 125 litros colectados especialmente de plasma bobino, un VIII:C recobrado estimado de 1 %.^{10,114}

Estudios recientes del factor VIII:C separado del VIIIIRVW y otras proteínas plasmáticas humanas mediante una técnica inmunoabsorbente, para determinar las propiedades de factor VIII:C es la más aceptada.¹¹³

Mientras que este VIII:C no es estable en ausencia del suero bovino albumina o proteínas similares que previenen la perdida del VIII:C de soluciones muy diluidas, la preparación puede ser estudiada por 2 ensayos VIII:C funcional y mediciones de VIII:CAG para determinar las propiedades del VIII:C cuando se esta separando del VIIIIRVW.

Aunque es difícil explicar la posibilidad de que la proteína se

modificará durante la purificación, las proteasas inhibitoras estaban presentes durante el procedimiento y el VIII:C purificado tenía la misma razón de actividad funcional e inmunológica como el plasma del que esta fué separada.

El peso molecular, estimado para la proteína procoagulante factor VIII:C humano separada de esta manera es de 285,000 D. (64)

Este valor se calculo a partir de las propiedades del factor sobre la filtración en gel sephadex G - 200.

El factor VIII procoagulante activo no es inactivado cuando el complejo es incubado con agentes reductores, por ejemplo 2 - mercaptoetanol 0.05 M. Esta estabilidad fué notable cuando se comparo con la rápida pérdida del cofactor de ristocetina activo en el experimento.⁶⁴

Los grupos tiol intactos parecen tener un importante papel en la función del VIII:C y una variedad de tioles inhibidores, incluyendo el reactivo específico, ácido P-Cloromercuribenzoico, inactivan el VIII:C.⁴

Este factor también se ve afectado por el pH y la concentración de calcio. Es más estable entre pH 6.9 y pH 7.2 y es marcadamente menor por debajo de pH 6.9 y por encima de pH 8.⁴

El muy bajo contenido de VIII:C de plasmas tratados con EDTA y resinas de intercambio iónico indican que la concentración de cationes en plasma también es importante.

Aunque el VIII:C humano no ha sido purificado en cantidad suficiente para el análisis de carbohidratos, existen evidencias indirectas en ambos casos de que la molécula contiene residuos de carbohidratos.

La conconavalina -A- agarosa se une al VIII:C purificado y es eluido por el azúcar alfa-D glucopiaranosido.^{9,113,114}

El éxito limitado de la purificación del VIII:C, ha hecho necesario expresar el contenido en plasma de esta proteína tomando estándares de plasma humano colectado y almacenados de manera que se reduzca la probabilidad de activación o pérdida del VIII:C. Así todos los valores de VIII:C y VIII:CAg son medidos arbitrariamente como una relación. Aquello no tiene ninguna interpretación molecular hasta ahora.^{9,113,114}

Podemos, por su puesto, estimar la cantidad de proteína que corresponde a un nivel de plasma normal de 1 U/ml. A partir de las mediciones del complejo factor VIII/VW humano intacto y la proporción de proteína que representa el VIII:C, el valor es aproximado 50 Ng/u.^{30,109}

Puede obtenerse un valor similar para la actividad específica del VIII:C bovino aparentemente homogéneo (45,000 U/ug).¹¹⁴ Debe reconocerse sin embargo, que la concentración estimada en plasma, 222Ng/ml, es incorrecta si el VIII:C purificado incluye proteínas que pueden ser activadas o inactivadas.

IV.3 Propiedades Inmunológicas

El anti-VIII:C humano, obtenido de pacientes hemofílicos multi-transfundidos que desarrollaron inhibidores y de individuos, los cuales forman anticuerpos que inactivan el VIII:C no forman inmunoprecipitados con el VIII:C o el complejo del factor VIII/VW detectables. No obstante, ese suero puede usarse para detectar el determinante antigénico del VIII:C por ensayos de neutralización con anticuerpos y por ensayos inmunoradiométricos para el VIII:CAg más sensibles.^{75,86,101}

El inmunoanálisis del VIII:CAg requiere anti-VIII:C humano marcado radiactivamente que haya sido purificado mediante la preparación de complejos inmunes seguido por su separación y disolución a bajos ph.

Los anticuerpos han sido obtenidos de sueros con altos títulos (más de 1000 unidades Bethesda/ml). Se han obtenido resultados similares con otros dos métodos diferentes de análisis, separaciones en fase fluida y doble fase sólida.^{75,86,101}

La sensibilidad del análisis del VIII:CAg es de 0.01-0.03 U/ml en muchos laboratorios y el coeficiente de variación para ese análisis es 10 %.⁷⁵

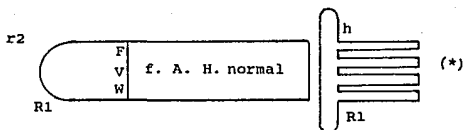
En general, existe una excelente correlación entre el factor VIII:CAg, el determinante del VIII:CAg es más estable que el VIII:C activo, sin embargo y esto es notable en el caso de sueros

en el que los valores de VIII:CAg son 60% - 80% de aquellos en el plasma correspondiente, aunque no existen niveles residuales de VIII:C activo.^{86,101}

Estudios efectuados con VIII:C purificado y alfa-trombina humana demostraron una dependencia menor de reactividad de VIII:CAg a bajas concentraciones de trombina del orden de 0.1 Nihu de trombina/ml - a 60% del valor original y cambios cualitativos en los determinantes del VIII:C expuestos a altas concentraciones de trombina.⁶⁴

Esos experimentos probablemente sobreestimaron el efecto de la trombina sobre el VIII:C puesto que fueron efectuados en sistemas purificados y las proteínas inhibitoras usuales del plasma no estaban presentes. Esta claro que la trombina tiene un efecto detectable sobre el VIII:CAg, pero que esta medida es mucho más estable que la actividad procoagulante.

Se cree que la molecula del factor VIII se puede representar con el siguiente esquema (5).^{86,88}



R1, r2, h = Determinantes antigénicos

f. V. W. = Factor Von Willebrand

f. A. H. = Factor antihemofílico

(*) = Sitio del factor VIII con actividad coagulante.

Esquema 5 molécula del factor VIII

IV.4 S I N T E S I S

Muy a pesar de muchos investigadores, el sitio de síntesis del VIII:C no es conocido, tanto los estudios de transplante y perfusión sugieren fuertemente que el VIII:C es producido por el sistema retículo endotelial.^{11,64,96,101}

Hay además datos que apoyan la hipótesis de que el factor VIII en su porción coagulante es sintetizado en el hígado, mientras que la función antigénica y de Von Willebrand se sintetiza en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.^{30,63,101}

Se tiene como un lugar de almacenaje de factor VIII al Bazo^{30,63} y se cree que el factor VIII antigénico forma en algún lugar un complejo con el factor VIII coagulante.^{30,63} Esos estudios efectuados, usando análisis procoagulantes estandar, no son definitivos, sin embargo, es importante verificar en un futuro esas observaciones con datos de inmunoanálisis y estudios de síntesis de proteínas.^{30,63}

Aun cuando existe la suposición que el hígado juega un papel importante en la producción de VIII:C en enfermedades hepáticas severas soporta fuertemente el concepto de que existe una fuente extra hepática de esta proteína. De cualquier manera, hasta el momento no se conoce el tipo de células responsables de la síntesis del VIII:C.^{30,63}

IV.5 F U N C I O N

Generalmente se esta de acuerdo en que el VIII:C acelera la coagulación sanguínea, y que juega un papel de cofactor en la activación enzimática del factor X por el factor IXa. En presencia de fosfolípidos y calcio, el VIII:C realza marcadamente esta reacción, en ausencia del factor IXa este no tiene la capacidad intrínseca de activar el factor X.^{12,83}

El VIII:C nativo puede no participar en esta reacción, sin embargo, el VIII:C activo es realizado cuando el plasma o concentrados de factor VIII son incubados con diluciones de trombina.^{12,88}

Es probable, que la activación de la trombina sea para el VIII:C activo.

Se asegura que la trombina activa el VIII:C mediante una modificación proteolítica y este efecto ya se ha demostrado. La incubación de trombina parece causar un rompimiento en cada una de las cadenas proteicas del VIII:C bovino, el VIII:C activado por trombina, tiene propiedades de filtración en gel y ultracentrifugación de una proteína de 116,000 daltons en contraste al valor de 285,000 calculado para la molécula inactiva.¹¹⁴

El factor VIII procoagulante activo es inactivado por concentraciones altas de trombina (o una exposición más prolongada a la enzima), además de notarse otros cambios en las propiedades de

filtración en gel de la proteína medida por VIII:CAg.(114) De tal forma que la trombina mediadora de la activación e inactivación esta asociada con modificaciones proteolíticas de la estructura del VIII:C.¹¹⁴

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 es imposible.^{12,75}

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 anticuagulante.^{12,75}

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.¹²

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 variados, se estudiarán exclusivamente aquellos inhibidores aparecidos en la hemofilia A.¹⁰¹

Se ha podido demostrar una predisposición genética en la aparición de inhibidores, concluyéndose que puede existir una tendencia familiar clara de reactividad inmunológica del factor VIII o a la expresión de genes que rigen una respuesta específica contra este factor.

Recientemente se ha clasificado a los enfermos hemofílicos con inhibidor en dos grupos.^{12,75}

- A) Enfermos de alta respuesta.
- 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, se confirmara si el paciente pertenece al grupo de enfermos de alta respuesta inmunológica que son pacientes cuyo tratamiento se complica gravemente, en cambio el grupo de enfermos con baja respuesta inmunológica puede beneficiarse con el tratamiento sustitutivo con el factor VIII.

En cuanto a las características y propiedades de los inhibidores del factor VIII se sabe poco, debido a que es un tema que esta aún en estudio sin embargo se sabe ya definitivamente algunas características de ellos, las cuales se resumen a continuación:^{12,75}

-Los inhibidores del factor VIII son específicos contra la actividad coagulante.

- Son IgG4 la mayoría y menos comunmente IgG3.

- La mayoría tiene cadenas ligeras tipo kappa, aunque una minoría presenta el tipo lamda.

- No fijan complemento.

- Son anticuerpos de tipo oligoclonales.

En cuanto a los complejos formados entre el inhibidor y el factor

VIII se sabe lo siguiente:

- son estables en un rango de ph 6.5 a 8.
- Son estables a temperaturas no mayores de 42 c.
- Pueden ser facilmente 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.
- 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.

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, los títulos de inhibidores que se han podido observar en poblaciones de hemofílico que los presentan, varían mucho, pues efectúan en el 0.5 a 20 unidades Bethesda/ml. 75, 86, 101

En 1974 en los Estados Unidos de Norteamérica y después de una reunión patrocinada por "The División of blood Diseases and resources of the National heart and lung Institute", se habló de lo difícil que resultaba entenderse entre los 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. Una unidad Bethesda es la cantidad de inhibidor suficiente y necesaria para dejar el 50% de actividad residual del factor VIII cuando se hace la mezcla de plasma y se incuban a 37° c. Durante 120 minutos.^{86,101}

IV.6 A S P E C T O S G E N E T I C O S

La deficiencia de factor VIII pasa de una a otra generación como carácter recesivo ligado al sexo.

En general la mujer es portadora, pero no presenta signos ni síntomas clínicos del trastorno.²³

Las posibilidades genéticas inherentes a este trastorno, y otros similares, se indican de preferencia mediante símbolos y esquemas, suele utilizarse para el varón XY, mientras que la hembra se domina XX.^{2,21,23}

Los genes específicos suelen señalarse mediante índices altos. Un gen dominante se indica con una letra mayúscula, un gen recesivo con una letra minúscula.

El gen anormal responsable de la deficiencia de factor VIII es recesivo y se indica con la letra minúscula h. El gen normal

dominante se denomina con una H.^{2,21,23}

Una mujer normal por lo tanto sería $X^H X^H$, la portadora sería $X^h X^H$, en el caso de la portadora la expresión dependerá de cual cromosoma X será funcional en las células somáticas.^{2,21,23}

La portadora no suele tener síntomas ya que la distribución al azar originaría por lo menos que el 50% de los cromosomas X, fueran X^H en las células somáticas.^{2,21,23}

El cromosoma Y del varón no lleva este gen, y no tiene H ni h. Que un niño varón sufra deficiencia del factor VIII, o no lo sufra, depende enteramente del carácter del cromosoma X que ha de recibir de la madre. Si la portadora femenina contribuye con el X^H normal a la descendencia, masculina el varón es normal. Pero si el cromosoma H aportado por la madre a su hijo varón, es el que lleva el gen anormal, habrá expresión patológica y existirá un gen normal H, capaz de suprimirla.^{2,23,37}

Los esquemas siguientes ilustran las posibilidades de heredar la alteración genética.

En cada caso el varón se indica con un rectángulo, la mujer con un círculo.

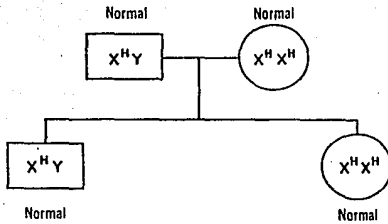


FIGURA (3) Representa una familia normal sin deficiencia de Factor VIII

En la figura (4) se representa la unión de un varón normal con una mujer portadora, que puede resultar en un varón hemofílico o una hembra portadora, y también en un hijo normal de cualquiera de los dos sexos. Por desgracia no hay manera de saber con seguridad si una mujer es o no es portadora, el carácter recesivo puede ser más o menos pronunciado, por supresión al azar del cromosoma X anormal.

Las mujeres portadoras pueden tener una actividad procoagulante normal o notoriamente disminuida.

Un nivel normal de factor VIII, no descarta el estado de portador, aunque un nivel muy bajo debería hacer pensar en la existencia del cromosoma anormal, recientemente se demostró, que las mujeres portadoras mostraban una discrepancia entre la cifra de actividad coagulante de factor VIII y el valor medio por ensayo inmunoquímico. Esta técnica permite identificar 90% de las mujeres portadoras.³⁷

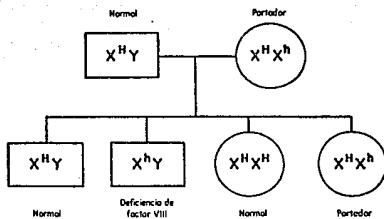


FIGURA 4 Unión de un varón normal con una mujer portadora

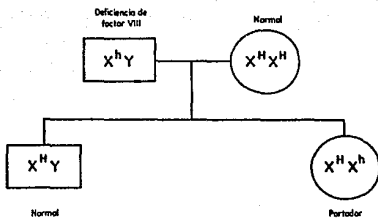


FIGURA 5 Indica los resultados de unión, de un varón con deficiencia de factor VIII con una mujer normal, todas las hijas normales deben ser portadoras ya que el único cromosoma X del varón es el que debe contribuir a llevar el gen anormal, por otra parte, ninguno de los hijos varones pueden tener hemofilia, ya que un varón sólo debe recibir el cromosoma X de la madre normal.

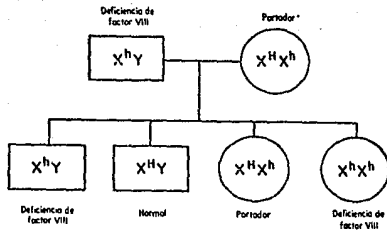


FIGURA 6 Se indican los resultados de la unión de un varón con deficiencia de factor VIII y una hembra portadora, durante años no se aceptaba la posibilidad de que una mujer pudiera sufrir deficiencia de factor VIII, pero actualmente ya se han presentado varios casos bien documentados de ello.

La hija de una unión como la señalada recibirá x^h del varón con deficiencia de factor VIII y el segundo x^h de la madre portadora.

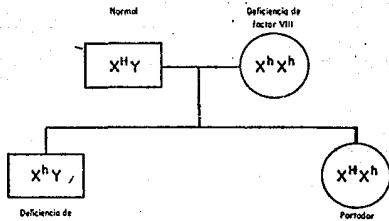


FIGURA 7 vemos el resultado de la unión de un varón normal con una mujer que sufre deficiencia de factor VIII. Todos los hijos varones recibirán X^h de la madre, mientras que todas las hijas recibirán X^H del padre además de X^h de la madre, por lo tanto, todos los varones tendrían deficiencia de factor VIII y todas las mujeres serían portadoras.

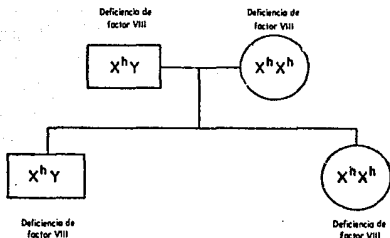


FIGURA 8 La unión de un hombre y una mujer, ambos con deficiencias del factor VIII posiblemente nunca se haya producido, todos los hijos de tal unión sufrirán deficiencia del factor VIII.

Como hay pacientes hemofílicos sin antecedentes familiares del trastorno, se piensa que el número de mutaciones ha de ser elevado.^{2,21}

Aunque el defecto en la hemofilia clásica se transmite como característica mendeliana recesiva ligada al sexo, está comprobado que por lo menos uno, y posiblemente dos Loci autosómicos intervienen en la producción de factor VIII.^{2,65}

En cualquiera de todos los casos se traduce en una deficiencia de una globulina procoagulante; el factor VIII humano, en ausencia de esta se perturba la primera fase de la coagulación, como las plaquetas y capilares no son afectados, el tiempo de sangría es normal mientras que el de la coagulación suele estar prolongado.^{2,65}

cuanto más intensa sea la deficiencia de factor VIII más grave será el problema hemorrágico. Suele observarse niveles de menos de 3 por 100 en pacientes sintomáticos, aunque puede observarse diatesis hemorrágica en pacientes con valores tan altos como el 20 por 100. Un estudio reciente parece indicar que las diferencias de comportamiento clínico podrían explicarse por variaciones de la función coagulante de las plaquetas, de un paciente a otro, conservándose un mismo nivel de actividad coagulante del factor VIII. La concentración de factor VIII en cada paciente es notablemente constante durante toda la vida.^{2,37,65}

IV.7 MANIFESTACIONES CLINICAS.

En general, el nivel de factor VIII, se correlaciona con la frecuencia de hemorragia clínicamente grave, sin embargo, la relación puede no ser tan fidedigna como la observación de que la gravedad de la hemorragia tiende a ser bastante similar en miembros de una familia dada. ³² La hemorragia es rara al nacimiento, incluso en el cordón umbilical, según la gravedad del feto, pueden aparecer hematomas del tejido blando durante la infancia temprana, pero sobrevienen más dificultades cuando el niño aumenta su actividad física. ^{19,87}

Es frecuente la hemorragia en las articulaciones de muñecas y manos, cerca de la mitad de los hemofílicos padecen hemorragias espontáneas graves en las articulaciones que a la postre terminan en deformidad e incapacidad. Tales pacientes tienen niveles de actividad de factor VIII inferiores a 5% de lo normal, por lo común menor del 1% de lo normal. ^{19,23}

El enfermo experimenta considerable dolor durante la hemorragia en las articulaciones, ya que la capsula articular se halla notablemente distendida y el movimiento está muy limitado. La presión erosiona o desgasta los extremos de los huesos largos y causa dolor perióstico, necrosis y formación de pseudoquistes.

A menudo hay hemorragia extensa con formación de hematoma en músculos y tejidos blandos. Puede comprobarse considerable pérdida de sangre en músculos del muslo o en el retroperitoneo pero la cantidad de sangre en estas áreas es a veces difícil de comprobar clínicamente y con frecuencia es subestimada. La hemorragia puede afectar casi cualquier región anatómica y dar lugar a signos y síntomas secundarios de menoscabo en la función de órganos de comprensión.

Las hemorragias nasales son raras, sin embargo, si hay sangrado, en la faringe o cuello pueden producirse, obstrucción de la vía aérea.^{19,87}

La hemorragia gastrointestinal plantea a veces problemas graves, ya que en algunos casos se debe a ulceraciones pépticas, en otros produce obstrucción intestinal parcial por hemorragia en la pared del intestino y en algunos pacientes con sangrado mesentérico ha conducido al desarrollo de isquemia y necrosis intestinal.
(19,32,87)

La hematuria puede presentarse en forma de cólico uretral causado por la pérdida de sangre, con la formación de coágulos que obstruyen el ureter. Son raros los hematomas subdurales y otras hemorragias del sistema nervioso central, que en ocasiones causan muerte o incapacidad.⁸⁷

Con mayor frecuencia, la hemorragia en el hemofílico aparece espontáneamente, y el enfermo no recuerda casi nunca si ha ocurri-

do traumatismo u otras causas provocadoras. Muchas veces se observan sangrados espontaneos durante periodos de stress como por ejemplo antes de los exámenes escolares o después de disgustos familiares.⁸⁷

Cuando la hemorragia sigue a un traumatismo puede ser detenida o demorada, ya que la hemostasia primaria que brindan vasos y plaquetas se halla intacta.^{19,87}

La cirugía mayor o menor, como extracciones dentales, puede producir perdida de sangre importante en el hemofilico y por tanto debe llevarse a cabo junto con la terapéutica sustitutiva de factor VIII.

Aún los pacientes con hemofilia leve, esto es, con niveles de factor VIII de 5 a 25%, pueden presentar hemorragia clínicamente importante durante la cirugía o traumatismos.²³

IV. 8 D I A G N O S T I C O

Cerca del 95% de las enfermedades hereditarias de la coagulación plasmática, se conocen como hemofilias, la hemofilia más común es secundaria, a la deficiencia del factor VIII de la coagulación: el caso de la hemofilia A o clásica, la coagulopatía más antigua que se conoce. La importancia de la hemofilia A se ejemplifica por su incidencia en la población general, aproximadamente 1 en 10,000. Como la enfermedad habitualmente sólo ocurre en varones, es posible que como mínimo se puede observar en 2 de cada 10,000 hombres.^{65,78}

La hemofilia A es una deficiencia determinada en la actividad coagulante del complejo macromolecular factor VIII/VW (VIII:C).⁷⁸

El diagnóstico de la hemofilia se basa en una historia clínica cuidadosa (pedeegre) aunada a pruebas de coagulación que comprenden tiempo de sangrado, cuenta de plaquetas, agregación plaquetaria, fragilidad capilar, tiempo de protrombina (t,p), y tiempo parcial de tromboplastina activado (T,T,Pa).¹

De estas pruebas la (TTPa) se encuentra prolongada y en ciertos casos el tiempo de sangrado, las restantes pruebas se encuentran normales.^{1,23}

Cuando se hace una investigación de escrutinio en la hemofilia A resulta necesario contar con alguna prueba simple y por lo tanto accesible que oriente hacia la deficiencia del factor coagulante, y que al mismo tiempo ese estudio pueda identificar a los anticoagulantes endógenos que tanto en forma hereditaria como adquirida se pueden encontrar asociados con la deficiencia del factor VIII.^{35,96}

Este es el caso de TTPa con diluciones en solución salina y las correcciones con plasma normal y además para que los resultados de estos casos con aparente hemofilia A se puedan interpretar correctamente, es necesario contar con la determinación del inhibidor específico de VIII:C pues cuando esa anomalía, resultado de las transfusiones, existe en un hemofílico, ocurren alteraciones cuantitativas y cualitativas de factor VIII:R:Ag que podrían hacer difícil su interpretación y llevar a un diagnóstico incorrecto de la enfermedad de Von Willebrand.^{79,93,94}

Por otra parte, también dentro de este estudio hay que tener en cuenta que algunos casos de hemofilia A pueden tener asociada otra deficiencia de la hemostasis, especialmente en la coagulación plasmática.⁸⁵ Por lo que en esos casos, para la correcta valoración de las causas de un TTPa prolongado con su patión de deficiencia.^{85,94}

Resulta necesario contar con la dosificación de la mayoría de los otros factores que determinan la actividad de esta prueba en la vía intrínseca de la coagulación, como se ha demostrado en multi-

ples estudios reportados en la literatura.^{78,85,94}

Otro estudio de coagulación que en la actualidad ha tomado cierta importancia es el tiempo de sangrado.²²

Los pacientes con hemofilia A no sangran de pequeñas heridas y el tiempo de sangrado en la hemofilia A se considera como normal.^{13,28} Estudios recientes han puntualizado sin embargo, que una prolongación definida puede ocurrir en mas del 20% de los hemofilicos.^{18,40}

sangrando en coyuntura y tejido blanco con frecuencia sin aparente trauma. Cuando el trauma ocurre, este con frecuencia dura varias horas después de haberse manifestado el sangrado, este alargamiento no es comprensible.^{16,169}

Si recordamos que la hemostasis se define como el cese espontaneo del sangrado de los vasos lesionados con un daño mínimo que involucra sólo a unas cuantas células endoteliales de pequeñas venulas o arteriolas, el defecto es cerrado efectivamente por la formación de un tapón de plaquetas. Este proceso llamado hemostasis primaria, es medido in vivo por el tiempo de sangrado y se dice que es normal en la hemofilia A.^{16,38}

El tiempo de sangrado ha sido definido como el tiempo entre la ejecución de una pequeña cortada estandar y el momento en que cesa el sangrado. Dos mecanismos se encuentran involucrados en la formación del tapón plaquetario que sella los vasos dañados.³⁸

El primero que depende del factor Von Willebrand plasmático, involucra la interacción de las plaquetas con el colágeno y la subsecuente degranulación con liberación de ADP.^{16,38}

El segundo involucra la agregación plaquetaria en presencia de fibrinógeno en respuesta al ADP y trazas de trombina producidas en el sitio del daño vascular. Se dice que el tiempo de sangrado es normal en los hemofílicos porque la adhesión y agregación plaquetarias en respuesta al ADP son normales, y porque el mecanismo que es iniciado por el factor tisular en ausencia de factor VIII coagulante activo puede generar aparentemente suficiente trombina para detener el sangrado proveniente del pequeño daño provocado para la prueba.¹²³

En 1910 se demostró claramente que el tiempo prolongado de sangrado se relacionaba con el número de plaquetas mas que con el tiempo de coagulación.³⁸ El encuentro que el tiempo de sangrado es normal en la hemofilia y en muchas otras anomalías de la coagulación con excepción de la fibrinogenemia y algunos casos graves de deficiencia de factor V.³⁸

En 1961 se reporto que el tiempo de sangrado fué normal en la totalidad de los 14 pacientes con hemofilia A severa estudiados por el, lo mismo que en los pacientes con otras deficiencias congénitas con excepción de la enfermedad de Von Willebrand.¹³

En 1969 se confirmó que el tiempo medido de sangrado era normal en la hemofilia, sin embargo, 2 de los 11 pacientes con hemofilia A severa tuvieron tiempos de sangrado de 12 y 15 minutos respectivamente prolongados.⁶⁹

En 1986, se estudiaron 63 hemofílicos los cuáles no recibieron fármacos esteroidales antiinflamatorios, el tiempo medio de sangrado de $7.65 + 3.20$ fue significativamente mayor que el grupo control de $5.35 + 1.49$, estudiados por métodos comparables ($p < 0.005$). Diez pacientes tuvieron tiempos de sangrado superiores a los 10 minutos con el promedio normal que es de 2.5 - 8 min.²² Hathaway mostro que el crioprecipitado y el factor VIII concentrado puede causar tiempos de sangrado prolongados y hemorragia paradójica en pacientes multitransfundidos.²²

Esas anormalidades fueron relacionadas ya sea a una función plaquetaria anormal o a un incremento en los niveles de monómeros de fibrina circulantes, productos de degradación de la fibrina o fibrinógeno interfiriendo con la reacción trombina fibrinogeno. Los monómeros de fibrina o sus productos de degradación no fueron medidos en estos pacientes. Sin embargo, las anormalidades descritas no fueron atribuidas a la transfusión, puesto que no se encontraron diferencias en los tiempos medios de sangrado de 28 pacientes los cuáles habían sido intensamente transfundidos y aquellos que no recibieron transfusiones en más de tres meses.⁶¹

Numerosas investigaciones han demostrado que la aspirina

incrementa el tiempo de sangrado en los individuos normales y en los hemofílicos.^{31,98}

Kaneshiro demostró que 10 de 19 hemofílicos tuvieron tiempos de sangrado marcadamente prolongados después de la administración de aspirina, 8 pacientes siguieron sangrando profusamente cuando terminó la prueba después de 40 minutos.⁶⁹

En un estudio posterior hecho por Kasper³⁵ observó las diferencias en el grado de prolongación del tiempo de sangrado por la aspirina y se pensó que los resultados consistentemente diferentes entre los pacientes se debían a los individuos más que a una respuesta diferente del mismo paciente en diferentes ocasiones.³⁵

La razón de la variación era desconocida, puesto que todos los pacientes mejoraron la agregación de manera similar con colágena sin una segunda ola de agregación con epinefrina.³⁵

Cuidadas historias farmacológicas obtenidas al momento del tiempo de sangrado fueron efectuadas haciendo un filtro confiable para excluir la aspirina y otros fármacos no esteroideos inflamatorios que se sabe dañan la función plaquetaria como una causa de los tiempos prolongados de sangrado en los pacientes.²²

Además cuando 9 pacientes con tiempos de sangrados superiores a los 10 minutos fueron estudiados con más detalle, se encontró que todos excepto dos tenían función plaquetaria normal.

Por otro lado, dos con anomalías moderadas tuvieron agregación normal frente al ácido araquidónico.²²

Estos hallazgos aunque inexplicables sugieren que esos dos pacientes pudieron tener un defecto relacionado con la liberación de ácido araquidónico posiblemente mediado por un factor plasmático. Se ha reportado que las enfermedades hepáticas prolongan el tiempo de sangrado.²²

Los pacientes con tiempo de sangrado prolongado tuvieron alanin transferasas en sueros normales, o muy cerca de lo normal, haciendo esto poco probable.²²

Se ha demostrado un tiempo de sangrado prolongado en 10 de 49 hemofílicos, los cuáles no habían recibido transfusiones en las últimas 72 horas.^{18,40}

Ninguno de esos pacientes mostro evidencias de enfermedad de Von Willebrand, al igual que los estudiados por b y m.²², lo cuál sugiere una bimodalidad que podría representar a un subgrupo de hemofílicos con un defecto inexplicable y hasta ahora no identificado en la hemostasis primaria.²²

Aunque la estandarización del tiempo de sangrado es difícil es poco probable que variables como las diferentes técnicas relacionadas con el sitio de punción cutánea, vascularidad o dirección o forma de la incisión contribuyan a la marcada prolongación del tiempo de sangrado en el 16% de los pacientes estudiados por by-

m²² y el 20% de los pacientes de Buchanan.

Algunos han dicho que el tiempo de sangrado es más prolongado con las incisiones transversales que con las verticales, sin embargo los datos publicados no sustentan esta aseveración, y Bowie¹⁶ encontro que, de 19 pruebas en 16 individuos normales, no hubo diferencias significativas entre las incisiones transversales y longitudinales excepto que la perdida de sangre era mayor después del corte longitudinal.^{16,79}

Cualquiera que sea la razón, el tiempo de sangrado no siempre es normal en la hemofilia A. Los pacientes con deficiencia en el factor VIII procoagulante y en un tiempo de sangrado prolongado no necesariamente tienen enfermedad de Von Willebrand o hemofilia en coexistencia con una función plaquetaria anormal. Esta observación tiene importantes aplicaciones diagnósticas.

IV.9.-METODOS INMUNOLOGICOS UTILES EN EL DIAGNOSTICO DE LA HEMOFILIA A O CLASICA

Aunque la baja concentración de factor VIII, en el plasma han impedido estudios bioquímicos en la hemofilia clásica, o A, las técnicas inmunológicas comenzaron por definir el defecto molecular. Esos estudios han intentado distinguir la baja producción del factor VIII normal de la síntesis de las proteínas no funcionales.

Pueden diferenciarse con claridad dos tipos de estudios inmunológicos.

El primero efectuado con anticuerpos humanos mediante la técnica de neutralización de anticuerpos, identificando proteínas no funcionales pero semejantes al AHF, mediante reacciones cruzadas antigénicamente en el 10% de los plasmas hemofílicos.^{34,43,64}

Los plasmas fueron designados material de reacción cruzada positiva (CRM+), conociéndose ahora que tiene niveles normales de VIII:CAG mientras que el VIII:C es muy bajo (2%-10%).

Posteriormente se demostró que el VIIIIR purificado a partir de plasmas hemofílicos no puede ser distinguido del VIIIIR normal por métodos bioquímicos estándar.²⁶

Así las mediciones del VIIIIR:Ag pueden usarse como una prueba para distinguir a la hemofilia de muchas formas de la enfermedad de Von Willebrand, pero no para proporcionar información alguna

Acerca de la naturaleza de la hemofilia. Aquella mide el producto de un gen (autosómico) diferente.

El estudio inmunológico de la hemofilia es posible sin embargo, puesto que el anti VIII:C humano ha sido usado en análisis inmunoradiométricos cuantitativos para los determinantes antigenicos del VIII:C.^{75,82}

Inmediatamente después, inmunoanálisis con antisuero de conejo para el factor VIII humano. Esos estudios identificaron (mediante mediciones cuantitativas de inmunoprecipitación) niveles normales de proteína ligada al factor VIII, en todos los plasmas hemofílicos.¹²

Además todos los plasmas hemofílicos neutralizaron las propiedades inactivantes del VIII:C de este antisuero de conejo. Los plasmas de los pacientes con enfermedad de Von Willebrand severa no formaron inmunoprecipitados ni neutralizaron el anti VIII:C activo.^{64,82} Esos y otros estudios efectuados con antisueros heterólogos, condujeron al concepto de que el material no funcional que efectúa reacciones cruzadas inmunológicas esta presente en todos los plasmas hemofílicos.^{64,121} Hasta ahora se reconoce que los ensayos utilizando antisueros heterólogos ya se han efectuado por inmunoprecipitación, hemaglutinación o radioinmunoanálisis, detectan el VIII:Rag, no antígenos relacionados con la función de VIII:C así ellos no demuestran un complejo valor VIII intacto en la inestabilidad del VIII.C

humano, ha sido el mayor obstaculo, tanto para el análisis de rutina de las muestras de sangre como para el diagnóstico diferencial de desórdenes hemorrágicos, al igual que para los estudios de la relación del VIII:C con el complejo molecular factor VIII/VW.

Recientemente, ha sido desarrollado el análisis inmunoradiométrico en fase sólida (Holmerg 1979,⁶³ Peake 1979⁸²) y en fase líquida (Labarchinck y Hoyer¹, 1978, Reisner 1979⁹⁹). En ambas técnicas, son adicionados anticuerpos frios y marcados al antígeno en dos pasos distintos; indicando así que deben existir al menos dos sitios distintos de interacción sobre el factor VIII:C. El análisis inmunoradiométrico del VIII:CAg asegura el uso de anticuerpos anti-VIII:C inmunoabsorbidos. La purificación de tales anticuerpos ha sido impedida por su baja concentración en plasma comparada con la de IgG en el interior. Como resultado, sólo altos títulos de anticuerpos (más de 500 U/ml) de hemofílicos de alta respuesta o inhibidores espontaneos han sido usados como material de prueba, ya sea como IgG o fragmentos de FaB.^{75,77}

En este trabajo comparamos los resultados obtenidos recientemente en estudios de VIII:CAg por IRMA usando ya sea IgG o fragmentos de FaB para cuatro anticuerpos de hemofilia A con un bajo título (100 y 150 U/ml) o un alto título (1000 y 1500 U/ml) de inhibidor.⁷⁵

La máxima recuperación de anti-VIII:C IgG específico fué

alcanzado después de la disociación del complejo inmune A ph 2 o 2.5. No se observaron diferencias significativas entre 1 procedimientos en fase líquida y sólida para la purificación de IgG. 63,75,82,99

El desarrollo de IRMA con tales IgG específicas fué encontrado que era altamente del título de anticuerpos empleados. Con ambos títulos elevados (1000 y 1500 U/ml) de IgG, se obtuvieron curvas dosis respuestas satisfactorias. Este análisis permitió la estimación de los niveles de VIII:CAg, inferiores a 0.2 U/dl; tal sensibilidad esta en buena correlación con lo reportado previamente (Holbmborg, 1979⁶⁹) con los dos títulos bajos (100 150 U/ml) de IgG, no pudo montarse un IRMA satisfactorio para el VIII:CAg debido a que los valores de reactividad máxima de la muestra y el blanco estuvieron muy cercanos. En este tipo de análisis, el parametro crítico parece ser el título de anticuerpo marcado inmunoabsorbido adicionado en el segundo paso; sustituyendo un anticuerpo no purificado por otro en el primer paso no se obtiene modificación alguna de los datos. La purificación de los anticuerpos específicos es entonces el factor limitante debido a la posible contaminación con IgG, no específica marcada o un antígeno no disociado específico marcado lo que podría interferir con IRMA, dando cada uno una radiactividad unida máxima o altos valores en el blanco.^{63,182}

El desarrollo de IRMA del VIII:CAg, se mejoro notablemente con el uso de fragmentos de FaB en el lugar de IgG. Contrario a los

resultados obtenidos con IgG. Los parametros de la curva usando títulos bajos de fragmentos específicos de FaB fueron distinguibles de aquellos donde se emplearon títulos altos.⁷⁵

Esto es entonces de mayor interes práctico que los bajos títulos (100 U/ml) de anticuerpos que pueden ser usados para este análisis puesto que es bien sabido que los títulos elevados son extremadamente raros y por consiguiente no muy disponibles. Otra ventaja del uso de fragmentos FaB en lugar de IgG, es la alta sensibilidad del ensayo permitiendo la medición de niveles de VIII:CAg, 10 veces más bajos (0.02 U/dl) que cuando se usa IgG (0.2 U/dl).⁷⁵

La sensibilidad del análisis usando fragmentos FaB, parece ser más alta que la reportada con anterioridad por Lazarchick y Hoyer⁷⁵, 1978, Peak y Bloom¹¹, 1978, Holmberg⁶³, 1979, Reisner⁹⁹, 1979, en controles y pacientes con hemofilia media se obtuvieron valores similares de VIII:CAg, usando ya sea IgG, o fragmentos de FaB.^{63,75,82,99}

La especificidad, título y afinidad, son los parametros más importantes para caracterizar los anticuerpos. Aunque la especificidad de todos los anticuerpos anti-VIII:C, parece ser identica con los metodos disponibles hasta ahora, su afinidad

probablemente varíe de un anticuerpo a otro o de una muestra a otra en un individuo dado. Los resultados usando una modificación del IRMA para estudiar las curvas de desplazamiento como medida de la afinidad indican que no existe una relación clara entre el título de neutralización del VIII:C, de los anticuerpos y su afinidad por el antígeno del VIII:C.⁷⁵

No existe también relación entre el título de neutralización y la concentración de anticuerpo en mg de IgG. Esto podría favorecer la existencia de al menos dos grupos de anticuerpos anti-VIII:C, un grupo dirigido contra un sitio activo expresado por el título del anticuerpo que da como resultado la neutralización de la actividad coagulante, el segundo dirigido contra la parte restante de la molécula de VIII:C, e interfiriendo principalmente con el análisis del VIII:CAg por IRMA.⁷⁵

La estimación de VIII:CAg, en la hemofilia A, en comparación con el VIII:C, soporta la heterogenicidad de este desorden fácilmente demostrable por el ensayo inhibidor de neutralización (Denson, 1969,³⁴ Hoyer, 1968,⁶⁴ Mayer y Larrieu, 1971,⁷⁷). En plasma normal, los niveles de VIII:C y VIII:CAg, están en íntima relación según se ha reportado. En la hemofilia severa todos los casos a excepción de uno al parecer carecían de ambos VIII:C, y VIII:CAg, es decir, tenían niveles por debajo de la sensibilidad del método de análisis (1 U/dl para VIII:C, 0.02 U/dl para VIII:CAg) tales casos, correspondientes a pacientes con hemofilia A son fácilmente identificados mediante el análisis inhibitorio

de neutralización, observándose relación con la falta de síntesis de proteína VIII:C. Un paciente con hemofilia severa estaba exento de VIII:C, pero contenía 8 U/dl de VIII:CAg, semejante discrepancia ha sido reportada por IRMA en tres de 9 hemofílicos según Lazarchik y Hoyer, (1978⁷⁵) uno de siete por Reisner (1979⁸²), y cuatro de 16 por Peak(1979⁹⁹).

Aunque los niveles de VIII:CAg, nunca han excedido las 8 U/dl en esos pacientes, puede ser detectable el VIII:CAg, en ausencia de VIII:C representando esto un posible riesgo de error en el diagnóstico prenatal de la hemofilia A severa (Peak, 1979⁴³; Firshein, 1979⁸²). La demostración de VIII:CAg, en sólo un pequeño número de hemofílicos severos contrasta con otros estudios usando el análisis inhebitorio de neutralización, mostrando la presencia de VIII:C, ligado a material en todos los casos (Bigs 1974⁸; Zimerman, 1977^{16,121}).

La heterogenicidad de la hemofilia A es más estricta entre los casos medios. En la mayoría de los pacientes los niveles de VIII:CAg están reducidos en la misma proporción que los de VIII:C o ligeramente superiores.

Este grupo podría estar relacionado con una anomalía cuantitativa, con una síntesis disminuida de una molécula de VIII:C aparentemente normal.

En unos cuantos casos, el VIII:CAg no se detecta frente a testigos, tales casos sólo han sido reportados cuando se usan ambos, IRMA (Peak 1979⁹⁹; Holmberg 1979⁶³). Esta discrepancia la

cuál necesita ser confirmada en un gran número de pacientes, podría estar relacionada ya sea con la sensibilidad limitada de IRMA en dos pasos, o con la presencia de una molécula anormal, no reaccionante con los anticuerpos usuales.

DETECCION DE PORTADORES PARA LA HEMOFILIA A POR EL METODO
INMUNOADSORBENTE

(E L I S A)

Una alta proporción de las portadoras de hemofilia clásica pueden ser identificadas en el laboratorio puesto que, en comparación con las mujeres normales, la concentración de antígeno, emparentados con el factor hemofílico (Ahf, factor VIII) que es detectada en su plasma mediante antisueros heterólogos específicos (factor VIII:R:Ag) es relativamente mayor que el título de AHF que es medido en los ensayos de cicatrización (factor VIII:C).^{63,75}

Recientemente, el análisis inmunoabsorbente unido a con enzimas (ELISA) ha sido introducido para medir los antígenos ligados al factor AHF (factor VIII:R:Ag). Los principios básicos de ELISA son similares a los de radioinmunoanálisis.^{63,75}

Los antisueros heterólogos frente a AHF son absorbidos sobre la superficie de una placa microtituladora. El antisuero excedente es retirado lavándolo y se adiciona una dilución de plasma a probar. El AHF presente en la muestra se adhiere específicamente al anticuerpo de la fase sólida absorbida sobre la superficie.

Después de la incubación de la muestra problema, se lava nuevamente y se adiciona una solución conteniendo antisuero heterólogo frente a AHF, marcado con fosfata alcalina. Después del periodo de incubación se lava nuevamente y se adiciona una dilución de sustrato fosfatasa alcalina.^{75,100}

La actividad de fosfatasa alcalina, medida colorimétricamente, es una función de la concentración del AHF, en la muestra problema.

Desde su introducción por Engval y Pelamann en 1971^{75,100}, ELISA se ha difundido ampliamente. Las modificaciones de los principios básicos han sido aplicados a análisis determinantes tales como títulos de anticuerpos virales, anticuerpos resultantes de la infección con malaria, insulina, tirotroprina, y títulos de factor reumatoide, la detección del antígeno del virus de la hepatitis (a) al igual que el anticuerpo, el antígeno de superficie de la hepatitis (b) y el antígeno de la hepatitis (e).

Recientemente ELISA ha sido usado por varios autores para la determinación del antígeno emparentado con el AHF, (factor VIII:Ag).^{100,122}

Los resultados más importantes para la detección de portadores de hemofilia A a que han llegado tales autores utilizando ELISA, usando antisueros heterólogos dirigidos frente a AHF, Bartlett, "Desarrollo un ELISA no competitivo para el antígeno emparentado con el AHF". Ocho portadores obligados de hemofilia clásica, diez hemofílicos, 30 individuos con enfermedad de Von

Willebrand y 20 individuos normales fueron estudiados. Se midió el antígeno relacionado con el AHF, con la técnica modificada de Laurell y con ELISA. En general la correlación entre los resultados de las dos técnicas fué buena. En algunas determinaciones, sin embargo el error se aproximó al 100%, quizá relacionado con las dificultades encontradas cuando se midieron bajos niveles de antígenos relacionado con el AHF, en individuos con enfermedad de Von Willebrand, usando la técnica modificada de Laurell.⁷³

Yorde⁷³, desarrolló un método de ELISA, competitivo para el antígeno relacionado con el AHF. En un estudio de 33 donadores normales. El ensayo demostró ser reproducible y sensible hasta 0.05 U/ml.

Ness⁷⁴, usando técnicas competitivas similares, correlacionó los niveles de antígeno emparentado con AHF, obtenidos mediante la técnica modificada de Laurell, con aquellos obtenidos por el método enzimático similar a los resultados de Yorde, el ensayo fué simple de efectuar, reproducible y tan sensible como el método modificado de Laurell.^{73,74}

Recientemente B. David usando una pequeña modificación de la técnica de Bartlett, identificó el portador para la hemofilia clásica en el total de 37 acarreadores obligados de esta enfermedad a un nivel de 5% de incertidumbre de los sujetos control normales (es decir, un nivel de certidumbre del 95%).

Compararon los resultados obtenidos para el antígeno relacionado con el AHF, con los resultados que se obtuvieron usando la técnica modificada de Laurell.¹⁰⁰

El examen de varios grupos de individuos con y sin desórdenes de AHF, (excluyendo a aquellos con enfermedad de Von Willebrand) reveló una excelente correlación (n=123) de 0.871. La comparación de ambas técnicas de análisis utilizando la prueba de T de Student para datos apareados reveló una diferencia significativa en la medida geométrica de todos los grupos excepto los portadores obligados. La técnica modificada de Laurell, generalmente proporciona valores ligeramente mayores a los obtenidos por ELISA.

Promediado esto, 67% en los 123 sujetos probados.⁷³

Los resultados obtenidos de individuos con enfermedad de Von Willebrand, fueron excluidos en el cálculo de los coeficientes de correlación debido a las dificultades ya conocidas, particularmente cuando se analizaron títulos de antígeno relacionado con el AHF, menores de 0.15 U/ml.

En 14 individuos probados usando la técnica modificada de Laurell, los valores no pudieron ser obtenidos en la mayoría. En contraste, el método de ELISA, dio resultados interpretables en la mayoría de los individuos probados. En el presente estudio los intervalos de confianza para el método ELISA fueron algunas veces menores que en el método modificado de Laurell, basado en 118

pruebas aplicadas, ELISA también proporciono datos más consistentes, con una coeficiencia de variación de +- 7.6% en contraste al de la técnica modificada de Laurell el cual es aproximadamente +- 12%.⁷³

El examen de los valores obtenidos en los individuos normales demostró que esos no se distribuyen en una fase variable normal cuando tales datos fueron transformados a logaritmos. Esta anormalidad se debio a la inclusión de individuos aparentemente normales en aquellos con actividad procoagulante para identificar el acarreador de la hemofilia clásica con el de la técnica modificada de Laurell, usando el ELISA, identificaron el total de los 37 acarreadores obligados con un nivel de incertidumbre del 5% de las mujeres normales portadoras. La capacidad para detectar portadores fué del 95% (35 de 37) a un nivel de confianza del 1% de las mujeres normales.^{73,100,101}

Así la detección de portadores para la hemofilia clásica puede ser conducida con relativa facilidad mediante el uso de ELISA.^{73,100,101}

Indudablemente, las separación de un 100% de las mujeres normales de las portadoras no se alcanzará nunca con el presente metodo disponible porque el fenómeno de lyonización mediante el que ocurre la inactivación fortuita del cromosoma X, en cada una de las células somáticas de la mujer desarrollada en la fase embrionaria.^{73,100,101}

**IV.10 APLICACION DE LA GENETICA MOLECULAR AL DIAGNOSTICO PRENATAL
Y LA DETECCION DE PORTADORES EN LA HEMOFILIA (A)**

Se han efectuado numerosos esfuerzos durante los pasados 20 años en el desarrollo de métodos para el diagnóstico exacto de la hemofilia A. Se ha dado especial atención al diagnóstico prenatal de varones hemofílicos y la detección postnatal de mujeres portadoras.^{44,67} El perfeccionamiento de los métodos inmunológicos, ha recibido alta prioridad. A causa de los varios refinamientos de laboratorio y de la técnica estadística, el margen de error en el diagnóstico de hemofilia en varones es menor del 1%, y el margen de error en la detección de portadores es probablemente menor al 10.7%. Una limitación básica de esos métodos consiste en que examinan el fenotipo (sangre) además del genotipo (DNA).^{44,67,83}

En la práctica, este es menos adecuado que el diagnóstico prenatal no pudiendo ser detectado sino hasta alrededor de la 16ava semana de gestación cuando el feto es lo suficientemente grande como para proporcionar una muestra de sangre, y en que la detección del portador esta a los caprichos de la "Lyonización". El nuevo método basado en el (DNA) promete mitigar ambos problemas. Durante la decada pasada, la aplicación de la biología molecular al estudio de la enfermedad hereditaria ha producido un diluvio de artículos.

No es sorprendente, que una proporción hayan tratado con globina,

la proteína de la genética molecular humana y un tópicos que ha sido hábilmente revisado muchas veces.^{24,106}

Los estudios moleculares de la hemofilia A también ha progresado. Recientemente dos compañías biotecnológicas han reportado la aislación independiente de el gen del factor VIII:C, el cuál ha sido clonado, caracterizado y expresado en cultivos de células de mamíferos.¹¹²

Este gen ha sido señalado en el brazo largo del cromosoma humano en el Xq24-qTer, el cuál tiene una longitud de 186 Kb, y contiene 26 exones, codifica una proteína de 2351 aminoácidos con una masa molecular relativa de 267,039D.

Varias publicaciones recientes han mostrado claramente que el diagnóstico prenatal y la detección de portadores por métodos que involucre el DNA son muy factibles en la hemofilia A.^{27,49}

Los autores naturalmente han apresurado los sucesos y las posibilidades de nuevas técnicas que tiendan a comprender sus limitaciones. Esto puede llevar a concluir que los métodos primitivos estan en inminente peligro de desaparecer.

Un grupo de médicos y científicos en Londres reportaron en julio de 1984 que podrian distinguir a los hijos hemofilicos y normales de una madre portadora usando métodos que involucran al DNA. La madre era doblemente heterocigota para la hemofilia A y para el Dx13, una restricción de polimorfismo enzimático y extragenético

del BgI II la cuál esta intimamente ligada al Locus del f.VIII sobre el cromosoma x (el papel biológico del Dx13 es completamente desconocido).⁵⁹

O B S E R V A C I O N E S

- 1) Los meritos relativos de los marcadores genéticos intragénicos y extragénicos.
- 2) La frecuencia esperada del uso de combinaciones genéticas, cuando existen marcadores genéticos del DNA adecuados.
- 3) Complicaciones del desequilibrio de unión.
- 4) Algunos problemas prácticos del diagnóstico.

Los marcadores polimórficos del DNA se basan en la mayoría de los casos en la presencia o ausencia de un sitio de reconocimiento en el DNA para la asociación del corte de una restricción enzimática bacteriana. Este sitio es siempre el sitio medio de una secuencia de tres. Los otros sitios estan siempre presentes y la presencia o ausencia del reconocimiento del sitio medio determina el tamaño de los fragmentos (restricción del polimorfismo en la logitud del fragmento, RFLPs) que son reconocidos por una prueba hibridizante específica.^{27,49}

Los sitios de restricción estan distribuidos en poblaciones de acuerdo con las reglas de la genética de poblaciones, sobre cruzamiento, mutación, eslabonamiento y conforme a la ley de Hardy-Weimberg y a las reglas del equilibrio de unión.²⁰

La detección de un polimorfismo en el DNA, normalmente se encuentra por el método de Southern.¹⁰⁵ Esta técnica requiere una

prueba adecuada, es decir un fragmento de DNA, que hidrolice al DNA, en la vecindad del sitio de reconocimiento, existen tres tipos de pruebas:

- 1.- Fragmentación DNA, al azar, los cuales no esten separados sino ligados al gen de la enfermedad de interes;
- 2.- Fragmentos subclonados del gen de interés ya aislados; y
- 3.- Pequeños oligometros sinteticos de DNA, que puedan reconocer diferencias tan pequeñas como un par de bases simples entre dos secuencias de DNA, tales oligonucleotidos pueden ser usados algunas veces en una afección similiar cuando la lesión ha sido definida con exactitud.

La primera prueba detecta los marcadores polimorficos extragenicos, la segunda detecta los marcadores intragénicos, y la tercera detecta la mutación en si.¹⁰⁵

Al igual que con el diagnóstico prenatal convencional y los procedimientos de detección de portadores, los tres métodos requieren del estudio de los miembros familiares, lo cuál es un requisito indispensable.

Un marcador intragénico es mas aconsejable para su uso que un extragénico por las diferencias en las frecuencias de entrecruzamiento, la medida convencional de la distancia en genética.²⁰

La teoria convencional de recombinación implica que la velocidad de sobrecruzamiento entre dos genes, o un gen y un sitio de reconocimiento se incrementa con la distancia que los separa, y que la recombinación entre un gen o un sitio de restricción seria esencialmente nula cuando el marcador se confunde con el gen.

La no frecuencia del sobrecruzamiento intragénico puede apreciarse considerando que una frecuencia de recombinación de 0.01% de sobrecruzamiento es recomendable para un promedio de alrededor de 1000 kilobases (Kb) de DNA, en humanos.²⁰

En las proximidades del centro del gen a 35-Kb. Cualquier cambio mutacional en el gen F.IX conduce a una hemofilia B que debe estar aproximadamente a 17Kb de este marcador, y la mayor parte debe estar dentro de 10Kb. Una distancia de 10Kb, podría trasladarse a una frecuencia de sobrecruzamiento de alrededor de 0.0001 (10/1000x0.01). El seguimiento del gen de la hemofilia B con este polimorfismo TAQ I, entonces, produce un resultado esencialmente no probabilístico.¹¹⁹

Cuando una mutación para la hemofilia B tiene lugar, sobre el cromosoma que tiene el sitio de restricción TAQ I, mencionado arriba, los dos se asociaron por muchas generaciones, quizás hasta que la mutación de la hemofilia se extinga y si ocurre una mutación sobre el cromosoma unido a un sitio TAQ I, la situación opuesta es factible.¹¹⁹

Es posible esperar que la relación específica sea constante semejante al polimorfismo intragenético que es muy valioso en la detección de portadores y el diagnóstico prenatal.

Cuando el gen codifica un producto de interés que ha sido clonado una investigación para el polimorfismo intragenético sería de alta

prioridad.

Sin embargo cuando el gen no ha sido clonado como es el caso de la enfermedad de Huntington⁵⁴, y la distrofia muscular de Duchenne⁵⁸ esto no es posible, los marcadores extragénicos unidos a distancias de 10 o más Centimorgans (10000 Kb) de un gen de interés puede algunas veces ser muy común, por ejemplo en la enfermedad de Duchenne. Cuando solamente esta disponible un marcador extragénico ligado, su utilidad dependerá de la tensión de la unión. Las respuestas obtenidas son probabilísticas siempre que sea usado un marcador extragénico, ya que el marcador es un polimorfismo del DNA, o uno de otro tipo. Si la frecuencia de recombinación (porcentaje de sobre cruzamiento) entre un gen mutante y un polimorfismo del DNA, excedente el margen de error de un procedimiento de diagnóstico diferente, el valor del polimorfismo del DNA, se reduce apreciablemente, un ejemplo podría ser la situación de la distancia de unión entre el Dx13, y la hemofilia A, descrita por Harper y sus colaboradores⁵⁹, puede exeder el margen de error de los primeros métodos de bioensayo, el cuál para el diagnóstico prenatal es esencialmente cero.

Hasta el momento, el diagnóstico prenatal de métodos basados en el DNA es igualmente bueno para la hemofilia A y B, han sido encontrados tres polimorfismos intragénicos en el factor IX, mientras sólo un polimorfismo común simple en el muy largo gen factor VIII, encontrado por un grupo después de una investigación intensiva en 37 restricciones enzimáticas. El pequeño

número de polimorfismos en el gen factor VIII fué inesperado, debido a su longitud; 186 Kb y 35 Kb para el gen factor IX y 70 Kb para el grupo de genes de las beta globinas.^{24,49,119}

Recientemente, un segundo grupo ha confirmado la naturaleza "hipopolimorfica" del gen f. VIII al descubrir sólo un polimorfismo común adicional después de un análisis de 19 mujeres normales (38 x cromosomas) usando 18 enzimas y ocho pruebas.²

La utilidad de un marcador genético, intragénico o extragénico, depende de otras consideraciones genéticas como la distancia de unión. Por su puesto, la madre la cuál es heterocigota para un gen de la hemofilia debe también ser heterocigota para el marcador polimorfo. La relación Hardy Weinberg explica, sin embargo que cuando la frecuencia de dos alelos es igual ($p = q = 0.5$), la heterocigocidad ($2pq$) es sólo del 50%. Así de acuerdo con las más favorables relación alelica (50 : 50) un polimorfismo intragénico simple será de utilidad al 50 : 50.²

Las relaciones alelicas de 70:30 y 80:20 son frecuencia menos utilizadas que las relaciona 50 : 50 pero teniendo más de dos alelos por marcador de DNA, como en el sistema HLA, seria muy ventajoso.^{2,51,89}

Una prueba extragénica ST14, estrechamente ligada al f.VIII ha demostrado tener al menos 14 alelos.^{51,89}

Presumiblemente, el polimorfismo es del tipo suspensión-inserción

más que una restricción del sitio enzimático, puesto que ocho de los alelos son reconocidos con el código TAq I y seis en el código MspI. La prueba ST14, entonces, posee mucho del poder discriminante genético de los tipos HLA y puede ser de importancia en futuros estudios genéticos de la hemofilia A.²⁰ Sigue sin establecerse como es que los alelos ST14 están permanentemente fijados y heredados en una fase mendeliana.

Se ha sugerido que el uso de métodos que involucran el DNA deberían mejorarse para describir varios polimorfismos dentro de un gen de interés.

Esta es una idea atractiva, pero existen varios problemas, polimorfismos adicionales que pueden ser algunas veces poco frecuentes, como en el ejemplo del f.VIII mencionado anteriormente.

Además puede demostrarse matemáticamente, que si existen dos polimorfismos intragénicos independientes, cada uno con una relación alelica de 50 : 50, la heterocidad para uno u otro o ambos, estará presente en sólo el 75% de las veces (la frecuencia será del 87.5% para tres y del 93.75% para cuatro polimorfismos). El análisis detallado del grupo de genes para la globina ha indicado que este polimorfismo íntimamente ligado no es independiente, pero está en unión (o Halotipo) desequilibrada.^{2,70} El enorme tamaño de los genes de la hemofilia sugiere que muchos polimorfismos podrían estar presentes y que la unión desequilibrada puede no ser un problema. Sin embargo, la experiencia con el hipopolimorfismo del f.VIII dan la pausa.^{2,51}

La unión desequilibrada ha ganado gran interés en la genética molecular en años recientes. Esta es detectada cuando ciertas combinaciones de alelos unidos a dos o más lugares (haplotipos) han sido asociados más frecuentemente que la frecuencia al azar precedida para la frecuencia de los genes. Los tres polimorfismos intragénicos del f.IX se ha encontrado que están en unión desequilibrada tal y como se había esperado, y los autores han estimado que la probabilidad de que la madre sea heterocigota para cualquiera de uno de los tres polimorfismos es solamente del 66%.¹¹⁹

El fenómeno de unión desequilibrada puede comprenderse intuitivamente, y el porcentaje de cambio hacia el equilibrio debido al sobrecruzamiento puede estimarse matemáticamente. La teoría del sobrecruzamiento se basa en un modelo derivado de la citogenética y la crianza de plantas y animales y si dos marcadores genéticos están estrechamente ligados, la intuición sugiere que el frecuente sobrecruzamiento será eventualmente fortuito en ambas formas de un polimorfismo con ambas formas de otro.¹¹⁹

Eventualmente los cuatro haplotipos (++),(+-),(-+),(--)) estarán presentes en frecuencias proporcionales a las frecuencias de los genes, y la condición de unión desequilibrada será alcanzada.²⁰

Sin embargo, cuando los sitios están muy próximos y el sobrecruzamiento es muy raro, como cuando ambos sitios son intragénicos, la velocidad de cambio hacia la unión en desequilibrio debida al sobrecruzamiento puede ser muy lenta. A partir de la teoría

genética, puede calcularse que cuando dos genes tienen una frecuencia de recombinación de 0.30 estos requieren 2.7 generaciones para alcanzar el "equilibrio medio".^{20,119}

Por otro lado el tiempo requerido para dos mutaciones de 10 Kb del periodo requerido para alcanzar el equilibrio medio es de 6,931 generaciones o al rededor de 173,000 años a 25 años por generación.^{20,119}

Dos marcadores intragénicos dentro de f.VIII o el gen f.IX esperados a priori para ser unidos en desequilibrio a menos de que exista un mecanismo para trabajar otro sobrecruzamiento que tienda a producir equilibrio. Semejante proceso como la conversión del gen y la recurrente mutación puede introducir perturbaciones en el equilibrio entre polimorfos íntimamente ligados en algunas circunstancias y un posible ejemplo ha sido reportado recientemente.⁶

El ejemplo involucra una restricción del polimorfismo en la longitud del fragmento (RFLPs), clásica, una longitud de 6.8 Kb de DNA sobre el cromosoma 11. Se encontró que este fragmento tenía cuatro sitios polimórficos de restricción enzimática íntima ligados y todos estaban en equilibrio genético como se esperaba.⁶

El efecto sobresaliente, sin embargo, fué que el otro par de polimorfismos mostraron un desequilibrio mayor que el par íntimo.

El descubrimiento de un marcado extragénico pero íntimamente

ligado a una distancia de 1 a 5 centimorgans a un gen de la hemofilia puede ser de un mayor valor diagnóstico que un segundo marcador intragénico, sería más oportuno mezclar los halotipos y la producción de nuevas combinaciones y además menos cambios de desequilibrio. Dos marcadores extragénicos localizados de 5 a 10 centimorgans a cada lado de un gen, puede usarse de otra forma.⁶

Si ellos cosegregan, se inferiría que, la velocidad de doble sobrecruzamiento, estará acompañada por el alelo con el que estaba asociada en el origen. Sabiendo como estaban asociados en sus padre requiere, por supuesto, que otros miembros de la familia sean estudiados. Una debilidad de este acercamiento es que este produce una respuesta probabilística. Se espera que los métodos para DNA eliminen esta complicación.⁶

Recientemente se ha puntualizado que cuando un marcador de DNA es extragénico y este producto es entonces probabilístico, el resultado puede usarse con el resultado de un bioensayo de plasma.^{89PT} Las matemáticas simples involucradas han sido delineadas claramente y han demostrado que si el RFLPs el gen ligado indica una probabilidad del 95% de portador, esta probabilidad se incrementa el 99.4 % si combinado con el bioensayo provee una probabilidad del 90 %. Así, el algoritmo para utilizar marcadores extragénicos para DNA en la detección de portadores incluire siempre cuidadosas evaluaciones recomendables para bioensayos de plasma.⁸³

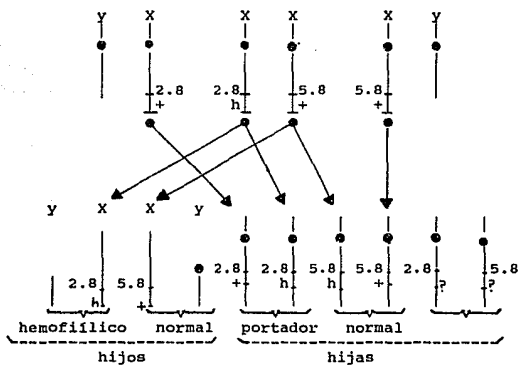
Los principios genéticos discutidos están lejos de aplicarse al diagnóstico prenatal y detección de portadores en ambos desórdenes ligados al cromosoma X la de detección de portadores es problema más complicado. Considerando el parentesco de la hemofilia a descrito por Harper⁵⁹, el cuál se esquematiza en la figura (10). La madre heterocigota para la hemofilia a y procreando hijos normales y hemofílicos. Ella mostro tener algunos fragmentos BgI II sin variar y dos variantes, 5.8 Kb y 2.8 Kb.

Un hijo hemofílico tuvo el fragmento de 2.8, esto establece que el fenotipo hemofílico de un hijo posterior podría establecerse prenatalmente por el tamaño de los fragmentos de Dna, como se indica en la figura (10) (el DNA del cromosoma X del padre no es informativo con respecto a su hijo, puesto que el sólo contribuye con un cromosoma Y).⁸³

Como se muestra, en el caso de una hija, si es homocigota para el fragmento de 2.8 podría ser portadora, provocando que el sobre cruzamiento no tenga lugar. Si ella fuera homocigota para el fragmento de 5.8, sería normal, bajo la misma premisa, pero que pasaría si ella fuera heterocigota?. El Dx 13 normal del padre tendría que ser determinado.⁸³

Si el tiene el fragmento de 5.8 será portadora. Si el DNA del padre no esta disponible para su estudio, la condición de hija heterocigota no podrá ser estimada por el método.⁸³

FIGURA No. 10 TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DEL DNA



2.8 Fragmento corto DNA

5.8 Fragmento largo DNA

h= Gene hemophilia

+ = Alelo normal al locus de la hemofilia

En una familia Danesa, se ha demostrado que el problema de la hija heterocigota indeterminada en un caso de hemofilia a puede ser real.²⁶

Usando la prueba Dx13, un feto masculino y su madre fueron claramente establecidos como normales. Amplias aplicaciones de la prueba a la familia permiten primero seguir a la madre para identificarla como portadora con una probabilidad del 92%. Sin embargo el genotipo de una segunda hija con un hermano hemofílico no podría ser determinada puesto que ambas, madre e hija fueron heterocigotas para el Dx13 y el padre no estuvo aparentemente disponible para el estudio.²⁷

La mutación exacta ha sido definida en un pariente por otros estudios, esto posibilita idear una prueba para el oligonucleotido para detectar directamente la presencia de una mutación en el DNA de la hija cuando esta no puede ser determinada por el RFLP. Deberá puntualizarse sin embargo que determinando la lesión genética precisa en una hemofilia emparentada es difícil hasta el momento.²⁷

IV.11 ENSAYO DEL FACTOR VIII:C CON UN SUSTRATO CROMOGENITO

El factor VIII procoagulante (factor VIII:C) activo es frecuentemente determinando durante ensayos de coagulación los cuales son variaciones de tiempo parcial de tromboplastina y en una menor proporción, por ensayos de dos estados de coagulación, los cuales se basan en el tiempo de generación de tromboplastina o en la generación de trombina.1,56,91,95

La precisión de los ensayos de coagulación con frecuencia puede ser poco satisfactoria con coeficientes de variación algunas veces cercanos al 30%.5 Esta cifra resulta de una variación del tiempo de coagulación usualmente sólo del 4.5%. Muchas variables influyen la exactitud y precisión de los ensayos de coagulación, por ejemplo, fuente de fosfolípidos, activador de contacto y sustrato plasmático.7,30,39 Procedimientos semiautomáticos o totalmente automáticos incrementan aún más la precisión.72,84

Aunque esta aproximación no garantiza una mejor reproducibilidad76, aún cuando se obtenga una alta precisión, la exactitud puede ser no satisfactoria, pero en ese caso el mayor riesgo de asignar niveles falsos de factor VIII:C, parece tener su origen en los plasmas estandar impropriadamente calibrados más que en el principio del método empleado.57,68

Recientemente se ha introducido un plasma estandar internacional el cuál podría ser de gran valor para incrementar la exactitud.

Una situación insatisfactoria permanece hasta el momento, sin embargo, puesto que la mayoría de los laboratorios emplean un método establecido y por esto se tiene que confiar en la disponibilidad del plasma con hemofilia A₇. Un suplente adecuado de este plasma substrato puede ser difícil de obtener debido al uso incrementado de la terapia casera. Además, existe un riesgo de contaminación con antígenos de hepatitis y otros agentes infecciosos. Han sido introducidos plasmas artificiales deficientes de factor VIII:C, pero es dudoso que estos sean ampliamente empleados en el futuro puesto que involucran una cierta cantidad de trabajo preparativo y además la estandarización, puede imponer un problema.²⁵

El advenimiento a un gran progreso en lo concerniente a los métodos para medir parametros importantes en la coagulación y la fibrinólisis.²⁹ La introducción del substrato S-2222 factor Xa de alta selectividad₃, condujo al desarrollo de un método con un factor VIII:C cromogénico basado en un estado de doble reacción en el cuál el efecto estimulador del factor VIII:C en la generación intrínseca del factor Xa sea utilizada y donde la formación de p-nitroanilina libre (pNa) medida a 405 nm refleje la actividad del factor VIII:C.⁶⁸ Sin una reacción de diazotación, sin embargo, el método carece de la sensibilidad necesaria para detectar bajos niveles de factor VIII:C, la desfibrinización

de la muestra también es necesaria. Un método sensible con la precisión requerida fué entonces desarrollado. Este se basa en el uso de factores IXa y X bovinos parcialmente purificados en vez de factores plasmáticos humanos. El método fué más tarde simplificado y desarrollado en un equipo reactivo.^{9,103}

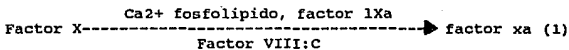
Recientemente la resolución ha sido mejorada y el intervalo de medición se ha ampliado.⁹ El propósito de este trabajo es describir el principio del método usado y presentar algunos resultados obtenidos con el equipo del método del factor VIII:C cromogénico.^{22,74}

PRINCIPIO, DISEÑO Y EJECUCION DEL EQUIPO DE COBERTURA
DEL FACTOR VIII:C

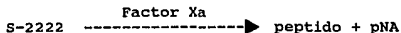
Durante el desarrollo del método del factor VIII:C cromogénico, se reconoció primeramente que además de la alta sensibilidad, precisión y exactitud, debieran satisfacerse los siguientes criterios:

- a).- El plasma con hemofilia A no debería incluirse.
- b).- Debería obtenerse una relación lineal entre el factor VIII:C y la formación del pNa, que es registrado a 405 nm.
- c).- El método debería ser simple en su ejecución y sólo incluir volúmenes rutinarios usados en los laboratorios.
- d).- Debería evitarse la defibrinación.
- e).- Los reactivos deberán tener cierta estabilidad.

El método se basa en la generación intrínseca del factor Xa donde el factor VIII:C actúa como un estimulante muy potente.



En una segunda reacción el factor Xa queda disponible para utilizar el sustrato S-2222 Factor Xa cromogénico.



La liberación de pNA es entonces medida en un espectrofotometro a 405 nm.

TABLA 5 La composición del equipo

S-2222 e I-2581 Liofilizados

Factores bovinos IXa y X Liofilizados

Emulsión Fosfolipida

Solución buffer: 50mm tris. Hcl ph = 7.3 I = 0.15 0.2% de
albumina bovina.

Por la delicada composición del reactivo que contiene los factores bovinos IXa y X, los requerimientos en a) y b) deben satisfacerse, puesto que las actividades del factor VIII:C entre 1 y 150% pueden determinarse, la relación lineal hecha es prácticamente imposible para obtener la resolución deseada dentro de un intervalo.^{22,74}

En cambio han sido definidos tres intervalos, los cuales se describen en la tabla (6).

Tabla (6) Tres rangos de factor VIII:C, son definidos con diferentes tiempos de incubación

Rango de VIII:C	Activación Tiempo	Tiempo Hidrolisis Acido - alto
15 - 100 %	5	5
20 - 150 %	5	5
1 - 20 %	10	10

El intervalo de 20-150% es intentado para usarse con propósitos de protección y en general para investigaciones de incubación. El intervalo de 15-100% ofrece una gran resolución y es el mejor situado para la detección de portadores y pacientes con algunas variantes de la enfermedad de Von Willebrand. El intervalo de 1-120%, finalmente fué usado en el análisis de muestras de pacientes con variantes de la hemofilia A y durante el tratamiento con factor VIII concentrado. 22,74

Las muestras obtenidas inmediatamente después de la infusión, sin embargo, pueden ser prediluidas para que caigan en este intervalo. 22,74

Después de algunos trabajos, desarrollados, es posible usar muestras bastante diluidas para facilitar el uso de muestras desfibrinadas. Tabla 7

Tabla (7) Muestras diluidas

Dilucion :		Muestra	
	Tubo no. 1		Rango
plasma o standard	ul. 25		0 - 1%
Buffer (0-8' c)	ul. 2000		1 - 20%
	3000		20 - 150 5

Mediante la inclusión de la labumina en el buffer se obtiene una estabilidad razonable y una alta recuperación de factor VIII:C.

Realmente se encontro que en ausencia de albumina, las perdidas inmediatas alrededor del 20% del contenido e factor VIII:C, ocurrio en muestras muy diluidas, indicando una absorción en las superficies.⁶⁸

El ensayo del factor VIII:C cromogénico puede efectuarse ya sea mediante un procedimiento de velocidad inicial o punto final pero el corto intervalo del último método es preferido porque la poca generación de factor Xa y las bajas actividades amidolíticas.⁶⁸

En la tabla 8 se muestra el método del punto final.

Para obtener una estabilidad apropiada, el factor reaccionante y

el fosfolipido no son mezclados hasta su uso (mezclando una relación de 5 + 1, v/v) y el reactivo de trabajo también preparado es estable durante 4 horas cuando se pone en hielo. El factor reactivo contiene albumina para minimizar perdidas durante la liofilización.⁶⁸

Tabla (8) Método del punto final

Reactivo de trabajo (0 - 8'c)	200 ml.
Muestra o dilución estandar	
Termostato 4-5 min. A 37'c	100 ml.
Ca cl2 incubación 5 o 10 min.	
A 37'c	100 ml.
S-2222 + I-2581 hidrolisis	
5 o 10 min. A 37'c	200 ml.
Acido acético al 50%	100 ml.

La absorbancia de la muestra es leída frente a un reactivo blanco con un espectrofotometro a 405 nm.

Aunque el S-2222 posee una alta selectividad para el factor Xa pueden causarse interferencias por la trombina la cual es formada durante el paso de la activación. Mediante la inclusión del inhibidor I-2581 de la trombina en el substrato esta interferencia se previene esencialmente.⁶⁸

Discusión.- la figura (11 y 12) muestran curvas estandar típicas en los tres intervalos definidos. Se obtiene una buena correlación entre las muestras diluidas en buffer, solas o con adición de plasma con hemofilia A para dar la misma concentración plasmática en todas las diluciones de muestras, el 1.24% correspondiente a 25 ul. De plasma + 2000 ul. De buffer, figura (12) esto demuestra que el método mide apropiadamente la actividad del factor VIII:C sin serias influencias de otros componentes del plasma. La figura (13) muestra el resultado obtenido con un concentrado de factor VIII llamado octonativ (Kabivitrim).⁶⁸

Puesto que la predilución en este caso es 1:50, la dilución total de la muestra correspondiente al 100% del factor VIII:C es de alrededor de 1:4000 (1:50 x 1:81). Sin embargo, los resultados obtenidos son reproducibles y exactos.⁹

En todos los casos los valores de absorbancia estan en un intervalo que permite el uso de fotometros rutinarios. La resolución del % de factor VIII:C es de alrededor de 0.013 unidades de

absorbancia en el intervalo mas bajo y 0.0053-0.008 unidades de absorbancia en los intervalos más altos respectivamente. En combinación con un coeficiente de variación inferior al 5% esto dara una discriminación entre muestras con diferencias muy pequeñas en los niveles del factor VIII:C como puede observarse en la figura (12), el limite de detección es de alrededor del 1% de factor VIII:C.^{9,68}

La estabilidad de las muestras diluidas cuando se ponen en hielo se muestra en la figura 14, en 30 min., no ocurrio un decremento significativo en la actividad del factor VIII:C. La temperatura ambiente da un decaimiento ligeramente acelerado de la actividad, pero también en este caso el almacenamiento por más de 30 min. Parece ser factible.⁶⁸

La alta especificidad del método ya ha sido reportada con anterioridad. Este también mostro que la antitrombina III en ausencia de heparina no afecta bajo condiciones prevaletentes durante el ensayo. En presencia de 0.5 UI de heparina/ml de plasma, sin embargo, ocurre una ligera inhibición probablemente por la acción del complejo antitrombina III/heparina.^{9,68}

Un estudio conjunto mostro que la correlación para ensayos de coagulación automatizados es 0.92 - 0.98 con una aproximación correspondiente a la asignada a la actividad del factor VIII:C.

Así el método al parecer da resultados exactos.^{9,68}

Finalmente, debiera enfatizarse que la exactitud de las mediciones de la actividad funcional de cualquier metodo con factor VIII:C, en un amplio grado es gobernada por el tratamiento de la muestra, debido a la labilidad de factor VIII:C. Preferentemente el análisis debiera efectuarse rapidamente y la muestra entonces será almacenada a menos de 40°C.^{9,68}

Almacenar a 20°C no es recomendable durante unos cuantos días. El descongelamiento también deberá estandarizarse para una muestra homogena sin creoprecipitado.^{9,68}

Figura 11.- Curva estandar para rangos a= 15- 100%

y b= 20 - 150% de factor VIII:C

diluciones de plasma normal correspondientes a 100%

de factor VIII:C en los dos rangos, como se muestra

en la tabla No. 7

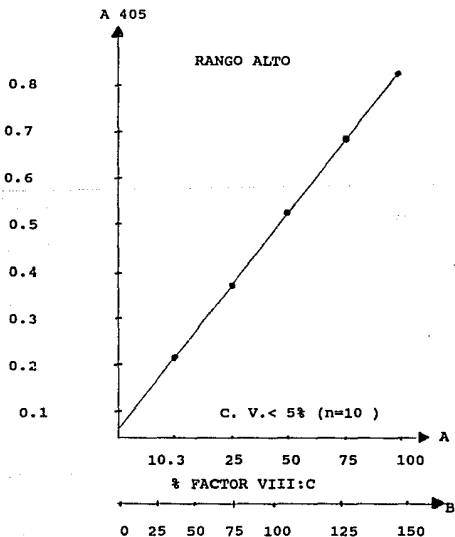


Figura 12.- Curva estandar para 1 - 20% de factor VIII:C

A 20% de Factor VIII:C le corresponde 5 ul de plasma normal + 2000 ul de k:t de buffer

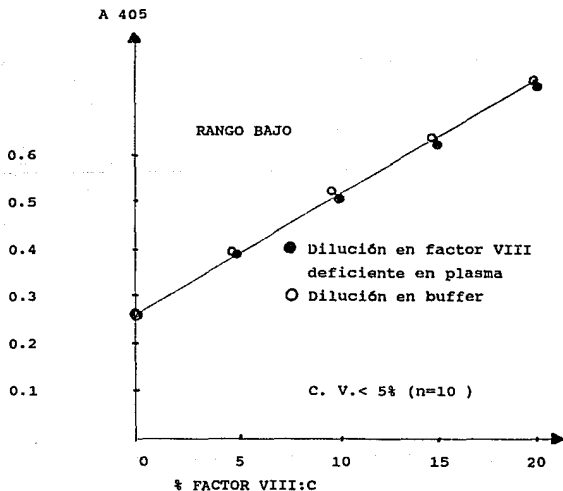


Figura 13.- Curva estandar obtenida con el factor VIII:C

concentrado con octonativ. Contiene

50 u/ml. Las diluciones son de acuerdo con la

tabla No. 7

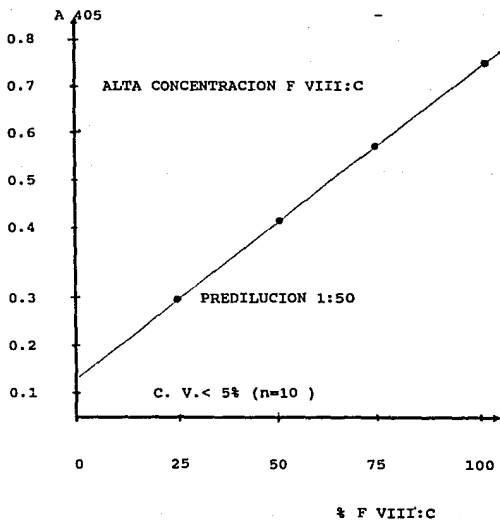
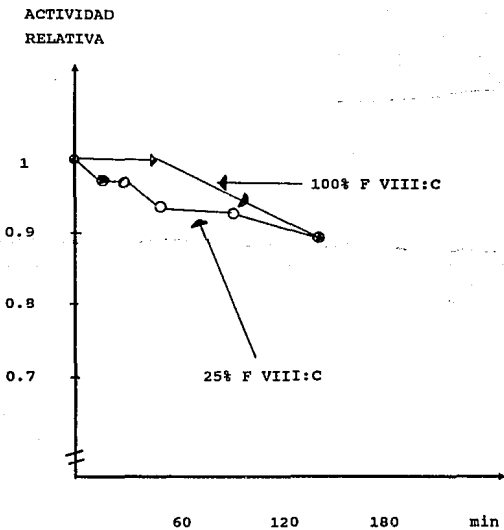


Figura 14.- Estabilidad de diluciones de plasma normal 100% y 25% factor VIII:C corresponden a 25 ul. y 6.25 ul.

Respectivamente de plasma normal.



IV.12 T R A T A M I E N T O

El tratamiento de los pacientes con hemofilia ha mejorado considerablemente en los últimos años. Los métodos modernos de bancos de sangre han puesto a disposición del médico grandes volúmenes de sangre completa y plasma; recientemente preparados muy potentes de factor VIII de origen animal, están en uso en Europa y en Estados Unidos de Norteamérica. Aunque ninguno de estos concentrados proporciona la solución total al problema de la hemofilia, resultan de gran utilidad para el hemofílico. La pérdida de sangre se resuelve mucho más rápidamente y se asegura la hemostasia. 12, 23, 25, 28

Si el paciente está preparado adecuadamente, la cirugía mayor, aunque sigue siendo bastante peligrosa resulta posible.

Plasma normal.- El empleo de plasma humano como fuente de factor VIII ha dado buen resultado para dominar la mayor parte de las hemorragias en tejidos blandos, hematurias y las que se observan después de extracción dental en pacientes hemofílicos con deficiencia ligera. Debe ser recién preparado, ya que pierde más del 50% de su actividad en cuatro días si se conserva en un banco de sangre a las temperaturas corrientes de 2 a 4°C. 57, 65, 83

El plasma separado rápidamente de los glóbulos y congelado a 30°C conserva su actividad hasta 30 días y constituye un producto excelente del cual debe disponerse. La concentración relativamente baja y la semidesintegración breve del factor VIII del plasma

normal constituye una limitación obligada.

Resulta difícil conservar a los pacientes sin hemorragia después de una intervención de cirugía mayor o traumatismo intenso, sin el peligro de sobre cargar el sistema circulatorio.65,83

Concentrados heterólogos. La necesidad de una fuente rica en factor VIII se reconoce desde hace tiempo. La obtención de un preparado muy activo, a partir de sangre animal, ha permitido administrar a los pacientes una cantidad de factor VIII equivalente a la contenida en ocho litros de sangre humana en una sola inyección de pequeño volumen. Sin embargo, como estos preparados son de proteína heteróloga, resultan antígenicos y por lo tanto de utilidad limitada. Resulta posible dar una sola serie de tratamiento en 8 a 10 días, pero la respuesta de las inyecciones muchas veces disminuye progresivamente. Puede darse una segunda serie, pero tiene el peligro de la reacción anafiláctica. Como sólo hay dos preparados de origen animal disponible (bovino y porcino), se reservan para los episodios más graves de hemorragia y para la cirugía mayor, en aquellos países donde están disponibles, cosa que no ocurre en Estados Unidos.115

Concentrados de factor VIII humano. El perfeccionamiento rápido de los concentrados de factor VIII humano durante los últimos años ha tenido gran importancia en el tratamiento de pacientes con hemofilia. Durante mucho tiempo el único concentrado disponible era el preparado mediante una modificación de la técnica de Cohn de fraccionamiento plasmático.36,65,115

Empezando con plasma mezclado, el preparado final contenía una concentración 10 x de factor VIII.

Este concentrado no ha sido uniformemente aceptado para tratar la hemofilia porque el empleo de plasma mezclado como material punto de partida conlleva gran peligro de hepatitis serica, y la potencia, aunque mejor que la de un plasma fresco, todavía es suficientemente baja para que pueda producirse una sobrecarga circulatoria. Se ha observado hemólisis durante la administración de este material a unos cuantos pacientes; se ha atribuido a la presencia de un título elevado de isoanticuerpos anti-a o anti-b contaminado el concentrado.^{36,65,115}

Un descubrimiento importante fué el reconocimiento de que el factor VIII podía separarse del plasma por crioprecipitación.

Cuando un plasma previamente congelado se descongela a temperatura de refrigerador, la mayor parte del factor VIII persiste como gel y puede separarse del resto del plasma por centrifugación.⁶⁵

Después de extraer el factor antihemofílico, la fracción residual del plasma puede utilizarse con otros fines. Este proceso permite obtener una concentración de factor VIII de 15 a 40 veces mayor que la del plasma normal, pero persiste el peligro de transmitir la hepatitis sérica. La gran ventaja de esta técnica ha sido su simplicidad. Puede producirse factor antihemofílico por crioprecipitación y almacenarse en cualquier laboratorio de banco de sangre bien equipado.^{36,65,115}

Se logro otro adelanto importante cuando se comprobó que el factor VIII precipitaba en presencia de algunos aminoácidos. Se ha obtenido un material precipitado con glucocola que contiene una concentración de 100 a 400 X de factor VIII.47,48,94

La concentración de factor VIII en un paciente con hemofilia puede normalizarse con un pequeño volumen de dicho material administrado. Si el costo de tales preparados puede reducirse y se evita la posibilidad de transmitir la hepatitis, el perfeccionamiento de la concentración de factor VIII permitirá tratar a los hemofílicos en forma, profiláctica. Un programa cuidadosamente establecido, con estrecha vigilancia del tratamiento en los pacientes hemofílicos, permitio conseguir mejoras.47,48,94

Como el empleo de concentrados de plasma humano tenia el peligro de hepatitis, muchos autores administraban profilácticamente globulina gamma mientras se sostenia la concentración de factor VIII. Algunos estudios recientes parecen indicar que las células endoteliales de los vasos sanguíneos son el foco donde se produce el factor VIII. Esto podría quizá explicar el aumento transitorio de las cifras de factor VIII, después de los transplantes de bazo y de higado.1,79,115

El tratamiento de la hemofilia A ha experimentado avances importantes desde la disponibilidad de concentrados de factor VIII. Sin embargo, en la actualidad seguimos sin una solución satisfactoria para aquellos pacientes que desarrollan inhibidores a dicho factor. La situación en ellos es de alto riesgo hemorrágico, lo

cuál unido a la incidencia de aparición de los anticuerpos, entre un 10 a un 15% de la población de pacientes hemofílicos, lo convierte en la situación de mayor gravedad clínica dentro de las coagulopatías congénitas.1,79,115

Hasta la fecha han sido ensayadas diferentes terapéuticas en esta patología; concentrados de factor VIII y IX. En periodos cortos, concentrados de factor VIII porcino complejos protrombínicos activados, concentrados de plaquetas, plasmoféresis e inmunosupresores, se han utilizado tratamientos diversos en pacientes afectados de hemofilia A con inhibidores, estos tratamientos se clasifican en tres grupos:57,65,83,79

1).- Aquellos que tratan de neutralizar el inhibidor provisionalmente. Por lo tanto únicamente se puede efectuar hemostasia efectiva hasta la aparición de la respuesta anamnesica. Se destacan los efectuados con concentrados de factor VIII, concentrados de factor VIII porcino con el riesgo de reacciones a proteínas heterólogas, formación de anticuerpos así como producción de trombopenias; plasmoféresis que tiene la ventaja de que el inhibidor se elimina de forma exponencial, pero tiene el inconveniente de la deplección de factores de la coagulación especialmente en plaquetas, así como de la necesidad de venas idóneas.

2).- Aquellos que consiguen un by-pass a la acción del inhibidor como son los complejos protrombínicos activados, tienen el inconveniente del desconocimiento de la propia composición de estos

productos y de su mecanismo de acción.

Tienen una respuesta clínica variable, corriendo el riesgo de provocar coagulación intravascular diseminada incluso en pacientes con alto título de inhibidor. A pesar de todo en determinadas ocasiones son una opción terapéutica efectiva.

3).- Por último comentamos los intentos de erradicación de inhibidores con inmunosupresores. Sus mayores éxitos se logran en el tratamiento de inhibidores dirigidos contra el factor VIII, en pacientes no hemofílicos (lupus eritematoso, artritis reumatoide, procesos asmáticos, procesos malignos, colitis ulcerosa, diabetes, alergia a la penicilina y durante el embarazo o el postparto). Únicamente se recogen referencias aisladas de erradicación de inhibidores al factor VIII, en pacientes hemofílicos con tratamiento inmunosupresor con ciclofosfamida. Hay que señalar que los escasos éxitos conseguidos, se logran en pacientes con título muy bajo de inhibidores y cuando la inmunosupresión se aplica al poco tiempo de la sensibilización incluso durante el desarrollo de la respuesta anamnésica primaria. De cualquier forma, el riesgo hemorrágico del tratamiento inmunosupresor en pacientes hemofílicos lo hace de muy difícil aplicación.

Hay que tener una buena higiene dental. Las extracciones dentales tienen ahora menos peligro por el empleo de cintas dentales de resina acrílica. Estas cintas protegen la encía y evitan la expulsión del coágulo una vez que se ha formado, evitando así el empleo de puntos. Si se saturan los bordes de las encías hay el

peligro constante de que la hemorragia continúe por debajo de la sutura y diseque los planos aponeuróticos del cuello, causando obstrucción respiratoria. Puede colocarse una gasa de alginato de calcio empapada en veneno de vibora de russel entre la ferula y la encía para actuar como agente hemostático local. 23,25,28

Se administra a estos pacientes plasma fresco. Se ha señalado que el empleo de dosis elevadas de esteroideos disminuye la hemorragia después de la extracción dental en pacientes con hemofilia. 23,25,28

La hemorragia en los tejidos de garganta o base de la lengua o cuello suele controlarse con la inyección de plasma fresco o de concentrado. Tengase presente el peligro de obstrucción respiratoria, de manera que si procede pueda introducirse un tubo endotraqueal. Hay que evitar la traqueotomía si es posible pues aumenta el peligro de hemorragia grave, la sangre en los tejidos no se localiza y el cirujano no intentara drenarla; tales intentos sólo ocasionarían hemorragia mayor y peligro para el paciente. La hemorragia cesará y la sangre se absorberá rápidamente si se logra una concentración adecuada de factor VIII. La hemorragia superficial se controla con aplicación inmediata de presión local mientras se inicia la inyección de plasma fresco. Después de logrado un aumento de factor VIII, hay que soltar la presión para permitir que la sangre con factor VIII substituya la deficiente en factor VIII dentro de los vasos bloqueados; luego vuelve aplicar se la presión. 23,32,87

Las hemorragias recientes en articulaciones siguen siendo objeto del tratamiento más conservador posible. Es importante en estos casos administrar plasma fresco o concentrados que aumenten las cifras de factor VIII y esta medida si se realiza rápidamente puede detener la evolución del sangrado. El reposo en cama, las bolsas de hielo y los apósitos compresivos sobre la articulación afectada durante la fase aguda alivian algo la situación. Para muchos autores debe evitarse la aspiración y el lavado de la articulación, que podría conducir a un mayor sangrado, o producir infección. 23,32,87

Al poderse disponer de un número creciente de concentrados de factor antihemofílico, la artropati hemofílica se trata más enérgicamente, algunos autores han señalado que la sinovectomía logra una mejor función articular y disminuye la frecuencia de hemorragias. Al parecer un tratamiento de 5 días con esteroides logra beneficios en el tratamiento de estos pacientes. Pueden plantearse problemas interpersonales entre el médico y el paciente hemofílico durante el tratamiento prolongado. 65,87

En un estudio reciente se comprobó que los hemofílicos se quejaban sobre todo del retraso para establecer la terapéutica de inyección continua, analgesia inadecuada, y punciones venosas defectuosas por el personal hospitalario. Estos pacientes se vuelven grandes expertos para diagnosticar las hemorragias y recienten mucho cualquier retraso en el tratamiento. 65,87

IV.13 HISTORIA NATURAL DE LOS ANTICUERPOS EN PERSONAS CON HEMOFILIAS

El tercer miembro de la familia de células "T" virulinfotrópicas (HTLV-III), el cual parece similar a la linfadenopatía asociada con virus (lav), ha sido propuesto como el agente etiológico de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida).^{84,97} El virus ha sido aislado de muchos pacientes con sida, y la prevalencia de anticuerpos en los infectados o de alto riesgo pero no en los controles de bajo riesgo.⁴⁶

Además, las evidencias serológicas de la infección han demostrado con anticipación en desarrollo de sida y ha relacionado las condiciones en dos grupos de homosexuales de alto riesgo.^{53,81}

Las personas con hemofilia son de alto riesgo para el desarrollo del sida, y se han encontrado anticuerpos para el HTLV-III y la LAV en la mayoría de esas personas que han recibido concentrados de factor coagulante puesto que la enfermedad apareció en hombres homosexuales en 1978-1979.⁵²

Las células T virus linfotrópicas humanas al parecer son transmitidas sexualmente y por transfusión sanguínea^{31,53,81}, y el periodo de latencia entre la exposición y la aparición del sida promedia de 5 meses a 5 años.³¹

Para investigar el periodo de latencia entre la exposición y la manifestación de la enfermedad, hay estudios recientes donde se reportan evidencias serológicas de la infección por HTLV-III en

muestras de suero almacenadas recolectadas de recipientes de concentrados de factor VIII seguido por un periodo de tres a nueve años. De acuerdo con este estudio, parece ser que muy pocos si no es que ninguno de los casos de seroconversión para los anticuerpos de HTLV-III ocurrió en pacientes con hemofilia antes de 1979, y que la velocidad de seroconversión se incremento rápidamente en 1981-1982. Así el intervalo es de al menos dos años entre la primera seroconversión y la aparición del sida en hemofílicos a finales de 1981 y principios de 1982.⁸¹

Este intervalo fué ilustrado por los pacientes estudiados los cuales desarrollaron sida o una enfermedad semejante al sida.⁵³

Como la mayoría de los hemofílicos que recibieron concentrados de factor VIII parecen haber desarrollado anticuerpos HTLV-III.⁵³

Durante 1981-1982, es posible que la insidencia máxima de sida en hemofílicos apareciera hasta 1985 o finales.⁵³

La prevaencia de linfadenopatía y otras condiciones relacionadas con el sida, tales como la linfocitopenia, trombocitopenia y bajo conteo de células T-HELPER, también se relacionaron con el tiempo de seroconversión, todos los hemofílicos que se seroconvirtieron antes de 1981 manifestaron linfadenopatía y/o un conteo bajo de células T-HELPER (menos de 400 células/mm CC).⁵³

En contraste, los hemofílicos en los que los anticuerpos HTLV-III aparecieron antes de 1981 están lejos de ser normales sobre esos

dos parametros clínicos e inmunológicos relacionados con el sida.

53

La linfadenopatía y/o el bajo conteo de células T-HELPER están presentes virtualmente en todos los hombres homosexuales que fueron seropositivos en 1982 y que vivían en el centro de la ciudad de Nueva York, donde apareció por primera vez el sida en 1979.⁸¹ En años recientes se ha notado hallazgos similares en hemofílicos que recibieron concentrados de factor coagulante.

Esos hallazgos sugieren que en el primer o segundo año después del desarrollo de anticuerpos HTLV-III pueden estar relativamente libres de condiciones relacionadas con el sida que la linfopatía, el bajo conteo de células T-HELPER y alguna otra condición relacionada como la trombocitopenia se encontrara en la mayoría de las personas tres o cinco años después de la seroconversión.^{31,53,84}

Es posible que la primera seroconversión se incremente de 1979 a 1982, requiriéndose más visitas clínicas y proporcionando más muestras de suero para probar HTLV-III, mientras que los pacientes sanos harán visitas clínicas menos frecuentes proporcionando menos muestras para detectar la primera seroconversión. Sin embargo, en vista de las dosis ligeramente altas de factor VIII concentrado recibidas por los primeros seroconvertidos, parece ser más probable que ellos visiten la clínica por problemas relacionados con la hemofilia severa y tengan una alta probabilidad de usar uno de los primeros concentrados de factor VIII menos

contaminados.^{81,100} No obstante las grandes dosis de concentrados de factor VIII pueden aumentar las manifestaciones de la infección por HTLV-III o acentuar las anormalidades inmunes independientes de la infección por HTLV-III aún determinadas. Sin embargo, esto parece ser poco probable en vista del amplio rango de dosis de concentrado en los primeros y últimos grupos seroconvertidos.^{81,100}

La prevalencia del 20% al 25% de la linfocitopenia y la trombocitopenia en este estudio de recipientes positivos a HTLV-III es mucho más alta que el 9.1% de prevalencia de linfocitopenia y el 4.6% de prevalencia de la trombocitopenia en un grupo comparable de 1539 hemofílicos en el estudio cooperativo de inhibidores espontáneos del factor VIII en hemofílicos, confiado por el instituto nacional del corazón, pulmón y la sangre (NHLBI) de 1975 a 1979.¹¹²

Evaluaciones respectivas para un mínimo de cinco años (1979 a 1984) revelaron una mortalidad del 14.5% en un grupo de 69 hemofílicos los cuales tuvieron linfocitopenia persistente o trombocitopenia; se encontró enfermedad hepática en cinco de esos diez que murieron. Es posible que la esplenomegalia, trombocitopenia y/o linfocitopenia de los pacientes con anticuerpos para HTLV-III estuvieran relacionadas con enfermedad hepática más que con la seroconversión de HTLV-III.¹¹²

La linfadenopatía no fué asociada con la enfermedad hepática en

el estudio del inhibidor NHLBI pero pudo observarse una estrecha relación con la presencia de anticuerpos HTLV-III por más de tres años.¹¹²

La historia natural exacta de la infección por HTLV-III no será reconocida por varios años más, los datos actuales sugieren que la infección por HTLV-III probablemente no conduzcan inevitablemente al sida en muchos pacientes, la incidencia acumulativa del sida en los hombres homosexuales con anticuerpos HTLV-III es sólo el orden de 5% al 20% (1988), y en este estudio los hemofílicos con anticuerpos HTLV-III. La incidencia acumulativa del sida y padecimientos similares al sida, durante más de tres años de observación fué más bajo del orden del 2% al 4%.^{53,81}

La asociación de la linfadenopatía y el bajo conteo de células T-HELPER con un prolongado periodo de incubación después de la aparición de anticuerpos HTLV-III sugieren un avance, un proceso tan indolente como una infección aguda. Siendo este proceso una aberración de la respuesta inmune iniciada por los antígenos HTLV-III. La última explicación es favorecida por el gran número de HTLV-III aislados de hombres homosexuales con linfadenopatía y el periodo de latencia de más de dos años en la transfusión asociada con los casos de sida.⁴⁶ La explicación anterior es favorecida por la observación de que la mayoría de los hemofílicos con anomalías relacionadas con el sida por una prolongada seroconversión posterior de 4 a 5 años.³¹

Si algunos anticuerpos HTLV-III son protegidos, la mayoría de los hemofílicos pueden ser inmunizados efectivamente con antígenos no infecciosos incompletos que fueron rotos durante el proceso de liofilización de los concentrados de factor coagulante.³¹

Si tan sólo un pequeño porcentaje de aquellos que fueron expuestos a los virus no atenuados antes del desarrollo de anticuerpos neutralizantes de antígenos incompletos no infecciosos podría esperarse que desarrollen sida. Por su puesto se requieren muchos estudios para medir los antígenos del HTLV-III al igual que de sus anticuerpos y los recipientes de factor VIII y suero y un largo período de observación para contestar esas interrogantes.³¹

V.- ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

La enfermedad de Von Willebrand ha sido un desórden enigmático, desde hace varios años, numerosos descubrimientos han ayudado a integrar sus diversas manifestaciones clínicas y de laboratorio.

ANTECEDENTES

En 1926 al terminar su internado, Eric Von Willebrand, reportó una familia de hemorrágicos en las islas Aland del Golfo de Bothania. En la mayoría de los isleños afectados, el tiempo de sangrado era prolongado y Von Willebrand sospecho que la prolongación se debía a una anormalidad de las plaquetas y los capilares.7,24

Posteriormente demostró que la función plaquetaria realmente estaba afectada, debido a que la concentración de plaquetas escapaban de las heridas en la piel al momento del sangrado era aproximadamente la misma que la concentración de plaquetas circulantes en la sangre.7,52

Por alguna razón las plaquetas no se adherían a la herida y no eran efectivas en la hemostasis.

Se efectuaron numerosas pruebas invitro para medir la función plaquetaria y una de las más comunes consistió en pasar la sangre a travez de columnas que contenían diminutas cuentas de vidrio.3 Cuando la sangre normal pasaba a travez de las columnas la mayoría de las plaquetas se adherían a las cuentas y la sangre emergente era pobre en plaquetas.7,52

Se encontro nuevamente que muchas plaquetas escapaban de los extremos de esas columnas, cuando se usaba sangre de pacientes con enfermedad de Von Willebrand.

Otras pruebas de la función plaquetaria tales como la agregación fueron completamente normales por lo que al parecer la anomalía de la función plaquetaria, no se debía a una anomalía intrínseca de las plaquetas sino más bien a una actividad en el plasma que estaba ausente o era anormal en la enfermedad de Von Willebrand.^{3,18} Mientras tanto, tres laboratorios por separado descubrieron que la actividad coagulante del factor VIII se encontraba disminuida en la enfermedad de Von Willebrand.^{16,82} Esta observación fué sorprendente porque, hasta entonces se pensaba que la deficiente actividad coagulante del factor VIII era transmitida como un carácter recesivo unido al cromosoma X; en la enfermedad de Von Willebrand este se transmite autosómicamente. Se encontró que la respuesta de la actividad coagulante del factor VIII a la transfusión era muy diferente a la observada en la hemofilia.^{16,82}

Después de la transfusión con plasma normal, la actividad coagulante del factor VIII de los pacientes aumenta a niveles tan altos que podrían explicarse por la cantidad de factor VIII transfundido y que se prolonga más de lo esperado. Se ha observado el mismo fenómeno cuando se han hecho transfusiones a los pacientes con una fracción de plasma I-O, suero adsorbido al igual que después de la transfusión de plasma de pacientes con hemofilia clásica.^{44,55,75}

Esto demostro entonces que la adición de plasma y fracciones de plasma conteniendo factor VIII a las columnas de cuentas de vidrio o a la sangre de Von Willebrand corregia la retención anormal de plaquetas.3

En esa época la enfermedad de Von Willebrand se diagnosticaba sobre la base de un modo autosómico de herencia, prolongación del tiempo de sangrado, disminución de la retención plaquetaria en columnas de cuentas de vidrio, baja actividad coagulante del factor VIII y la respuesta poco usual de la actividad coagulante del factor VIII a la transfusión.3

El siguiente avance importante fué la demostración de que una proteina que se pensaba estaba relacionada inmunológicamente al factor VIII estaba disminuida o ausente en la enfermedad de Von Willebrand, mientras que estaba presente en cantidades normales o incrementada en la hemofilia clásica a pesar de la deficiente actividad coagulante del factor VIII.68

Al mismo tiempo se hicieron observaciones usando el antibiotico, ristocetina. Este antibiotico causo trombocitopenia y fué capaz de inducir aglutinación plaquetaria en el suero normal rico en plaquetas.20 La aglutinación plaquetaria, sin embargo, no ocurrio en el plasma de los pacientes con enfermedad de Von Willebrand a menos que se adicionará suero o plasma normal o de pacientes con hemofilia A.20

La disminución de la aglutinación plaquetaria inducida por la ristocetina en la enfermedad de Von Willebrand se debe a la disminución o ausencia de una actividad relacionada con el factor VIII y este ha conducido al desarrollo de una prueba funcional la cuál ha probado ser de mucha utilidad en el diagnóstico de la mayoría, aunque no de todos los diferentes subtipos de la enfermedad de Von Willebrand. 20,62

Recientemente se ha aislado el factor de Von Willebrand y se demostro que es una proteina, que consiste de series de grandes polímeros. Numerosos estudios han demostrado que el factor Willebrand juega un papel esencial en la adhesión de las plaquetas al subendotelio. Se han descrito las anormalidades del factor de Willebrand y se han asociado con formas variantes de la enfermedad. 20,62

V.1 PROTEINA ASOCIADA AL FACTOR VIII: FACTOR VON WILLEBRAND

ESTRUCTURA:

Es imposible discutir los diferentes tipos de la enfermedad de Von Willebrand sin el conocimiento de los aspectos moleculares del complejo factor VIII/VW.

Las propiedades asociadas a este complejo son las siguientes: 7, 16, 52, 82

Factor VIII (ausente o anormal en la hemofilia A)

VIII C. La actividad coagulante esta ausente o es anormal en el plasma hemofílico; factor VIII con actividad coagulante factor antihemofílico.

VIII-C Ag. Determinante antigenico del VIII C.

Factor de Von Willebrand (ausente o anormal en la enfermedad de Von Willebrand)

VIII R WF- Factor de Von Willebrand activo; factor del tiempo de sangrado; actividad necesaria para la formación del tapón plaquetario.

VIII R RCo- Cofactor de ristocetina, actividad necesaria para que la ristocetina induzca la aglutinación plaquetaria.

VIII R Ag- Determinante antigenico del factor de Von Willebrand.

Las evidencias presentadas en la reseña histórica indican que en el plasma normal existe una proteína relacionada con el factor VIII la cuál corrige la función plaquetaria anormal en la enfermedad de Von Willebrand. Esta proteína puede detectarse inmunológicamente (VIII RAg) y juega un papel importante en la adhesión de las plaquetas al vaso sanguíneo dañado.7,16,52

V.2 PROPIEDADES BIOQUIMICAS

Como parte del complejo factor VIII/VW consiste de proteína ligada o emparentada al factor VIII (VIIIIR, factor Von Willebrand), los datos obtenidos para el factor VIII bifuncional reflejan propiedades del VIIIIR.^{52,55} En todos estos estudios, la propiedad más sorprendente del factor VIII puro es su enorme tamaño. La separación por filtración en gel de agarosa sugiere un paso molecular superior a 10^6 dalton^{55,75} y el peso molecular obtenido por estudios de equilibrio de sedimentaciones efectuados en guanidina 6 m fué 1.12×10^6 .⁵²

Aunque el factor VIII humano altamente puro no es disociado por la guanidina 6 m o el dodecil sulfato de sodio (sds) al 1%, pueden detectarse las subunidades cuando el VIIIIR es reducido con 2- mercaptoetanol o ditiotretitol. Se detecta una banda única sobre la electroforesis en gel de poliacrilamida y S D S, y las subunidades tienen peso molecular estimado de 195,000 a 240,000.D.^{16,52,55}

Los estudios efectuados con factor VIII altamente purificado pueden ser engañosos, sin embargo, estos sólo han examinado la fracción pequeña de las moléculas (Ca. 5-10%) Que no se pierde durante la serie de separaciones. Hasta el momento parece ser que la proteína asociada con el factor VIII, es en efecto una población heterogénea de multímeros que tienen un peso molecular en el intervalo de Ca. 850,000 Hasta más de 12×10^6 .Dalton

Esta primera propiedad llega a ser aparente cuando la técnica de inmunolectroforesis transversal identifica heterogeneidad en el VIIIR.^{16,52,55}

La electroforesis de zona en agarosa no resuelve las diferentes formas, sin embargo, la población de multimeros no puede reconocerse hasta que el VIIIR sea examinado en agarosa o geles de agarosa/acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.^{16,20} Estos estudios del VIIIR humano y porcino efectuados con materiales purificados, hicieron posible que el patrón multimérico aparente fuera causado por la agregación que ocurrió durante la purificación. Análisis subsecuentes de plasma humano normal completo demostraron que el VIIIR circula como una población de multimeros muy largos y que la distribución de tamaño no es inducida artificialmente por los métodos de purificación, refrigeración, o quelación con calcio.^{34,69}

Los pequeños polimeros detectados en el plasma humano normalmente tienen un peso molecular aparente de 0.85×10^6 .

Este podría ser o aparecer como un tetramero con uniones disulfuro de 200,000 subunidades básicas.

Las formas grandes tienen un peso molecular que indica que están compuestos por un número integral de esos tetrameros, por ejemplo, tienen un peso molecular de 1.7×10^6 , 2.5×10^6 , 3.4×10^6 . Dalton^{34,69}

El suero obtenido a partir de sangre cuagulada en tubos de vidrio a 37°C tuvo la misma cantidad de VIIIIR.³⁴ Fueron observadas en 8 bandas separadas en la mayoría de las plasmas normales y hubo una población de VIIIIR con un peso molecular de Ca. $8-12 \times 10^6$.

El VIIIIR humano purificado también fué analizado por métodos bioquímicos estandar. Este es una glucoproteína que contiene 5-6% de carbohidratos, hexosa, hexosamina y ácido sialico.^{52,55}

La composición de aminoácidos también fué determinada en esos estudios; los valores de metionina, tirosina y triptofano son relativamente bajos y no existen grupos sulfhidrilo libres.^{52,55}

La cantidad de proteína VIIIIR en el plasma ha sido calculada a partir de la actividad específica del factor VIII altamente puro.^{52,55,62}

Y de análisis inmunolectroforeticos del plasma en los que se ha utilizado VIIIIR puro como estandar. Los valores estimados para la proteína VIIIIR en el plasma normal humano se encuentra entre 5 y 10 mcg/ml. Este es aproximadamente 100 veces más grande que la concentración de proteína VIII:C.^{52,55,62}

V.3 PROPIEDADES INMUNOLOGICAS.

Conejos inmunizados con factor VIII humano puro formaron anticuerpos inmunoprecipitantes.⁹⁴ Aunque el suero varía en su habilidad para inactivar el VIII:C, todos forman inmunoprecipitados con el VIIIR e inactivan el cofactor de ristocetina activo en plasma, al igual que otras interacciones mensurables del VIIIR plaquetario.^{3,7,56} Ellos son monoespecíficos en ensayos inmunoprecipitantes si son preparados con suficiente factor VIII puro, pero la absorción con fracciones de VIIIR plasmático libre frecuentemente es necesaria. Numerosos análisis diferentes han sido usados para detectar y cuantificar este antígeno relacionado con el factor VIII. El electroinmunoanálisis, la inmunolectroforesis y el inmunoradioanálisis, todos dan resultados similares, y el antisuero preparado en diferentes laboratorios. Han tenido generalmente propiedades consistentes en esos análisis inmunquímicos.^{35,37,93,94}

Ese antisuero de conejo varía en su efecto sobre el VIII:C humano activo.⁴⁷ Las propiedades del material usado para la inmunización parecen ser muy importantes en este respecto, y el contenido de VIII:CAg depende del método de purificación. Aunque pequeñas cantidades de anti VIII:CAg pueden estar presentes en algunos sueros (además del anti-VIIIR:Ag) ello no afecta las mediciones inmunquímicas; la interacción del anti VIII:Ag con el complejo factor VIII intacto también inactiva el VIII:C y el anti VIII:Ag se une a la agarosa removiendo a ambos VIIIR y VIII:C del

plasma.92

En general existe una buena correlación entre el factor VIII procoagulante activo y la concentración de antígeno relacionado con el factor VIII en el plasma humano normal. El incremento paralelo en VIII:C y VIIIIR:Ag ha sido notado en el plasma de pacientes con una gran variedad de enfermedades no hematológicas y de individuos normales sujetos a estímulos fisiológicos.35,37

V.4 F U N C I O N

FACTOR VON WILLEBRAN ACTIVO

La proteína emparentada con el factor VIII tiene un papel central en la función plaquetaria normal, una propiedad que ha sido designada "factor Von Willebrand" activo, puesto que esta es deficiente en pacientes con enfermedad de Von Willebrand.45

El tiempo de sangrado prolongado en esos pacientes es presumiblemente debido al contenido reducido de VIIIIR en plasma y se corrige por transfusión de crioprecipitado rico en VIIIIR.45

Dos análisis en plaquetas in vitro son usualmente anormales en la enfermedad de Von Willebrand; aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina y retención de plaquetas en columnas de cuentas de vidrio.37

Ambas son corregidas cuando el factor VIII normal puro es adicionado a la sangre de pacientes con enfermedad de Von Willebrand

severa. Aunque la forma de un tiempo de sangrado prolongado es consecuencia del bajo nivel de la proteína factor VIII es conocida hasta el momento, existe una buena correlación entre esta anomalía y los bajos niveles de VIIIIR en plasma y las mediciones del cofactor ristocetina.^{18,86}

El uso de ristocetina para el establecimiento de las funciones del VIIIIR in vitro ha sido adoptados ampliamente en corto periodo de tiempo. La observación inicial - agregación plaquetaria reducida o nula cuando la ristocetina fué adicionada al plasma rico en plaquetas - (prp) de pacientes con enfermedad de Von Willebrand¹⁹ proporciona una medida simple que muchos laboratorios han incorporado a la evaluación de rutina de pacientes con desórdenes hemorrágicos. Desafortunadamente, el establecimiento de la ristocetina en la inducción de la agregación en el (prp) de pacientes tiene limitaciones como técnica de diagnóstico.^{18,86}

Además por su naturaleza cualitativa la agregación normal o reducida, a una o más concentraciones de ristocetina, puede dar falsos positivos en algunos pacientes con desórdenes plaquetarios primarios y esta no es lo suficientemente sensible para detectar enfermedades de Von Willebrand media o moderada.³² Mientras la agregación anormal en la enfermedad de Von Willebrand es consecuencia de una deficiencia en el plasma y puede corregirse mediante la adición de VIII normal, el fenómeno requiere también la presencia de una proteína de la superficie de la plaqueta normal que es deficiente en el síndrome de Bernard - Soulier.³⁰

La agregación plaquetaria inducida por ristocetina es examinada de forma más crítica por ensayos en los que las diluciones de plasma son probados con plaquetas normales lavadas y una concentración fija de ristocetina. Ese cofactor ristocetina puede ensayarse con plaquetas frescas lavadas o con plaquetas fijadas en formaldehído que sigue siendo una prueba reactiva satisfactoria durante varias semanas si es almacenada en refrigeración.³⁰

La velocidad de agregación inducida por la ristocetina esta relacionada con la cantidad de plasma que es adicionado, y el valor puede obtenerse con un agregometro o midiendo el tiempo requerido para detectar la aglutinación plaquetaria.⁷³ Los diferentes métodos dan resultados similares bajo muchas condiciones.

Aunque la velocidad es una buena correlación del cofactor Von Willebrand activo in vivo, a juzgar por la liberación del sangrado anormal y por las mediciones del tiempo de sangrado.⁸⁶ Existen excepciones por ejemplo, el valor del VIIIIR:Rc puede ser normal en la enfermedad de Von Willebrand durante el embarazo y en estados inflamatorios, o después de transfusiones con factor VIII, aunque el tiempo de sangrado siga siendo prolongado.^{64,85}

Además, los pacientes con una forma variante de la enfermedad de Von Willebrand tienen tiempos de sangrado prolongado a pesar de los valores de cofactor de ristocetina por debajo de lo normal y reactividad incrementada cuando la ristocetina es adicionada a su plasma rico en plaquetas.^{67,69}

Así el valor de cofactor ristocetina ensayado como medida de la función del VIIIIR in vitro no debe ocultar el efecto que este no siempre refleja en las funciones biológicas in vivo.^{67,69}

A este respecto, debería enfatizarse también que el VIIIIR:Ag y los ensayos del cofactor de ristocetina miden diferentes propiedades de la proteína VIIIIR. Mientras el inmunoanálisis detecta todas las moléculas de VIIIIR con determinantes antígenicos específicos, la proteína no siempre tiene actividad biológica.^{67,69}

También valores de inmunoanálisis artificialmente incrementados son obtenidos para los polímeros pequeños de VIIIIR cuando ellos son comparados con plasmas estandar por el método de inmunoanálisis de Laurell.¹⁸ En contraste, las mediciones del factor ristocetina sólo identifican proteína VIIIIR que puede interactuar con las plaquetas, y esta capacidad se limita a los polímeros grandes.¹⁸ Así, los plasmas o proteínas purificadas que carecen de los polímeros largos de VIIIIR tendrán una muy baja relación de VIIIIR:Rc a VIIIIR:Ag, y por el contrario, el material que es relativamente rico en formas largas, tendrán altos valores de ristocetina activa comparados con los de VIIIIR:Ag, cuando son comparados con los de plasma estandar.^{68,69}

El VIIIIR puro radiomarcado unido específicamente a las membranas plaquetarias, sugiere que existen sitios receptores discretos,^{43,44} la ristocetina, la cuál se une también a la membrana plaquetaria, aparentemente hace este receptor disponible al VIIIIR y

realza esta unión. En efecto, se ha demostrado que las concentraciones incrementadas de ristocetina causan que más moléculas de VIIIIR se unan a las plaquetas.^{43,59} Una correlación entre el VIIIIR unido a las plaquetas y la agregación plaquetaria inducida por ristocetina también ha sido demostrada.⁴⁴ La heterogenicidad de los polímeros de VIIIIR complican ese análisis, sin embargo, por ahora se reconoce que el VIIIIR largo se une a las plaquetas en presencia de ristocetina.^{18,69}

Varias series de datos sugieren que el carbohidrato de VIIIIR es importante en la interacción factor VIII-plaquetas, y en la agregación inducida por ristocetina.^{18,69}

Los estudios iniciales indicaron que el ácido sialico removido redujo la agregación plaquetaria inducida por ristocetina en un 65%,²¹ otros estudios no mostraron cambios en el nivel de reactividad aunque el ácido sialico fuera removido.⁷⁹ Estos últimos estudios sugieren que la oxidación de la penúltima galactosa modifico la agregación plaquetaria inducida por ristocetina, y que hubo una reducción del 90% de la función del VIIIIR:Rc cuando esos residuos fueron oxidados; la subsecuente reversibilidad de la reacción causada por la reducción de la galactosa completo la regeneración de la función VIIIIR;Rc. No se notaron cambios en el VIIIIR:C cuando el factor complejo VIIIIR fué modificado de manera que fueran reducidos u oxidados esos grupos de carbohidratos.^{21,79}

Los residuos de carbohidratos también son importantes en la supervivencia intravascular del VIIIIR. El asialo derivado es eliminado por el hígado de conejo en un tiempo medio de 5 minutos.²¹ Otros estudios han demostrado que la lecitina de hígado de conejo que se une específicamente a las asialoglicoproteínas unidas a los asialoderivados, no lo hace al asialo - galacto - VIIIIR o nativo.⁷⁸

V.5 S I N T E S I S

Estudios inmunoflorescentes ha identificado al VIIIIR:Ag en células endoteliales de las arterias, arteriolas, capilares y venas de todo el cuerpo, al igual que en macarocitos y plaquetas.^{6,33}

Además, ambos VIIIIR:Ag y VIIIIR:Rc han sido identificados en el medio obtenido de cultivos de células endoteliales del cordón umbilical humano.^{40,41} Evidencias directas de la síntesis del VIIIIR por las células endoteliales también han sido obtenidas en cultivos tisulares.⁴⁰ No ha sido detectado el factor VIII con actividad coagulante en esos medios de cultivo, sin embargo mientras existe la posibilidad de que el VIII:C pueda ser activado por una proteasa presente en el medio, el VIII:CAg es indetectable. Así, cada una de las condiciones de cultivo y/o fuente de células (venas del cordón umbilical) no son satisfactorias para la síntesis de VIII:C es sintetizada por diferentes tipos de células.⁸⁴

V.6 INTERACCION DEL VIII:C Y EL VIIIR EN EL COMPLEJO
FACTOR VIII/VW

Aunque el VIII:C y el VIIIR tienen propiedades muy distintas, pudiendose hacer una simplificación para sugerir que ellos no se relacionan entre si y que son sólo dos proteínas que pueden purificarse juntas.⁶⁵

Varias observaciones indican que en el plasma ellas interactúan a través de uniones no covalentes para formar un complejo.⁶⁵

Por ejemplo, la concentración de las dos proteínas está estrechamente correlacionada en el plasma normal y en la mayoría de los estados patológicos (no hematológicos).⁶⁵

La interacción entre los componentes permanece intacta cuando el VIIIR interactúa con anticuerpos heterólogos (por ejemplo, antifactor VIII de conejo) y el VIII:C es incluido en el complejo inmune. Los inmunoprecipitados obtenidos con antifactor VIII de conejo tienen actividad coagulante₄₀ y saca el anti VIII:C cuando es inyectado en otros conejos.³⁶ También en el anti VIIIR unido a la agarosa remueve a ambos VIII:C y VIIIR del plasma.^{17,92}

Si el VIII:C y el VIIIR no interactúan podría esperarse que el VIII:C siga con el inmunoabsorbente. Una razón alternativa para la pérdida del VIII:C del plasma, directamente unido a VIII:C no reconocible en el antisuero de conejo, puede descartarse puesto

que el VIII:C puede recobrase por las perlas por un modesto incremento en la fuerza iónica que no afecta las reacciones inmunológicas.¹⁷

Los anticuerpos humanos para el factor VIII. Tienen un efecto diferente. Aunque los anticuerpos unidos a la agarosa remueven al VIII:C con actividad coagulante (y VIII:CAG) del plasma, el VIIIIR :Ag plasmático y el cofactor ristocetina activo no es afectado.¹⁷

La diferencia entre los anticuerpos heterólogos humanos en esos experimentos son semejantes debido a las muy diferentes concentraciones de proteína VIII:C y VIIIIR en el plasma.¹⁷

Puesto que menos del 1% de la proteína en el complejo factor VIII es VIII:C, la cantidad de VIIIIR removida con VIII:C puede ser tan pequeña que los análisis no detectan un cambio de la concentración de VIIIIR. Además, el complejo factor VIII parece ser desestabilizado cuando el VIII:C interactúa con los anticuerpos humanos.¹⁷

Las bases para esta sugerencia se fundamentan en estudios de complejos solubles obtenidos incubando anti VIII:C humano con plasma normal. Complejos inmunes fueron detectados en las últimas fracciones eluidas, además de que el volumen vaciado mediante el VIII:C se limitó a las fracciones de volumen vaciado cuando el anticuerpo no estaba presente.⁵⁰

Una interacción de relativamente alta afinidad, entre el VIII:C y

el VIIIIR pueden ser también interferidas por el efecto de agentes reductores sobre el VIII:C plasmático. Después de que el plasma es expuesto a bajas concentraciones de ditiotritol o 2-mercaptoetanol, el VIII:C posee propiedades de una proteína relativamente pequeña sobre la centrifugación por densidad en sucrosa, filtración en gel agarosa y la precipitación en etanol.⁵

Este también podría deberse a un efecto directo de los agentes reductores sobre las propiedades de VIII:C, ellos retornan a la normalidad si el plasma hemofílico (VIIIIR libre de VIII:C activos) es adicionado. Esta secuencia sugiere fuertemente que la presencia del VIIIIR modifica las propiedades de la proteína VIII:C en las técnicas de separación estándar.⁵

Los datos antes mencionados sugieren que el VIII:C y el VIIIIR interactúan de alguna manera, pero se tiene muy poca información de como se forma tal complejo. No obstante, la susceptibilidad a la disociación por buffers de sales es una evidencia indirecta de que las fuerzas electrostáticas son importantes.⁵

La importancia biológica de las interacciones del plasma también son inciertas, pero la inestabilidad del VIII:C en ausencia de VIIIIR (o en plasmas que tienen VIIIIR relativamente reducido) sugiere que la formación del complejo protege al VIII:C de la inactivación proteolítica.⁹⁰

V.7 I N C I D E N C I A

La enfermedad de Von Willebrand parece ser una de las enfermedades hemorrágicas hereditarias más comunes. La incidencia exacta, sin embargo, es incierta debido a la dificultad de su diagnóstico en las formas moderadas de la enfermedad y la ocurrencia de pacientes asintomáticas. La enfermedad ha sido cuidadosamente estudiada en Suecia en 1963, cuando la población de este país era de 7 millones, fueron reportadas 47 familias.³⁷

Se ha estimado que la frecuencia de la enfermedad en la población sueca se encuentra entre 2.5 y 5%.^{37,39,68}

Al parecer no tiene relación racial o técnica.³⁷

V.8 CLASIFICACION Y GENETICA

La enfermedad de Von Willebrand se hereda autosómicamente y la gran mayoría de los pacientes son heterocigotos. La enfermedad de Von Willebrand en pacientes homocigotos ha sido reportada en un pequeño numero de familias.¹⁹

Enfermedad de Von Willebrand en homocigotos:

Esta es una forma recesiva de la enfermedad y el caracter es heredado de ambos padres.¹⁹

Las manifestaciones clínicas de la hemorragia son severas, pero casi siempre menos que en la hemofilia.

Esta forma de la enfermedad es rara excepto tal vez en los países del medio oriente en donde los matrimonios entre primos hermanos son comunes.^{19, 67, 69} El tiempo de sangrado es muy prolongado y el factor Von Willebrand plasmático esta ausente o presente en pequeñas cantidades. El factor Von Willebrand no esta presente en las plaquetas o en las células endoteliales.^{19, 67, 69}

El VIII y el VIII:CAG siempre son detectables y se encuentran en niveles más elevados que los observados en la hemofilia clásica.

13, 19

Ocasionalmente se presentan los inhibidores del factor Willebrand.

Los padres de esos pacientes homocigotos son generalmente asintomáticos aunque pueden tener bajos niveles del factor Von Willebrand.^{13,19}

Enfermedad de Von Willebrand en heterocigotos.

Esta es una de las formas comunes de la enfermedad de Von Willebrand y es generalmente ligera o moderadamente severa. Esta se transmite autosómicamente como un caracter dominante.^{13,19}

Tipo I se caracteriza por bajos niveles de factor Willebrand normal en el plasma. Las cantidades de VIII:C, VIII:CAg y VIII:RCo todas estan disminuidas aproximadamente al mismo nivel.

Estudios del factor Willebrand muestran que este es cualitativamente normal en plasma, plaquetas y células endoteliales. El tiempo de sangrado generalmente es prolongado pero puede ser normal. Esto es de particular interés ya que esos pacientes son hemorrágicos moderados y algunos pueden ser asintomáticos, sugiriendo que el factor Willebrand plaquetario y endotelial interviene en la hemostasis.^{23,69}

Tipo II: este se divide a su vez en tres subtipos:

tipo II a: los pacientes con esta forma de la enfermedad de Von Willebrand muestran ausencia de formas largas e intermedias del factor Willebrand en el plasma, plaquetas y células endoteliales y respuesta deficiente de las plaquetas a la ristocetina.⁶⁷

Los niveles de VIII:RCo estan reducidos al grado que alcanza los

niveles del VIII:Ag; los niveles de VIII:C pueden ser normales.

67

En el tipo II B, hay ausencia de las formas largas del factor Willebrand en el plasma pero hay mayor sensibilidad a bajas concentraciones de ristocetina y su factor de Willebrand muestra una mayor unión a las plaquetas.⁶⁷ El factor Willebrand plaquetario muestra una estructura multimerica normal y al mismo tiempo mayor unión a las plaquetas a bajas concentraciones de ristocetina como la mostrada por el factor Willebrand plasmático.⁶⁷

En el tipo II C, hay ausencia de grandes multimeros del factor Willebrand en el plasma y las plaquetas. Una estructura multimerica aberrante del factor Willebrand es típica de esos pacientes, con ausencia del patrón regular de "tripleto" de cada uno de los multimeros y la presencia de bandas de dobletes con movilidad anormal sobre electroforesis en gel agarosa (SDS). Los padres se encuentran clínicamente infectados y los parientes son presumiblemente doblemente heterocigotos por diferentes anormales.⁶⁷

V.9 VARIANTES DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

Recientemente, se ha hecho alusión a una pseudo enfermedad de Von Willebrand tipo plaquetario.

El desórden hemorrágica transmitido autosómicamente involucra anomalías cuantitativas y/o cualitativas del complejo factor VIII/factor Von Willebrand (VIII/vwf) esta nueva variante de la enfermedad de Von Willebrand (tipo II B),^{19,69} se caracteriza en tener un tiempo de sangrado superior al normal, el conteo de plaquetas inferior al normal, actividad coagulante del factor VIII normal al igual que del antígeno relacionado con el factor VIII, actividad del cofactor ristocetina - VIII disminuida, disminución selectiva de multímeros de alto peso molecular del factor VIII/factor Von Willebrand (VIII/vwf), e incremento de la aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina a bajas concentraciones de la misma fueron característicos. La unión del factor VIII/vwf de los pacientes a plaquetas normales lavadas estuvo dentro de límites normales mientras que la unión del factor VIII/vwf normal a las plaquetas de los pacientes se incrementa significativamente (p 0.001 a 0.6 mg/nl de ristocetina.)^{13,67} Este desórden por consiguiente parece involucrar una anomalía intrínseca de las plaquetas que afecta las interacciones entre el factor VIII/vwf y las plaquetas. Esto lleva a proponer que el concepto de la enfermedad de Von Willebrand debe ampliarse para incluir a aquellos pacientes con esta anomalía, la cuál puede llamarse apropiadamente enfermedad de Von Willebrand tipo plaquetario.^{13,83}

Un mayor estudio de las plaquetas de los pacientes con este subtipo del síndrome de Von Willebrand serán de importancia para continuar la elucidación de los receptores plaquetarios para el factor VIII/vwf así como las vías metabólicas celulares del factor VIII/vwf plasmático. Una mejor comprensión de esos procedimientos contribuiría al desarrollo de una terapia apropiada para los pacientes con este desorden.²³

Variante de la enfermedad de Von Willebrand tipo II dominante con patrones multimericos aberrantes del antígeno relacionado con el factor VIII (tipo II D).

El antígeno relacionado con el factor VIII (FVIII:Ag) existe en el plasma normal como una serie de multímeros con pesos moleculares que van de 0.9×10^6 a 20×10^6 daltons, según lo ha demostrado la electroforesis con dodecilsulfato de sodio (sds) en agarosa.^{34, 67}

Mediante el uso de esta técnica, los pacientes con enfermedad de Von Willebrand han sido clasificados en varios tipos. En la forma clásica o enfermedad de Von Willebrand tipo I, el patrón multimerico es idéntico al del plasma normal, pero la cantidad de anti-

geno es menor, yendo desde su completa ausencia (homocigoto o doble heterocigoto) hasta una disminución moderada. La enfermedad de Von Willebrand tipo II se caracteriza por la ausencia de los multímeros largos, con dos subtipos basados en las diferencias de reactividad frecuente a la ristocetina (IIa respuesta normal, IIb mayor respuesta) y un subtipo IIc caracterizado por un patrón anormal de migración multimerico en gel de agarosa al 2.5%.^{66,67} Usando métodos similares, se ha reconocido una nueva variante de la enfermedad de Von Willebrand tipo II en una madre y su hija las cuales presentaban manifestaciones hemorrágicas típicas de la enfermedad de Von Willebrand. Los hayasgos de laboratorio incluyen tiempos de sangrado consistentemente prolongados, con niveles normales de antígeno y factor VIII procoagulante, pero actividad del cofactor ristocetina disminuida. La electroforesis en (sas) en gel de agarosa al 1.5% y la reacción con antifactor de antígeno IgG de conejo relacionado con el factor VIII marcado con I₁₂₅ seguida por autorradiografía, reveló que tanto el plasma como las plaquetas carecían de los multímeros largos del antígeno relacionado con el factor VIII. En gel al 2.5% el plasma carecían del patrón normal de "tripleto". En gel al 3% se observó un patrón de 5 bandas en el plasma normal tipo IIa y tipo IIb, mientras que el plasma IIc presento un patrón de 2 bandas el plasma de los pacientes reveló un patrón distintivo de 4 bandas diferentes del normal u otras variantes del tipo II. Se sugiere que esta variante sea llamada tipo IIId, hasta que se desarrolle una nomenclatura más apropiada.^{1,12,89,66,67}

V.10 ANTIGENO II DE VON WILLEBRAND PLAQUETARIO

La enfermedad de Von Willebrand es un desórden hemorrágico heredado autosómicamente caracterizada en el laboratorio clínico por un tiempo de tromboplastina parcialmente activado prolongado y un tiempo de sangrado también prolongado.³⁷

Esos hallazgos han sido atribuidos a una deficiencia del complejo molecular del factor VIII, causando de este modo una actividad coagulante del factor VIII (VIII C) menor, el antígeno relacionada con el factor VIII (VIIIIR:Ag), y el factor VIII/factor Von Willebrand, el cuál es el componente plasmático del factor VIII que corrige el tiempo de sangrado prolongado en la enfermedad de Von Willebrand.^{27,37}

Montgomery y Zimmerman describieron un segundo antígeno, al antígeno II de Von Willebrand (vW Ag II), el cuál también es deficiente en el plasma de los pacientes con enfermedad de Von Willebrand.⁵⁸ Reportes recientes han descrito la liberación del vW Ag II de las plaquetas. Previos trabajos han mostrado que el vW Ag II, es inmunológica y bioquímicamente distinto al VIIIIR:Ag^{49,96} También se ha mostrado que el vW Ag II, plaquetario es inmunológicamente idéntico al vW Ag II, plasmático y tienen el mismo coeficiente de velocidad de sedimentación (4.8s).⁵⁸

Aunque la función de vW Ag II, plaquetario se desconoce hasta ahora, este esta presente en concentraciones relativamente eleva-

das en las plaquetas y es liberado de estas durante la coagulación y la agregación.⁵⁸

En la enfermedad de Von Willebrand, el plasma y las plaquetas son ambas deficientes en vW Ag II.^{49,96} más del 80% del vW Ag II, de Las plaquetas es liberada como respuesta al colágeno y la trombina esto difiere bastante del 10-20% liberado de VIII:Ag de las plaquetas. Además el vW Ag II, plaquetario esta presente en concentraciones relativamente mayores comparado con el plasma que es el VIII:Ag. Estudios sugieren que del 10-25% del VIII:Ag total circulante esta presente en las plaquetas, pero debido a las bajas cantidades liberadas de este, las concentraciones en plasma y suero son casi idénticas.^{31,41,69,96}

El vW AgII plaquetario, por otro lado, alcanza el 67% de vW AgII circulante.⁵⁷ El vW AgII es liberado casi en su totalidad con la coagulación alcanzando concentraciones 3 ò 4 veces mayor en suero comparadas con las del plasma.^{31,41,69,96}

La cantidad de vW AgII presente en las plaquetas mediante la técnica de lavado fué 3.39 ± 0.75 u/10.⁹ plaquetas. Este resultado es ligeramente mayor que al obtenido por otros dos métodos lisis con detergente de plaquetas sedimentadas sin lavar (3.14 ± 0.76 u/10.⁹ plaquetas) y liberación por coagulación (3.17 ± 1.15 u/10.⁹ plaquetas).⁵⁷ así, parece haber menos vW AgII con el lavado de plaquetas. El efecto de que la concentración puede ser ligeramente mayor que los otros dos métodos podría ser explicado por la

remoción selectiva de las plaquetas de baja densidad con la técnica de gradiente. Knotts y colaboradores,⁴⁹ encontraron que el gradiente de densidad de separación de la albumina de plaquetas que son relativamente insensibles al (adp). Aún a grandes concentraciones de (adp), la agregación de las plaquetas fué mínima y la liberación de vW AgII, y 5-Hidroxitriptamina (5 ht), se menoscabo de forma similiar. La adición de fibrinógeno o plasma de Von Willebrand citrado no corrige la respuestá al (adp). Esta insensibilidad puede deberse a la remoción del calcio extracelular, aunque los experimentos para determinar estos no fueron emprendidos.

En los variados experimentos dosis/respuesta y concentración/respuesta con colágeno y trombina, la liberación de 5 ht y vW AgII de las plaquetas normales lavadas hubo alta correlación. En el curso del experimento el vW AgII mostro ser liberado en el mismo tiempo o un poco antes que la 5 ht. Esto contrasta con los estudios con VIII:Ag, el cual mostro ser liberado más lentamente que la 5 ht.^{49,96} Koutts sugiere que la tardanza en la liberación del VIII:Ag, puede deberse a su gran tamaño molecular.⁴⁹

Puesto que el vW AgII, es mucho más pequeño (aproximadamente 140,000 daltons y una velocidad de sedimentación de 4.8 s)⁵⁸ puede esperarse que sea liberada antes que el VIII:Ag. La liberación del vW AgII, es un proceso metabólico que es bloqueado por los inhibidores metabólicos antimicina-a y 2-desoxi-d-glucosa.

La antimicina-a y la 2-desoxi-a-glucosa agotan el atp de las plaquetas, menoscabando así la agrupación plaquetaria y la reacción de liberación.²⁸

De interés particular fué la inhibición completa del vW AgII liberado por el colágeno al punto en que la 5 ht fué inhibida completamente. La inhibición del vW AgII y la 5 ht fué solamente del 40% cuando se utilizó trombina como agente agregante.²⁸

Knotts y colaboradores reportaron datos similares para el VIIIIR:Ag, demostrando que los inhibidores metabólicos fueron más efectivos con la inhibición de la liberación inducida por colágenos que con la liberación inducida por trombina.⁴⁹ Esos mismos investigadores encontraron también una inhibición del VIIIIR:Ag más pronunciada que la de la 5 ht. Esto fué similar a la comparación de la liberación de vW AgII y 5 ht observada en algunos estudios.

La aspirina, un inhibidor de la ciclooxigenasa plaquetaria, se encontro que inhibía a ambas liberaciones de 5 ht y vW AgII en respuesta al colágeno. Zucker también demostró la inhibición de la liberación del VIIIIR:Ag por la aspirina.⁹⁶

Existen numerosas similitudes en la liberación de vW AgII y VIIIIR:Ag. Ambos son liberados por eventos metabólicos que son bloqueados por inhibidores metabólicos y aspirina. La liberación del vW AgII ocurre aproximadamente al mismo tiempo que la de 5 ht mientras que el VIIIIR:Ag pude liberarse con más lentitud. Ambos

vW AgII y VIIIIR:Ag son bloqueados por la antimicina-a y la 2-desoxi-d-glucosa más efectivamente que la liberación de 5 ht con colágeno como agente agregante. Las mayores diferencias entre el vW AgII plaquetario y el VIIIIR:Ag plaquetario son en su distribución relativa en la sangre. Así, el vW AgII es principalmente un antígeno plaquetario. Además, las plaquetas son capaces de liberar virtualmente todo su vW AgII (más del 80%), mientras que otros investigadores han demostrado que las plaquetas liberan menos del 35% del VIIIIR:Ag.⁴⁹

Esta alta concentración de vW AgII plaquetario y su capacidad de ser liberado por agentes coagulantes y agregantes sugiere que el vW AgII puede ser un marcador efectivo de la reacción de liberación plaquetaria in vivo. Así la liberación sería similar para la beta-tromboglobina (beta-tg) y el factor 4 plaquetario (pf-4) esto es de especial importancia puesto que demuestra que el vW Ag II no se ve afectado por el tipo de anticuagulantes o por las fluctuaciones de temperatura en cortos periodos de tiempo que es bien sabido afectan al pf-4 y a la beta-tg.⁵⁸ Se ha estudiado que pacientes con púrpura trombocitopenica idiópatica, síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopenica trombótica y coagulación intravascular diseminada, el vW AgII tuvo una concentración que fué de ayuda para diferenciar el tipo de trombocitopenia aunque todas esas entidades estan asociadas con un periodo de vida corta^{26,46} tal acortamiento, es presumiblemente debido a la destrucción intravascular de las plaquetas mientras en la púrpura

trombocitopénica idiopática se piensa que se debe a la remoción extravascular de la capa de anticuerpos de la plaqueta.^{54,60}

Los datos de este estudio mostraron una marcada elevación del vW AgII plasmático en síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopénica trombótica y coagulación intravascular diseminada, con todas menos una de las determinaciones dentro de los rangos normales. En la púrpura trombocitopénica idiopática, sin embargo ninguno de los valores cayó fuera del rango normal, aunque la cantidad de vW AgII estuvo elevada.^{54,60}

Se sugiere que el vW AgII puede ser un importante marcador in vivo, de la liberación plaquetaria durante el consumo intravascular plaquetario, existen varias diferencias remarcables entre el vW AgII y las proteínas plaquetarias más extensamente estudiadas, la beta-tg y el pf-4. Los niveles séricos de beta-tg son 500-1000 veces más grandes que los niveles plasmáticos.⁹¹ El vW AgII plaquetario es aproximadamente 3-4 veces la concentración en plasma.

En aquellas enfermedades clínicas asociadas con niveles elevados de beta-tg tales elevaciones son menos de 10 veces más que los niveles plasmáticos.¹⁴ El vW AgII tiene niveles en coagulación intravascular diseminada, púrpura trombocitopénica trombótica y síndrome urémico hemolítico iguales o mayores a las concentraciones séricas.

Para explicar la diferencia entre el vW AgII y la beta-tg o el pf-4. El vW AgII puede ser liberado mucho más rápidamente de las plaquetas in vivo durante la activación. Alternativamente, algunas otras fuentes de liberación de vW AgII pueden ser involucradas (por ejemplo células endoteliales). Estudios del fluido sobrenadante del cultivo de células de tejido endotelial sugieren que el vW AgII puede estar presente en tales células. Así, el vW AgII es un antígeno plaquetario, el cuál es deficiente en las plaquetas de los individuos con enfermedad de Von Willebrand severa y es liberada de las plaquetas normales mediante un proceso metabólico. Esta liberación es bloqueada por la aspirina e inhibidores metabólicos. El estudio del vW AgII en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome urémico, hemolítico y coagulación, intravascular diseminada sugiere que el vW AgII puede ser otro marcador de la reacción de la liberación plaquetaria in vivo y puede ser de ayuda para diferenciar entre la destrucción intravascular y extravascular de las plaquetas.

V. 11 VARIACION DE LOS NIVELES PLASMATICOS DEL FACTOR VIII
DEL FACTOR WILLEBRAND

Los niveles de la actividad coagulante del factor VIII se ven afectado por estímulos beta adrenérgicos y factores neurohumorales debido a que los niveles pueden incrementarse como respuesta al ejercicio, oclusión venosa y administración de insulina, vasopresina y hormona del crecimiento.³⁷

El aumento de los niveles de VIII:C y factor Willebrand se asociaron numerosas condiciones clínicas incluyendo enfermedad renales y diabetes mellitus. El embarazo y la administración de hormonas estrogénicas puede causar también un aumento de esas actividades.³⁷

Además se ha sugerido que los niveles de los factores Willebrand y VIII pueden variar de acuerdo con la época del año. El aumento del factor Willebrand en cualquiera de esas condiciones (particularmente en embarazo y la administración de píldoras para el control de la natalidad) puede oscurecer el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand particularmente en pacientes con el tipo I.³⁷

V. 12 SINDROME DE VON WILLEBRAND ADQUIRIDO

Un síndrome semejante a un desorden hemorrágico congénito, la enfermedad de Von Willebrand, algunas veces se presenta en pacientes sin antecedentes familiares o síntomas previos de sangrado anormal. El síndrome usualmente llamado enfermedad de Von Willebrand adquirida, es estrictamente similar a la enfermedad congénita en términos de los hallazgos de laboratorio caracterizada por un tiempo de sangrado prolongado y un tiempo de tromboplastina (ttp) parcialmente prolongada con actividades procoagulantes del factor VIII (VIII:C) disminuida, al igual que del antígeno relacionado con el factor VIII (VIII:R:Ag), y la actividad del factor Von Willebrand (VIII:vWf). Un antígeno más de Von Willebrand, llamado antígeno II de Von Willebrand (vWAgII), también es deficiente en el plasma y plaquetas de los pacientes con enfermedad de Von Willebrand, sin embargo ha sido estudiada en la enfermedad de Von Willebrand adquirida.^{25,42,37,94}

Simone y sus colaboradores⁷⁶ fueron los primeros en descubrir la enfermedad de Von Willebrand adquirida en un paciente de 14 años de edad con lupus eritematoso sistémico, cuyo desorden hemorrágico retrocedió después de la terapia con esteroides de este lupus.⁷⁶

Enseguida reporto que, se había encontrado la enfermedad de Von Willebrand adquirida en dos o más casos asociados con desórdenes colágeno-vasculares,⁵³ especialmente el lupus eritematoso siste-

mico^{38,63} gamamopatia monoclonal,⁵³ desórdenes malignos y angiodisplacia.^{25,42}

La revisión de diferentes casos reportados en la literatura indican que la enfermedad de Von Willebrand adquirida ocurre más frecuentemente en asociación con desórdenes autoinmunes o linfoproliferativos, asociada o no a gamopatias monoclonales. Aún cuando esta asociación indica fuertemente que la enfermedad de Von Willebrand adquirida tiene bases inmunológicas, existen casos en los que la enfermedad fundamentalmente (tumores sólidos, angiodisplasias, etc.), no tienen relación obvia con alguna anomalía del sistema inmune.⁷⁰

Se han propuesto tres mecanismos generales para explicar la patogénesis de la enfermedad de Von Willebrand adquirida. El primero implica que cada uno de los anticuerpos inactiva las actividades biológicas del f-VIII/vWf, uniéndose al complejo sin afectar los sitios activos, o induciendo la rápida eliminación del complejo de la circulación a través de la formación de un complejo inmune.^{25,72} El segundo propone que la enfermedad de Von Willebrand adquirida es resultado de una absorción selectiva de FVIII/vWf de las clonas linfocíticas anormales o células malignas, conduciendo a una disminución de los niveles plasmáticos.^{42,74} El tercero establece que existe una síntesis defectuosa del FVIII/vWf en los compartimientos celulares (megacariocitos, células endoteliales) y/o existe una liberación defectuosa hacia el plasma.⁷⁰

Estas tres nuevas aportaciones se aplicaron recientemente para investigar el problema de la patogenesis de la enfermedad de Von Willebrand adquirida en siete pacientes con enfermedad de Von Willebrand asociada con desórdenes linfoproliferativos o gamopatias monoclonales benignas.⁷⁰

Lo primero que se realizó fueron las mediciones del antígeno del factor Von Willebrand y el cofactor ristocetina (vWf:Ag y vWf:R:cof, respectivamente) en las plaquetas, para la cuál se conto con células de origen megacariocítico de las cuales el contenido celular de vWf o sus comportamientos celulares pudo ser evaluado.^{70,88} Lo segundo fué medir la tasa de liberación y eliminación del fVIII-vWf mediante la evaluación de los cambios del vWf:Ag, vWf:R:cof, y f VIII:C después de la infusión del cfl-deamino - 8-d argenina vasopresina (ddavp), un farmaco que probablemente libere f VIII-vWf de los comportamientos celulares.^{70,88}

Lo tercero fué el análisis electroforético del fVIII-vWf, que consiste de series multiméricas de oligómeros de un protomero compuesto por un número variable de subunidades idénticas, en plasma y plaquetas.^{34,68} El contenido plaquetario del antígeno de Von Willebrand y el cofactor de ristocetina fueron normales y la estructura multimérica estaba intacta, indicando que la síntesis del FVIIIvWF en las megacariocitos es cuantitativa y cualitativamente normal.^{70,88}

Todos los multímeros del vWF:Ag podrían ser observados en patrones de electroforesis sobre el gel agarosa-sds al 1.6% de plasma y lisados plaquetarios.^{34,68} La infusión de I-deamino-8d-arginina vasopresina (ddavp) aumento los niveles plasmáticos de vWF:Ag y vWF:ricof en todos los pacientes y corrigió los tiempos de sangrado prolongado,⁷¹ sin embargo comparados con los pacientes con enfermedad de Von Willebrand congénica tipo I y grados comparables de anormalidades tratadas de la misma manera, el vWF:Ag y vWF:ricof se incrementaron menos y se eliminaron más rápidamente del plasma y el tiempo de sangrado se mantuvo normal por un período corto de tiempo.¹⁰

Los resultados de esta investigación pueden tener también implicaciones terapéuticas. El (ddavp) normaliza transitoriamente el tiempo de sangrado en todos los pacientes con enfermedad de Von Willebrand adquirida e incrementada las concentraciones plasmáticas de FVIII:C, vWF:Ag, y vWF:ricof. El (ddavp) puede ser usado para el tratamiento de episodios hemorrágicos o seguridad hemostática para procedimientos quirúrgicos sin recurrir a crioprecipitados, con un inherente riesgo de hepatitis.¹⁰

V. 13 D I A G N O S T I C O

En la mayoría de los pacientes con la enfermedad de Von Willebrand el diagnóstico presenta pequeñas dificultades y puede hacerse en la historia clínica y pruebas de laboratorio bastante sencillas. El tiempo de sangrado es prolongado y podría hacerse por la técnica de (ivy) la cuál es más sensible a las normalidades medidas que la técnica de Duke.³⁹

El tiempo parcial de tromboplastina (TTPa) resulta algunas veces alargado. La retención plaquetaria en columnas de cuentas de vidrio generalmente es anormal. La prueba de la retención plaquetaria se usa como auxiliar en el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand pero esta ya ha sido superada por pruebas más específicas. La actividad coagulante del factor VIII se reduce moderadamente y el nivel de VIIIIR:Ag usualmente disminuye.^{39,61}

La ristocetina que induce la aglutinación plaquetaria en plasma rico en plaquetas esta ausente o mermada en la mayoría de los casos. Sin embargo, en el tipo IIB, esto ocurre a bajas concentraciones de ristocetina en contraste con lo normal.^{39,61}

El nivel de cofactor de risticetina esta disminuido en la mayoría de los pacientes pero puede estar moderadamente disminuido o igual al normal en algunas variantes (tipo IIB y IIC).^{31,61}

En el síndrome de Bernard Soulier, la aglutinación con ristocetina también es anormal pero el nivel del factor de ristocetina es

normal (en cualquier caso, el síndrome de Bernard- Soulier es morfológicamente fácil de distinguir por la presencia de plaquetas gigantes).⁸¹

Se piensa que la disminución del nivel del cofactor de ristocetina alguna manera refleja la importancia del factor Willebrand en la hemostasis. En ocasiones, sin embargo, el VIII:RRCo es normal, aunque la tendencia hemorrágica se presenta claramente. En los pacientes con formas variantes de la enfermedad, son necesarios análisis inmunolectroforéticos adicionales del factor Willebrand.⁸¹

Pueden utilizarse numerosas técnicas tal como la electroforesis gel agarosa (sds) para identificar la distribución anormal de los polímeros del factor Willebrand.⁸⁰

Esta nueva técnica da información más detallada que la inmunolectroforesis bidimensional.⁸⁰

Se han desarrollado técnicas inmunoradiométricas para el factor Willebrand pueden ser de ayuda en el diagnóstico de las formas variantes de la enfermedad por que los pacientes con factor Willebrand anormal dan una curva dosis respuesta que ningún momento es paralela a la del plasma control. Sin embargo, esto no tiene valor diagnóstico y esos ensayos son usados especialmente para el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand en homocigotos. Esto se hace principalmente por electroforesis sobre agarosa (sds) lo que permite la clasificación de los subtipos.²

Podría hacerse un estudio de la agregación plaquetaria y sería normal en la enfermedad de Von Willebrand excepto en presencia de ristocetina. Ocasionalmente se han reportado anomalías en la agregación plaquetaria inducida por otros estímulos.⁸⁰

Es particularmente importante tener cuidado en el manejo de fármacos porque la aspirina puede prolongar el tiempo de sangrado, aunque esta no afecta los niveles del factor Willebrand. Como ya se mencionó con anterioridad, las hormonas estrogénicas, pueden incrementar el nivel de VIIIIC y factor Willebrand y así opacar el diagnóstico.⁸¹

Un problema común en el diagnóstico es decidir si el paciente tiene enfermedad de Von Willebrand moderada o es normal. En los casos en el que el diagnóstico es dudoso, pueden repetirse los estudios después de un intervalo de varias semanas o meses debido a que el tiempo de sangrado y los niveles del factor Willebrand y factor VIII pueden variar. También puede obtenerse información valiosa investigando a otros miembros de la familia.

V.14 T R A T A M I E N T O

La literatura acerca del tratamiento de la enfermedad de Von Willebrand no es muy extensa. Se han sugerido grandes variadas terapéuticas, la mayoría de las cuales al parecer han sido exitosas. Esta diversidad tal vez pueda atribuirse al efecto de que la mayoría de las personas con enfermedad de Von Willebrand presentan ligeros síntomas hemorrágicos y el sangrado puede cesar espontáneamente haciendo difícil juzgar el efecto del tratamiento.^{8,11}

Esto es inusual para los pacientes con enfermedad de Von Willebrand ligera o moderadamente severa que requiere terapia por episodios hemorrágicos a menos que sufran una operación. Los episodios hemorrágicos usuales que requieren tratamiento son la epistaxis severa, menorragia, y la hemorragia gastrointestinal recurrente. La hemorragia gastrointestinal es tal vez la manifestación hemorrágica más problemática de esta enfermedad de Von Willebrand y en algunos pacientes puede ocurrir a intervalos repetidos durante su vida. El episodio inicial requiere, por supuesto, la investigación completa del tracto gastrointestinal.^{8,11}

Como ya se ha puntualizado; algunos de esos pacientes tienen lesiones angioplásticas del intestino las cuales pueden ser diagnosticadas por angiografía. La menorragia generalmente puede controlarse mediante terapia hormonal y, puesto que las hormonas

estrogénicas pueden incrementarse las actividades del factor VIII y el factor Willebrand, pueden usarse para el tratamiento de otros tipos de hemorragias. La prednisona puede causar un acortamiento dramático del tiempo de sangrado en la enfermedad de Von Willebrand aunque no se ha usado ampliamente en su tratamiento.27,68

En las formas ligeras o moderadas de la enfermedad de Von Willebrand, la indicación terapéutica usual es una operación. La meta de la preparación preoperatoria es generalmente la de incrementar los niveles de VIII y acortar el tiempo de sangrado.27,68

Esos objetivos parecen ser razonables por lo que se conoce acerca de las anomalías del mecanismo hemostático en la enfermedad de Von Willebrand. En la experiencia de algunas gentes sin embargo el acortamiento del tiempo de sangrado es solamente transitorio y esos pacientes moderadamente afectados pueden sujetarse a procedimientos quirúrgicos mayores con hemostasis relativamente normal. Deberá tenerse en cuenta, sin embargo que algunos procedimientos de cirugía mayor son hemostáticamente menos riesgosos que algunos menores. Cualquier forma de cirugía en el que no se alcance la hemostasis quirúrgica deberá proceder a la corrección del tiempo de sangrado. Estas incluyen particularmente extracciones dentales, tonsilectomía, cirugía ortopédica, o cualquier procedimiento que lesione las superficies, además, la corrección del tiempo de sangrado defectuoso se hace generalmente para corregir o prevenir el sangrado mucoso.27,68

En la enfermedad de Von Willebrand media, las extracciones dentales usualmente se realizan con transfusiones mediante el uso de una buena hemostasis local e inhibidores fibrinolíticos.^{24,48}

Los niveles del factor VIII pueden permanecer elevados varias semanas después de la operación sin necesidad de más transfusiones a pesar de la rápida caída del factor Willebrand. No es común que el factor Willebrand permanezca elevado durante largos periodos de tiempo.^{24,48}

Existen reportes conflictivos en lo que se refiere a la efectividad de las diferentes preparaciones terapéuticas sobre el tiempo de sangrado. La técnica de (ivy) es más sensible que la técnica de Duke.³⁹ El tiempo de sangrado de (ivy) puede ser difícil o imposible de corregir incrementando el nivel del factor Willebrand en plasma, y la causa por la que este método se ha usado en muchos estudios puede explicarse algunos de las discrepancias encontradas en la literatura.^{11,29,39}

El tratamiento preoperativo de elección es con plasma o crioprecipitado. En Suecia, la fracción I-O también se ha usado con frecuencia. El concentrado comercial de factor VIII generalmente no es efectivo debido a que no contiene el polímero de alto peso molecular del factor Willebrand.^{11,29,39}

Además, mucha gente siente este contraindicado puesto que causa grandes concentraciones de plasma los cuales incrementan significativamente el riesgo de una hepatitis. Esto concuerda con la

mayoría de las terapias preoperativas efectivas de la enfermedad de Von Willebrand con crioprecipitado.²⁷ Algunos autores recomiendan dar el crioprecipitado de doce a veinticuatro horas antes de la operación.

Sin embargo la mayoría cree que puede darse inmediatamente antes de la operación, en cada caso, esto se repite diariamente durante un período de tiempo variable, que va desde un día hasta catorce días después de la operación.

VI H E M O F I L I A B

VI.I ESTRUCTURA Y FUNCION

El factor IX humano juega un papel importante en el proceso de la coagulación sanguínea, de manera que una deficiencia en la actividad de esta proteína ocasiona comunmente un estado hemorrágico conocido como hemofilia B o enfermedad de Christmas.⁵⁴

El factor IX humano, es una glicoproteína de peso molecular de 57,500 daltons que se encuentra en el plasma en una concentración de 2.6 - 5.0 mg/ml con una vida media en la circulación de 20 a 30 hrs.⁵⁵

Este factor circula en forma de precursor inactivo o zimogeno.⁵⁶ Siendo este una proenzima de proteasa sérica que participa en la primera etapa de la cascada de la coagulación. Es una proteína de cadena simple dependiente de la vitamina K, que contiene 416 aminoácidos y un 17% en peso de carbohidratos. Los primeros 12 residuos de ácido glutámico en las terminales amino de la proteína, estan presentes como residuos de ácido alfa-carboxiglutamato, importantes en la unión a calcio y fosfolípidos.⁵⁵

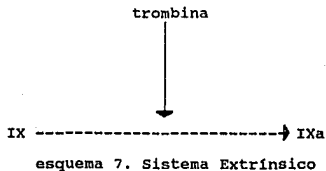
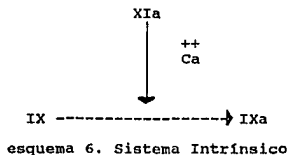
Factor IX, es aislado del plasma como precursor de cadena simple, cuya activación es llevada a cabo, por una fragmentación interna de la molécula debida a dos rompimientos consecutivos.⁵⁵

En la mayoría de los pacientes, la deficiencia de la actividad coagulante se debe a la ausencia de la molécula del factor IX,

sin embargo, se ha encontrado de un 10 a un 30% de los pacientes que presentan deficiencia en la actividad coagulante existen variantes anormales del factor IX.⁵⁵

Usharani y Cols.¹ Consideran que durante el proceso de coagulación del factor IX puede ser activado de tres maneras:

- a. Por factor XIa. (Sistema intrínstico). Esquema I
- b. Por factor VIIa. (Sistema extrínstico). Esquema II
- c. Por trombina



La activación normal de factor IX por la vía intrínseca es llevada a cabo, por el factor XIa en presencia de los iones calcio.^{55,56}

En el primer paso de activación de este factor, el enlace entre arginina y alanina es hidrolizado por el factor XIa, generando así dos cadenas intermedias unidas mediante un puente de disulfuro, esta entidad estructural constituye el factor IXa.^{55,56}

El segundo paso de la activación el enlace entre arginina y valina es hidrolizado con una menor fuerza de comparación con el primero, dando como producto el factor IXa que constituye una verdadera glicoproteína activada.^{55,56}

Osterud y rapaport (1,2) mostraron el factor IX, puede ser activado por la vía extrínseca, mediante la activación del factor VIIa y el factor tisular que hidrolizan el factor IX, sin embargo el mecanismo de proteólisis aún no ha sido establecido.^{57,2}

Aún no se ha establecido si el factor VIIa hidroliza primeramente el enlace arginina y alanina o al enlace de arginina-valina.

Aparentemente el factor VIIa y el XIa difieren en los pasos de hidrólisis de los enlaces, y esto hace posible que las enzimas que participan en la activación del factor IX actúen conjuntamente.^{57,2}

La activación del factor IX por la vía extrínseca es dependiente de su concentración en el plasma y es controlada por los niveles

del factor tisular.

Por otra parte, cantidades suficientes de elastasa, pueden ser generadas para inactivar el factor IX, aunque parece ser que la elastasa hidroliza enlaces peptídicos cercanos; pero no los específicos que son: arginina-alanina; arginina valina necesarios para la activación del factor IX. La degradación del fix por proteasas neutras celulares (elastasas) representa un mecanismo de control para coagulación, en pacientes con coagulación intravascular diseminada se han encontrado niveles altos de elastasa granulocítica.⁵¹

Marlar y Seegers¹³ describieron la reacción del factor IX bovino con trombina bovina. En esta reacción la trombina rompe y libera un péptido (p.m. 8,000) De la región carboxi-terminal del factor IX; demostrado de esta manera que el factor IX puede ser activado por la trombina.

Sin embargo cabe aclarar que este resultado es de poco valor; y en cuanto se refiere al péptido liberado, este constituye el llamado factor IXb.

La activación del factor IX por alguno de los mecanismos ya mencionados, genera el factor IXa, el cuál es una proteasa serina constituida por dos cadenas polipéptidicas; una cadena ligera (p.m. 18,000) Constituida de 145 residuos del factor IX aminoterminar y doce residuos de ácido gamacarboxiglutámico unida mediante un puente de disulfuro a la cadena pesada (f.m. 28,000).

La cuál esta constituida por 236 residuos del factor IX carboxi-terminal.^{53,54}

El principal papel del factor IXa en el proceso de la coagulación, es la activación del factor XIa, Xa, aunque en realidad el activador fisiológico de esta reacción es el complejo formado por el factor IXa calcio, fosfolípidos y trombina que activa (altera o modifica) al factor VIII.^{53,54}

El factor IXa es una enzima útil de esta reacción, mientras que el calcio y los fosfolípidos son cofactores importantes de esta reacción.

Sea ha mostrado que la activación del factor IX es influida por una serie de factores entre los que se encuentran el factor XII, quininógenos de alto peso molecular (hmwk) factor XIa, así como también los fosfolípidos entre los que se encuentran la cefalina, la cuál acelera la activación de los conceptos del factor IX de dos a tres veces.^{53,54}

Los fosfolípidos tienen mucha importancia como factores enlazantes en todos los pasos subsecuentes de la cascada de la coagulación.

VI.2.- G E N E T I C A

La hemofilia B es una alteración hemorrágica que se transmite por mujeres transportadoras como un caracter recesivo ligado al cromosoma X, el cuál se hereda y causa un defecto en la coagulación intrínseca del factor IX.^{11,37}

Esta enfermedad aparece en varones con una frecuencia de aproximadamente de 1 entre 30,000.^{11,37}

Se ha observado que la hemofilia B en las mujeres es muy rara y cuando se presenta es debido a aberraciones en el cromosoma X.
11,37

Probablemente se deba a un proceso de extrema ionización, esto es, el riesgo de inactivación del cromosoma X portador del gen normal, que es llevado en la mayoría de las células que sintetizan al factor IX.^{11,37}

La hemofilia B en las mujeres se debe a un alto grado de ionización, se presenta una alta inactividad del factor IX semejante a la que presentan los varones afectados.³⁶⁻³⁷

POSIBILIDADES GENETICAS DE LA HEMOFILIA B

La deficiencia del factor IX pasa de una a otra generación como un caracter recesivo ligado al sexo. En general, la mujer es la portadora, pero no presenta signos ni síntomas clínicos de trastorno.^{19,20.}

Las posibilidades genéticas inherentes a este transtorno y otros similares, se indican de preferencia con símbolos y esquemas.^{19,20}

Los genes específicos suelen señalarse mediante índices altos. Un gen dominante se indica con letra mayúscula U un gen recesivo con letra minúscula.^{19,20}

El gen anormal responsable de la deficiencia del factor IX es recesivo y se indica con la letra minúscula (n) el gen normal dominante se designa (h). Una mujer normal por lo tanto será XH XH, mientras que la portadora XH Xh. En el caso de la portadora, la expresión dependerá de cuál cromosoma X sea funcional en las células somáticas. La portadora no suele tener síntomas, ya que la distribución al azar origina que por lo menos el 50% de los cromosomas X sean XH en las células somáticas. El cromosoma Y del varón no lleva este gen y no tiene H ni h. Que un niño varón sufra deficiencia del factor IX, o no la sufra, depende enteramente del carácter del cromosoma X que ha de recibir de la madre.^{19,20}

Si la portadora femenina contribuye con el cromosoma XH normal a la descendencia masculina, el varón es normal. Pero si el cromosoma X aportado por la madre a su hijo varón es el que lleva el gen anormal habrá expresión patológica y no existirá un gen normal capaz de suprimirla.^{19,20}

Los siguientes esquemas presentan las posibilidades genéticas de la hemofilia. El varón se indica con rectángulo y la mujer con círculo.

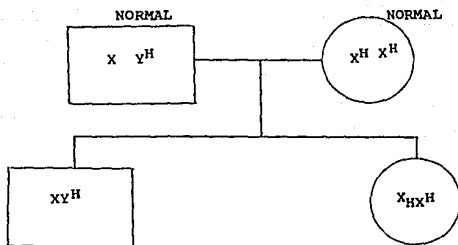
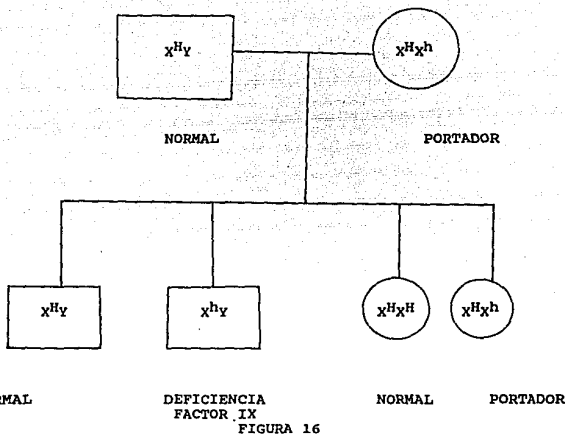


Figura 15 Representa una familia normal sin deficiencia del Factor IX, todos sus hijos son normales



NORMAL

DEFICIENCIA
FACTOR IX

NORMAL

PORTADOR

FIGURA 16

Figura No. 16 Representa la unión de un varón normal con una mujer portadora, que puede resultar en un varón hemofílico o una hembra portadora, y también un hijo normal de cualquiera de los dos sexos. Por desgracia no hay manera de saber con seguridad si una mujer es o no portadora. La mujer portadora puede tener una actividad coagulante normal o notoriamente disminuida. Un nivel normal del factor IX no descarta el estado de portador, aunque a un nivel muy bajo debería hacer pensar en la existencia del cromosoma anormal.

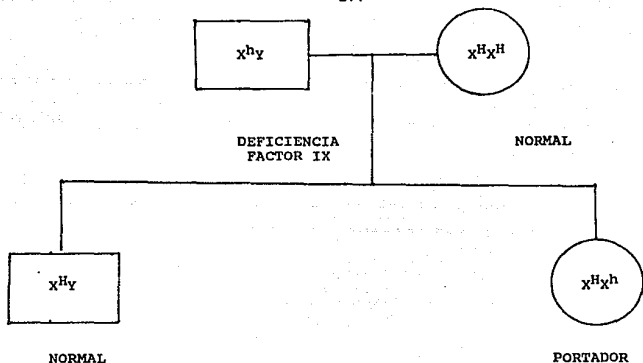


Figura 17 Indica los resultados de la unión de un varón con deficiencia del factor IX con una mujer normal. Todas³⁰ las hijas normales deben ser portadoras, ya que el único cromosoma X del varón es el que debe contribuir a llevar el gen normal. Por otra parte, ninguno de los hijos varones puede tener hemofilia ya que un varón sólo debe recibir el cromosoma X de la madre normal.

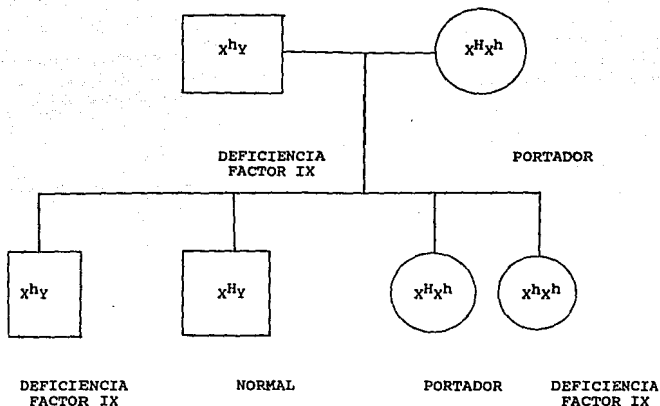


Figura 18 Indica los resultados de la unión de un varón con deficiencia del factor IX y una portadora. Durante años no se aceptaba la posibilidad de que una mujer pudiera sufrir deficiencia del factor IX, pero actualmernte ya se han publicado varios casos bien documentados de ello.

La hija hembra de una unión como la señalada recibiría x^h del varón con deficiencia del factor IX, y el segundo x^h de la madre portadora.

La hija hembra de una unión como la señalada x^h del varón con deficiencia del Factor IX, y el segundo x^h de la madre portadora.

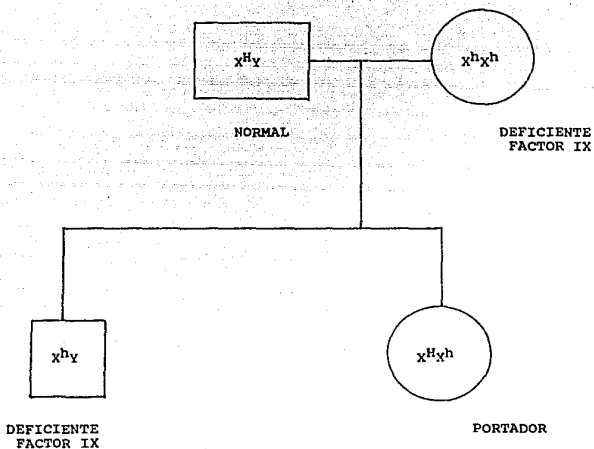


Figura 19 Vemos el resultado de la unión de un varón normal con una mujer que sufre deficiencia del factor IX, todos los hijos varones reciben x^h de la madre, mientras que todas las hijas recibirán x^h del padre, además del x^h de la madre. Por lo tanto todos los varones reciben x^h de la madre, mientras que todas las hijas recibirán x^h del padre además del x^h de la madre, por lo tanto todos los varones tendrán deficiencia del factor IX y todas las mujeres serán portadoras.

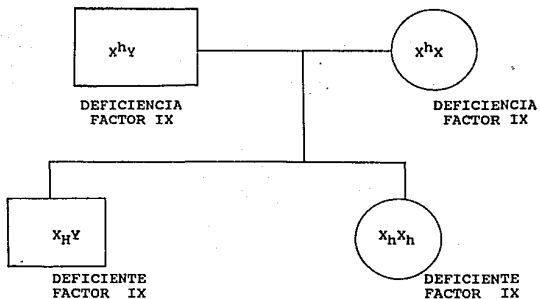


Figura 20. La unión de un hombre con una mujer, ambos con deficiencia de Factor IX probablemente nunca se haya producido, excepto en animales de Laboratorio, todos los hijos de tal unión tendrían deficiencia del Factor IX.

Como hay pacientes hemofilia sin antecedentes familiares del trastorno, se piensa que el número de mutaciones ha de ser elevado.^{19,20}

El resultado de un defecto genético se conoce por la deficiencia de la globulina descrita primero por Patek y Taylor en ausencia de esta globulina, se perturba la primera fase de la coagulación.

Para caracterizar las variantes anormales del factor IX, Usharani y Cols, llevaron a cabo una investigación.³⁸ Consideraron primeramente la existencia de moléculas anormales con alteraciones funcionales, logrando aislar y caracterizar sólo tres.

Las variantes caracterizadas por este grupo son:

factor IX	:	factor IX	:	factor IX
BmLE		LB		LA

El objetivo era comprender mejor la relación entre la función y la estructura del factor IX normal.

Cada una de las variantes caracterizadas pertenece a pacientes con hemofilia severa. Los cuales, de acuerdo a pruebas de laboratorio se encuentran clasificados en grupos diferentes.³⁸

El factor IX BmLE posee un tiempo parcial tromboplastina prolongadamente: el factor IX:LB presenta un tiempo parcial tromboplastina moderadamente prolongado: mientras que el factor IX:LA, tiene un tiempo parcial tromboplastina normal.³⁸

Las tres variantes presentaron peso molecular, composición de aminoácidos, residuos de alfa-carboxiglutámico, punto isoeléctrico y distribución de carbohidratos normales; pero debe tomarse en cuenta que la mutación puntual que genera la sustitución de un aminoácido no puede ser detectada por los análisis realizados, sino que requiere de otro tipo de pruebas.^{19,20}

Existen otras variantes anormales, las cuales han sido anteriormente caracterizadas: factor IX, Zutphen y factor IX, Chapell Hill.

El factor, Zutphen, tiene un peso molecular anormalmente elevado, parece tener una unión baja con el Ca^{++} . Factor IX, Chapell Hill, es una de las variantes mejor caracterizado. Esta variante no sufre la activación normal por el factor XIa ya que durante el proceso de activación solamente el enlace arginina 180 valina 181 es hidrolizado.^{19,20}

La incapacidad del factor XI para hidrolizar el enlace de los aminoácidos arginina 145 alanina 146, del factor IX Chapell Hill es debido a la sustitución de la histidina por la arginina en la posición 145.

La enfermedad de Christmas puede ser dividida en dos clases:

- CRM + (positiva en cuanto a sustrato de reacción cruzada)
- CRM - (negativo en cuanto a sustrato de reacción cruzada)

La primera se refiere a individuos que poseen niveles normales del factor IX, demostrado con ensayos de tipo inmunológico: pero disminución de la actividad del factor IX. Así como también en su actividad coagulante.⁵²

La segunda clase, se refiere a individuos con una gran reducción o niveles no detectables del factor IX, así como también de su actividad coagulante.⁵²

La hemofilia B ha sufrido una subclasificación en tres grandes grupos: tomando como base los niveles del antígeno del factor IX y los siguientes.¹⁶

- I) B+.-Con niveles normales del antígeno del factor IX
- II) BR.-Con niveles reducidos, pero detectables del antígeno del Factor IX.
- III) B.-Con niveles muy bajos, no detectables del antígeno del Factor IX.

La hemofilia B es una alteración hemorrágica que resulta por una deficiencia o anormalidad del factor IX₃₇ el cuál, es esencial para el proceso de la coagulación.¹⁶

Se reporto que de un 10-30% de los pacientes con deficiencias en la coagulación, estas son debidas a la presencia de variantes anormales de la molecula del factor IX.¹⁶

Las bases moleculares, por la cuál, existe la deficiencia del factor IX es casi desconocida, pero lo que si se sabe es que se trata de un daño hereditario ligado al sexo.²⁵

Los estudios sobre el gen normal del factor IX, ha hecho posible la caracterización de la hemofilia a nivel genético.²⁷ Aproximadamente el 40% de los pacientes que tienen una concentración normal de antígeno del factor IX (fact IX Ag) en su plasma, es probable que presenten también mutaciones puntuales en una secuencia codificada: teniendo así el riesgo de presentar cambios en los aminoácidos, tal como el encontrado en el f-IX Chapell Hill.⁵²

Por trabajos realizados a nivel de laboratorio, se ha demostrado que la activación Fix Chapell Hill, da como dos cadenas con una estructura similar a la que se reportó en el factor IX de bovino.⁵⁵

Así como se puede presentar cambios de aminoácidos para producir el Fix de Chapell Hill, también, puede ser que el defecto sea debido a una reducción en la cantidad de (rna) mensajero del Fix, o mutaciones en la cadena terminal causando la producción del Fix truncando y muy inestable.⁵⁵

El desarrollo de un anticuerpo inhibidor circulante es una complicación severa en la hemofilia B implicando al mismo tiempo daños bastante severos.¹⁷ La hemofilia B con el inhibidor es asociada con la presencia del gen alterado del Fix, lo cuál se observo en 5 de 6 casos presentados.¹⁵

La extensión de la alteración es aparentemente homogénea y puede involucrar diferentes regiones del gen, en este mismo experimento 17 se observó una alteración en los pacientes a nivel de la kilobase (Kb)₃₃ del locus del Fx. Por otro lado, los resultados obtenidos con un (dna) clonado₁₆ y diferentes genomas demostraron que la alteración se extiende a través de la estructura del gen a partir de la Kb 7.5 del primer exon al último.

La hemofilia B además de ser causada por una alteración a nivel genético se ve complicada por el desarrollo de los anticuerpos específicos contra el Fx, los cuales van en su acción coagulante. Estos anticuerpos inhibidores, son anticuerpos no precipitantes de tipo IgG₃₈ los cuales, se desarrollan después de una terapia de sustitución aplicada a pacientes con hemofilia B, o de manera espontánea en pacientes hemofílicos, esto limita en alguna manera el uso de la terapia de sustitución en este tipo de pacientes 38,37,32,31

Se ha demostrado que estos anticuerpos de tipo IgG tienen la capacidad de formar complejos inmunes in vitro cuando son incubados con el factor IX purificado₂₂, y se ha aprovechado para la cuantificación de los inhibidores haciendo uso de diversas técnicas como son:

ELISA, RIA, contrainmunoeléctroforesis, ensayos inmunoradiométricos y pruebas de inhibición en la coagulación.₂₂

VI.3 MANIFESTACIONES CLINICAS

La hemofilia B es una alteración hemorrágica que resulta por la deficiencia del factor IX.

En la ausencia del factor IX, se obtienen resultados anormales en:

Tiempo parcial de tromboplastina

Tiempo de coagulación

Utilización de protrombina

Y generación de tromboplastina.

Se sospecha en cualquier paciente con una tendencia a sangrar en la que se encuentre un tiempo de tromboplastina parcial prolongado y un tiempo de protrombina normal. El plasma normal y el plasma fresco es absorbido con SO₄Ba corregirán el defecto en cuanto al tiempo parcial tromboplastina. 19,20

La forma grave de la enfermedad se caracteriza por una hemorragia masiva que amenaza a la vida, hemartrosis en las articulaciones que más peso cargan, y hemorragias excesivas por mínimos traumatismos.

La hemorragia excesiva que se requiere una transfusión de sangre se produce por extracciones dentarias, pequeñas intervenciones quirúrgicas o traumas moderados. 19,20

VI.4 METODOS DE DIAGNOSTICO

Radioinmunoensayo

Fundamento:

La técnica de radioinmunoensayo consiste en formar un complejo inmune de bajo peso molecular, el cuál es separado del antígeno libre utilizando calor, fijado con formalina, se utilizaron células de Staphylococcus, en forma sólida la cuál absorve el complejo.

Metodología:

1. Se obtiene plasma de pacientes normales y hemofílicos.
2. Se prepara una suspensión de staphylococcus aureus deionizada en agua y marcados a un volumen de IO.
3. Se centrifugan y se suspenden en R.I.B.
4. Se purifica el factor IX de acuerdo al método Chung, por absorción de hidróxido de aluminio, se efectúa la absorción en cefadex (deac) y se corre una cromatografía en de-52 y sobre agarosa hepaquizada.
5. Si hay, el radioinmunoensayo de acuerdo al método Hunter.
6. La suspensión de staphylococcus aureos se aplica a una columna con cefadex la cuál se equilibra con RIB (también se corrió una con albumina de huevo).

Resultados:

Los resultados obtenidos por este método se observan en la tabla 9, la cuál también se compara con el sistema de la inhibición de la coagulación.^{19,20}

Tabla 9 Comparación de títulos anti-IX por diferentes métodos de medición.

Aloantisuero	inhibición coagulación	radioinmunsayo peg	sas	stpha
a	800	33000	62000	52000
b	60	4200	7700	8200
c	160	1700	2200	17000
d	16	100	200	390
e	13.2	-- +	-	5600
f	nd+	-	-	380
g	nd	-	-	37
heteroantisueros:				
conejo	80	3700	5700	8000
cabra	64	2500	4000	1200

□ las muestras anticuerpo e, f y g fueron amablemente donadas por el Dr. K. N.

+ Los títulos anticuerpos f y g estuvieron por debajo del nivel de los ensayos efectuados en nuestro laboratorio la actividad inhibidora fué detectada por el Dr. Ostrawid.

METODO INMUNOENZIMATICO

Detección de hemofilia B por uso de un sitio polimórfico marcado asociado con el gen del factor IX de la coagulación.

Fundamento . (O)

1.- El DNA complementario para el factor IX (fix) de la coagulación, se detecta una frecuente restricción de un gran polomorfismo (rflp) en el DNA, digerido de los genomas humanos con la restricción de una endonucleasa, en esta técnica se utilizó un marcador paralelamente con ensayos inmunológicos mostrando la segregación de un gen fix anormal en una familia con hemofilia B.

Métodos:

1.- Se utilizaron métodos inmunológicos y pruebas globales, la coagulación como tiempo de protombina, tiempo parcial de trombo-plastina, la actividad del factor IX fué medida utilizando un equipo comercial inmunoenzimático (asserachrom).

2.- La preparación del D.N.A. Leucocitario, se diluyó la sangre completa con solución de tris ph 7.5 y 5m M de EDTA centrifugandose a 4,000 rpm por 5 minutos. Las plaquetas se resuspenden en T.E. 20.5 y se centrifugan en las mismas condiciones, este ciclo se repite varias veces.

3.- La digestión de la proteinasa K fué hecha por 16 hrs. 37°C.

4.- El DNA fué purificado en 2 ciclos de extracción utilizando fenol o equilibrandose con tris 0.1M ph=8.0 y 8', hidroxiquino leina-cloroformo-isosn11.alc6hol, esto se repite 10 veces.

5.- Se agrega etanol para precipitar el DNA el cuál se disuelve

un tris 20 mM y se guarda a 4°C.

6.- La muestra del DNA en la enzima inhibida se coloca en placa de electroforesis sobre unos papeles diazoben 3 y lo xymetil (dbm) y se ahorra la hibridación del factor IX.15,55

Resultados:

Se demostró que hay mutación con niveles normales de antígeno fix el tiempo de tromboplastina fué normales indicando que no hay variante de hemofilia B.

La determinación del fix c y A g fix se muestran en el cuadro 1.

1.- La hibridación del fix y cDNA muestra la detección de y fragmentos constantes y 2 fragmentos dialelos de 1.8 Kh de alelo (A) g 1.3 kh alelo (a).

Caracterización y uso de un marcador polimórfico intragénico para la detección de hemofilia B (factor IX)

FUNDAMENTO.- Se analiza DNA previamente del gen para el factor IX de coagulación conteniendo un axon de dectroforesis, sobre un gel de agarosa y transferido a filtros de nitrocelulosa.15,55

METODOLOGIA

- 1.- Se analizaron 33 sangres de pacientes normales y 27 con hemofilia B.
- 2.- Se lizaron las células y se extrajo el DNA.
- 3.- Se pone a digestión el DNA con la enzima restringida.
- 4.- Se colocó en un gel de agarosa al 0.8% y se separo por eléc troforesis.
- 5.- Se transfirio a un filtro de nitrocelulosa.

RESULTADOS

El polimorfismo detectado por muestra, prueba ha sido virtualmente ideal en la población y el utilizado genéticamente alrededor de un 40 en las familias con hemofilia B.

La cantidad de DNA, del gen por el factor IX varia desde 1.3 a 5.3 Kb.

- Análisis molecular del factor IX con una detección subtotal.

Fundamento: el gen del factor IX fué analizado en pacientes con hemofilia B a través de una digestión con endonucleasas, hibridado y posteriormente se corrió una inmunolectroforesis (reacción antígeno anticuerpo).

METODOLOGIA

- 1.- Se analizó la sangre de 47 pacientes con hemofilia B.
- 2.- Se colectó su sangre periférica en citrato de sodio.
- 3.- Se determinó la cantidad de plaquetas.
- 4.- Las células rojas se lavaron con solución salina buferada y almacenada a -20°C. el DNA De alto peso molecular, se obtuvo de los leucocitos de acuerdo a técnicas anteriores.
- 5.- Al DNA Se corrió una electroforesis sobre agarosa al 0.8% 1.5% y 2% de laboratorio (bio-rad).
- 6.- Después se transfiere a filtros de nitrocelulosa.
- 7.- Se hibridiza el DNA.

RESULTADOS

se muestra en la figura 21

fragmentos de DNA. De pacientes con hemofilia A (A), hemofilia B (B) y pacientes normales (C)

Diagnóstico prenatal de hemofilia B por ensayo inmunoradiométrico para el factor IX.

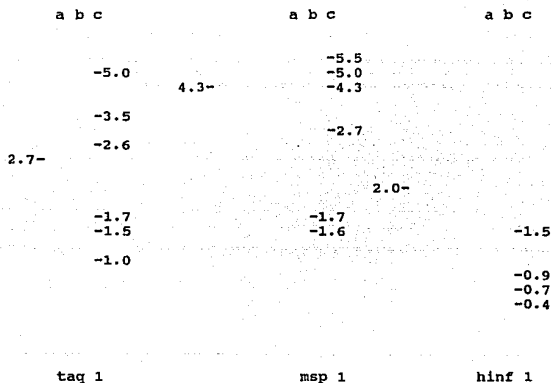


Figura 21. DNA restriction fragments pattern of the hemophilic patient (a), his daughter (b), and a normal subject (c) after hybridization with the cdna probe.

Patrones de los fragmentos de restricción del paciente hemofílico (A), su hija (B) y un sujeto normal (C) después de la hibridación con el DNA cíclico de prueba.

FACTOR IX INTRAGENICO SOBRE EL SITIO POLIMORFICO EN VARIANTES DE
HEMOFILIA B

Fundamento:

Se determinan los niveles antigenico del factor IX a través de una inmunoelectroforesis y un ensayo de enzima unida a un sustrato inmuoadsorbente (ELISA)

Metodología.

- 1.- Se procesaran 47 muestras de individuos normales y 20 mujeres con 27 hombres con hemofilia B.
- 2.- Se colectó sangre en citrato de sodio.
- 3.- Se determinó la cantidad de plaquetas.
- 4.- Se puso a digerir el d.n.a. Obtenido de leucocitos.
- 5.- Se restringe con 4 U/mg. De d.n.a. De endonucleares.
- 6.- El d.n.a. Unido con la endonucleasa se le hizo una electroforesis sobre gel de agarosa al 0.8% y se transfirió a filtros de nitrocelulosa.
- 7.- Hidridandose con 100 ng de plabilidad d.n.a.

Resultados.

La cantidad del factor IX fué de 2.5 Kb.

Figura 22 Modelo de tap I en sujetos normales así comparados con pacientes de hemofilia B.

*	*	**	**	***	***	II	2
***	**	**	**	***	***	II	10
		**	**	***	***	III	3
	*	*		***	***	III	14
*	*	**	**	***	***	III	15
				***	***	IV	2
1.0	1.3(a)	1.5	1.8a)	3.6	5.0		

Análisis de manchas taq-I de dnas digeridos de los miembros de la familia m. Los dnas se prepararon, digirieron, contaqi, se transfirieron en papel dbm, y se hidrolizaron como se describio.

Se uso la prueba fix dnac correspondiente a la secuencia coronada 5' no se hibrido el fragmento taqi de 2.7 kb del gen.

Diagnóstico Prenatal

En cuanto a diagnóstico prenatal de hemofilia B, ha sido demostrado por fetoscopia o sangre fetal de especímenes abortados que se presenta en menor proporción que la hemofilia A, la deficiencia del factor IX ocurre aproximadamente en 1 de cada 30,000 casos es por ello que se hace un intento por detectar familias portadoras de esta, haciendo un análisis general en mujeres normales, sin embargo el gran intervalo normal y los

bajos grados de ionización (inactivación causal del cromosoma X más en portadores que son detectados por un ensayo directo.⁶

El fluido amniótico es una mezcla compleja de proteínas y lípidos capaces de activar los factores de coagulación por vía extrínseca, donde es fácilmente detectable la deficiencia de factor IX.

La deficiencia se detecta mediante diferentes métodos:

- 1) Midiendo los niveles del factor IX por ensayos inmunoradiométricos en muestras de fluido amniótico y sangre.
- 2) Inmunoeléctroforesis cruzada y por electroforesis en gel de poliacrilamida₂₀
- 3) Una prueba sensitiva de ELISA con Ag del factor IX, con una base de anticuerpos monoclonales, para detectar un bajo nivel del factor IX.
- 4) Utilizando pruebas genéticas, con el uso del DNAC para detectar mujeres portadoras.₂₀

Este diagnóstico es difícil de realizar en la mitad del primer trimestre de gestación, y no ha podido elucidar los niveles del factor IX, además de que se ha demostrado que la protombina presenta un nivel menor de movilidad en comparación con la adulta el factor IX fetal, es una traza de proteínas plasmáticas de muy bajo peso molecular, lo que limita su sensibilidad, especificidad, ya que el rango de distribución de este no es igual al de una persona adulta.⁶

VI.5 TRATAMIENTO

Los pacientes con deficiencia del factor IX pueden seguir un curso tan grave como los pacientes con deficiencia del factor VIII. La administración de plasma fresco congelado a razón de 15 a 20 ml/kg suele tener como resultado un aumento de solamente 5 a 10 por 100 de la cifra del factor IX, del paciente, para intervenciones importantes o en caso de hemorragia postraumática grave, es preciso conservar hasta la cicatrización completa un nivel del factor IX superior a 25 por 100. No se puede alcanzar este resultado con plasma solamente y se requieren concentrados. Ha sido necesario el desarrollo de preparados del factor IX para pacientes que requieren terapéutica con el fin de controlar hemorragias. Se han recomendado para tratar los pacientes que necesitan unas concentraciones del factor IX que no podían conservarse con inyecciones de plasma solamente, como los concentrados se preparan a partir de plasmas mezclados, pueden transmitir hepatitis.^{37,38}

Se considera que el factor IX es estable cuando la sangre conserva a temperaturas de los bancos de sangre durante dos a tres semanas. Los resultados de las transfusiones de plasma, a juzgar por la medición del factor IX, suelen ser desalentadores, y la respuesta clínica puede ser mejor de lo que dejaría probar el resultado de la medición. Los comentarios presentados en cuanto a manejo clínico de la deficiencia de factor VIII también puede aplicarse al manejo del trastorno que nos ocupa aquí.

VII HEMOFILIA C

VII.I ESTRUCTURA Y FUNCION

El factor XI es una glicoproteína encontrada en el plasma en concentraciones de 2 a 7mcg/ml. Este es presumiblemente sintetizado en las células parenquimales del hígado. Su peso molecular inicialmente estimado fué de 140 000 a 150 000 (4,6) daltons.

Cuando es tratado por agentes reductoras su peso molecular se reduce alrededor de 75 000 a 80 000, sugiriendo que el factor XI circula como un dímero, las dos cadenas permanecen juntas por un puente de sulfuro y se encuentran circulando como un zimógeno compuesto de 2 cadenas similares o idénticas de pm 80 000 daltons. g

La actividad del factor XI puede recuperarse a partir del precipitado que se obtiene después de tratar el plasma normal con SO4Ba, se ha comunicado que el SO4Ba no extrae la actividad del factor IX. g

El factor XI es relativamente estable a la temperatura ambiente o a una inferior y se ha comunicado que su actividad precipita en el plasma cuando se le satura con sulfato amónico a niveles del 5% o mayores. g

Electroforéticamente emigra con las globulinas ϕ rápidas o entre las globulinas ϕ y β . g

VII.2 PROPIEDADES BIOQUIMICAS

Cuando el factor XI es activado a su forma enzimática factor XI por el factor XIa, por el factor XIIa, las dos cadenas 80 000 daltons en el dimero se rompen cada una con un peso de 50 000 y 35 000, la cadena pesada comprende la region nh_2 terminal de la molecula del factor XI y la cadena ligera contiene la región COO-H terminal.¹⁶

Las cadenas permanecen unidas por puentes disulfuro.

La serina contiene el centro activo enzimático que reside en la región de la cadena ligera.

La activación del factor XI por el factor XIIa requiere la disponibilidad de superficies, precaleina y quiminógenos de alto peso molecular₆ las composiciones de aminoácidos y carbohidratos del factor XI humano se muestran en la tabla 10.

Su secuencia aminoterminal es:

GLI-CIS-VAL-THR-ALA-LEU-LIS-ASP-THR-PHE-GLU-GLI

El factor XIc es fácilmente inhibido por los inhibidores de la seronproteasa como el diisopropil fosforofluorado, y su inhibidor se une al residuo serina en el sitio activo de la enzima.

El factor XI esta presente en muy bajas concentraciones en el plasma. Este se encuentra asociado a muchas otras gamaglobulinas.¹⁶

La actividad del factor XI puede recuperarse a partir del precipitado que se obtiene después de tratar el plasma normal con sulfato de Bario. Es muy probable que la actividad del Ba_2SO_4 .

Tabla 10: aminoácidos y carbohidratos composiciones de humano y bovino factor XI.

componentes	Humano factor XI (residuos/ 124 000)	bovino factor XI (residuos/ 124 000)
aminoácidos		
Lys	62.8	55.6
His	28.6	38.9
Arg	33.8	40.9
Asp	69.4	82.9
Thr	82.6	75.7
Ser	93.4	79.9
Glu	106.8	123.8
Pro	52.0	52.6
Gly	70.2	68.7
Ala	49.0	44.1
γ-Cystine	36.4b	42.3
Val	58.8	46.8
Met	7.2	11.6
Ile	49.6	50.2
Leu	71.8	72.1
Tyr	27.2	29.4
Phe	39.4	41.6
Trp	20.8c	20.7
Carbohidratos		
Hexose	4.1(0.6%)	37.2(5.4%)
N-Acetylhexosamine	15.3(2.7%)	26.6(4.7%)
N-Acetylneuraminic	7.3(1.7%)	4.3(1.0%)
Acidos		
Proteinas (%)	95.0	88.9
Carbohidratos (%)	5.0	11.1

Por el factor XI sea intermedia entre la que tiene por la protrombina y el factor VIII, el factor XI es relativamente estable a temperatura ambiente o a una inferior y su actividad precipita en el plasma cuando se le satura con sulfato de amonio a niveles del 50% o mayores.¹⁶

El factor XI es convertido a una enzima, factor XI, por factor XII (factor Hageman activado) en presencia de cionógenos de alto peso molecular esta reacción ocurre fácilmente con una relación enzima sustrato 1 a 50. El factor XIa está compuesto, de un par de cadenas pesadas, peso molecular aproximado 35,000 y un par de cadenas ligeras de peso molecular 25,000 estas cuatro cadenas se mantienen unidas por puentes disulfuro. La secuencia terminal de aminoácidos de las cadenas pesadas es: gli-cis-val-thr-gln-lev-lis-asp-thr-gln-phe-glu-gly-aly-asp, la cuál es idéntica a la encontrada en la molécula precursora.¹⁶

El factor XIa, es activado también por otras seriproteasas como la tripsina. El factor XIa, cataliza una importante reacción en la fase inicial de la coagulación sanguínea, convirtiendo el factor XI en una enzima activa aunque la antitrombina III, un inhibidor del factor XIa, normalmente contribuye a un sexto de la actividad inhibidora del plasma contra el factor XIa, se ha encontrado que su efectividad es aumentada por la heparina.¹⁶

La capacidad de la heparina para potenciar la inhibición del factor XIa, por la antitrombina III purificada y el plasma usando sustratos tripéptidos amídicos sintéticos. La capacidad de la heparina para incrementar la rapidez de la inactivación de la

trombina por el plasma sólo se observa aceleración en la inhibición del factor XIa, por el plasma utilizando concentraciones de heparina de 5 gIV/ml₂₀ en adelante ya se vio un incremento de 2 a 4 veces en la rapidez de inactivación del factor XIa. Por la antitrombina III₁₂ en comparación con otro inhibidor.

Se encontró que era la hemoglobina polidonal A(IgG) de la subclase 4 contra el factor XI, se muestra por la capacidad del inhibidor aislado al unirse a perlas de policrilamida para remover el factor XI, relativamente del plasma normal.¹⁵

La unión de los anticuerpos con el factor XI mostro bloquear las multiples actividades del factor de la coagulación.

Este factor XI no se une al quimógeno de alto peso molecular ni sufre activación ni rompimiento de las 2 cadenas, el complejo del factor XIa, con el híbrido previno el rompimiento y la activación del factor XI, en consecuencia el híbrido parece actuar uniendose a los multiples sitios sobre el factor XI.¹⁵

VII.3 G E N E T I C A

La deficiencia congénita del factor XI fué descrita primero por Rosenthal y se refirió a esta como antecedente de la deficiencia de tromboplastina plasmática o de PTA. En comparación con los desórdenes hemorrágicos vistos anteriormente, la deficiencia del factor XI, es más frecuente encontrada. Es probable que en vista de la alta frecuencia de esta enfermedad, muchos casos aún no se han reportado en la literatura.

Un gran número de pacientes con este desorden son descendientes de Judios especialmente Judios Ashkenjir, la enfermedad también es encontrada en Negros y Japoneses.¹⁶

La deficiencia del factor XI se transmite como una enfermedad recesiva autosomal incompleta.¹⁶

La consanguinidad de los padres se ha reportado sólo en unos cuantos casos. Los pacientes homocigotos pueden diferenciarse¹⁷ Se encontró un nivel de factor XI inferior a 20% en enfermos homocigotos y comprendido entre 20 y 70 de los pacientes heterocigotos. Algunas técnicas recientes indican que la síntesis del factor XI esta alterada pues no es posible encontrar ningún antígeno relacionado con dicho factor en pacientes que presentan la deficiencia correspondiente.¹⁶

La deficiencia del factor XI como la del factor IX y VIII dificulta el desarrollo de una actividad coagulante adecuada durante la primera fase de la coagulación. Se ha señalado que la

actividad del factor XI aumento en el plasma cuatro o cinco horas después de una comida rica en grasa.²⁸

La deficiencia del factor XI, se transmite como un rasgo simple dominante con expresión y penetración variables. La relativa rareza del grave defecto del factor XI sugiere que sólo la forma homocigota produce una tendencia hemorrágica. Otros datos sugieren que el gen del factor XI es incompletamente recesivo y el defecto puede darse como un defecto homocigoto y como un defecto heterocigoto.²⁸

Debe sospecharse con los pacientes con un leve trastorno hemorrágico y cuyos resultados en las pruebas de laboratorio sean anormales el consumo escaso de protrombina calculado mediante hallazgo de más valor. Los experimentos de mezcla; en los que el plasma de un paciente con un déficit comprobado, en factor XI, fracase en corregir el defecto de coagulación del paciente que esta siendo estudiado, constituye el único método de diagnóstico en el momento actual.²⁸

VII.4 MANIFESTACIONES CLINICAS

Los pacientes de ambos sexos sufren una diatosis hemorrágico similar a la que produce la deficiencia de factor VIII y factor IX. Los episodios hemorrágicos no son tan frecuentes ni tan intensos como los observados en pacientes con deficiencia del factor VIII, y factor IX y hay períodos durante los cuales no se producen hemorragias a pesar de traumatismos mayores. La hemorragia puede ser trastorno grave. La diatésis hemorrágica suele tener la misma gravedad en diversos miembros de una familia y no hay una relación absoluta entre la concentración del factor XI y la aparición de hemorragia.^{12,13}

Sólo los pacientes heterocigotos con deficiencia del factor XI tienen diatésis hemorrágica, los demás son asintomáticos, las hemorragias no se caracterizan por ser postoperatorias, ocasionalmente se han notado epistaxis, equinosis y menorragia.

Las hemorragias espontaneas son raras y en algunos pacientes con deficiencias del factor XI no tienen hemorragias postraumáticas.
12,13

Por esta razón es fácilmente identificada.

Se sugiere que las determinaciones del tiempo parcial de trombo-plastina puede efectuarse en todos los pacientes de riesgo.²⁵

La poca frecuencia de los problemas hemorrágicos en la deficiencia del factor XI es sorprendente, sin embargo, es posible explicar esto en base a la presencia de la vía alterna de la activación del factor XI en vivo. Osternd demostró que el factor IX también puede ser convertido en factor IXa por la calicreina sin

requerir factor XIa puesto que los factores de contacto estan usualmente presentes en cantidades normales en pacientes con deficiencia del factor XI, es posible que la calicreina en vivo juegue un papel mayor en el paso del factor XIa. Además el factor IX puede ser activado por el factor VII y factor tisular.⁶⁸

El número de plaquetas, la prueba de fragilidad capilar, el tiempo de hemorragia, la retracción del coagulo, y el fibrinógeno son normales. El tiempo de coagulación puede reflejar trastorno a la actividad tromboplastinica, suelen ser anormales. El tiempo parcial de tromboplastina y la prueba de generación de la tromboplastina.⁶⁸

A diferencia del factor VIII, la coagulación el factor IX no se consume junto con el factor IX, se hallan presentes en plasma y suero, sin embargo el factor XI no es absorbido del plasma normal por el factor XI(COH₃), mientras que el factor IX si lo es. En consecuencia el tiempo de coagulación de plasma deficientes en el factor XI es corregido por plasma normal, tratado con Al (OH)₃ que no corrige el tiempo de coagulación del plasma que carece del factor IX. También es corregido por la adición de unsuero normal, que no mejoraría el tiempo de coagulación de plasma deficiente, del factor VIII. Los tres trastornos pueden separarse por la prueba de la generación de tromboplastina, creada teniendo en cuenta estos hechos. Se observa, ningún defecto cuando el plasma o el suero son absorbidos del paciente son incubados con suero normal o con plasma absorbido respectivamente. Existe un anticoagulante circulante en lupuseritematoso que no produce un alarga-

miento progresivo del tiempo parcial de tromboplastina, esta peculiaridad permite distinguirlo de los anticuerpos específicos. El anticoagulante de lupus puede dar origen a diferentes anomalías de las pruebas de laboratorio sin datos clínicos de diatésis hemorrágica.^{4,5}

Se han reportado pacientes con lupus eritomatoso sistémico con una deficiencia adquirida del factor XI.^{4,5}

Los bajos niveles del factor XI no se debieron a un inhibidor clásico de la coagulación, sino a un factor del plasma (probablemente inmunoglobulina) que se unía solutivamente al factor XI.^{4,5}

Otra de las enfermedades en las cuales hay deficiencia del factor XI, es el síndrome de Noonan.¹

VII.5 METODOS DE LABORATORIO HEMOFILIA C

1er. Método

Fundamento

El factor XI se une a los factores de contacto de la coagulación en el sistema intrínseco via factor IX.

Metodología:

- 1.-se obtiene un inhibidor (IgG) a partir de plasma y se purifica con precipitaciones utilizando dae (a-50) y cromatografía en - proteína a-sepharosa⁶
- 2.-La inmuno-adsorbentes (IgG) se obtiene de suero de conejo y - cerdo con cromatografía sobre proteína a-sepharosa.
- 3.-Purificación de los factores XI.

El factor XI fué purificado por una modificación del método Hecky Kaplan¹⁰ utilizando una secuencia de cromatografía sobre Deaesehadec (a-50)⁵⁰

Se marco el factor XI 125-J por el método de cloramina el cuál retuvo su actividad coagulante, se almaceno a 70°C. Y se cromatografio sobre 5 ds-page¹³

- 4.-El plasma completo citrado y el inhibidor de la IgG se acopla sobre policrilamida de acuerdo a instrucciones del equipo.
- 5.-Se activa el factor IX de acuerdo a Ostipd y Rappaport, rompiendo el 125-I-factor IX sobre sas-page al 10% reducido. En la figura no. 4 Se observa la activación del factor IX.
- 6.-Se activa el factor XI mediante el rompimiento del 125-I-factor-XI sobre sas. Page al 10%.

Se incubó este último 2 hs. A 39°C, se adiciona a cada una de las 2 cadenas del factor XII humano (0.2, 2, 4, 10 mg/ml) cada uno por separado.

- 7.-Se hacen ensayos de la coagulación incubando volúmenes iguales plasma inhibidor y plasma normal por 1 hora a 37°C y ensayando la activación 0.1 ml. De la mezcla para determinar la actividad del factor XI (20). La unidad de inhibición se define como la cantidad de inhibidor requerido para activar el 50% de la actividad del factor XI en una hora a 37°C comparándolo con un control.

Resultados.

La inmunoabsorción usando plasma purificado mostraron que la actividad fue sobre la IgG las placas de inmunodifusión confirman la presencia de una sola cadena gámmapesada y dos cadenas ligeras una kappa y una lambda.

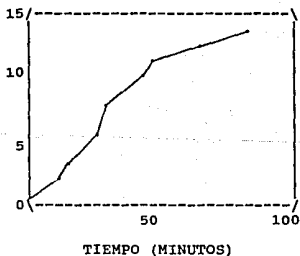


Figura 23 Curva de unión para el 125 I-Factor XI

2do. Método

Fundamento; la interacción del factor XI con una superficie activante en la expresión de la actividad procoagulante del factor XI cuando el factor XI es convertido a su forma (XIIa) sufren rompimiento proteolítico.

Metodología.

- 1.- Se purifican proteínas, de cromatografía secuencial sobre dfae-sephadex y proteína a-sepharosa; se obtiene con una concentración de 90mg/ml de proteína con 140 ml de actividad procoagulante con una actividad de 1550/mg de proteína.
- 2.- El quininógeno de alto peso molecular se preparo mediante el método de thompson.
- 3.- La proteína ya purificada tuvo una actividad detectable para los factores XI, XII o factor fhetcher.
- 4.- El factor XI fué preparado por el método ariffine.
- 5.- Se corrió una electroforesis sobre policrilamida con s.a.s.
- 6.- Los factores XI y XII se marcaron con 125^1 utilizando el método de la paraoxidasa, la concentración del factor XI fué de 1.9 mg./ml y de factor XII fué de 2 mg/ml.
- 7.- se efectuaron uniones de superficie con 125^1 -XI, el cuál tenía una actividad de 0.07 u/ml de procoagulante del factor XI, los cuales se combinaron y posteriormente se incubaron 10 min. En un tubo de plástico de Nunc a temperatura ambiente.
- 8.- Se cuantifican en un espectómetro gamma.
- 9.- El contenido se lavo 2 veces con citrato salino.

- 10.-Se ensayo la coagulación del factor XI y XII con sistemas modificados, para el tiempo de tromboplastina parcialmente actividad usando plasmas hereditariamente deficientes.
- 11.-La actividad procoagulante del h m w k se midio usando la actividad del cofactor de contacto.
- 12.-Las actividades se expresaron en unidades / mililitro en que la cantidad de actividad en 1 ml. De plasma es definida como I. U.

Resultados.

La absorción del factor XI de plasmas normales y deficientes en factor XI, XII, factor Fletcher o h m w k.

3er. Método:

el factor XI purificado esta esencialmente libre del factor II, V, VII, IX, X, XI y factor de Fletcher.

El factor XI migra entre las globulinas beta y gamma en la electroforesis con almidón, el factor XI esta presente en muy bajas concentraciones en el plasma, estas se encuentran asociadas a otras gamma globulinas.

Metodología.-

- 1.- El factor XI se purifico de plasmas normales y anormales, con columnas de cromatografía sobre D E A E -celulosa, con buffer de barbital sódico 0.02 N.

- 2.- La purificación se llevo a cabo en 5 pasos.
 - A).- Se cromatografía el plasma en d.e.a.e.-celulosa.
 - Bj).- La fracción obtenida del paso 1 se dianza con oxalato de sódio 0.015 m. Y se absorve 2 veces con BaSO_4 por 30 mins. A 40°C. Los precipitados se lavan 3 veces.
 - C).- El lavado de baso_4 se cromatografio sobre sephadex (c-50=), con acetato de sódio 0.05 M+ Na U 0.05 M.ph=6.5
 - d).- Las fracciones obtenidas se cromatografiaron sobre di-calita - 4,200 las fracciones se neutralizan inmediatamente con H CL y se dializan.
 - E).- Las fracciones activas se concentraron 10 veces por ultracentrifugación.
- 3.- Se medio la actividad del factor XI, sobre una suspensión de caolin en 20 mg/ml de solución salina y cefalina.
- 4.- Se colocaron 0.1 ml de plasma deficiente de factor XI 0.1 de la sustancia prueba se incubaron por 3 mins a 37°C. Con Ca cl_2 y se midio el tiempo de coagulación.
- 5.- El plasma deficiente en factor XI se incubó a 37°C. Durante 3 min. En un tubo de plástico.
- 6.- Se midio la actividad del factor V para medir la capacidad de acortar el tiempo de coagulación del plasma.
- 7.- La trombina eluida se diáliso con sephadex - a-200 y su actividad final fué de 48 unidades N I H/ml.

Resultados:

El estado de activación del factor XI, fué probado con todas las gracciones probadas y con caolin para establecer las cantidades relativas del factor XI presente, y un ensayo sin caolin para detectar la presencia de factor XI activado. Los resultados se muestran en la tabla II.

Tabla II Efecto de la purificación sobre la actividad del factor XI, medida en presencia o ausencia del caolin.

Fraction	Dilution	Clotting times (s)	
		Kaolin	Plastic
Step 3	1/15	66	230
Step 4	1/40	67.5	200
Step 5	1/30	66.5	210
Normal plasma	1/5	63	225
Activated XI	1/5	60	67
Activated XI	1/10	74	82

No se observo contaminación significativa con los factores II,V, VII, VIII, IX, X, XII o factor de Fletcher tampoco se detecto IM ó IgA reactivos, el factor X fué estable a la temperatura 37°C, 4°C.

VII.6 RESULTADOS

Estado de activación del factor XI todas las fracciones fueron aprobadas en (1) un ensayo de factor XI con caolin para establecer las cantidades relativas del factor XI presente, y en (2) un ensayo sin caolin para detectar la presencia de cualquier factor XI activado. Los resultados con una serie de fracciones se muestran en las 3 líneas superiores de la tabla 2. Los controles se muestran en las tres líneas inferiores de la tabla. El plasma normal proporcionó el factor XII nativo. El factor XI activado fue la fracción eluida con NaCl 1.2M cuando el plasma normal fue cromatografiado sobre dicalita 4200 usando la técnica descrita en materiales y métodos.

Esos resultados indican que el factor XI no se encontraba activado durante la purificación. Durante algunos meses se noto una disminución del tiempo de coagulación sin caolin o de una fracción refrigerada del APSO 5.

Otro factor es coagulante. La fracción de paso 5 fue probada para otras actividades del factor coagulante. Como se muestra en la tabla II, no hubo contaminación significativa con los factores II, V, VIII, IX, X, XIII o factor de Fletcher.

No pudieron detectarse evidencias de plasmin o material activable por la estreptoquinasa en la fracción del paso 5 que contiene más de 400% de actividad de factor XI usando la prueba de la placa de difusión de la fibrina de Enzo (Hyland).

Inmunoglobulinas. Las fracciones del paso 5 fueron probadas para

la contaminación de inmunoglobulinas por una doble difusión en agar.

No pudo detectarse material IgM o IgA reactivo. Se observaron trazas de IgG reactiva usando películas muy delgadas de agar sobre portaobjetos.

Mezclas de una fracción del paso 5 con anti IgG en la región de equivalencia tuvieron una actividad completa del factor XI después de una hora de incubación indicando que la proteína IgG era probablemente un contaminante.

Esos resultados sugieren que el factor XI probablemente no sea una inmunoglobulina. Esta conclusión puede ser consistente con nuestro descubrimiento de que cantidades normales del factor XI crudo puede ser aislada por cromatografía D E A E del plasma de un paciente con hipogamaglobulinemia severa. (S. Schoffman, observación no publicada).

-Propiedades de la filtración en gel.

En la cromatografía sobre sephadex c-200 en NaCl 0.5M eluyo justamente después de la aldolasa en una posición equivalente a la de una proteína globular de peso molecular aproximadamente de 210,000 bajo esas condiciones la actividad del paso 4 se perdió completamente sin embargo, si la columna era equilibrada con NaCl IgM. Conteniendo seroalbumina humana a una concentración que produjera una absorbencia de 0.10, la actividad factor XI del paso 4 nuevamente se recobrará a una posición equivalente a un peso molecular aproximado de 210,000 D Movilidad electroforética.

La actividad del factor XI en las fracciones de los pasos 3 y 4 migraron entre el angor y gama globulinas en la electroforesis sobre almidón, migraron más hacia el catodo que las fracciones del paso 4 pero la diferencia fué pequeña. La recuperación de la actividad EM ambas fracciones fué pobre. La actividad del factor XI en la fracción del paso 5 se perdió completamente en el boque de almidón. (Esto puede ser resultado de la remoción de la albúmina estabilizante durante la electroforesis).

Actividad de esterasa. Ni la actividad del factor XI en la fracción del paso 4 de aproximadamente el 40 (a 280 = 0.02) mide las fracciones del paso 5 de 37 y 55% tuvieron alguna actividad estereolítica sobre B A E e durante 30 minutos bajo las condiciones descritas arriba.

- Efecto de la tripsina sobre el factor XI. La incubación del factor XI del paso 5 con tripsina debil (40 mg/ml) produjo una marcada activación como se muestra en la tabla 12.

La activación por la tripsina fué prevenida con una preincubación de la tripsina con inhibidor de la tripsina del frijol de lima.

Una mezcla de reacción que contenía factor XI y 25 mcl de tripsina no mostro cambio en la actividad coagulante medida en un ensayo modificado del factor XI durante 15 min. (La muestra de prueba fué adicionada inmediatamente antes de la calcificación).

Tabla 12 Efecto de la tripsina sobre el factor XI purificado

Mezcla de reacción	tiempo de sangrado				
	15 s*	5 min	10 min	15 min	20 min
XI +25 ul tripsina	85	57	48	47	51
XI +10 ul tripsina	101	73	60	55	50
XI +citrato salino	108	--	110	--	110
Albumina solución+25 ul tripsina	328	--	327	--	310

En consecuencia, el producto de la reacción observado en el ensayo del factor XI no se debió aún intermediario tardamente activado de la coagulación.

Cinco mezclas de reacción que contiene factor XI y 25 mc1 de tripsina fueron probadas al tiempo cero y 15 minutos después de incubarlas para la actividad de estearasa B A E e.

- Efecto de la trombina sobre el factor XI.

La incubación del factor XI del paso 5 con trombina humana a una concentración de 2.5 ó 0.25 U/ml. En la mezcla de la reacción no produjo cambios en la actividad del factor XI (tabla 12) la adición de tripsina a las mezclas tratadas con trombina, produjo un rápido incremento en la actividad como se muestra indicando que el factor XI tratado con trombina puede seguir siendo activo por la tripsina.

- Efecto delcaolin XII y XIIa sobre el factor XI.

La incubación del factor XI del paso 5 con caolin XII o XIIa no

produjo cambios en la actividad aparente del factor XI con el tiempo como se muestra en la tabla 14 líneas Y 2. Esta concentración de factor XI coágulo en un ensayo del factor XI en 67 seg. En contraste, cuando plasma diluido deficiente en factor XI fué la fuente de factor XI (tiempo de coagulación=76 en un ensayo del factor XI) se produjo un marcado incremento en la actividad tanto por elcaolin XII como por XIIa tabla 14 líneas 3 y 4 mientras que la fracción de factor XII D E A E no tratada no tuvo efecto (tabla VI, línea 5); las mezclas de reacción que contenían plasma diluido deficiente en factor XII y XIIa o caolin - XII fueron probadas en un ensayo modificado del factor IV (la mezcla de prueba fué adicionada inmediatamente antes del calcio para prevenir cualquier destrucción durante la incubación) no se detectaron cambios en la actividad a los 20 min. Indicando que la activación aparente del factor XI no refleja la generación de un intermediario de la coagulación tardíamente activado.

Esos resultados sugirieron que el plasma diluido deficiente en factor XII contenían una actividad, careciendo de factor XI purificado; la cuál fué requerida para la intervención de los factores XI y XIII.

Tabla 13 Efecto de trombina en purificador factor XI

Mezcla de reacción	tiempo de sangrado					
	15s*	2.5min	5min	10min	20min	30min
XI+0.5 U/ml trombina	81	81.5	80.5	76	76	78
+tripsina	81	66	64	61	63	62
XI+5 U/ml trombina	41	40	40	40.5	--	--
+tripsina	41	--	36	34	--	34

Tabla 14 efectos de kaolin-XII, XIIa, o XII en purificado en factor XI y factor XII deficiente plasma

Mezcla de reacción	tiempo de sangrado					
	15s	5min	10min	15min	20min	25min
step-5 factor -XI						
+kaolin-XII*	112	116	120	119	---	119
+XIIa+	116	121	118	---	116	---
factor-XIIdeficientplasma(1/10)						
+kaolin-XII++	137	98	96	94	---	90
+XIIas	246	---	140	--	117	
+XIII	287	---	287	--	280	

Una actividad del plasma relacionada con la fase de contacto de la coagulación intrínseca es el factor de fletcher (hathaway y alsover 1970). Para determinar si el factor de fletcher puede ser la actividad plasmática requerida para la interacción de los factores XI y XII, se desarrollaron dos tipos de experimentos: 1) determinación de la generación de XIIIa en mezclas que contiene caolin-XII, factor XI y factor de fletcher 2) determinación del efecto del plasma deficiente en factor de fletcher en una mezcla caolin XII y factor XI incapaz de generar XIa.

Como se muestra en la tabla 15, una mezcla de reacción que contenía caolin - XII, del factor de fletcher no generó un incremento en la actividad de factor XI a los 20 min. (Línea 1) cuando el plasma diluido deficiente en factor de fletcher fué adicionado a esta mezcla de reacción, ocurrió la activación del factor XI (línea 2). Puesto que el factor de fletcher no pudo proporcionar la actividad requerida para la interacción de los factores XI y XII y el plasma deficiente en factor de fletcher contenía esta actividad, se demostró que el cofactor de la actividad de contacto en este sistema no pudo ser el factor de fletcher.

Tabla 15 Efectos de Fletcher, Factor en la interacción de Kaolin-XII y Factor XI

reacción				tiempos			
kaolin XII	XI	fletcher Factor	fletcher-f def.plasma	15s*	5min	10min	20 min
+	+	+	-	148	151	150	146
+	+	+	+	150	93	93	76

VII.7 TRATAMIENTO

Suele lograrse el control de la hemorragia en pacientes con hemofilia C, cuando se les suministra crioprecipitados o concentraciones de globulina, antihemofílica (gah) con plasma fresco congelado o con transfusiones de sangre fresca.

En los pacientes con hemofilia C, los crioprecipitados antes mencionados no son útiles, pero si el plasma fresco congelado.

Las lesiones en los labios, lengua o epistaxis no deben tratarse con cauterizaciones, sino por medio de comprensión.

Otros agentes terapéuticos coadyuvantes para prevenir hemorragias graves y potenciar las transfusiones son las siguientes.

- 1.-Corticoesteroides: disminuyen el dolor en la hemartrosis limitan los riesgos en las extracciones dentarias y en pacientes con hematurias.
- 2.-Antifibrinolíticos: el ácido epsilon aminocarproico parece eficaz para evitar el sangrado en intervenciones quirúrgicas o en extracciones dentarias.

El uso de analgésicos resulta indispensable en muchas situaciones del hemofílico, sin embargo no deben ser aplicadas por vía intramuscular y deben evitarse la aspirina. Ya que esta aumenta la tendencia hemorrágica.²⁵

Las circunstancias clínicas del caso hemorragia severa rebelde a la infusión del plasma pero es fácil respuesta a un agente alternativo promotor de la coagulación, sugiere un defecto crítico del sistema de activación intrínseca, soportando la inferencia de que el factor XI participa en la hemostasis normal.

VIII DISCUSION

La hemofilia es uno de los trastornos hemorrágicos conocidos de más antigüedad. Se ha descubierto que los signos clínicos de la hemofilia clásica pueden resultar de tres diferentes defectos genéticos o de anticoagulantes circulares; esto sólo se puede diferenciar mediante pruebas de laboratorio.

EXISTEN TRASTORNOS GENETICOS

- 1)Deficiencia del factor VIII que es del 80 a 82%
- 2)Deficiencia del factor IX de 11 a 15%
- 3)Deficiencia del factor XI de 5 a 7%

1)Deficiencia del factor VIII

El factor VIII cumple con dos funciones una como coagulante, y la segunda en la hemostasis primaria la cuál tiene interferencia en la enfermedad de Von Willebran.

Se forma un complejo factor VIII/VW, en el cuál tiene actividad procoagulante de factor antihemofílico (VIII) este es inactivado por anticuerpos humanos, y se usa para inmunoensayo.

Algunos investigadores sugieren que el factor VIII se produce en el sistema reticuloendotelial, se sintetiza en el hígado mientras la fracción de Von Willebrand se sintetiza en células endoteliales de vasos sanguíneos, el factor VIII se almacena en el bazo y el factor antigénico forma con complejos con el factor VIII coagulante.

La fracción del factor VIII es acelerarla, la coagulación sanguínea y como cofactor en la actividad enzimática del factor X por el factor IXa cuando el factor VIII ETA en presencia de calcio y fosfolípidos se activa la reacción coagulante.

En algunos pacientes hemofílicos se presenta un inhibidor circulante de factor VII lo cuál explica el tratamiento de estos.

La deficiencia del factor VIII, separa de una generación a otra con su caracter recesivo ligado al sexo.

Las anormalidades comunmente observables son hemorrágicas a nivel nasal, bucal, muscular, cerebral y a nivel de las articulaciones principalmente. El diagnóstico se da por historia clínica del paciente, pruebas de laboratorio como cuantificación de plaquetas, prueba de torniquete, tiempo de sangrado, tiempo de trombina, tiempo parcial de tromboplastina, cuantificación del factor VIII, estas pruebas son importantes para confirmar.

CLASIFICAR LAS HEMOFILIAS

Existen otras pruebas más sofisticadas de laboratorio como son: Las inmunológicas una de ellas en la neutralización de anticuerpos humanos, identificando proteínas no funcionales.

Para diferenciar la hemofilia A de la de "Von Willebrand", con la neutralización de anticuerpos, los plasmas con deficiencia del factor VIII, formaron inmunoprecipitados y los de Von Willebrand no formaron.

Se han producido técnicas utilizando antisueros heterólogos para explicar técnicas de inmunoprecipitación, hemaglutinación o radio inmunoanálisis. En el capítulo se muestran generalidades sobre lo que respecta en la hemostasis que involucra a la interacción entre la fase vascular plaquetaria y plasmática.

Se hace énfasis en el sistema de la coagulación y se habla de las dos vías existentes:

- a) extrínseca
- b) intrínseca

Existiendo algunos inhibidores de la coagulación sanguínea y fibrinólisis. Lo cuál ocurre por activación de proenzimas y neutralización de enzimas.

En este trabajo nuestro interés es mostrar lo más sobresaliente sobre todo lo referente a las deficiencias de algunos factores de la coagulación.

En el capítulo referente a la hemofilia A (deficiencia del factor VIII) se analiza su estructura, sus funciones biológicas que

consisten en la actividad coagulante y participa en la hemostasis primaria.

Se ha reportado que el factor VIII forma con complejo e 2 componentes los cuales desempeñan funciones diferentes, también se destacan las diferencias entre el factor VIII y el complejo que forma.

Se mencionan las técnicas que existen para separar ese complejo, la más aceptada en la inmunoabsorbencia a través de una filtración en el gel de Sephadix G-200.

El factor VIII se sintetiza en el sistema reticuloendotelial su función es la de acelerar la coagulación sanguínea, que es un cofactor en la activación enzimática del factor X, se habla de que su deficiencia es de caracter recesivo ligado al sexo.

La hemofilia A se ve clasificada de tres formas de acuerdo a la actividad coagulante que presenta el factor VIII.

Se mencionan los trastornos decisivos debido a la deficiencia del factor VIII los cuales son principalmente hemorrágicas en el diagnóstico se incluyen pruebas de coagulación principalmente y métodos inmunológicos en los cuales se utilizan antisueros heterólogos, a los cuales se les efectuó hemaglutinación inmunoprecipitación y radioinmunoanálisis.

Otro sistema implantado es la ionización que se basa en el DNA y la donación del gen del factor VIII.

Existe la formación de un complejo inmunosorbente ELISA para detectar portadores de hemofilia A el cuál sirve para medir antígeno ligados al factor AHF (factor VIII) RAg.

La ionización es un nuevo método basado en la fragmentación del DNA. Y consiste en tres métodos:

- 1) Fragmentación del d.n.a. En este al azar, ligado al gen de interés en este se detectan marcadores polimorficos extragenicos.
- 2) Fragmentos subclonados aislados detecta marcadores intragenicos.
- 3) Oligomeros sintéticos del d.n.a. En el cuál se pueden reconocer dos secuencias de d.n.a. Como oligonucleotido detecta mutaciones, estos métodos se aplican al paciente y a sus familiares.
- 4) Para el tratamiento de la hemofilia "A", consiste en la aplicación de 3 sistemas.
 - a) La aplicación de plasma humano como fuente de factor VIII, el cuál ha dado resultado para controlar la mayor parte de hemorragias en tejidos blandos hematurias etc.
 - b) Concentrados heterólogos es un preparado activo que se obtiene a partir de sangre animal, del cuál una proteína heteróloga que es antigenica y por lo tanto de utilidad limitada.
 - c) Concentrados del factor VIII humano es un concentrado que se obtiene a partir de plasma humano por medio de la crioprecipitación, y el factor obtenido es de 15 a 40 veces mayor que el del plasma normal.

Hemofilia vascular (enfermedad de Von Willebrand) se forma un complejo factor VIII/vw, la proteína plaquetaria anormal en la enfermedad de Von Willebrand esta proteína se detecta inmunológicamente (VIII RAg) y tiene un papel importante en la adhesión de plaquetas en el vaso sanguíneo dañado.

Existe un factor VIII bifuncional (VIIIIR) el cuál es separado por electroforesis, la cantidad de proteínas VIIIIR se calcula a partir de la actividad específica del factor VIII altamente puro. La proteína unida al factor VIII tiene un papel en la función plaquetaria normal, los estudios in vitro son usualmente anormales en la enfermedad de Von Willebrand.

A) Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina.

B) Retención de plaquetas en columnas de vidrio esto se corrige cuando se adiciona factor VIII puro y normal en los pacientes con esta anomalía. Se encuentran en células endoteliales de arterias, arteriolas, capilares y venas de todo el cuerpo también en megacariocitos y plaquetas.

La enfermedad de Von Willebrand se hereda autosómicamente y en pacientes que son heterocigotos y en hemocigotos en muy pequeña frecuencia.

En pacientes hemocigotos las manifestaciones clínicas son hemorragias severas.

Cuando se presentan en pacientes heterocigotos se presentan en dos clases.

Tipo I.

Caracterizado por bajos niveles de factor Willebrand, el tiempo de sangrado es normal.

Tipo II. Que presenta tres subclases:

IIa. Existe respuesta deficiente a la ristocetina.

IIb. Sensibilidad a cantidades bajas de ristocetina.

IIc. Hay ausencia de multímeros del factor de Von Willebrand

EN PLASMA Y PLAQUETAS

La enfermedad de Von Willebrand es un desorden hemorrágico heredado autosómicamente, caracterizado por un tiempo de tromboplastina parcialmente activado prolongado y tiempo de sangrado también prolongado la prueba de retención plaquetaria se usa como auxiliar en el diagnóstico de esta enfermedad.

También se puede utilizar técnicas de electroforesis en gel agarosa para identificar los polímeros del factor Willebrand, las técnicas inmunoradiométricas son también para detectar los polímeros.

La deficiencia del factor IX ocasiona la hemofilia B o enfermedad de Christmas.

Este factor IX se aísla del plasma, siendo este factor activado de tres formas.

- 1.- En presencia del calcio (en la vía intrínseca) XIa.
- 2.- En presencia de calcio (vía extrínseca) factor VIIa y factor tisular.
- 3.- Por acción de la trombina.

Cuando se activa el factor IX por el segundo método este depende de la cantidad presente en el plasma, y se controla por los niveles que existen en el factor tisular.

Se ha demostrado que el factor IX puede ser activado por la trombina.

Cuando se activa el factor IX pasa a factor IXa, el cuál es una enzima proteasa sérica), la cuál aunado a dos cofactores que son el calcio y los fosfolípidos.

Las moléculas del factor IX funcionalmente inactiva interfiere con la reacción en la que el factor VII y cerebro proporcionando una tercera vía para clasificar a los pacientes con deficiencia del factor IX.

La hemoglobina B se debía a aberraciones en el cromosoma X pasa de una generación a otra como carácter recesivo ligado al sexo.

Se divide en dos.

- 1.- Persona con niveles normales de factor IX.
- 2.- Persona con niveles casi no detectables del factor IX, como cambios en la secuencia de aminoácidos y además se ve complicada por el desarrollo de anticuerpos específicos, los cuales actúan en su acción coagulante.

Existen métodos de diagnóstico específicos para la detección de la deficiencia del factor IX, como son:

- a) Radioinmunoensayo. En el cuál se forma un complejo fijado con formalina y se absorbe en complejo en células de *staphylococcus aureus*.
- B) Electroforesis. Se marca paralelamente con ensayos inmunológicos la segregación de un gen F IX anormal. Utilizando diajoben 3Y Lixinetil (ddm).
- C) Inmunoeléctroforesis. Se utiliza una hibridación con endonucleasas para detectar el gen del factor IX.
- D) Método de ELISA. Se determina el nivel antigénico del factor IX.
- E) El diagnóstico prenatal se lleva a cabo con la combinación de los métodos anteriores a partir del segundo trimestre de embarazo.
- E) Para el tratamiento de la hemofilia B se les administra plasma fresco congelado, elevando el factor IX de un 5 a 10%.
- F) Concentrados de factor IX para controlar hemorragias intensas.

El factor XI se encuentra en plasma en un 2 a 7 mcg/ml. - Se sintetiza en células parenquimales del hígado. Se encuentra activo en su forma enzimática en esta forma puede ser inhibido por el disopropil fósforo fluorado el cuál se une a su sitio activo.

Cuando existe anticuerpos del factor XI estos muestran un bloqueo en el funcionamiento del factor XI. Porque se forma un híbrido uniéndose a los sitios activados del factor XI.

La deficiencia del factor se transmite como una enfermedad autosomal recesiva incompleta, en pacientes hemocigotos y heterocigotos.

La actividad del factor XI se aumenta cuando se tiene una dieta rica en grasa.

Los pacientes con estas deficiencias presentan diatesis - hemorrágica muy similar a la que presentan los que tienen deficiencia del factor VIII y del factor IX. Los pacientes heterocigotos con deficiencia del factor XI presentan diatesis hemorrágica y son enzimáticos. Las pruebas de laboratorio como fragilidad capilar, tiempo de sangrado, retracción de coagulo y fibrinógeno son normales.

Presentar anormalidades el tiempo parcial de tromboplastina y el tiempo de generación de tromboplastina.

- A) Los métodos de laboratorio más específicos para determinar deficiencia del factor XI, son inmunológicos, en uno de ellos se utiliza inmunoabsorción, con plasma purificado y se utiliza la inmunodifusión.
- B) Purificación de proteínas para romper proteínas utilizando cromatografía secuencial en DEAE-Sephadex y proteína a sepharosa, posteriormente se corre una electroforesis para cuantificarse espectrofotometri

camente y así medir la actividad procoagulante del -
factor XI.

- C) Electroforesis con almidón utilizando sulfato de bario sobre cromatografía en sephadex, se mide la actividad y acortamiento del tiempo de coagulación.

Para el tratamiento de la deficiencia del factor XI.

Se administran:

- a) plasma fresco el cuál contiene crioprecipitados o concentraciones de globulinas.
- B) corticoesteroides.
- C) antifibrinolíticos.

DISCUSION HEMOFILIA B y C

Se ha señalado que la frecuencia con la cuál ocurre la deficiencia del factor IX es las sexta parte de la que ocurre en la deficiencia del factor VIII, el cuál clínicamente es similar al del factor VIII esto se debe a la deficiencia de una proteína diferente que se encuentra en el plasma.

Existen evidencias de que el plasma de pacientes que frecuentan estas deficiencias factor IX, se encuentra una proteína similar al factor IX la cuál tiene actividad antigénica es decir se comporta en cierta forma con actividad coagulante, pero no lo hace completamente.

El factor IX se transmite como caracter recesivo unido al sexo. Con características genéticas muy similares a la deficiencia del factor VIII.

Se ha visto que el desarrollo en individuos con deficiencia del factor IX de un inhibidor circulante en plasma ofrece daños y complicaciones severas en la coagulación intrínseca del paciente. Por otra parte se ha observado que el factor IX se activa con el factor VIIa y el tisular aunque no se sabe exactamente con cuál unión de aminoácidos se lleva a cabo la proteólisis.

En cuanto al cuadro clínico cabe mencionar que los pacientes refieren diatesis hemorrágicas al sufrir traumatismo que son desde menores a mayores. Ya que el factor IX no se consume durante la coagulación y puede persistir en el severo. El tratamiento de plasma fresco congelado y concentrados de factor IX.

La deficiencia del factor XI se transmite como dominante autosómico y de expresión completa, la deficiencia de este factor dificulta el desarrollo de la actividad de la tromboplastina en la primera fase de la coagulación.

A) por otra parte se ha observado que las plaquetas contienen una actividad coagulante similar a la del factor XI, y esa actividad se localiza en las membranas plasmáticas de las plaquetas se lavan en glicerol se observa un requerimiento cuatro veces en la actividad similar a la del factor XI.

B) el 93% de la actividad similar a la del factor XI, en las plaquetas lavadas se encuentra asociada a una fracción particulada.

También se ha observado que pacientes tratados con heparina - con concentraciones mayores a 5g/IIVv/ml se incrementa la inactivación del factor XI son asintomáticos.

Existen varias alternativas para activar el factor XI en vivo a través de la calcicreina, sin necesidad de recurrir al factor XIa.

Durante la coagulación el factor XI no se consume el factor IX, estos dos factores se hallan presentes en plasma o suero, se puede corregir el plasma deficiente de factor XI con adición de plasma normal tratado con alcohol³.

IX R E S U M E N

De acuerdo a nuestra revisión bibliográfica, en el presente trabajo se establece que las hemofilias son transtornos hemorrágicos producidos por aquellos factores que por un defecto estructural o a falta de una síntesis correcta, producen cierta tendencia a sangrar y se clasifican en :

1.-Hemofilia A, o deficiencia de factor VIII. la cuál es una enfermedad hereditaria recesiva ligada al sexo, la cuál se presenta en hombres y es transmitida por mujeres portadoras.

El factor VIII es un complejo de dos componentes que tienen funciones distintas, un componente del complejo Factor VIII/VW tiene actividad procoagulante de factor antihemofílico se designa como VIII:C. El otro componente, mayor, comprende la mayoría de la maza protéica e interactúa con las plaquetas de tal forma que promueve la hemostasis primaria, este generalmente se designa como proteína enparentada con el factor VIII ó factor Von Willebrand (VIII:R). Para caracterizar sus propiedades bioquímicas, se establece que el factor VIII:C tiene un peso molecular de 285000 D, sobre filtración en gel sephadex G-200.

Este factor se ve afectado por el pH y la concentración de calcio. Es más estable entre pH 6.9 y pH 7.2 y es marcadamente menor por de bajo de pH 6.9 y por encima de pH 8.

Aunque el VIII:C humano no ha sido purificado en cantidad suficiente para el análisis de carbohidratos, existen evidencias en ambos casos de que la molécula contiene residuos de carbohidratos.

El anti VIII:C humano obtenido de pacientes hemofílicos multitransfundidos que desarrollaron inhibidores y de individuos los cuales forman anticuerpos que inactivan el VIII:C, no forman inmunoprecipitados con el VIII:C o con el complejo del factor VIII/VW detectable, no obstante ese suero puede usarse para detectar el determinante antigénico del VIII:C por ensayo de neutralización con anticuerpos y por ensayos inunoradiométricos para el VIII:CAg más sensibles.

Algunos investigadores sugieren que el factor VIII:C es producido por el sistema reticuloendotelial, se sintetiza en el hígado mientras que la función antigénica y de Von Willebrand se sintetiza en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Aún cuando existe la suposición, que el hígado juega un papel importante en la producción de VIII:C en enfermedades hepáticas severas, soporta fuertemente el concepto de que existe una fuente extra hepática de esta proteína, de cualquier manera hasta el momento no se conoce el tipo de células responsables de la síntesis del VIII:C .

Generalmente se está de acuerdo en que la función del VIII:C es acelerar la coagulación sanguínea y que juega un papel de cofactor en la activación enzimática del factor X por el factor IXa, en presencia de fosfolípidos y calcio.

El diagnóstico de la Hemofilia A se basa en una historia clínica, aunada a pruebas de coagulación que comprenden: tiempo de sangrado, cuenta de plaquetas, agregación plaquetaria, fragilidad capilar, tiempo de protombina y tiempo parcial de tromboplastina activado.

De estas pruebas el tiempo parcial de tromboplastina se encuentra prolongado y en ciertos casos el tiempo de sangrado, las restantes pruebas se encuentran normales.

Para la determinación del factor VIII, el método inmunológico más recomendable según nuestro estudio bibliográfico es el de ELISA ya que presenta una magnífica correlación con otros métodos y no se requiere de mucho material para efectuarlo así como de tiempo para realizarlo. En cuanto a la aplicación de la genética molecular al diagnóstico prenatal, es de gran importancia ya que promete mitigar las limitaciones básicas de los métodos inmunológicos que consisten en examinar el fenotipo (sangre) además del genotipo (DNA) además de los caprichos de la lyonización se ha demostrado claramente que el diagnóstico prenatal por métodos que involucran el DNA son muy factibles en la hemofilia A.

2.- La enfermedad de Von Willebrand ó deficiencia de factor VIII es una enfermedad que se hereda autosómicamente y la mayoría de los pacientes son heterocigotos, en homocigotos se ha reportado en un pequeño número de familias. Aunque también se presenta en pacientes sin antecedentes familiares ó síntomas de sangrado anormal. El factor VIII:R ó factor Von Willebran es una proteína de enorme tamaño con un peso molecular de 1.12×10^6 , es una glucoproteína que contiene de 5 a 6% de carbohidratos, hexosa, hexosaminosa y ácido sialico. Esta compuesto por los siguientes aminoácidos: metionina, tirosina y triptofano que son relativamente bajos y no existen grupos sulfhidrilo libres.

El VIII:R es aproximadamente 100 veces más grande su concentración en plasma que la del VIII:C.

Estudios inmunoflorescentes han identificado al VIII:RAG en células endoteliales, de las arterias, arteriolas, capilares y venas de todo el cuerpo al igual que megacariocitos y plaquetas. La proteína VIII:R tiene un papel central en la función plaquetaria normal. Aunque el VIII:C y el VIII:R tiene propiedades muy distintas se puede hacer una simplificación para sugerir que ellas no se relacionan entre sí y que son sólo dos proteínas que pueden purificarse juntas.

Varias investigaciones indican que en el plasma, ellas interactúan a través de uniones no cobarentes para formar el complejo factor VIII.

En la mayoría de los pacientes con la enfermedad de Von Willebrand el diagnóstico se realiza con una historia clínica y pruebas de coagulación como son: el tiempo de sangrado que resulta prolongado y puede hacerse con la técnica de Ivy la cuál es más sensible que la de Duke.

El tiempo parcial de tromboplastina resulta algunas veces alargado, la retención plaquetaria en columna de cuentas de vidrio generalmente es anormal. Pueden utilizarse técnicas inmunoradiométricas e electroforesis para el factor Von Willebrand, pero carecen de valor diagnóstico.

3.-La deficiencia del factor IX ocasiona la hemofilia B o enfermedad de Christmas ésta enfermedad es transmitida por mujeres

portadoras como un caracter recesivo ligado al cromosoma X. El factor IX humano es una glicoproteína de peso molecular de 57,500 D que se encuentran en el plasma en una concentración de 2.6-5.0 mg/ml con una vida media en la circulación de 20 a 30 horas. Este factor circula en forma de zimógeno, es una proteína de cadena simple dependiente de la vitamina K que contiene 416 aminoácidos y un 17% en peso de carbohidratos. El factor IX se sintetiza realmente en el hígado y se almacena en el bazo.

La principal función del factor IX en el proceso de la coagulación, esta activación del factor XIa, Xa, aunque en la realidad el activador fisiológico de esta reacción es el complejo formado por el factor IXa, calcio fosfolípidos y trombina activa el factor VIII. El factor IX es una enzima útil de esta reacción, y mientras que el calcio y los fosfolípidos son cofactores importantes. Existen métodos de diagnóstico específico para la detección de la deficiencia del factor IX como son:

Radioinmunoensayo, Electroforesis, Inmunolectroforesis, método de ELISA. El mejor método propuesto en esta investigación bibliográfica es el de Radioinmunoensayo, ya que es una técnica conocida y el material químico biológico empleado es de fácil adquisición y no se requiere de mucho tiempo para realizarlo, en comparación con los otros tres métodos existentes para esta determinación.

4.- La deficiencia del factor XI ocasiona la hemofilia C, enfermedad que se trasmite en forma recesiva autosomal incompleta.

El factor XI es una glicoproteína encontrada en el plasma en concentración de 2 a 7 mcg/ml este es sintetizado en las células parenquimales del hígado. Su peso molecular es de 75000 a 80000 D.

El factor XI es relativamente estable a temperatura ambiente ó a una inferior y su actividad precipita en el plasma cuando se le trata con sulfato de amonio.

El factor XIa esta compuesto en un par de cadenas pesadas con un peso molecular aproximado de 35000 D y un par de cadenas ligeras de peso molecular de 25000 D, estas 4 cadenas se mantienen unidas por puentes de disulfuro.

El factor XIa cataliza una importante reacción en la fase inicial de la coagulación sanguínea, convirtiendo el factor XI en una enzima activa. La actividad del factor se aumenta cuando se tiene una dieta rica en grasa. Para el diagnóstico de la hemofilia C se utiliza principalmente métodos inmunológicos siendo el más importante el de la electroforesis en almidón, puesto que utiliza migración de proteínas a través de una diferencia de carga eléctrica y el equipo de material se adquiere fácilmente, presentan una correlación de resultados obtenidos por este método.

Para el tratamiento de cada una de las deficiencias de los factores VIII, IX y XI es común para todos ellos, ya que se emplean transfusiones de plasma fresco, concentrados de cada uno de los factores extraídos de plasma normal humano. Para el tratamiento de la enfermedad de Von Willebrand además de utilizar plasma y concentrados se puede utilizar la prednizona que puede acortar el tiempo de sangrado.

R E F E R E N C I A S

H E M O F I L I A A

- 1.- Ambriz Fernandez Raul. Agustin Aviles Miranda. utilidad de un perfil basico de estudio para la certeza diagnóstica en la hemofilia A.
- 2.- Antonarakis S.E. Waber P G. Kittar S D. Hemophilia A, molecular defects carrier detection by DNA analysis subunitd : n. engl j med 288 : 191 - 202, 1980.
- 3.- Aurell L. Frigerber P. Karisson. A new sensitive and highly Specific chromogenic peptide sustrate for factor xa. thromb res, 11 : 595 - 597 ; 1977.
- 4.- Austen D.E.G.Thiol groups in the blood clotting action of Factor VIII.BR. J Haematol 19 : 447 - 484 ; 1970.
- 5.- Austen D.E.G. Rhymes I.L.A laboratory manual of blood coaguation. BR. J. Haematol 58 ; 298 - 299 ; 1975.
- 6.- Barker D. Holmt, White R.A locus on chromosome 11 p with multiple restriction site polymorphisms.Am J Hum genet 36 1159 ; 1984.
- 7.- Barrow Cliffe T.W. Thomas D.P.Factor VIII standardization the role of nibsc. BR. J. Haematol 52 : 151 ; 1982.
- 8.- Biggs R. The absorption of human factor VIII neutralizing antibody by factor VIII.Britis Journal of Haematology 26:259 - 267 ; 1974.
- 9.- Biggs R. Bidwell J. Humad blood coagulation haemostasia and thrombosis. Britis Journal of haematology 51 : 143 - 162 ; 1978.
- 10.- Bloom A. L. Physiology of factor VIII, in peller l. recent advances in blood coagulation. edinburght churchill linvigston p.p. 141 - 181 ; 1977.
- 11.- Bloom A. L. The biosynthesis of factor VIII Clin Haematol 8:53-77;1979
- 12.- Bloom L. Arthur, Duncan P. Thoma.Hemostasis and trombosis edinburgh londos, melbourne and new york p.p.425-450 firest published 1981.

- 13.- Borchgrevinek Chref. Platelet adhesion in vivo in patients with bleeding disorders. *Acta Med Scand* 170: 231; 1962
- 14.- Bouma B.N. Wiegerink y Sixma J.J. Immunological characterization of purified anti-hemophilic factor a (factor VIII) with corrects abnormal platelet retention in von Willebrand's disease nature (*new biol*) 236: 104-106, 1972.
- 15.- Bowie E. J. Von Willebrand's disease: state of the art. *Scand haematol suppl* 40 vol 33, p.p. 431-440; 1984
- 16.- Bowie E. J. Owen C. A. The bleeding time prog haemostas *thromb* 2:249-271; 1974.
- 17.- Brun-Vezinet Fronzioux Barre Sinoussi. Detection of IgG antibodies of lymphadenopathy-associated virus in patients with aids or Lymphadenopathy syndrome. *Lancet L* : 1253 - 1256 ; 1984.
- 18.- Buchanan G.R. Holtkamp C. A. Prolonged bleeding time in children and young adults with hemophilia. *Pediatrics* 66 : 951; 1980.
- 19.- Buchanan G. A. Hemophilia *Pediatr Clin North J. Am* 27 : 309 ; 1985.
- 20.- By John B. Graham B. Philip P. Royal A. Application of molecular genetics to prenatal diagnosis and carrier detection in the hemophilias : some limitations. *Blood* 66 : 759-764 ; 1985.
- 21.- Bylli J.W. The fibrinolytic activity, of human tissue. *Blood* 51; 125 - 130 ; 1980.
- 22.- By M. Elayne Eyster. Robert A. The bleeding is longer than normal in hemophilia. *Blood* 58 ; 18 - 22 ; 1982.
- 23.- Byrd S. Leavell. Oscar A. Thrup J.R. *Hematologia Clinica* 4ta. edicion editorial interamericana p.p. 604-608 mex. 1988
- 24.- Camerino G. Grzeschikh. Jaya M. Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus) *proc natl acad sci usa* 81 : 489 ; 1984.
- 25.- Chantarangkul V. Ingram Gic. An artificial haemophilic plasma for one - stage factor VIII assay *Br. S. Haematol* 40 : 271 ; 1978.
- 26.- Chapiro G. A. Andersen J. C. The subunit structure of normal an hemophilic factor VIII *J. Clin Invest* 52 : 2198 - 2210 ; 1973.

- 27.- Chem Sh. Chance P. Yoshitake S. Factor IX deficiency. Patrial integral gene detection in a family and the value of cdna probe for genetic analysis. Clin Res 33 : 117 ; 1985.
- 28.- Cisar Rius Federico, Pedro Farras. Diagnostico Hematologico, laboratorio y clinica. Edit. Jims. p.p. 255 - 275 Barcelona España 1974.
- 29.- Claeson G. Aurell L. Karlsson G. Substrate structure and activity relations ships. Proc int Longr. Haematol K Yoto. 4 : 11-15 ; 1976.
- 30.- Counts R.B. Solid phase immunoradiometric assays of factor VIII protein. Brj. Haematol 31 : 429 - 436 ; 1975.
- 31.- Curran J.W. Lawrence D.N. Acquired immunodeficiency syndrome (aids) associated with transfusens. Nengl J Med 310 : 69 - 75 1984.
- 32.- Davidsonhn Israel M.D. John Bernard Henry. Diagnostico clinico por el laboratorio 6ta. edicion p.p. 425 - 447, ed. salvat bar. esp. 1978.
- 33.- Davie E W. and Fuji Kawak. Basic mecanisms in blood coagulation. ann rev. biochem 44 : 799 ; 1975.
- 34.- Denson Kwe. Biggs R. Two tipos of haemophilia ca + an a-j a stndy of 48 cases. Br J. Haematol 17 : 163 - 171 ; 1969.
- 35.- Diez E. M. Chuny Y. L. Circulating anticoagulat in a family with prolonged bleeding Time and factor VIII deficiency blood 19 : 799 - 1977.
- 36.- Dosamantes B.M.C. Frecuencia de mujeres portadoras en México de hemofilia A tesis profesional I.P.N. p.p. 3 - 24, 1988.
- 37.- Dunkan B. M. I. J. Tumbrid Ge T.M. Detection of hemophilia carriers: multivariante analisis, compared with discriminant analys using up to five factor VIII variat. Brjournal of hematology : 57 : 113 - 121 ; 1984.
- 38.- Duke W.W. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. Jama. 55 : 1185 - 1192 ; 1910.
- 39.- Elödis. Varadik. Some sources of error in the one atanga assay of factor VIII Haemostasis 7 : 1 - 2 ; 1978.
- 40.- Eyster M. E. Jones Mb. Moret. Carrier detection in classic hemophilia by combined measurement of immunologic and procoagulant activities.

- Amj. Clin Invest 52 : 2708 - 2716 ; 1973.
- 41.- Eyster M. E. Cadda R. L. Carrier With excessively low factor VIII procoagulant activity (VIII ahf) : a study of two unrelated families with mild hemophilia A. blood 49 : 607 - 618 ; 1977.
 - 42.- Eyster M. E. Whithurst D. A. Long term follow up of hemophiliacs with lymphocytopenia or, thrombocytopenia, Abstracted blood. 64 : 95 ; 1984.
 - 43.- Feinstein D. Chona Mny. Hemophilia A, polymorphism detectable by a factor VIII antibody : Science 163 : 1071 - 1072 ; 1969.
 - 44.- Firchein S. I. Hoyer L. W. Prenatal diagnosis of classic hemophilia Engl J Med. 300 : 937 ; 1979.
 - 45.- Forbes C. D. Pretince CRM. Aggregation of human platelets by purified porcine and bovine anti-hemophilic factor. Nature (new biol) 236 : 104 - 106 ; 1972.
 - 46.- Gallo R. C. Salahuddin SZ. Popovich CM. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses HTLV-III from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science. 224 : 500 - 503, 1984.
 - 47.- Garcia V. Fonrodon R. Battle J. Avances recientes, sobre el conocimiento del factor VIII. Rev. Clin. Española, 148, 42 : 325 - 338 ; 1983.
 - 48.- Gerso R. F. Hemophilia. Actualidades medicas II (12):76 - 80 1980.
 - 49.- Gianelli R. Chookh. Winchip P.R. Characterization and use of an intragenic polymorphic marker for detection of carrier of hemophilia B (factor IX deficiency). Lancet I . 239 ; 1984.
 - 50.- Gill J. C. Menitove J. E. Generalized Lymphadenopathy and t-cell abnormalities in hemophiliac A.J. pediatric. 103 : 18 - 22 ; 1983.
 - 51.- Gitschier J. Drayna D. Tuddenham Egd a bel i polymorphism in the factor VIII gene enables genetic mapping and diagnosis of hemophilia A. Nature 314:738 1985
 - 52.- Goedert JJ. Sarngadharan M.G. Antibodies reactive with human t-cell leukemia viruses (HTLVIII) in the sera of hemophiliacs receiving factor VIII concentrate blood 65: 492-495; 1985.

- 53.- Goedert JJ. Sarngadharan M.G. Determinants of retrovirus (HTLV III) antibody and immunodeficiency condition in homosexual men. *Lancet* 2:711-716;1984.
- 54.- Gusella Jf. Wenlwr Ns. Conneally PM. Naylor Sl. A polymorphic DNA marker genetically linked to huntington's disease *Nature* 306:234;1986.
- 55.- Ham W. Arthur. *Tratado de Histologia* 7ta. edicion Editorial Interamericana 1979 p:p 259-270
- 56.- Hardisty RM. Mc Pherson J.C. A one-stage factor VIII (anti-haemophilic globulin) assay and its use on venous and capillary plasma thromb diath. *Haemorrh* 7:215;1962
- 57.- Harper T.A. Chauhan K. A collaborative study on the suitability of commercial assayed plasma for, one-stage factor VIII; Assay. *Am J. Clin Pathol* 77:614;1982.
- 58.- Harper P.S. Obrient. Murray JM. The use of DNA polymorphisms of genotype prediction in families with duchenne distrophy *J. Med Genet* 20:252;1983
- 59.- Harper P.S. Pembrey A Clinically useful DNA probe closely linked to, haemophilia A. *Lancet* 2:6;1989.
- 60.- Harrey R. Gralnick M.D. Factor VIII *Ann Int. Med.* 86:596-623;1979.
- 61.- Hathaway W.E. Mahosondane C. Paradoxical Bleeding in intensively Transfused Hemophiliacs. *Transfucion* 13:6-12;1973.
- 62.- Hadeito Saito. The participacion of pta (factor XI) in contact-activated Fibrinolysis. *Proc Soc Exp Biol Med* 102(2): 153-157;1980.
- 63.- Holmberg L. Burge L. Ljung R. Measurement of antihemophilic factor a antigen (VIII:C Ag) with a solid phase inuoradiometric method based on homologus non-haemophilic antibodies. *Scand J. Haematol* 23:17-24;1979.
- 64.- Hoyer L.W. Immunologic stidies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII); cross-reacting material in a genetic variant of hemophilia A. *Blood* 32.962-971;1970.
- 65.- Hoyer L.W. The factor VIII complex: estructura y function. *Blood* 58 (1): 1-14;1984.

- 66.- Hoyer L.W. Von Willebrand's in spaet. Progress in haemostasis and thrombosis vol 3 New York p.p. 231-287;1976.
- 67.- Hoyer L.W. Carra A. Carl Mahoney J. Detection of hemophilia carries during pregnancy. Blood 60(6):1407-1410;1982.
- 68.- Kaby Vitrum A.B. S. Rosen. Assay of factor VIII: with a chromogenic substrate. Scand J.Haematol.40(33):139-145;1984.
- 69.- Kaneshiro MM. Mielke Ch. Kaesper Ck. Bleeding time after aspirin in disorders of intrinsine clotting. N Engl J Med 281:1039-1042;1970.
- 70.- Kazazian H.H. Orkin S.H, Markan A.F. Quantification of the close association between DNA Haplotypes an specific beta thalassemia mutations in mediterraneans Nature 310:152;1984.
- 71.- Kinf M.M. Trumpi. Kalshoren A.F. Factor XI dependent fibrinolisis a double function of plasma kalikrein depent plasmigen proactivador. Throm Haemos. 41;(4):121-122;1977.
- 72.- Laurence A. Harker. Hemostasis manual. F. A Davis Company Philadelphia P. A. 1974.
- 73.- Laurell C. B. Electroimmunoassay. Scand J Clin Invest. 52:2708-2716;1973.
- 74.- Laurell C. B. Quantitative Estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal Biochem 15:45-52;1976.
- 75.- Lazarchick J. Hoyer L.W. Immunoradiometric meassurement of the factor VIII procoagulant antigen. J Clin Invest. 62:1048-1052;1978.
- 76.- Lawrie A. L. One-stage assay of factor VIII variation due to reagents and machines. Med Lab Sci 39:197-200,1982.
- 77.- Legaz M.E. Weinstein M.J. Heldebrand C.M. Isolation subunit structure and proteolytic modification of bovine factor VIII. Ann Ny Acad. Sci 240:43-61;1965.
- 78.- Mammen E.F. Combined congenital clotting factor abnormalities. Semin Thromb Hemostas 9:55;1983.
- 79.- Manucci P.M. Canciani M.T. y Rota. Response of factor VIII/VW factor to DDAVP in healthy subjects and patients with hemophilia a and Von Willebrand's disease. J. Hematol 47:283;1981.

- 80.- MC Kee P.A. Andersen J.C. Switzer M.E. Molecular structural studies of human factor VIII. *Ann Ny Acad Science* 240:8-53;1975.
- 81.- Melbye M. Biggar RJ. Seroepidemiology of HTLV-III (AIDS-agent) antibody in European homosexual men: prevalence transmission and disease outcome: *Br. J. Med.* 289:573-575;1984.
- 82.- Meyer D. Obert B. Mutimeric structure of factor VIII/Von Willebrand factor in Von Willebrand's disease. *Blood* 8:42;1985
- 83.- Mibashan R.S. Rodeck CH. Thupstom. JK. Plasma assau of fetal factor VIII and IX for prenatal diagnosis of haemophilia. *Lancet L:* 1309-1312;1979.
- 84.- Montagnier L. Cherman JC. Barre Sinoussi. A new human T-lymphotropic retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndrome. *Cold Spring Harbor Laboratory p.p.* 363-379;1984.
- 85.- Morales M. Ambriz R. Reyna M. Aviles A. Diatesis Hemorragica antoimmunitaria. *Rev. Med I.M.S.S. (MÉX).* 20:279;1982.
- 86.- Muller HP. Van Tilburg NH. Bertina RM. Immunoradiometric assay of procoagulant factor VIII antigen (VIII:CAG) *Clin Acta* 107:11-19;1980.
- 87.- Nelson Vanghan Mckey. *Tratado de pediatria.* Salvat Mexicana 7ta. edicion Barcelona Madrid 1980. p.p. 1203-1214,1984.
- 88.- Neshein Me. Myrnel KH. Isolation and characterization of single chain bovine factor V. *Bood* 254:508-517;1979.
- 89.- Oberle I. Drayma D. Heilig R. Tetelomeric region of the human X chromosome long armi:presence of ahighly polymorphic DNA marker and analysis of recombination frequency. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 82:2824;1985.
- 90.- O'brien Jr.The bleding of normal time and abnormal subjects. *J. Clin Pathol* 4:272-285;1969.
- 91.- Owen W G. Wagner R.H. Antihemophilic factor: separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents. *Thromb Diath Haemorrh* 27:502-515;1972.
- 92.- Pert N. Walsh An Nyatt. Comparison of the coagulant activities of platelets and phospholipids. *B.J.H.* vol 33 no.1;1979.

- 93.- Pizzuto. J. Ambriz R. Reyna M. Monrey L. Acquired Von Willebrand's syndrome during autoimmune disorder. *Thromb Haemost* 42:1523;1980.
- 94.- Pizzuto J. Garcia MS. Reyna MP. Morales MR. Thrombin time dilution test: a simple method for control of heparin therapy. *Thromb Haemost* 42:1276;1979.
- 95.- Pool J.G. Robinson G. Assay of plasma antihaemophilic globulin (AHG) *BRJ Haematol* 5:17;1959.
- 96.- Poon M C. Ratnoft OD. Evidence that functional subunits of antihemophilic factor (factor VIII) are linked by monocovalent bonds. *Blood* 48:87-94;1976.
- 97.- Popovic M. Sarngadharan MG. Reda E. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-VIII) from patients with AIDS and pre AIDS. *Science* 224:497-500;1984.
- 98.- Quick AJ. Salicylates and bleeding: the aspirin tolerance Test. *AM J. Med. Sci.* 252:265-269;1966.
- 99.- Reisner HM, Barrow E.S. Radioimmunoassay for coagulant factor VIII related antigen (VIII:CAg). *Thrombosis* 14:235-239;1979.
- 100.- Reisner HM. Armitage H. Davidb. Detection of carrier state for classic hemophilia using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *Blood*. 59(6):1163-1170;1982.
- 101.- Rick ME. Hoyer LW. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF factor VIII): Immunologic properties of active subunits produced by salt dissociation. *Blood* 42: 737-747; 1983.
- 102.- Rocha E. Fernandez JM. Solana J. Perez JA. Síntesis bioquímica y estructura molecular del factor VIII. *Sangre* 23; (5-b): 642-666; 1978.
- 103.- Rosen S. Friberger P. Andersson M. A new chromogenic assay for determination of human factor VIII:C activity. *Acta Med Scand.* 178: 112-114; 1980.
- 104.- Shaw E. Giddings JC. Synthesis of procoagulant factor VIII: factor VIII related antigen and other coagulation factors by the isolated perfused rat liver. *Br. J. Haematol* 41:585-596;1979.

- 105.-Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol Biol 98:503:1975.
- 106.-Spritz RA. Forget B.G. The thalasemias:molecular mechanisms of human genetic disease. AMJ.Human Genet 35:333-340;1983.
- 107.-Suomela H. Blomback B. The activation of factor X evaluated by using synthetic substrates. Thromb Res 10:267-281;1979.
- 108.-Sussman H. Weiss HJ:Dissociation of factor VIII in the presence of proteolytic. Thromb Haemostas 40:316-325;1978
- 109.-Switzer ME. McKee PA. Studies on human antihemophilic factor. J. Clin Invest 57; 925-937;1976.
- 110.-Takada AT Urano Y. Influence coagulation on the activation of plasminogen by streptokinase an urokinase. Thrombosis and Hemostasis vol. 42 no. 3 ; 1979.
- 111.-Tonnesont Sondergaard F. Kklesen M. X-Chromosome-Specific probe Dx 13 factor carrier detection in the Hemophilias: Some Limitations. Blood. 66:759-764;1985
- 112.-Toole JJ. Knopf. Wozney JM. Saltman LA. Molecular cloning of a DNA coding human antihemophilic factor. Nature 312:342-346-1984.
- 113.-Tudderham EGD, Troboid NC Hoyer. The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoadsorbent chromatography. J. Lab Clin Med. 93:40-53:1980.
- 114.-Vehar GA. Davie EW. Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). Biochemistry 19:401-410;1980.
- 115.-Warrie I. Faillace WJ Canady AI. Paraplegia after lumbar puncture. In an infant with previously un diagnosed hemophilia A. Treatment and peri-operative considerations. Clin pediatr (Phila). 28 (3): 136-138:1989.
- 116.-Weiss HJ. Platelet physiology and abnormalities of platelet function. N. Engl J Med. 293:531-541;1975.
- 117.-Weiss HJ Hoyer LW. Von Willebrand factor: dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. Science 182:1149-1151:1973.

- 118.-Weiss HJ Kochwa S. Molecular forms of antihaemophilic globulin in plasma, cryoprecipitate and after thrombin activation.
- 119.-Winship FR. Anson DS. Rizza CR. Carrier detection in haemophilia B using two further restriction fragmen length polymorphisms.
- 120.-Williams J. Williams. Ernest Beutha. Allan J. Hematologia. Salvat Editores, Barcelona España 1979.
- 121.-Zimmerman TS. Edgington TS. Factor VIII coagulat activity and factor VIII. Like antigen:independent molecular entities. J. Exp. Med 138:1018-1020;1973.
- 122.-Zimmerman TS. Ratnoft OD. Detection of carrier of classic hemophilia using an immunology assay for antihemophilia for (factor VIII). J. Clin Invest 50:255-258;1971.
- 123.-Zucker MB. The functioning of blood platelets. SEI AM 242:86-103;1980.

Referencias. Enfermedad de Von Willebrand

- 1.- Abilgaard CF. Suzukis Harrison J. Zimmerman T. S.
Serial studies in Von Willebrand disease: variability
versus " variansts " Blood 56:712; 1980
- 2.- Armitage H. Rizza C. R.
Two populations of factor VIII related antigen in a
family with willebrands disease.
BR. J. Haematol 41: 279; 1979
- 3.- Baumgartmer H. R. Tschopp T. B. Meyer D.
Shear rate dependent inhibition of plateled
adhesion an agregation on collagenons surfaces by
antibodies of human factor VIII/Von Willebran.
BR. J. Haematol 44: 127-139; 1980
- 4.- Bird P. Rizza C. R.
A method for detecting factor VIII clotting
activity associated with factor-related
antigen in agarose gels. BR. J. Haematol 31: 5-12; 1975
- 5.- Blomback B. Hesel B. Savidge G. Wikstroml.
The effect of reduccing agents of factor VIII and
other coagulation factors.
Throm Res 12: 1177-1194; 1978

- 6.- Bloom AL. Giddings J. C. Wilks C. J.

Factor VIII on the vascular intima: possible importance
haemostasis and thrombosis.

Nature (New Biol). 241: 217-219; 1973

- 7.- Bouna B. N. Wiegerinck Y. Sixma J. J.

Immunological characterization of purified anti-haemophilic
factor a (factor VIII) which corrects abnormal platelet
retention in Von Willebrand's disease

Nature (New Biol) 236: 104-106; 1972

- 8.- By John Paul Scott. Robert R. Montgomery

Acquired Von Willebrand's disease in association
with Wilms tumor: regression following treatment.

Blood 4: 58; 1981

- 9.- By John Paul Scott. R. Montgomery

Platelet Von Willebrand's antigen II : active release by
aggregating agents and marker of platelet in vivo

16, 195-200; 1983

- 10.- By P. Mannucci R. Bader M. H.

Studies of the pathophysiology of acquired Von Willebrand's
disease in seven patients with lymphoproliferative disorders
or benign monoclonal gammopathies. Blood 64: 393; 1976

11.- Byrness JJ.

Plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Semin Thromb Hemostas 8:9; 1981

12.- By Seiji Kinoshita. Janet Harrison.

A new variant of dominant type II Von Willebrand's with aberrant multimeric pattern, factor VIII-related antigen (type II D)

Blood 63: 1369-1371;1971

13.- Castella and Miller JL. Platelet Factor VIII

Von Willebrand factor binding in variant Von Willebrand disease. Fed Proc. 41:700;1982.

14.- Chen YC. Wukk.

A comparison of methods for the study of platelet hyperfunction in thromboembolic disease. BR. J Haematol 46: 263-268;1980.

15.- Celler B. S.

The effects of ristocetin and Von Willebrand factor on platelet electrophoretic mobility. J. Clin Invest.

61: 1168-1175;1977.

16.- Counts R.B. Paskell S.L.

Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/Von Willebrand factor. J. Clin Invest. 62:702-708;1978.

17.- Counts R. B.

Solid phase immunoradiometric assay of factor VIII protein

- Br. J. Haematol 31:429-436;1976.
- 18.- Doncet de Bruine M. H. M. Sixma JJ.
Heterogeneity of human factor VIII binding to platelet in the presence of ristocetin. J. Lab. Clin. Med. 92:96-107;1978.
- 19.- E. J. W. Bowie.
Von Willebrand's disease: state of the art. Scand J. Haematol suppl 30 vol. 33 p. p. 431-440;1986.
- 20.- Fass D. N. Knutsson G.J. Bowie E. J. W..
Porcine Willebrand factor: a population of multimers. J Lab Clin Med 91: 307-320;1978.
- 21.- Gralnick H.R.
Factor VIII/Von Willebrand factor protein galactose a cryptic determinant of Von Willebrand factor activity. J.Clin Invest 62:496-496-499;1978.
- 22.- Gralnick H. R. Collier B. S. Shulman N.R.
Factor VIII, Ann Intern Med 86:598-616;1977.
- 23.- Gralnick H.R. Williams S. Shafer B.
Von Willebrand disease with normal ristocetin - induced platelet aggregation abnormal platelets and abnormal factor VIII/Von Willebrand factor protein Blood 58 suppl 193a.1981
- 24.- Gutterman LA. Sterenson TD.
Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with vincristine: J am Med Assoc 247:1433;1982.

- 25.- Handin R I. Martin V. Maloney W.C.
Antibody induced Von Willebrand disease. anewly defined
inhibitor syndrome: Blood 48: 393;1976.
- 26.- Harker LA. Slicher S.A.
Platelet and fibrinogen consumption in man. N Engl J Med
287:299-1005;1972.
- 27.- Harknees D R Byrnees JJ.
Hazard of platelet transfusion in thrombotic thrombocytopenic
purpura semin Thromb Hemostas 246:1931;1981.
- 28.- Holmsen H Setkowsky C A. Day H J.
Effects of antimycin and 2-desoxyglucose on adenine
nucleotides in platelets. Biochen J. 144:385-396;1974
- 29.- Howard MA. Firkin B G.
Ristocetin-a new tool in the investigation of platelet
aggregation. Thromb Diath Haemorrh 26:363-369;1971.
- 30.- Howard M A. Hutton R.A. Hardisty R.M.
Hereditary giant platelet syndrome:a disorder of a new
aspect of platelet function. BR. Med J. 2:586-588;1973.
- 31.- Howard MA. Montgomery D.C.
Factor VIII-Related antigen in platelet. Thromb Res
4: 617-624; 1974.

- 32.- Howard MA Sawers R. J. Firling BG.
Ristocetin means of differentiating Von Willebrand disease into two groups. Blood 41:687-690;1973.
- 33.- Hoyer L.W. De los Santos R. Hoyer Jr.
Antihemophilic factor antigen localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy. J. Clin Invest. 52: 2737-2744;1973.
- 34.- Hoyer L. W. Shainoff Jr.
Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. Blood 55: 1056-1059;1980.
- 35.- Hoyer L.W.
Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF factor VIII) radioimmunoassay of AHF antigen. J. Lab Clin Med 80:822-833;1972.
- 36.- Hoyer L.W.
Specificity of precipitating antibodies in immunologic identification of antihaemophilic factor. Nature (New Biol) 245: 45-51;1973.
- 37.- Hoyer L.W.
Von Willebrand disease. Prog Hemostasis Thromb 3: 231-287;1976

- 38.- Ingram Gec Kingston P.J. Leslie J.
For cases of acquired Von Willebrands sindrome. Br.J.Haema-
tol 21: 189-199;1985.
- 39.- Ivy E.A. Nelson D. Bucher G.
The standerization of certain factor in the entaneuns
"venostasis" bleeding time technique. J. Lab Clin Med
26: 1812;1943.
- 40.- Jaffe E. A. Hoyer L. W. Nachman R.L.
Synthesis of antihemophilic factor antigen bycultured humen
endotalial cells. J. Clin Invest. 52:2757-2764;1973.
- 41.- Jaffe E.A. Hoyer L.W. Nachman RL.
Synthesis of Von Willebrand factor by human endothelial
cells.Prue Natl Acad Sci U.S.A. 71:1906-1909;1974.
- 42.- Joist JH. Cowan JF. Zimmerman T.S.
Acquired Von Willebrand's disease evidence for a quantitati-
ve factor VIII disorder. Nengl J Med 298:988;1987.
- 43.- Kao Kj Pizzo Sv. Mokee P.
Demostration and characterizacion of specific binding sites
for factor VIII/Von Willebrand factor on human paltelets.J.
Clin Invest. 63:656-664;1974.
- 44.- Kao Kj Pizzo Sv. Mekee P.
Platelet receptors for human factor VIII/Von Willebrand
factor protein to human platelets. Blood 55:9-15;1980.

45.- Kaplan RL. Nossel Hz. Drillings M.

Radioimmunoassay of platelet factor 4 and b-thrombuglobulin development and application to studies of platelet release in relation to fibrinopeptide a generation. BR. J. Haematol 29: 129-146; 1978.

46.- Kete J. Krawitz S. Sacks PV. Levin SE.

Platelet, erythrocyte, and fibrinogen kimeties in the hemolytic uremic syndrome of infancy. J. Pediatr 83:739-748;1973.

47.- Kernoff PBA. Rizza CR.

The specificity of antibodies to factor VIII produced in the rabbit after immunization with human cryoprecipitate Thromb Diath Haemorrh 29: 652-660; 1973.

48.- Kobayashi.

Treatment of hemophilia a and Von Willebrand's disease patients with and intranasal dripping of DDAVP. Thrombosis Research 16: 775-780; 1979.

49.- Kontts JP. Walsh PN. Plow EF. Bouna BN.

Active release of human factor VIII-Related antigen by adenosine diphosphate collagen and thrombin. Clin Invest 62: 1255-1263; 1978.

50.- Lazarchick J. Hoyer L.W.

The properties of immune complexes formed by human antibodies to factor VIII. J. Clin Invest. 60:1070-1079;1977.

- 51.- Legaz M.E. Shimer G. Conts R.B.
Insolation and characterization of human factor VIII:C
(Antihemophilic factor) J. Biol Chem 248:2946-2955; 1973
- 52.- Legaz M.E. Einstein M.J. Heldebrant C.M.
Insolation, subunit structure and proteolytic modification
of bovine factor VIII. Ann Ny Sci 240:43-61;1975.
- 53.- Leone G. Paola P. Guerrera G.
Acquired Von Willebrand's syndrome duving a collagen disorder. Haematologica 59:212;1974
- 54.- Tuiken Game Millan R. Lightsey AL.
Platelet associated IgG in inmune thrombocytopenic purpura
Blood 50:317-325;1978.
- 55.- Marches SL. Shulman NR. Gralnik HR.
Studies on the purification and characterization of human
factor VIII. J. Clin Invest. Sli 2151-2161;1972.
- 56.- Meyer D. Jenkins C. Dreyfus M.
An experimental model for Von Willebrand's disease. Nature
243: 293-294; 1973.
- 57.- Montgomery RR. Johnson JW. Von Willebrand's antigen ii stu-
dies in hereditary on acquired disease states.
J. Lab Med 79:307-313;1971.

- 58.- Montgomery RR. Zimmerman TS.
Von Willebrand antigen II : a new plasma and platelet antigen deficient in severe Von Willebrand's disease. J. Clin Invest. 62:1498-1507; 1978.
- 59.- Morisato DK. Gralinck HR.
Selective binding of the factor VIII/Von Willebrand factor protein to human platelets. Blood 55:9-15;1980.
- 60.- Muller Berghans G.
Pathophysiology of generalized intravascular coagulation, Semin Thromb Hemostas 3: 209-246;1977.
- 61.- Nachman RL. Jaffe E.A.
Subcellular platelet factor VIII antigen and Von Willebrand factor J. Exp. Med 141: 1101-1112;1975.
- 62.- Olson JD. Brockway W. Fass DN.
Purification of porcine and human Ristocetin-Willebrand factor. J. Lab Clin Med 89: 1278-1294;1977.
- 63.- Poole Wilson PA. Jones NF.
Acquired Von Willebrand's syndrome and systemic lupus erythematosus proc. R. Soc. Med. 65: 561-562;1972.
- 64.- Ratnoff OD. Saito H.
Bleeding in Von Willebrand's disease. N Engl Med 290:1089;1984

- 65.- Rizza CR. Rhymes I. L. Austen Deg.
Detection of carriers of haemophilia A "blind" study. BR J
Haematol 30: 447-456;1975.
- 66.- Ruggeri ZM. Nilsson IM. Lombardi R.
Aberrant multimeric structure of Von Willebrand's factor in
a new variant on Von Willebrand's disease (type II C). J
Clin Invest. 70:1124;1984.
- 67.- Ruggeri ZM. Pareti FI. Mannuci PM.
Heightened interaction between platelets and factor VIII/Von
Willebrand factor in a new subtype of Von Willebrand's
disease.
- 68.- Ruggeri ZM. Zimmerman TS.
The complex multimeric composition of factor VIII/Von Wille-
brand factor. Blood 57: 1140; 1981.
- 69.- Ruggeri ZM. Zimmerman TS.
Variation in Von Willebrand's disease, characterization of two
subtypes by analysis of multimeric composition of factor
VIII/Von Willebrand factor in plasma and platelets.
J. Clin Invest. 65: 1318-1325; 1980.
- 70.- Ruggeri ZM. Mannuci PM.
Factor VIII-related properties in platelets from patients
with Von Willebrand's disease. J. Lab. Clin Med 101:411;1983.
- 71.- Ruggeri ZM. Mannuci PM. Lombardi R.
Multimeric composition of factor VIII/Von Willebrand factor
following administration of DDAVP. Implications for pathophysy-

siology and therapy of Willebrand's disease subtypes,
Blood 59: 1272; 1982.

72.- Sampson BM. Greaves M. Malia RG.

Acquired Von Willebrand's disease. evidence for a qualitative factor VIII/disorder. N Engl. J. Med 298: 988; 1978.

73.- Sarji KE. Stratton RD. Wagner RH.

Nature of Von Willebrand factor: a new assay and a specific inhibitor. Proc Natl Acad Sci U.S.S. 71: 2937-2941; 1974.

74.- Scott JP. Montgomery RR. Tubergen DG.

Acquired Von Willebrand's disease in association with Wilms tumor. Treatment, Blood 58: 665; 1981.

75.- Shapiro GA. Andersen JC. Pizzo S.V.

The subunit structure of abnormal and hemophilic factor VIII. J. Clin Invest. 52: 2198-2210; 1973.

76.- Simone JV. Cornet JA.

Acquired Von Willebrand's systemic lute erythematous Blood 31: 806-812; 1978.

77.- Sixma JJ.

Platelet isolation in platelet function testing in day 14. Holsen Tucker (EDS); proceeding of a conference on platelet function testing. Anal Biochem 15: 45-52; 1971.

78.- Sodetz JJ. Paulson JC. Pizzo SV.

Carbohydrate on human factor VIII/Von Willebrand factor: impairment of, function by removal of specific galactose residues J. Biol Chem 253: 7202-7206; 1978.

- 79.- Sodetz JM. Pizzo SV. Mckeep.
Relationship of sialic acid to function and in vivo survival
of human factor VIII Von Willebrand factor protein.
J. Biol Chem 252: 5538-5546; 1977.
- 80.- Solana JM. Rocha E. Arrizabalaga B.
Aplicacion diversas tecnicas al diagnosticos de la enferme
dad de Von Willebrand. Sangre 26 (6): 1156-1163; 1981.
- 81.- Stableforth P. Tamagnini GL. Dormandyk.
Acquired Von Willebrand's syndrome with an inhibitor to
factor VIII clotting activity and ristocetin-induced
platelet aggregation. BR. J. Haematol 33:565-573;1973
- 82.- Swintzer ME. Mckee PA.
Studies on human antihemophilic factor
J. Clin Invest 57: 925-937; 1976.
- 83.- Takahasshi
Studies on the pathophysiology and treatment of Von Wille-
brand's disease mechanism of increased ristocetin induced
platelet aggregation in Von Willebrand's disease.
Thromb Res 19: 857; 1980.
- 84.- Tuddenham EGD Lazarchick J. Hoyer LW.
Synthesis and release of factor VIII by cultured human endu-
thelial cells. Pruc Natl Acad Sci USA. 71:1906-1909;1974.
- 85.- Weiss HJ. L.
Relation of Von Willebrand factor to bleeding time. N Engl J.
Med 291: 420; 1974.

86.- Weiss HJ. Hoyer LW. Rickles FR.

Quantitative assay of plasma factor deficient in Von Willebrand's disease. That is necessary for platelet aggregation. relationship to factor VIII-procoagulant activity and antigen content. J. Clin Invest. 52: 2708-2716; 1973.

87.- Weiss HJ. Meyer D. Rabinowitz R. Pieta G.

Pseudo Von Willebrand's disease an intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/Von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high molecular weight multimers Blood 58: 209;1981.

88.- Weiss HJ. Pietu G. Girma JP.

Heterogeneous abnormalities in the multimeric structure, -- antigenic properties and plasma platelet cont. of factor -- VIII-Von Willebrand factor subtypes of classic (type I) and variant (type IIa) Von Willebrand's disease J Lab Clin Med 101: 411; 1980.

89.- Weiss HJ. Roger J. Brand H.

Defective ristocetin: induced platelet aggregation in Von -- Willebrand's disease and its correction by factor VIII. J. Clin Invest. 52. 2697; 1973.

90.- Weiss HJ. Sussman II. Hoyer L. W.

Stabilization of factor VIII in plasma by the Von Willebrand factor J. Clin Invest. 60: 390-404; 1977.

91.- Zahav J. Kakkar VV.

B. thromboglobulin-specific marker of in vivo platelet release reaction. Thromb Haemostas 44: 23-29;1980.

92.- Zimmerman TS. Edgington TS.

Factor VIII coagulant activity and factor VIII-Like antigen: independent molecular entities. J. Exp. Med 138:1015-1020; 1973

93.- Zimmerman TS. Hoyer LW. Dickson, Edgington.

Of the Von Willebrand's disease antigen (factor VIII-related antigen) in plasma by quantitative immunoelectrophoresis. J. Lab Clin Med 86: 152-159; 1973.

94.- Zimmerman TS. Ratnoff od powel AE.

Immunologic differcmtation of classic hepholilia (factorVIII deficiency) and Von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proacceleiving factor (V) and an acavired circulating anticoagulant against. antihemophilic factor. J. Clin Invest. 50:244-254; 1971.

95.- Zimmerman TS. Robert TJ. Edgington TS.

Factor VIII related antigen: multiple molecular forms. in -- human plasma proc. Natl Acad Sci. USA 72: 5121-5125; 1975.

96.- Zucker MB. Brockman MJ. Kaplan KL.

Blood platelets localization and release by thrombin and collagen. J. Lab. Clin. Med 94: 675-682; 1979.

OBRAS DE CONSULTA

- BIGG. R. Human blood coagulation hemostasis and thrombosis ed. Blackwell.
- HENRY. J.B. Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 16 th. ed. Philadelphia, wb saunders co. 1979.
- WINTROBE. Clinical hematology, 7 th ed. Philadelphia lea febiger, 1976.
- HOYER L. W. The factor VIII complex: structure and function Blood 58: i-13, 1981.
- KELLY D. A. Localization of factor VIII:C antigen in guinea pig. tissues and isolated liver cell fractions. BR. J. Hematology 54: 535 1984.
- MAMMEN E.F. factor VIII abnormalities. Semin Thromb Hemost. 9:22-27 1983.
- STEL H. V. Detection of factor VIII coagulant antigen in human. Liver tissue. Nature 303:530-532 1983.
- ANLES ABE S. Studies of lymph nodes from patients
- KAUFMAN J. Protactectomy in factor XI deficiency. The journal of urology 117 (1) 1977 p.p. 75-78
- NATNOFF D. The prevalence of plasma thromboplastin antecedent deficiency. Blood: 44 (4) 1975:p.p. 569-572.

BIBLIOGRAFIA HEMOFILIA B y C

- 1.- Arveiler B, Oberle I-vient A. Laboratoire de génétique moléculaire des eucaryotes de C.N.R.S. "An y human genet" vol. 42 (2)=380-9 (1988)
- 2.- Beslaar A.Ran.I.E.Alderhamp the role of factor IX in tissue thromboplastin induced coagulation "Thromb. Hemostas" vol. 48 (1): 54-58 (1983)
- 3.- Byod S.Loavell, Oscar A. Thrombp. Jr. Edit Interamericana p/p 602,617 (1988)
- 4.- Biggs R. Bidverll J. "Human Blood Coagulation Haemostasis an Thrombosis" Ed. Blackwell 2 de ed. p/p 143-162 (1978)
- 5.- Jrarn S. Nitcheve M. Dand James A. Portial y Coagulation factor XI am necoly factore of noonan syndrome the jound pedia--tricos vol. 102 (2) 224-227 (1983)
- 6.- Choryl F. Scott Marc Schepirar. "Effect of hepain on the inactivation. rate of human. factor XI by autithrombin III. Blood. vol. 60 (4) 940-9479 (1982)
- 7.- D. Nafted Oscar.The prevalence y of plasma, thromboplastin - antecedent (pta:factor XI) deficiency.Blood. vol. 44 (2):569 570 (1974)
- 8.- G. Lione. L. Aceorra circulating anticoaglant agueot factor - XI and thrombocy topenia with patelet aggregation inhibition in systemic lupus erythematoses. Acta Haemat vol. 58 (1) 240-244 (1977)
- 9.- Giaelli L. Cho. Nh. Characterization andus. Of an intragenic - polimorphin. Marher for ditetion of carries of hemophilia B - (factor IX deficiency) "The lawt 1507 (12) 239-241 (1984)
- 10.-Arrunchw Luila. and Ceygnave Jean. Prorr. carrier detection - of hemophilia B. by vising a restriction factor IX gene."Jo--Urnell Clin invest vol. 73 (5:1941-45 1984)
- 11.-Hassen H.J. Lionard A. hemophilia B voith inhibitor molecular analysis of the subtotal detection of the factor IX gen. "Blood" vol. 66 (3) 728-730 (1985)
- 12.-Hassen H. de Orlando M. Intragenie factor IX restriction site golymporpsn in haemophilia buarrants. "Blood" vol. 65(2): 441-43 (1985)

- 13.-Holnbey Lorg. Austalvi Bson. Prenatal diagnosis of hemophilia B by immunoradiometric of factor IX.
"blood" vol. 56 (3):397-340 (1980)
- 14.-G.M. Vorcellotu an D.F. Mosher. Acquired factor XI deficiency in systemic lupus erythematosus.
Haemostast vol. 48 (3):250-252 (1982)
- 15.-Kikotu Kurshi and Ecl. i.v. activation of human factor XI -- (plasma thromboplastia. Antecedent by factor XIa (activat ed hazeman factor) Biochemistre vol. 16 (84): 5831-5838 (1977)
- 16.- (KI) Davedsohn J.B. Henry Diagnóstico clínico, por el laboratorio Edt. Salvat edicion p/p 425-440 (1974)
- 17.-Kisiel Walter Mac. Mullon. Bord A. Proteolytic inactivation of blood coagulation factor IX by thrombin.
"Blood" vol. 66 (6): 1302-1308 (1985)
- 18.-Mammahatler Christine. Sandra Shiffam.
Phospholupuds accelerate factor IX activation by surfa ce bound factor XIa. British Journal of hematology vol. 56 (11): 261-271 (1984)
- 19.-Manrahalfco Christine. Sepace adsorptin of factor XI evidence that different mecanismo are involved in bonding to glose and plastic materials. Thromb Haemostae vol. 47 (3): 214-217 (1982)
- 20.-Machelter Christine Trysia. Activation of human factor XI. The Journal of Biological Chemistry vol. 255 (7):2667-2669 (1980)
- 21.-Margalit Ruth and Sandra Schiflman. Factor XI adsorption to surface interation of high molecular wight fininogle (hmk) and plasma adsorption inhibitor.
Blood vol. 56(2):168-172 (1980)
- 22.-Laurence A. Haracheo. Hemostasis Manual esit f.a.daws and company pp 236-240 (1974)
- 23.-Levis M. Richard Reisher M. Howard. Detection of factor IX -- antibodin by radioimmunoasey. e. factor ofcalines and anti body factor IX inactivation "Blood vol.56 (4):608-614 (1980)
- 24.-Myat S. Lups Comb. Homan. Plastilots auelfactor XI localiza tion inplatelet membrana of factor XI-liske activity and its funetinal. dustinitional from plasma factor XI y clih invent vol. 63 (2) 1006-1014 (1978)

- 25.-Leavel Thrombp "Hematologia Clinica" Edit. Interamericana 4^a. ed. pp. 602-632 (1978)
- 26.-Lynch Raphael, Miller Apak. Metodos laboratorio edit. Interamericana 2da. edicion pp 806-820 (1978)
- 27.-M.V. Raini D. Sancho. Companson of bluding tendeney factor XI coagulant activity and factor XI, antoglu in 25 factor XI deficcent vlin drods. Blood vol. 65 (3) 719-724 (1985)
- 28.-Mac Larlave R. Haemostasis "Brithos moducal bulletin vol. 33 (3) 102-105 (1977)
- 29.-Moneache Donis, Blise H. Evans. Coagulation factor IX concentrate methed of preparation and as sesoments of poten tial in-vivo trombocity in models "blood" vol. 64 (6) 1220-1227 (1984)
- 30.-Miller H. Conrie Arthur H. Choraterization of an oscolt inhi- bitor to factor IX in hemophilia B patient "British journal of Haemotology " vol. 61: 329-338 (1985)
- 31.-Mitchelli G.A. Lluprogenie Lubstrate Asiag for factor VIII -- and IX introduction ya nen solid phase fluorecent detection method.Thrombosis Research vol. 21): 573-584 (1981)
- 32.-Nilson Vanghar Inckal. Tratado de pediatria edit. subrat 7^a edicion pp 1203-1210 (1980)
- 33.-Nogen Claudia Identification of the molecular of jet in a factor IX Chapel Hill sustitution of hurtudine for argunine - at position 145. Pro.Nat acad.sei.vol.80 (1):4000-4002 1982
- 34.-Peter Dokl M.D. John P. Asociation wich haemophilia (factor - XI deficiency) in a foot balls player jana vol. 237 (20):2215-2216 (1977)
- 35.-Orstavik Vil. Allo antibadin to factor IX in haemophilia B. B charactorizad by crosed and enzima enjugated. Haematology vol. 48 (1) 15-23 (1981)
- 36.-Orstavick U.H. Orstavik L. Enzima-marihed inmucadsorbent assay (ELISA) for the detection afan tibosin to factor IX in haemophilya B. Thrombosis Research vol. 22 (2): 257 (1981)
- 37.-Porten Vaslsh. Activation of plateles on pholimorphismo. British Journal Hematology vol. 30 (1):10-15 (1976)
- 38.-Peake D.R. Carrier detection by direct gene analysis an family next haemophilia B (factor IX apliquency.Blood vol. 4 (1257) 242-243 (1984)

- 39.-Pecter N. Walsh and John. Contribution of to the proticolytic activation of blood coagulation factors XII and XI. "Blood" vol. 57 (1) 116-117 (1981)
- 40.-Ross P. J.G. Rizza C.R. Haemophylic beaused by a point mutation in a doner espluce justion of the human factor IX gene Nature vol. (316-115) 643-645 (1985)
- 41.-Russell E. Thompson, Robert Mondle. Association of factor XI and molecular might fibrinogeno, in human plasma "The Journal of Clinical Investigation" vol. 60 (5) 1376-1380 (1984)
- 42.-Ruth Mazalit and Sandra Sahattuman. Factor XI adsorption of surface: interation of nigh molecular phibrinogeno (hmk) and plasma adsortion inhibition Blood vol.56(2)1768-1772 1980
- 43.-Rajindra N. Ruitb Franh M. Jadeuc circulating anticoagulant - agaunet factor XI in proreau. Journal of Medicine vol. 13 (4): 289-300 (1982)
- 44.-Shiffman Sandra and Rearl. The preparation characterization and activation of a hig purificad factor XI, evidence that homogenized plasma activaty participate on the interaction of factors XI. BR. Journal of Haematology vol. 27 (4): 101-113 (1974)
- 45.-U. Soligashon. High gene frequency of factor XI (pta) dificiency in askenaje Live Blood vol. 51 (6):1223-1228 (1978)
- 46.-Sott A. Gerald M. Jach Levin family multiple coagulation - factor deficiency combine D. factor VIII, IX, and XI dificiency and el combine factor XI and XI dificiency two previcously in characterized family multiple factor deficiency - syndrome. In Thrombosis and Hemostasis vol. 7 (2)144-168 1981