



102  
Zej  
UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

TRABAJO MONOGRAFICO DE  
ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A:

HILDA REYNA INES ROLDAN ARMAS



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado:**

<b>Presidente</b>	<b>Prof. Genoveva Abdala Matuk.</b>
<b>Vocal</b>	<b>Prof. Guillermo González Vargas</b>
<b>Secretario</b>	<b>Prof. Raúl Nieto Camacho</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>Prof. Laura Peniche Villalpando</b>
<b>2do. Suplente</b>	<b>Prof. María Estela Cevallos Ferriz</b>

**Sitio donde se desarrollo el tema:**      **Facultad de Química - CICH**  
**Banco Central de Sangre**  
**IMSS, Congreso Hemofilia**

**Asesor del tema:**



**Guillermo González Vargas**

**Sustentante:**



**Hilda Reyna Inés Roldán Armas**

**Mi agradecimiento muy en especial para el Dr. Cornelis L. Verweij,  
para el Dr. Raúl Ambriz Fernández y para el QFB Guillermo González  
Vargas, cuya ayuda y guía fueron de gran utilidad.**

**Gracias, también a tí, que me apoyaste, acompañaste, aconsejaste y  
compartiste conmigo la tarea de lograr algo útil en una profesión tan noble  
como lo es la Química.**

## INDICE

	Pag-
I.- OBJETIVO E INTRODUCCIÓN	5
II.- GENERALIDADES: HISTORIA Y DEFINICIÓN.	13
INDICE DE SIGLAS.	20
FACTOR VIII	22
III.- ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA.	28
NATURALEZA DEL DEFECTO DEL FVIII	30
BIOSÍNTESIS	31
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	35
LOCALIZACIÓN	43
FISIOPATOLOGÍA	47
IV.- INCIDENCIA.	51
V.- HISTORIA CLÍNICA.	55
VI.- INHIBIDORES DEL FACTOR VW.	59
VII.- TERAPIA.	63
VIII.- DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.	70
PRUEBAS CUALITATIVAS	71
PRUEBAS CUANTITATIVAS	72
PRUEBAS SUGERIDAS	74
IX.- CONCLUSIONES.	101
X.- BIBLIOGRAFÍA.	106

**LA ENFERMEDAD DE  
VON WILLEBRAND**

**HILDA REYNA INES ROLDAN ARMAS**

## **CAPITULO I**

### **OBJETIVO E INTRODUCCION**

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es elaborar un documento que sirva de apoyo al personal del Sector Salud involucrado en el estudio de la hemostasia para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de **von Willebrand**.

Actualizar los conceptos de este padecimiento con la incorporación de los últimos reportes aparecidos en la literatura médica.

Además, proporcionar a los alumnos que estudian la materia de Hematología, las bases suficientes para la mejor comprensión de uno de los trastornos de la hemostasia.

Considero importante el estudio de esta enfermedad de **von Willebrand** debido a la incidencia de estos casos en nuestro país, ya la Sociedad de Hemofilia reportaba en 1984, 13 casos de hemofílicos por millón de habitante en el mundo (el 30% es enfermedad de **von Willebrand**) y la trascendencia para las personas afectadas es mayor debido a que es una enfermedad de por vida, así que al realizar procedimientos quirúrgicos o un mal manejo de estos pacientes con defectos en la coagulación podría poner en peligro la vida o la calidad de ella, por lo que un acertado diagnóstico facilita el manejo y el control del paciente.

## INTRODUCCION

La Hemostasia es el proceso por el cual el aparato circulatorio se protege de la pérdida excesiva de sangre; la lesión de los vasos desencadena una serie de reacciones complejas como la vasoconstricción, agregación plaquetaria y coagulación que culminan con la formación del coágulo que detiene la hemorragia sin entorpecer la circulación sanguínea en el vaso dañado.

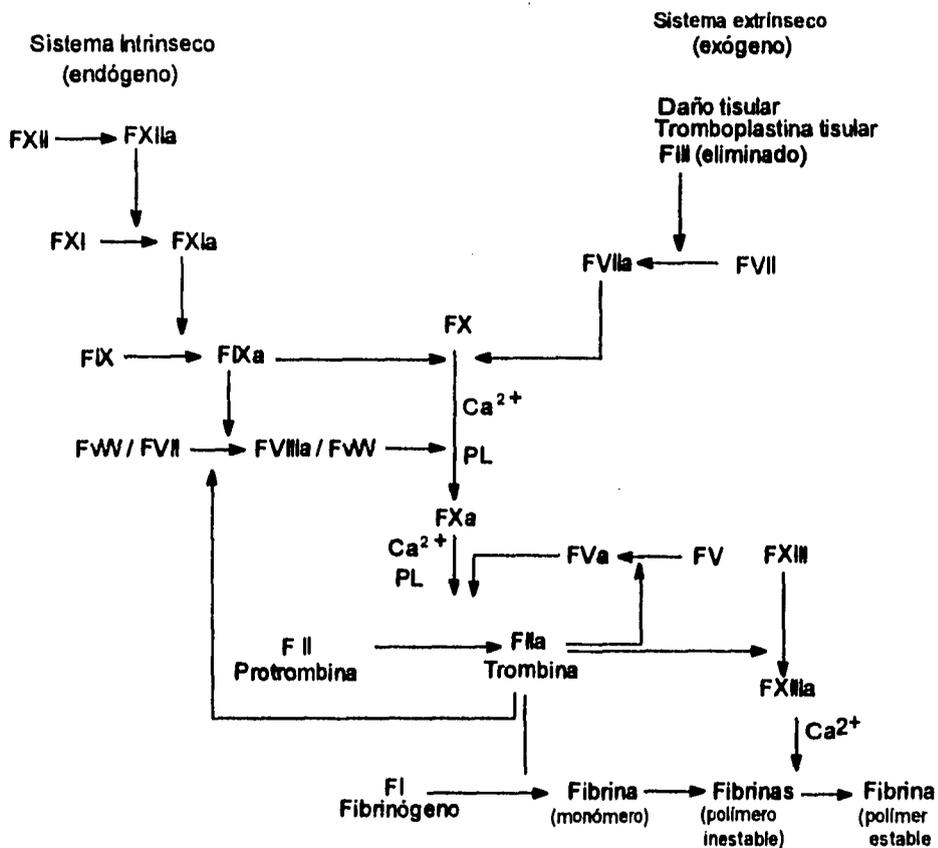
La magnitud del daño tisular es un factor que rige la intensidad de la hemostasia, pero en general se considera que segundos después de la lesión a un vaso, los reflejos nerviosos y el espasmo de los músculos lisos del sitio dañado hacen que se contraigan las paredes por la secreción de serotonina, adrenalina y lipoproteínas. La vasoconstricción dura unos 10 minutos en vasos finos y tarda hasta 30 minutos en vasos de mayor calibre, y disminuye el flujo de la corriente sanguínea.

Las plaquetas circulantes convergen en la lesión para tocar las fibras de colágeno y adherirse a ellas en el endotelio roto, estimulando la secreción de ADP, el cual activa a un número mayor de plaquetas en la lesión y el agregado evita mayor pérdida hemática al formarse un coágulo gelatinoso, esta fase está influida por agentes en la sangre y los tejidos que estimulan e inhiben la coagulación.

Alrededor de 60 seg. después de la lesión, comienza la coagulación gracias a los sistemas extrínseco e intrínseco; el sistema extrínseco es activado con la liberación de tromboplastina tisular y con ayuda del factor IV (iones de calcio) y fosfolípidos forman un complejo que activa al factor X (Stuart Prower). (esquema No. 1).

### ESQUEMA No. 1

Representación diagramática de la cascada de la coagulación..



a = factor de la coagulación activado  
 PL = fosfolípido

En el sistema intrínseco se activan los procoagulantes sanguíneos para producir tromboplastina plasmática que requiere que el factor III interactúe con el factor VII (proconvertina) en presencia de iones de calcio, luego es estimulado por el contacto con la superficie o lesión vascular y el factor XII (Hageman), activa al XI que en presencia de iones de calcio activa al factor IX (Christmas). La forma activada de la proteína plasmática en presencia de fosfolípidos plaquetarios transforma el factor VIII para que forme el complejo que active al factor X.

Casi simultáneamente las dos vías intrínseca y extrínseca convergen al activar al factor X reacciona con el factor V (proacelerina) en presencia de iones calcio y fosfolípidos plaquetarios forman el complejo convertidor de protombina, que en un lapso de 15 segundos comienza a desdoblar el factor III (protombina) para formar trombina, que es una enzima que transforma el fibrinógeno en fibrina, estabiliza el coágulo final y comienza la lisis después que ha sanado la lesión.

Es importante señalar que la deficiencia en algún factor de esta serie de reacciones o cascada dificulta la coagulación y se le denomina defecto. Esta deficiencia puede ser de origen congénito o adquirido.

Entre las deficiencias de factores más importantes se considera a las siguientes:

- ♦ **-Factor I (Fibrinógeno).**- ocasiona hemorragia intensa con amenaza a la vida en sus dos formas hipofibrinogenemia y afibrinogenemia (natural o adquirida).
- ♦ **-Factor II o Hipoprotrombinemia.**- hereditaria o adquirida, generalmente se reconoce por la deficiencia de vitamina K y suele acompañarse de niveles bajos de los factores VII, IX y X.

- ◆ **-Factor IX.-** ocasiona a veces hemofilia B (enfermedad de Christmas), este factor se forma en hígado y para su síntesis se requiere la presencia de vitamina K.
- ◆ **-Factor XI.-** no produce síntomas y es de carácter recesivo autosómico.
- ◆ **-Factor XII.-** similar al anterior, en ocasiones surge una forma adquirida por nefrosis, hipovitaminosis K, anticoagulante y enfermedad hepática.
- ◆ **-Factor VIII.-** puede heredarse como recesivo autosómico, suele causar síntomas de coagulación anormal, epistaxis, equimosis y gingivorragia; la forma adquirida se debe a hipovitaminosis K, administración de warfarina y en hepatopatía . Este defecto ocasiona dos trastornos congénitos: hemofilia A (forma clásica) y la enfermedad de **von Willebrand**.

La hemofilia A es un trastorno recesivo ligado al sexo, transmitido por mujeres que afecta a varones y se caracteriza por hemartrosis y hemorragia de músculos y vías gastrointestinales.

La enfermedad de **von Willebrandes** de menor intensidad que la hemofilia A, se caracteriza por función plaquetaria anormal, debido a la carencia de un componente plasmático llamado factor **von Willebrand** maduro y deficiencia del factor VIII, transmitida como rasgo dominante autosómico, los síntomas incluyen epistaxis, equimosis y hemorragia capilar posterior a extracción dental. La coagulación intravascular diseminada y la fibrinólisis a veces inducen la deficiencia adquirida del factor VIII.

El defecto de la coagulación referente a los trastornos plaquetarios se dividen según sea el tipo en: anormalidad en el número (trombocitopenia y trombocitosis) ó de función (trombastenia y trombocitopatía).

Para considerar otro defecto de la coagulación nos referimos a defectos vasculares que son debidos a la permeabilidad vascular anormal (deficiencia de vitamina C) o la fragilidad (púrpura).

Los pacientes con requerimientos transfusionales con enfermedad de **Von Willebrand** (y pacientes hemofílicos) presentan alto riesgo de desarrollar algunas de las complicaciones entre las que se incluyen: hepatitis postransfusional, paludismo transmitido por sangre transfundida; así como riesgo elevado de padecer artropatía hemofílica y desarrollar invalidez progresiva; o bien, presentar hemorragias viscerales, musculares profundas o en el sistema nervioso central.

## **CAPITULO II**

**GENERALIDADES:**

**HISTORIA Y DEFINICION**

## HISTORIA

La enfermedad de **von Willebrand** es un desorden hemorrágico hereditario que se detectó por primera vez en numerosos miembros (3 ramas) de una familia (23 de 66) nativas de las islas Aland, situadas a lo largo de las costas de Finlandia (75). Esto se caracterizaba con un tiempo de sangría prolongado. El desorden motivó que el investigador **Eric von Willebrand** efectuara los primeros estudios, reportándolos en 1926 y 1931.

En 1957, se informó que muchos miembros de esta familia tenían también una moderada deficiencia de factor VIII, asociado también con un prolongado tiempo de sangría, hecho observado en algunos pacientes de otros países durante los 5 años precedentes.

Con el avance de la tecnología se identificó la combinación de alteraciones en la molécula del factor VIII acompañado de la prolongación en el tiempo de sangrado, y en conjunto sirven ahora para diagnosticar la enfermedad.

En nuestro país, se ha detectado la enfermedad desde hace 18 años. En el estudio más reciente efectuado en el IMSS en 1983 (1, 7), resultó que de 60 pacientes el 78% fueron del sexo femenino y el 22% de sexo masculino, con edades que fluctuaban de 11 a 55 años. Estos pacientes procedían de 24 familias ubicadas en el Distrito Federal, Estado de México, Hidalgo y Sonora y todos con ancestros de origen europeo y generalmente de raza blanca (1).

Este desorden de la hemostasia ha sido denominado con varios nombres como: pseudohemofilia, hemofilia vascular, angiohemofilia, trombopatía constitucional, tiempo de adherencia prolongada idiopática y trombopatía de **von Willebrand-Jurgens**; y parece que el más acertado es el que se usa en la actualidad.

## DEFINICION

El factor VIII tiene dos actividades biológicas: coagulación y participación en la hemostasia primaria (procoagulante). Cada uno de estos componentes tienen distintas propiedades bioquímicas, inmunológicas y de orden genético.

La enfermedad de **von Willebrand** se debe a un trastorno en la molécula del complejo factor VIII/vW.

La deficiencia aislada del factor VIII con actividad procoagulante (FVIII:C), es lo que caracteriza a la hemofilia clásica, enfermedad que se transmite ligada al cromosoma X.

La disminución o alteración funcional del factor VIII referido a la coagulación (FVIII:R) se relaciona con la enfermedad de **von Willebrand** ya que es el complejo FVIII/vW del subendotelio que se adherirá a los receptores de las plaquetas en la formación del coágulo.

Se ha determinado que la enfermedad de **von Willebrand** tiene un patrón hereditario que depende de un gen autosómico dominante producido por alteraciones cuanti y cualitativas del factor **von Willebrand**. Este factor es una glicoproteína multimérica que se sintetiza en células endoteliales y en megacariocitos, su función es ser cofactor para la agregación plaquetaria al subendotelio, ya que acarrea el factor VIII procoagulante circulante de la sangre.

La subunidad vW madura contiene 2050 residuos de aminoácidos y más de 22 cadenas laterales de carbohidratos. El gen del factor vW consiste de aproximadamente 180 kilobases y contiene 52 exones, y se localiza en el extremo del brazo corto del cromosoma 12, además ahora se sabe que existe un pseudofactor vW en el cromosoma 22.

El factor **von Willebrand** juega un papel crítico en la regulación de la actividad del FVIII por diversos mecanismos:

- ⇒ El FvW estabiliza al factor VIII en su secreción de la célula.
- ⇒ El FvW protege al FVIII de la activación por factor Xa, de la inactivación por proteína C activa, pero no de la activación por trombina.
- ⇒ El FvW previene al FVIII del enlace a fosfolípidos y plaquetas activadas.
- ⇒ El FvW funciona como acarreador de FVIII a la vecindad de las plaquetas adheriéndose al endotelio dañado.

La enfermedad de **von Willebrand** se caracteriza por un patrón bien definido de los resultados de laboratorio, en las pruebas de hemostasia: tiempo de tromboplastina parcial activado (**TTPA**), Tiempo de Protombina (**TP**), Tiempo de Trombina (**TT**), Tiempo de sangrado, Tiempo de agregación plaquetaria, tiempo de lisis de euglobulina, recuento plaquetario y nivel de fibrinógeno.

En nuestro país, en la mayoría de los casos (ya que la intensidad de la enfermedad es variable), se determinó que los estudios de TP, TT, fibrinógeno,

lisis de euglobulinas y recuento plaquetario dan valores normales (dentro de las referencias). El TTP resultó prolongado.

El diagnóstico de la enfermedad se apoyó en la determinación del factor VIII antigénico disminuido, considerándose no tan relevante el tiempo de sangrado para el diagnóstico, ya que aumenta cuando hay ingestión del ácido acetil salicílico, de acuerdo al Dr. R. Ambriz (1).

Como esta enfermedad es de carácter hereditario, presenta diferentes intensidades, que se basan en el patrón de transmisión genética, las alteraciones de laboratorio encontradas en cada caso en particular o su forma de reacción al tratamiento, las variedades se clasifican de acuerdo al esquema No. 2:

**ESQUEMA No. 2**

**VARIANTES PRINCIPALES DEL SINDROME DE VON WILLEBRAND SEGUN WINTROBE**

	Niveles en plasma de:		Deficiente agregación con ristocetina	Respuesta desproporcionada a la transfusión	Retención anormal plaquetaria	
	VIIIC	VIII <sub>Ag</sub>				
gen dominante autosómico	bajo	bajo	+	+	+	variante clásica. Tipo I
gen recesivo autosómico (homocigoto)	muy bajo	muy bajo	+	-	+	variante recesiva. Plaquetas y células endoteliales clínicamente deficientes severas en VIII <sub>Ag</sub>
recesivo ligado al gen x	bajo	normal o alto	-	-	-	variante Tipo II, puede ser cualitativamente anormal
gen dominante autosómico con niveles normales en plasma FVIII:C y FVIII:Ag	normal	normal	+	+	+	variante Tipo B, cualitativamente anormal, predominancia de formas moleculares de peso ligero, no precipitadas por etanol, concovalina A o crioprecipitación; movilidad electroforética anodal y anormalmente rápida, contenido reducido de carbohidratos e inmunoensayo aberrante

+ = PRESENCIA.

- = AUSENCIA.

ESTA CLASIFICACIÓN ENFATIZA EL CRITERIO GENÉTICO.

El tiempo de coagulación es por definición prolongado en todas las variantes, de acuerdo a M. Wintrobe (76).

En el caso del gen autosómico recesivo, afecta a homocigotos, frecuentemente son el producto de matrimonios consanguíneos y tienen bajos niveles de factor VIII:C y deficiencias tisulares de VIII:Ag. Los heterocigotos son asintomáticos. Los dobles heterocigotos con la forma dominante del desorden también presentan severas alteraciones en la coagulación y más marcados los resultados de las pruebas de laboratorio a veces hasta llegar al grado de no distinguir las variantes dominante y recesiva. La variante ligada al gen X se ha documentado en los familiares. Esta forma del síndrome (variante tipo II) difiere en algunos aspectos del dominante autosómico y del recesivo autosómico.

Otros desórdenes hereditarios se han asociado a la enfermedad de **von Willebrand** en familiares como son: anemia falciforme (forma de hoz), telangiectasia hemorrágica hereditaria, hemofilia A, disfunción plaquetaria, trombocitopenia, deficiencia de factor XII (variante San Diego de la enfermedad de **von Willebrand**).

Behring propone la siguiente clasificación del Esquema No. 3

**ESQUEMA No. 3**

**TABLA DE CLASIFICACION ACTUAL. BEHRING**

	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II A</b>	<b>Tipo II B</b>	<b>Tipo II C</b>	<b>Tipo II D</b>	<b>Tipo III</b>	<b>Tipo Plaqueta</b>
<b>Transmisión genética</b>	dominante	dominante	dominante	recesivo	dominante	recesivo	dominante
<b>FVIII:C</b>	disminuido o normal	normal o ligeramente bajo	normal o ligeramente bajo	normal o ligeramente bajo	normal o ligeramente bajo	bajo 1-5UI/dl	normal o ligeramente bajo
<b>FvW:Ag</b>	bajo	cercano a normal	casi normal	normal	normal	<5 UI/dl	disminuido
<b>ELISA / IRMA</b>	bajo o disminuido	bajo	bajo	bajo	bajo	<0.1 UI/dl	bajo
<b>FvW:Rcof</b>	bajo o disminuido	bajo	bajo	bajo	bajo	ausente	bajo
<b>Multímeros del FvW en plasma</b>	todos en cantidad reducida	ausencia de multímeros intermedios y grandes	ausencia de multímeros mas grandes	ausencia de multímeros grandes, estructura anormal de tripletas	ausencia de multímeros grandes, bandas aberrantes	no hay proteína	ausencia de multímeros grandes

TOMADA DEL BEHRING HAEMATE P BOOKLET (77), Y ES LA MÁS RECIENTE CLASIFICACIÓN.

**Indice de siglas.**- Es conveniente introducir algunas definiciones y análisis de siglas:

**FVIII** Factor VIII es una proteína involucrada en el patrón intrínseco de la coagulación y que tiene tres propiedades medibles.

**FVIII:C.**- Actividad procoagulante, factor antihemofílico, es la actividad coagulante del plasma normal, capaz de corregir defectos de coagulación del plasma hemofílico y se determina con una prueba de tiempo de tromboplastina parcial midiendo la coagulación del plasma diluido en un plasma deficiente de factor VIII.

**FVIII:R.**- factor **von Willebrand** específico, es la proteína polimérica de gran tamaño que corrige los defectos de la función plaquetaria de la enfermedad de **von Willebrand**, es necesaria *in vivo* para que la adherencia plaquetaria y el tiempo de sangrado sean normales y se determina con dos pruebas.

**FVIII R:Ag.**- Actividad antigénica, es necesaria *in vivo* factor para que la adherencia plaquetaria y el tiempo de sangrado sean normales al unirse el factor vW y formar un complejo, se determina por inmunoelectroforesis cuantitativa de Laurell con la modificación de Zimmerman y con placas fotográficas, agarosa y antisuero de conejo dirigido contra **VIII:Ag**.

**FVIII R.RCo ó FVIIIr.**- es la propiedad del factor VIII de ser soporte de la agregación de plaquetas normales inducida por ristocitina. Dan falsos positivos a esta prueba los pacientes afectados por enfermedades

plaquetarias primarias como el síndrome de Bernard Soulier, y no es prueba sensible para una enfermedad de **von Willebrand** leve.

**FvW ó FVIII/FvW.** - Factor von Willebrand, causa la aglutinación de plaquetas al subendotelio de la región dañada. Se determina por el método de floculación macroscópica de Allain usando formaldehído para la fijación de plaquetas y pruebas específicas como se verá más adelante.

**TS.**-Tiempo de hemorragia o sangrado, sirve para evaluar la función hemostática global y detectar trastornos congénitos y adquiridos en la función plaquetaria; se determina por el método Ivy

**FC.**- Fragilidad capilar sirve para evaluar la fragilidad de las paredes capilares e identificar deficiencia plaquetaria, se determina por la técnica Rumpel-Lude.

**TTPa.**- Tiempo de tromboplastina parcial activada, sirve para identificar deficiencias de los factores de la coagulación en vías intrínsecas, se determina por el método Biggs y Douglas.

**TP.**- Tiempo de protombina, sirve para evaluar sistema extrínseco de la coagulación y para determinar la reacción a los anticoagulantes ingeribles; se determina por el método de Quick.

**TT.**- Tiempo de trombina, sirve para determinar deficiencia de fibrinógeno, facilita el diagnóstico de coagulación intravascular diseminada y enfermedad hepática, permite evaluar el tratamiento con heparina, estreptocinasa o urocinaasa.

**pdf.-** Productos de degradación de fibrina, que sirve para detectarlos en la circulación, para diferenciar la coagulación intravascular y determinar el grado de fibrinólisis durante la coagulación

**Recuento plaquetario.-** sirve para evaluar la producción de plaquetas, los efectos de la quimioterapia o radioterapia en ella; se determina por recuentos directos.

**Agregación plaquetaria.-** sirve para detectar trastornos hemorrágicos congénitos y adquiridos de las plaquetas.

**CP.- Consumo de protombina,** sirve para detectar deficiencias de plaquetas o factores de coagulación esenciales para la formación de tromboplastina (Factores VIII, IX, XI Y XIII), se emplean los métodos de Bigg y Sen.

**Medición de factores II, V, VII y X.-** sirve para identificar deficiencia de factor específico, estudiar defectos congénitos, vigilar la administración de anticoagulantes y estudiar el sistema de coagulación extrínseco.

**Fibrinógeno plasmático.-** sirve para facilitar el diagnóstico de trastornos hemorrágicos ya que sus niveles están alterados o disminuidos en etiologías características.

**Lisis de euglobulinas.-** Esta prueba se utiliza para evaluar la fibrinólisis aunque no es específica, pero si se refleja la actividad inicial de la hemostasis.

**Factor VIII.-** Es una proteína involucrada en el patrón intrínseco de la coagulación, es una molécula compleja compuesta de al menos dos

componentes dissociables, cada uno con diferentes propiedades bioquímicas y funcionales.

El FVIII es una macromolécula que puede concentrarse por crioprecipitación y filtración en gel, determinándose un peso molecular de 1'000,000 a 2'000,000, contiene una alta concentración de ácido siálico y otros carbohidratos. El factor VIII es inestable en plasma con citrato y es rápidamente inactivado por agentes fuertemente quelantes.

Silber y Finlay (59), en 1982 después de examinar la interacción del factor VW porcino con plaquetas humanas en presencia de ristocetina, asumen que el factor VW es un tetrámero con un peso molecular de  $9.5 \times 10^5$ , con 94000 sitios de unión por plaqueta y con un promedio de enlace constante de  $2.1 \times 10^{-8}$  y observaron en este experimento que el factor VW humano compete con la proteína porcina por estos sitios de enlace solo en presencia de ristocetina.

En el mismo año EP Kirby (44) en su estudio de la aglutinación de plaquetas humanas por factor VIII:R bovino, determinó que la óptima aglutinación ocurre a un pH de 6.5 a 7.5 y el punto isoeléctrico del factor VIII:R fue de 4.3, lo que indica que tiene una carga negativa neta a pH fisiológico.

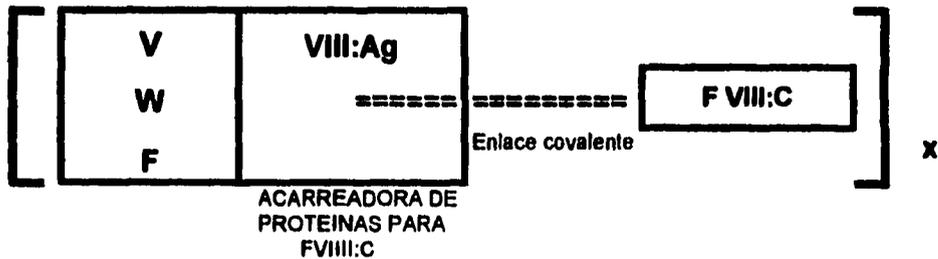
El factor VIII puede ser dissociado *in vitro* en dos subunidades: FVIII:Ag y FVIII:C, a partir de sangre heparinizada y completado por una filtración en gel con amortiguadores de alto contenido de iones Calcio, o aún por pasar este factor VIII a través de una columna conteniendo inmunoabsorbentes

preparados a partir de Ac heterólogos. Esta disociación es más fácil si primero se concentra por crioprecipitación.

Bajo circunstancias normales FVIII:Ag contiene las actividades correspondientes a FVIII:R y FVIII/FvW y el factor responsable para la retención plaquetaria en columnas de vidrio y con perlas como soporte.

Hay evidencias indirectas de que FVIII/vWF puede ser un componente separado que reside en la porción rica en carbohidratos de la molécula FVIII:Ag unida por enlace covalente.

La interpretación esquemática de la subunidad del factor VIII la dan BG Firkin y M.A. Howard (según Wintrobe, 76) y proponen que sea



FVIII:C - Factor de actividad coagulante.

VWF - Factor de **von Willebrand**

FVIII:Ag - Factor VIII referido al antígeno.

En la actualidad se manejan otros esquemas, este solo se refiere a la subunidad.

La proteína relacionada con el factor VIII:R, segundo componente molecular del FVIII, tiene gran tamaño, se encuentra compuesta de multímeros en una población heterogénea y tiene un peso molecular de 850,000. Las subunidades que la componen tienen un peso molecular de 195,000 a 240,000, su composición bioquímica corresponde a la de una glucoproteína, con 5 a 6% de carbohidratos como hexosa, hexosamina y ácido siálico. Esta proteína se identifica por medio de anticuerpos precipitantes de conejo (FVIII R:Ag).

Esta proteína FVIII:R es deficiente en los pacientes con la enfermedad de **von Willebrand**, también esta proteína es la causante de la agregación plaquetaria inducida por ristocitina en la prueba que identifica alguna función del factor **von Willebrand**

Jeanneau y Sultan (33) en 1982 informaron que el factor VIII/VWF:Ag (VIII:Ag) ha sido localizado en las células endoteliales humanas por un método con inmunoperoxidasa y microscopía electrónica.

Kadhom et al (34) en 1988 hicieron un estudio del antígeno del factor VIII procoagulante en tejidos humanos como hígado, pulmón, bazo, placenta y cordón umbilical por una técnica de inmunoperoxidasa usando un complejo avidina-biotina (ABC) y concluyeron que las células andoteliales del hígado son el mejor sitio de almacenamiento del FVIII y que el pulmón y la placenta pueden ser una fuente sustancial de FVIII.

El factor VIII:Ag se ha identificado en las plaquetas en la membrana externa y en la fracción granular.

Algunos autores consideran que el sitio de la síntesis para el factor VIII es el sistema retículo endotelial (sistema fagocito mononuclear). El riñón

participa en esta síntesis, debido a que produce una proteína de bajo peso molecular que exhibe actividad de FVIII:C *in vitro*.

La concentración plasmática de factor VIII es 1 a 8 µg/ml. Solo una pequeña cantidad de FVIII está presente en la linfa, el tiempo de vida media en una transfusión a paciente hemofílico es de 3 a 6 h, aunque hay un componente lento con un tiempo de vida media de 8 a 18h.

Y. Katagiri y Col.(35) en 1990 estudiando la localización del factor vW indica que la glicoproteína Ib de la membrana plaquetaria (GPIb) funciona como receptor para trombina y factor de von Willebrand en presencia de ristocetina. El dominio<sup>1</sup> de enlace del factor de von Willebrand existe en una pequeña región entre residuos Asp235 y Lys262; el dominio interactuante de trombina, en contraste, se localiza entre los residuos Phe216 y Ala274, con un posible centro de interacción en la secuencia de Phe216 a Thr240 en la cadena alfa de la glicoproteína Ib de la plaqueta.

---

<sup>21</sup>Dominio: "Dominio es una unidad compacta, globular de la estructura proteica" L. Stryer".

## **CAPITULO III**

### **ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA**

## ETIOLOGIA

En 1933 **von Willebrand** y **Jürgens** en uno de sus escritos originales llegaron a la conclusión de que existía un defecto de adhesividad o agregación plaquetaria en sus pacientes; el instrumento que emplearon para medir estas propiedades fue un trombómetro capilar que medía el tiempo de formación del trombo de sangre en tubos capilares. Los autores dijeron que este tiempo era normal en pacientes de hemofilia ligada al sexo.

En 1956 se informó que el tiempo de sangría en pacientes con la enfermedad de **von Willebrand** se acortaba transitoriamente después de recibir una transfusión de plasma pobre en plaquetas. Después se demostró que el factor responsable de este efecto se hallaba en la fracción rica de factor VIII en plasma normal; luego se determinó que el factor antihemorrágico era distinto al factor VIII, puesto que un efecto similar sobre el tiempo de sangría podía darse en fracciones de sangre obtenidas de pacientes normales y hemofílicos analizados de datos obtenidos de la prueba Duke e Ivy.

A partir de los años setentas se determinó que existía algún defecto en las propiedades adhesivas de las plaquetas, que es el responsable de la prolongación del tiempo de sangría y que hay un factor del plasma ausente en la enfermedad de **von Willebrand**, necesario para la adherencia plaquetaria normal. Esto se pudo determinar gracias a la filtración de sangre venosa a través de una columna empacada con perlas de vidrio resultando que la retención plaquetaria estaba disminuída en pacientes con la enfermedad de **von Willebrand**.

Otro defecto plaquetario considerado en este tiempo se refiere a la agregación con el antibiótico ristocetina, la cual debería causar la agregación plaquetaria cuando se adiciona plasma rico en plaquetas con citrato, la

agregación no se dá en enfermos **von Willebrand** y se ha observado que tampoco en pacientes con el síndrome de Bernard-Soulier. Sin embargo no todos los pacientes de **von Willebrand** dan la misma respuesta a la ristocetina.

Se ha visto que la concentración del factor VIII está disminuída en pacientes con la enfermedad clásica de **von Willebrand**; sin embargo, cuando se les hace una transfusión de plasma hemofílico aunque deficiente en FVIII, incrementa en forma progresiva la concentración de este último factor. También ha propuesto que el gen (locus) autosómico **von Willebrand** controla la producción de una proteína estructural que se combina con el producto del cromosoma X para formar una molécula complementaria de FVIII. También se dice que los pacientes de la enfermedad **von Willebrand** pueden ser incapaces de sintetizar factor VIII, mientras que los hemofílicos sintetizan una proteína similar pero funcionalmente inactiva.

Las consideraciones anteriores dieron lugar a pensar que los defectos plaquetarios y hemostáticos en pacientes **von Willebrand** pueden ser corregidos por transfusión de plasma o fracciones plasmáticas que contengan FVIII o aún fracciones de plasma de hemofílicos, se hicieron otras investigaciones como un experimento en el que se analizaba que el enlace del factor VIII:R bovino a las plaquetas causa aglutinación de las plaquetas y este modelo se empleó para ver la interacción plaquetaria en el subendotelio con daño vascular y se pudo determinar que la ristocitina promueve el enlace del factor VIII:R bovino a las plaquetas pero no promueve la aglutinación de plaquetas por el factor VIII:R bovino.

Para 1988 ya se consideraba que el factor vW es un factor hemostático importante sintetizado por células endoteliales y es una glicoproteína plasmática

grande que promueve la adhesión de plaquetas al pre-pro-polipéptido. Durante sus transporte al exterior de la célula la cadena sencilla de polipéptidos se ensamblan en multímeros. El propolipéptido puede ser anclado y también ser secretado. El propolipéptido libre se identifica como el antígeno vWII, una glicoproteína plasmática de función desconocida.

El factor vW consiste de una serie heterógena de multímeros, compuesta de aparentemente subunidades glicoprotéicas sencillas unidas por enlaces disulfuro. La potencia hemostática del factor vW fue mostrada como la que incrementa conforme incrementa el tamaño del multímero. El ensamble multimérico del factor vW es un aspecto crucial de su biosíntesis, además el factor vW puede ser secretado y almacenado bajo estimulación de las células endoteliales.

**Mecanismo de acción:** Las plaquetas de pacientes con la enfermedad de von Willebrand se adhieren al colágeno, liberan ADP y se agregan de forma normal, sin adherirse al labio endotelial de la herida.

**Naturaleza del defecto del Factor VIII.-** La evidencia sugiere que los pacientes con este desorden tienen una anomalía cualitativa o cuantitativa de una proteína FVIII/FvW cuya síntesis en células endoteliales está controlada por uno o más genes autosómicos. Esta proteína puede enlazar las plaquetas al subendotelio y así promover la acumulación plaquetaria a sitios con daño vascular, regulando también el nivel plasmático de otras proteínas con actividad FVIII:C que es un complejo no covalente en plasma.

Se investigó la interacción entre FVIII humano purificado y los fosfolípidos encontrándose que la zona de actividad de este factor es afín a algunos fosfolípidos.

**Biosíntesis.**-En el plasma, el factor VIII circula como un heterodímero consistente de una cadena pesada de 90 a 200 KDA en un ion metálico dependiente de la asociación con una cadena ligera de 80 KDA. Este complejo es enlazado por interacciones no covalentes al factor vW, una glicoproteína plasmática multimérica grande la cual media la adhesión de plaquetas al subendotelio dañado. La presencia del factor vW es requerida para estabilizar el factor VIII en plasma. El factor VIII está compuesto por tres dominios los cuales ocurren en el orden A1→A2 →B→A3→C1→C2. El dominio A ocurre dos veces en la cadena pesada y una en la cadena ligera y tienen homología con la ceruloplasmina, una proteína con enlaces de cobre en plasma.

Los dominios C ocurren dos veces en la cadena ligera y tienen homología al enlace fosfolípido de las proteínas.

El dominio B del factor VIII es único y contiene 18 de 25 sitios de glicosilación que por medio de asparagina se una al factor VIII y el cofactor protéico homólogo: factor V, los dominios B tienen fuertes divergencias pero los de los factores V y VIII no se requieren para la actividad procoagulante de esas moléculas *in vitro* o *in vivo*.

El factor VIII es translocado dentro del lumen del retículo endoplásmico durante el cual una señal péptida de 19 aminoácidos se ancla. La adición de altas unidades del oligosacárido manosa ocurre en el retículo endoplásmico, quien

después transita al complejo de Golgi donde la mayoría de los sitios de glicosilación unidos al amino terminal en la cadena pesada se modifican a estructuras híbridas. Hay adiciones de oxígeno unidos a azúcares en la cadena pesada y también hay sulfonación que ocurre en residuos de tirosina dentro de las regiones ácidas entre los dominios A1 y A2 en el amino terminal derivado del fragmento que se ancló, así pues ahí en el complejo de Golgi el factor VIII es clavado para generar las cadenas pesadas y ligeras donde en presencia del factor vW ensamblan ambas dentro del complejo estable ligado por un puente de ión metálico. En ausencia del factor vW, las cadenas pesadas y ligeras son secretadas disociadas o son rápidamente desligadas.

Los estudios dependientes del tiempo de adhesión plaquetaria y el enlace del FVIII-FvW al subendotelio arterial humano se llevaron a cabo *in vitro*, usando el marcador Cr<sup>51</sup> para plaquetas y el I<sup>125</sup> para FVIII-FvW; encontrándose que el enlace de FVIII-FvW precede el incremento en la adhesión plaquetaria y que el arreglo puede ser causado directamente por FVIII-FvW o indirectamente como resultado de un mejor acomodo de las plaquetas de contacto.

Para determinar la composición de aminoácidos del fragmento FvW Nosaki et al (53) diseñaron experimentos utilizando calpain II porcino (cistina proteinasa dependiente de calcio) para fijar el factor vW humano en una solución de SDS (dodecil sulfato sodio) en 2 fragmentos y electroforesis en gel de poliacrilamida, separándose los fragmentos principales por electroelución.

La composición de aminoácidos de esos fragmentos fue similar a aquellos de partes equivalentes del FvW humano, la secuencia amino terminal del fragmento de 165 KDa fue SLSCRPPMVH que coincide con la determinación de

Titani en 1986; y la secuencia del fragmento 145 KDA fue SHRVNCDRGL comenzando desde el aminoácido 1151.

Para la identificación de las secuencias repetitivas en los sitios de iniciación de la transcripción en el gene humano del factor vW se determinó clonando el que con DNA complementario y oligonucleótido complementario a áreas del factor vW en el RNA mensajero del extremo 5' terminal de la región que no cambia. La secuencia fue de 2158 pares de bases del sitio de iniciación de la transcripción, se reportó el primer exon y el primer entron-exon.

El primer exon incluye la secuencia entre 5' de 250 pares de bases y el codón de iniciación de la translación comienza en el segundo exon y esto sugiere un mecanismo de control para la célula de expresión específica de factor vW. Se encontraron 32 pares de bases para el sitio de iniciación de la transcripción a los nucleótidos 1030 y 1806 siendo repetitivas las secuencias ALU de aproximadamente 300 pares de bases. Los eventos recombinantes de estas secuencias podrían resultar en algunas formas clínicas de la enfermedad vW que involucran defecto en la transcripción.

A continuación se presenta la secuencia completa de nucleótidos del factor vW del DNA complementario y la secuencia de aminoácidos pronosticada para el pre profactor vW:

## **SECUENCIAS DE AMINOACIDOS**









Sadler et al, Bonthron et al, y Verwei, et al (72) dilucidaron la secuencia de nucleótidos y la de aminoácidos (las cuales están representadas por el código de una letra), están numeradas separadamente. Las flechas indican los sitios de anclaje para la señal de peptidasa (186) y proteínasa (2410) respectivamente. El propolipéptido se extiende desde el residuo aminoácido 23 (alanina A) al 763 (arginina R) y el factor vW maduro a partir de 764 (serina S) a la 2813 (lisina K).

Las secuencias subrayadas (N-X-S/T)<sup>1</sup> representan sitios potenciales de glicosilación unidos al extremo amino de la asparagina. Las secuencias arginina-glisina-asparagina R-G-D presentes en el propolipéptido y el factor vW, están en un rectángulo.

Se determinó en 1986 que el RNAm del factor vW es considerablemente más largo que el requerido para enclavar la proteína precursora y esto ha dado pie a un nuevo concepto de la biosíntesis del factor vW.

Es evidente que este RNAm codifica para dos distintas proteínas: la glicoproteína del factor vW maduro y el Ag II de vW.

El esquema más simple para la biosíntesis del factor vW maduro incluye solo dos etapas del proceso proteolítico:

Primero una señal peptidasa remueve el amino terminal del péptido de 22 residuos aminoácidos durante el transporte de la cadena de polipéptido en crecimiento a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso y se da la parte esencial de la glicosilación.

---

<sup>1</sup> La fórmula general se refiere a NGT-420, NKT-590, NIS-753, NLT-2120, NCT-2770, NLT-3813, NRS-4670, NRT-4840, NVS-6790, NCT-6990, NFT-7190, NST-7320, NVS-7760, NGT-7860, NNT-8030 Y NGS-8490.

Estas moléculas de profactor vW consistentes de 2791 residuos de amino ácido, formarán dímeros por enlaces disulfuro en intercadena a sus respectivas terminales carboxilo. Tales dímeros son transportados al aparato de Golgi, donde ocurre la sulfatación de las moléculas y los residuos glicosilados se convierten en complejos.

De estos procesos resultan subunidades de profactor de peso molecular de 360.000; la discrepancia entre este valor con el de 275 reportado por Wagner y Marder (73), se debe probablemente a la estimación del peso molecular relativo de glicoproteína en geles de poliacrilamida-SDS.

Del aparato de Golgi a la última secreción de la superficie celular, el factor vW puede seguir dos patrones: puede ser almacenado y liberado bajo estimulación con agentes como trombina (patrón regulatorio) o puede liberarse continuamente (patrón constitutivo), en este último los dímeros del profactor vW paralelamente multimerizados (en aparato de Golgi), se transportan a la superficie celular.

El segundo evento proteolítico divide la molécula del profactor vW en dos proteínas: el propeptido (Ag II vW) y el factor vW maduro. Así es común que la multimerización ocurra en el aparato de Golgi en su parte transversal y los multímeros grandes puedan ser almacenados en los cuerpos de Weibel-Palade, estos organelos de almacenamiento contienen una subclase de multímeros activos del factor vW grandes y pesados consistentes solamente de subunidades maduras.

Los indicadores sugieren que el evento proteolítico para las moléculas del profactor vW, destinadas al patrón regulatorio, ocurren dentro de los cuerpos

de Weibel-Palade, de acuerdo a los experimentos de Montgomery *et al.* Usando métodos inmunológicos demostraron la presencia del Ag II de vW.

La estructura repetitiva de la proteína precursora del factor vW, incluyendo una duplicación, dos triplicaciones y una cuádruplicación indican que el gene cromosomal está envuelto en eventos duplicativos de al menos 4 diferentes dominios (A, B, C, y D para el factor vW). Los dominios D3 en cada dímero están involucrados en enlaces disulfuro interdímero para formar multímeros. Se han presentado argumentos que demuestran que los dominios D1 y D2 constituyentes del AgII vW son obligatorios en los procesos de multimerización. La función principal del dominio D repetido es para facilitar la formación de estructuras multiméricas muy largas, sirven para conectar las plaquetas con la pared del vaso dañado. Se demostró que dos diferentes péptidos (residuos amino ácidos 1360-1385 y 1733-1760, respectivamente) generados de la subunidad del factor vW maduro, exhiben actividad colágena enlazante siendo el primero localizado dentro del dominio A-1, mientras que el segundo se localiza en el homólogo A-3.

C. Verweij *et al* (71, 72), proponen que la multimerización de los dímeros profactor vW procede de la siguiente manera:

- El dímero asociado por no covalencia, las interacciones intermoleculares son mediadas por pares de dominios D1-D2, mientras que las interacciones similares pueden existir entre pares de dominios D-D3.
- Los enlaces disulfuro entre pares de dominios D3 estabilizan la conexión de los dímeros profactor vW.
- Finalmente, el proceso proteolítico, libera el dímero del propolipéptido.

Para que se entienda a que nivel del rfactor vW se encuentran las diferencias que dan lugar a las variantes en la enfermedad vW, mencionaremos la variante más estudiada (25), nos referimos a la "Normandía" el cual corresponde a una anomalía en cuanto al enlace con el factor VIII; para lo cual se debió digerir con tripsina y comparar luego los péptidos resultantes, luego se sometió a electroforesis que pueda mostrar una banda correspondiente al péptido que va del aminoácido 1 al 272, los exones se amplificaron en las secuencias 18-24 por el uso de polimerasa en una reacción en cadena. Resultó un punto de mutación C.

**Localización** .- C. Verweij (71, 72) para la localización diferencial del factor vW empleó una técnica indirecta de inmunofluorescencia en cultivo de células endoteliales previamente fijadas y tratadas con alcohol/acetona, paraformoldehído y 2% de triton x-100. Su localización celular fue en células endoteliales lo que es morfológicamente consistente con su contribución en la regulación de la tromboresistencia de las paredes de los vasos sanguíneos.

Para 1982 se determinó la localización de los dos factores por microscopía inmunoelectrónica usando fragmentos Fab acoplados a peroxidasa, encontrándose estos factores en las células endoteliales humanas.

La topografía del complejo FVIII/FvW fue evaluada por transferencia de energía fluorescente usando las subunidades del factor VIII modificadas con N-(1-pirenil) maleimida (NPM donador de fluorescencia) y fragmentos derivados del FvW modificados con 7 dietil amino-3-(4<sup>1</sup>-maleimidilfenil) -4-metil cumarina (CPM aceptor de fluorescencia). Se encontró la subunidad del interfactor VIII en la cadena pesada en el Cys 528 y en la ligera en Cys 1858. La modificación de la fluorescencia del homodímero del factor vW (residuo del 1 al 1365), indican múltiples sitios de ataque en Cys 126/135/1360 como determinantes para el análisis de secuencia en la proteína modificada. Los niveles del aceptor sugieren una estequiometría equimolar del factor VIII (en las cadenas ligeras) fragmentos del factor vW en los complejos reconstituídos. Estos resultados indican un arreglo espacial muy cerrado entre el dominio A3 de la cadena ligera del factor VIII, el dominio A2 de la cadena pesada del factor VIII y el amino terminal del factor vW en el complejo del factor VIII-factor vW.

También para la localización del antígeno procoagulante del factor VIII (VIII:Ag) y el antígeno del factor vW, se investigó en hígado humano, pulmón,

riñón, cordón umbilical y placenta por su técnica de inmunoperoxidasa usando un complejo de avidina biotina (ABC), resultando la tinción positiva en las células endoteliales de venas, arterias y sinusoides del hígado, tan bien como en células endoteliales de placenta, pulmón y riñón.

El antígeno del factor vW fue detectado en las células endoteliales vasculares de todos los órganos explorados. La tinción de la intensidad para ambos factores (VIII y vW) varía en los diferentes tejidos y muestran un patrón distintivo de distribución en el hígado. Del análisis de los resultados se ve que las células endoteliales del hígado son el mejor sitio para que el factor FVIII se almacene y desde ahí pueda pasar a la circulación. La intensidad de la brillantez del teñido de los dos factores en el pulmón y placenta, sugiere que estos dos epitelios deben ser una fuente sustancial del factor VIII.

Otro método desarrollado en 1990 para la localización del factor vW emplea a la glicoproteína IL (GP1b) de las plaquetas humanas en presencia de ristocetina dando como resultado que el péptido de mayor acción se localiza del Asp249 al Asp273, existiendo una pequeña región entre los residuos Asp235 y Lis262 para el dominio que enlaza al factor vW, en contraste con un posible centro de interacción entre los residuos Phe216 a Tho240 del segmento Phe216 a Ala276 del GP1b en la cadena alfa donde enlaces de trombina requieren una conformación estricta en este dominio.

En la representación esquemática de la estructura repetitiva de profactor vW. La línea superior del siguiente diagrama (esquema 4) representa la proteína precursora del factor vW. Area sombreada representa al propolipéptido y el área oscurecida es el factor vW maduro; y se indican los dominios triplicados

"A" (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>) y "B" (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>) y el dominio duplicado "C" (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>); el dominio cuadruplicado "D" (D<sub>1</sub> a D<sub>4</sub>) y el dominio D' parcialmente duplicado.

Estas repeticiones corresponden con los siguientes residuos de aminoácidos.

A <sub>1</sub> (1242-1480),	A <sub>2</sub> (1480-1673),	A <sub>3</sub> (1673-1875)	
B <sub>1</sub> (2296-2331),	B <sub>2</sub> (2340-2366),	B <sub>3</sub> (2375-2400)	
C <sub>1</sub> (2400-2518),	C <sub>2</sub> (2544-2663)		
D <sub>1</sub> (34 - 387).	D <sub>2</sub> (387-746),	D <sub>3</sub> (866-1242),	D <sub>4</sub> (1947-2299)
D' (769 866)			

En el esquema No. 4 las posiciones de los tripéptidos R-G-D se muestran como un triángulo.

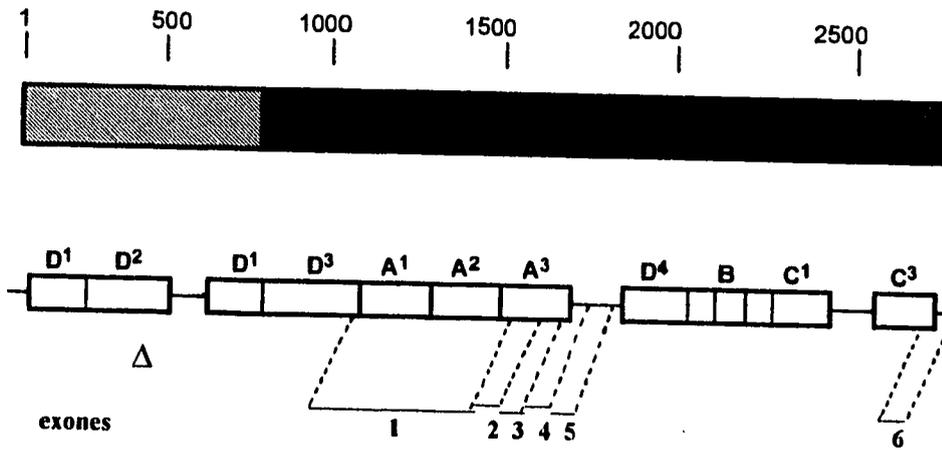
La secuencia RGD arginina-glisina-asparagina, está presente en el propolipéptido en la parte C terminal del dominio C<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> y en el FvW maduro.

Media la actividad celular de la fibronectina y del FvW al quererse unir ambos al receptor de la glicoproteína IIb/IIIa de las plaquetas RGD inhibe las interacciones de ambos con las plaquetas.

Además se esquematiza la posición de los 6 exones que corresponden a los residuos de aminoácidos como sigue: exon 1 (1226-1685), exon 2 (1685-1724), exon 3 (1724-1771), exon 4 (1771-1818), exon 5 (1818-1875) y exon 6 (2630-2662).

### ESQUEMA 4

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ESTRUCTURA REPETITIVA DEL PRO FWW



Δ = RGD

## FISIOPATOLOGIA

Considerando que el defecto básico de la enfermedad de vW es una anomalía o deficiencia del factor VIII/FvW, y que estos factores de la coagulación se requieren para la función plaquetaria normal, y las anomalías en las etapas iniciales de la hemostasia primaria resultan cuando se encuentran en concentraciones bajas, constituyen la diátesis de la coagulación.

Durante muchos años se consideró que las anomalías de la hemostasia primaria en enfermos vW era el resultado de defectos vasculares primarios o de una anomalía intrínseca en plaquetas, y que se podía demostrar por métodos que midan la adhesión plaquetaria a la superficie subendotelial.

Los inmunoensayos han revelado niveles de actividad subnormales del factor VIII:Ag en la mayoría de los pacientes con enfermedad de vW. Otros estudios revelaron anomalías cualitativas de la molécula del factor VIII, particularmente común en la variante de la enfermedad de tipo B, en la cual la reactividad antigénica deficiente y discrepancia entre los resultados de varios inmunoensayos son característicos. En homocigotos con la forma recesiva del desorden, el FVIII:Ag no puede demostrarse en células endoteliales o plaquetas aún después de la transfusión.

De las anomalías bioquímicas podemos anotar que en la variante B de la enfermedad de vW el factor VIII presente es anormalmente pequeño, presentando una anormal movilidad electroforética anódica rápida y un contenido de carbohidratos subnormal, no precipita con concanavalina A, solventes o cropprecipitación; se ha sugerido que tal factor (pequeño) es el resultado de síntesis deficiente y una desbalanceada producción de moléculas pequeñas que no sirven de soporte a la adhesión plaquetaria.

El subtipo II B está caracterizado por la ausencia de multímeros de alto peso molecular del factor vW en plasma pero hay todos los multímeros en plaquetas. Hay dos posibilidades para explicar por qué las formas intermedias y pesadas del factor vW están ausentes del plasma, la pérdida podría ocurrir durante el proceso de liberación del factor vW de las células endoteliales y plaquetas o iniciar solo cuando los factores vW de nueva síntesis hacen contacto con los componentes sanguíneos. El grupo normal de multímeros que está presente en el medio apropiado de cultivo de células endoteliales sugiere que los multímeros más pesados desaparecen después del contacto con la sangre.

Consecuentemente el subtipo II B de la enfermedad vW es obviamente causado por la síntesis de un factor vW anormal con afinidad incrementada por las plaquetas, debiéndose la ausencia a un enlace directo a las plaquetas.

Tanto en el tipo II A como el tipo II B se caracterizan por la ausencia de multímeros pesados en plasma pero en ambos no se debe a cambios en el proceso de multimerización de la molécula (51).

Otra explicación para el defecto en el tipo II B puede ser una mutación que causa un cambio en la molécula del factor vW comparable con el cambio inducido por la interacción con ristocetina, la mutación debe causar un cambio relativamente pequeño en la estructura primaria, porque los pesos moleculares aparentes del factor vW inmunoprecipitado de células normales son los mismos.

**ESQUEMA No. 5**

**CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD vW**  
Según Cornelis L. Verweij

	<b>Tipo II</b>	<b>Tipo II</b>	<b>Tipo II B</b>	<b>Tipo III</b>
Transmisión genética	Autosómico dominante	Autosómico dominante	Autosómico dominante	Autosómico recesivo
Tiempo de sangrado	prolongado	prolongado	prolongado	prolongado
Factor VIII de actividad procoagulante (VIII:C)	disminuída	disminuída o normal	disminuída o normal	disminuída
Antígeno factor vW (vWFAG)	disminuído	disminuído o normal	disminuído o normal	disminuído o ausente
Promueve la aglutinación de plaquetas lavadas en presencia de ristocetina (vWFRCo)	disminuída	marcadamente disminuída	disminuída o normal	ausente
Agregación plaquetaria inducida por ristocetina en plasma rico en plaquetas, (RIPA)	disminuída o normal	ausente o disminuída	aumentada	ausente
Estructura multimérica.	normal en plasma y plaquetas	ausencia de multímeros grandes y medianos de plasma y plaquetas	ausencia de solo los multímeros más grandes del plasma normal en plaquetas	variable

## **CAPITULO IV**

### **INCIDENCIA**

No se ha informado de predilección o inmunidad racial o étnica, pero el tipo dominante puede ser una de las alteraciones hemorrágicas congénitas más comunes, en muchos lugares ocupa el segundo lugar en incidencia después de la hemofilia tipo A (76). En Suecia para 1976 habían reportados 240 familias que manifiestan esta enfermedad representando 10 casos por cada 100,000 habitantes. (75)

Además se considera que las manifestaciones leves pueden permanecer sin diagnosticar, las incidencias de las formas severas se ha estimado en 1 por 1 millón de personas para 1978. (75).

Dentro de otros estudios de incidencia en pacientes con otra enfermedad paralela, de Japón reportaron en 1988 que los pacientes con enfermedad de von Willebrand resultaron seronegativos a Ac del virus del SIDA, no así los hemofílicos tipo A y B que resultaron seropositivos en un 23.4 y 45.5% en cada caso. (36)

La fundación para la hemofilia en Italia, reporta en el mismo año un estudio para evaluar la prevalencia y características del virus del SIDA y referirlas a pacientes hemofílicos, se encontró seropositividad en el 23% de estos enfermos, los de hemofilia B representaron el 44%, luego con el 29% de los hemofílicos, los de hemofilia A y los enfermos de vW con el 4%. (29).

Aún se estudia la prevalencia del virus entre los hemofílicos europeos.

La enfermedad de von Willebrand se ha descrito en asociación con otras anormalidades de la coagulación incluyendo disfunción plaquetaria, aunque esta puede ser una asociación relativamente común pero independiente de los desordenes heredados o adquiridos.

En un estudio realizado por el Dr. J.M Gerard, *et al* (27), en un grupo de 523 universitarios en Manitoba, Winnipeg, se encontraron los siguientes datos:

### ESQUEMA NO. 6

#### NO. DE SUJETOS CON DESÓRDENES EN EL TIEMPO DE COAGULACION

vW	NORMAL	LEVES	SEVERAS	SUJETOS
Alta > 80%	108 (7.86)	89 (9.96)	46 (10.5)	243
Media 50- 80%	81 (8.46)	69 (9.3)	49 (11.3)	199
Baja <50%	26 (9.42)	33 (10.81)	22 (11.3)	81
Total de sujetos	215	191	117	523

De donde se resume que: los pacientes con un defecto leve de la coagulación y un factor vW mayor de 80% tuvieron en promedio un tiempo

prolongado de coagulación (9.96 min) que indica significativo problema de coagulación, ya que los valores de referencia son 5-8 min.

- Sólo 81 pacientes (15%) tuvieron un nivel de Ag vW menor de 50%.
- Los pacientes con un nivel <50% del Factor vW y sin anormalidad en la agregación plaquetaria, tuvieron un promedio de 9.42 min para la coagulación.

Por lo que en resumen, al menos en esta población los pacientes con defectos de la función plaquetaria tuvieron alteraciones en el tiempo de coagulación más significativa que el correspondiente a los enfermos vW.

Los resultados enfatizan la complejidad de los procesos hemostáticos y sugieren que hay otros parámetros importantes que no se consideran como son prostaciclina, 13-HODE (ácido 13-hidroxi-octadecadienoico, Aznar. 3) factores relajantes dependientes del endotelio y trombomodulina. Aún donde hay un defecto primario aislado, los cambios en los niveles de otros componentes pueden exacerbar la tendencia coagulatoria.

Además en el grupo de Manitoba (27) no se encontró correlación entre el sexo o el VIII:C y el tiempo de coagulación; sin embargo se determinó una correlación negativa con la edad, los pacientes más jóvenes tuvieron tiempos más largos.

## **CAPITULO V**

### **HISTORIA CLÍNICA**

Las manifestaciones de la coagulación deficiente en la enfermedad de von Willebrand son consistentes con el grado de deficiencia del Factor VIII.

La forma dominante es probablemente el tipo más común en la enfermedad, y estos pacientes son solo afectados en forma moderada y muestran reducciones variables en los componentes del complejo factor VIII. Los pacientes heterocigotos con la forma recesiva son generalmente asintomáticos, pero el nivel de FVIII R:Ag, puede a veces ser menor que el de FVIII:C. En los homocigotos consanguíneos los síntomas se manifiestan severos.

Esta alteración hemorrágica puede manifestarse en las primeras semanas de la vida, cuando puede haber hemorragia espontánea de nariz o encías y tienden a decrecer con la edad.

Las anomalías tanto del nivel de factor VIII como de tiempo de sangría pueden ser menos acentuadas durante el embarazo ya que en este período se eleva el nivel de factor VIII significativamente.

Algunos pacientes con resultados leves en las pruebas de laboratorio, pueden ser asintomáticos.

En muchos casos un traumatismo pequeño vá seguido de una hemorragia excesiva, la menorragia es común y sorpresivamente no ocurre un excesivo sangrado post-parto.

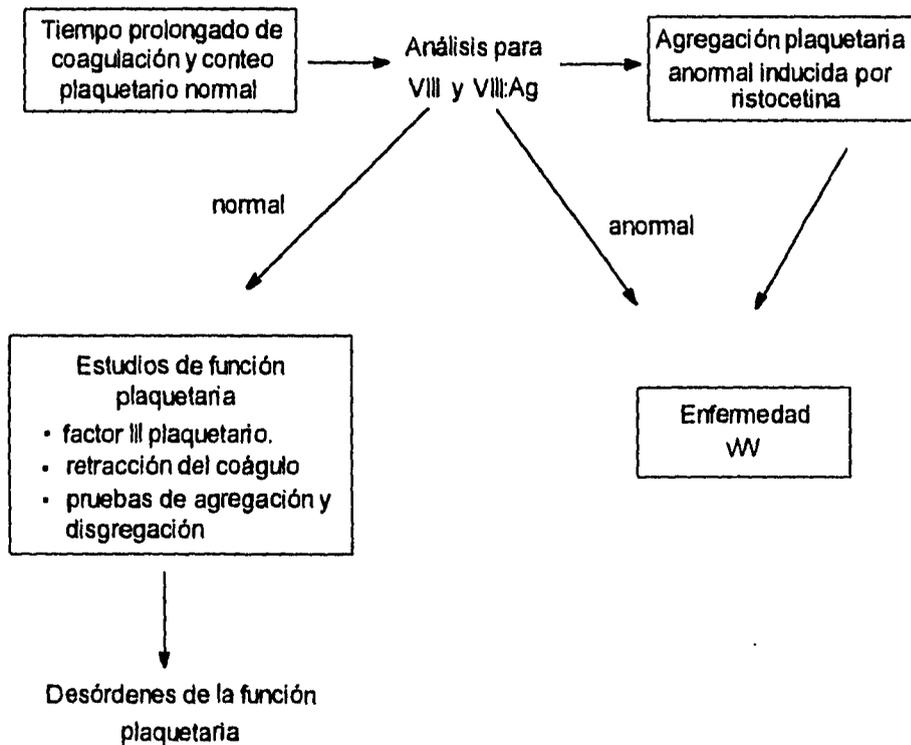
Entre los síntomas más frecuentes están la epistaxia y la fácil contusión.

Es posible la hemorragia de la mucosa digestiva, no obstante puede ser prevenida con el tratamiento adecuado. En esta enfermedad no son frecuentes las petequias ni las hemartrosis.

Para el diagnóstico en el laboratorio se puede considerar el esquema No. 7.

### ESQUEMA No. 7

#### Secuencia para el Diagnóstico



### ESQUEMA No. 8

TABLA COMPARATIVA DE LOS DESORDENES DE LA COAGULACION HEREDITARIOS SEGUN WINTROBE

DESORDEN	TIEMPO DE AGLUTINACION	PTT	TIEMPO DE PROTOMERINA	TIEMPO DE COAGULACION	CONSUMO DE PROTOMERINA	TIEMPO DE TROMBINA	TGT	PRUEBAS EXTRAS
Hemofilia A	normal	anormal	normal	anormal	anormal	normal	deficiente en plasma	VIII Ag normal o aumentado relación VIII C/VIII Ag baja
Hemofilia B	normal	anormal	normal	anormal	anormal	normal	deficiente en suero	
Enf. de von Willebrand	anormal	variable normal	normal	variable anormal	variable anormal	normal	deficiencia en plasma variable	VIII Ag y VIII C bajos relación VIII C/VIII Ag variable agregación plaquetaria inducida por ristocetina y retención plaquetaria disminuidas
Afibrinogenemia	usualmente anormal	anormal	anormal	anormal	normal	anormal	normal	hipofibrinogenemia niveles FDP incrementados
Disfibrinogenemia	normal	variable anormal	anormal	frecuentemente normal	normal	anormal	normal	hipofibrinogenemia niveles FDP incrementados
Hipoprotrombinemia	normal	anormal	anormal	variable anormal		normal	normal	anormal en pruebas de 2 etapas los resultados de las técnicas de una etapa pueden no ser fáciles de interpretar
Deficiencia factor V	usualmente normal	anormal	anormal	anormal	variable anormal	normal	ligeramente deficiente en plasma	
Deficiencia factor VII	normal	normal	anormal	normal	normal en pruebas de 2 etapas	normal	normal	
Deficiencia factor X	normal	anormal	anormal	anormal	anormal en pruebas de 2 etapas	normal	deficiente en suero	
Deficiencia factor XI	normal	anormal	normal	anormal	anormal	normal	ligeramente deficiente en plasma y suero	
Deficiencia factor XII	normal	anormal	normal	anormal	anormal	normal	ligeramente deficiente en plasma y suero	
Deficiencia factor XIII	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	pruebas de coagulación solubilidad anormales

**NOTA:** El conteo de plaquetas y retracción de coágulo son normales en todos los desordenes hereditarios de coagulación.

## **CAPITULO VI**

### **INHIBIDORES DEL FACTOR vW**

Se han descrito dos mecanismos inhibidores de este desorden (enfermedad de von Willebrand).

- Un inhibidor circulante dirigido contra F-VIII:vWF en el plasma, este inhibidor en una inmunoglobulina IgG previene la agregación inducida por ristocetina de plaquetas normales pero no se liga a plaquetas lavadas y por tanto no es un anticuerpo antiplaquetario.
- Un inhibidor de FVII:vWf no está presente en sangre, en su lugar hay bajos niveles de FVIII:vWF, factor VIII referida al antígeno (FVIII:Ag), y FVIII:C, posiblemente ambos enlazan el factor VIII a elementos celulares en la sangre o en el tejido.

Los pacientes que heredan la enfermedad de vW desarrollan anticuerpos contra FVIII:vWF como una reacción al plasma o productos plasmáticos transfundidos.

La persistencia de estos anticuerpos depende de la existencia de idiotipos. No se sabe bien como pero los inhibidores bloquean la función del FVIII, y son bases las que determinan el bloqueo. (75).

Estos inhibidores son IgG policlonaal y forma complejos precipitantes con FVIII:vWF. Hay una tendencia familiar a desarrollar esos inhibidores. Los inhibidores interfieren significativamente con el tratamiento de la enfermedad de vW y pueden ser reducidos parcialmente con terapia de glucocorticoides, o por infusión continua para inducir tolerancia al FVIII, la que se debe iniciar cuando los títulos del inhibidor sean <10UB (Unidades Bethesda).

Se ha observado también en estudios de microscopía electrónica que disminuye al 50% la actividad específica del factor vW y de la actividad procoagulante del factor VIII por la reducción de 4 a 12 enlaces disulfuro cuando se someten a una concentración de 0.4 mM de DTT a 1mM de DTT, respectivamente (ditiotreitól).

Se ha determinado también que el  $\gamma$ IFN (gamma interferón) y el TNF (factor necrosante tumoral), actúan independientemente y en forma cooperadora para deprimir la secreción del factor vW de las células endoteliales, ya que interfieren en el almacenamiento del factor vW, y se toma en cuenta este dato ya que debe considerarse durante episodios inmunológicos o inflamatorios.

Puede haber inhibiciones del receptor para el factor VIII/factor vW de las plaquetas humanas por trombina en concentraciones que son generadas fisiológicamente (0.008-0.05 U/ml), este estudio se realizó utilizando yodo marcado I<sup>125</sup> y el enlace que se forma entre trombina y FVIII/FvW no se aprecia si las plaquetas son lavadas con amortiguadores de EDTA y EGTA que inhiben a la trombina. (23). EGTA al 2% para fijar células.

Se ha determinado también que las proteasas extracelulares producidas por *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *S. marcescens* digieren la membrana de plaquetas lavadas y fijadas que generalmente son estables a la agregación del factor vW humano y perdiéndose la agregabilidad de las plaquetas, lo que nos puede ayudar en el estudio de membranas e interacciones entre el factor vW y las plaquetas.

La mitomicina C no inhibe o afecta al factor vW de células endoteliales sino que inhibe a la biosíntesis de prostaciclina y esta toxicidad el hombre la expresa como un síndrome urémico hemolítico y crónico. (19)

Contrario a los inhibidores, hay sustancias como la desmopresina que induce la adhesión de eritrocitos humanos a la superficie del endotelio comprobado por estudios de microscopía electrónica; esta adhesión se elimina con anticuerpos vs el factor vW.

Algunas drogas también inducen anomalías en la coagulación como son: cefalotina (altera la polimerización de la fibrina) y, otros antibióticos de la cefalosporina; tetraciclina a dosis intravenosas alta; aspáraginasa que produce hipofibrinogenemia y deficiencia de otros factores de la coagulación; mitramicina, que produce diátesis hemorrágica y activación de la fibrinólisis; adriamicina y daunomicina que activan la enzima fibrinolítica; cumarina que afecta a la Vitamina K.

El enlace del factor VIII/factor vW a la membrana plaquetaria en presencia de ristocetina fue disminuida en el sitio de enlace por el uso del anticuerpo monoclonal AN5 1 que es un anticuerpo contra la glicoproteína I de la membrana plaquetaria. (57).

## **CAPITULO VII**

### **TERAPIA**

Antes de la determinación de que el factor vW circula unido a la glicoproteína factor vW y que juntos actúan en el mecanismo de coagulación de la sangre, se consideraba que en pacientes con algún desorden de la hemostasia, que necesitaran someterse a cirugía, se debía empezar un tratamiento 24 a 48 horas antes a fin de obtener el máximo de síntesis de FVIII y se consideraba que el factor que acorta el tiempo de sangría y estimula la síntesis del factor VIII estaba presente en el crioprecipitado.

Después ya se consideró que la estimulación del factor VIII endógeno permitía elevar y conservar los niveles adecuados en enfermos de hemofilia clásica. El plasma fresco y el fresco congelado habían sido eficaces para restablecer los valores normales de factor VIII, por lo que se recomendó entonces la administración de plasma fresco, fresco congelado y crioprecipitado, repitiéndose las transfusiones en días alternos hasta la curación completa.

La terapia estaba dirigida hacia el incremento del nivel de FVIII:C y acortamiento del tiempo de coagulación.

En pacientes con enfermedad vW clásica se recomendaba el uso de ácido εaminocaproico en cirugías menores, en pacientes con daño gastrointestinal donde el sitio primario es demostrable, semanalmente o 2 veces a la semana la administración de crioprecipitado. (Ponencia Magistral, 78).

La administración intravenosa de vasopresina diamino-8-Darginina se ha empleado para prevenir complicaciones hemorrágicas en pacientes de cirugía con enfermedad de von Willebrand.

Se ha utilizado anticuerpos monoclonales contra el factor VIII humano que neutraliza el factor antihemofílico y activa al cofactor ristocetina, según estudios

de inmuno radio ensayo en fase sólida adicionando un anticuerpo monoclonal dirigido contra un contaminante del factor VIII que es un anticuerpo antifibrinógeno.

Se considera que la administración de plasma a algunos concentrados de factor VIII o crioprecipitado, a pacientes con la enfermedad vW resulta en un incremento de FVIII:C y puede disminuir el tiempo de coagulación prolongado, el cual es reducido a las 4 h. de la administración del plasma normal y en 24 h. después de la transfusión de plasma hemofílico a pacientes con la enfermedad vW. La disminución del tiempo de coagulación seguida a la administración de crioconcentrado u otras fracciones es de menor duración con respecto a la elevación de niveles del FVIII:C.

Cuando los productos sanguíneos conteniendo factor VIII son transfundidos a pacientes con hemofilia A, los niveles de FVIIIc se elevan inmediatamente, esta actividad declina en 8 a 10 horas de vida media. Veinticuatro horas después la actividad es mínima, sin embargo el FVIIIa persiste más tiempo en la circulación. En la mayoría de pacientes con la enfermedad vW la transfusión de factor VIII normal produce una elevación de niveles, la actividad plaquetaria se eleva alrededor de las 24 h. y persiste hasta por 72 h., este fenómeno es altamente variable e irregular; en algunos pacientes una rápida caída en el nivel inicial es seguida de una elevación de la actividad, a esta respuesta se le llama síntesis de novo del factor VIII y aparentemente es un rasgo distintivo de la enfermedad de vW.

Acerca de las respuestas a transfusiones tenemos que considerar:

- Los niveles post transfusionales del factor VIII no pueden atribuirse al factor VIIIc presente en el transfundido, ya que se obtienen resultados similares usando plasma normal o con plasma hemofílico A que es deficiente en ese factor.
- La complementación no es recíproca, la transfusión de plasma de pacientes con vW no producen una respuesta desproporcionada en pacientes con hemofilia A.
- La desproporcionada elevación en VIIIc aparentemente no están referidos a niveles de VIIIAg.
- La relación VIIIc/VIIIAg en plasma es anormalmente alta después de la transfusión.
- El factor VIII presente en el plasma de algunos pacientes transfundidos parecen diferir inmunológicamente.
- En la variante del tipo B la movilidad electroforética del FVIIIg aparentemente está alterada dentro de la circulación del paciente receptor.
- En homocigotos con la forma recesiva de la enfermedad y de aquellos con la variante II, la respuesta desproporcionada es mínima.

Respecto al tiempo de coagulación, la transfusión de productos sanguíneos conteniendo el FVIIIg, acortan el tiempo de coagulación en enfermos vW, este efecto correctivo persiste por algunas horas aún en transfusiones masivas.

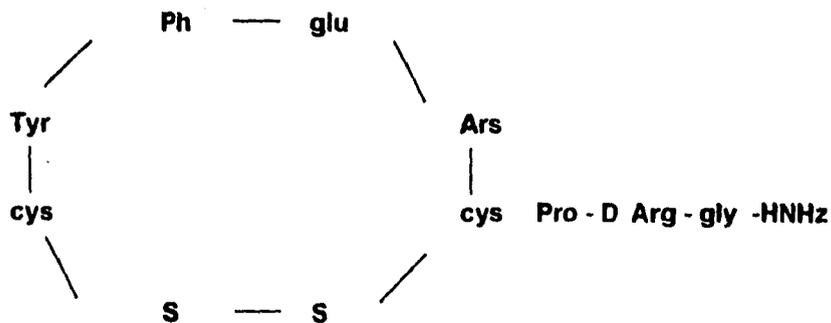
En la actualidad (según datos obtenidos en el reciente XXI Congreso Internacional de Hemofilia, celebrado en México en 1994), se manejan concentrados como:

- Hemato P (Behring) - Se inactiva con calor, tiene FVIII y FvW y los virus se inactivan con detergentes, mantiene el tiempo de sangrado normal en cirugías.
- Profilate (CRTS de Lille) no contiene multímeros grandes.

Para profilaxis se puede emplear un concentrado puro del FVIII en dosis de 40-60 UI de FVIII:C/Kg corrigiendo durante 6-12 h.

La terapia de sustitución con derivados de sangre está indicada en la enfermedad de vW'tipo III, IIA, IIB, IIC y IID, raramente en tipo I.

- DDAVP (1 desamino-cis-8-D-Ar vasopresina) acetato de desmopresina, que se emplea en casi todas las cirugías.



**MOLÉCULA DE DDAVP**

Sus propiedades farmacodinámicas según Mannucci en 1977 (Ponencia, 78) son que eleva el factor VIII:C, eleva el nivel del factor vW y elevan la activación del plasminógeno tisular.

**Su mecanismo de acción es:**

- ⇒ actúa sobre el endotelio.
- ⇒ en cultivos de estas células no tiene efecto.
- ⇒ ocasiona que no haya vasoconstricción.
- ⇒ reduce la filtración renal (disminuye el volumen de orina)
- ⇒ se absorbe con facilidad desde mucosas nasales hasta la aplicación endovenosa.
- ⇒ llega a su máxima actividad en 25-30 min y lo mantiene por 120 min.
- ⇒ en algunos pacientes provoca taquifilaxis (agotamiento de reservas naturales con administraciones posteriores).

**Indicaciones para su uso:**

- ⇒ Casos de enfermedad vW Tipo I para cuadros de sangrado y extracciones dentales, en vías intravenosas y subcutánea (parenteral) y nasal (en gotas o en spray).

La presentación de uso nasal se puso a la venta en 1986 con una dosis de 300 µg por aspiración, se debe hacer una prueba nasal, la respuesta se vuelve constante administraciones sucesivas.

Aunque la desmopresina provoque retención de agua y bochornos, tiene a su favor la disminución del peligro de virus, agregación plaquetaria y trombocitopenia.

- ⇒ Casos de hemofilia moderada
- ⇒ En enfermos vW por su acción sobre la molécula.
- ⇒ En sangrado urémico.
- ⇒ En desórdenes plaquetarios.
- ⇒ Reduce la pérdida de sangre en cirugía.

En ancianos no hay riesgo de complicaciones trombóticas, en embarazadas no se ha considerado su uso pues se ha visto que en el primer trimestre se vuelven sus valores normales debido a la gestación.

**Contraindicaciones:**

En la enfermedad de vW Tipo IIB porque hay una aglutinación continua y el conteo de plaquetas disminuye.

**Dosificación:**

0.3 - 0.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso	
vía intravenosa	0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$
intranasal	300 $\mu\text{g}/\text{dosis}$
subcutáneo	15 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Su efecto es elevar el FVIII de 2 a 5 veces el valor residual, el nivel de FvW' se duplica, es un activador del plasminógeno en 3 veces su actividad.

Para cirugías orales en enfermos vW se usa dosis normal (0.3 o 0.4  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en dosis anterior y luego se administra ac tranexámico.

El tratamiento general recomendado es DDAVP y un antifibrinolítico sistémico y tópico.

En pacientes que desarrollan inhibidores contra el FVIII se sugiere el uso del factor VIIa recombinante monitoreado pues es un fibrinolítico intrínseco del patrón exógeno. Estos estudios de firinolíticos son en enfermedad vVII y IIA y se monitorea porque hay un riesgo trombótico con el FVII a recombinante.

**CAPITULO VIII**

**DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

Para llegar a hacer el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand se debe iniciar con la

## **INVESTIGACION DEL MECANISMO HEMOSTATICO**

1. Deficiencia de factores de coagulación (congénita o adquirida)
2. Presencia de inhibidores en la sangre a la actividad de los factores de la coagulación.
3. Fibrinólisis aumentada.
4. Trombocitopenia.
5. Disfunción plaquetaria
6. Combinación de los factores antes mencionados.

## PRUEBAS CUALITATIVAS

- 1.- Si se sospecha de un trastorno de coagulación:
  - (A) Si TP está prolongado: suero normal + plasma envejecido + plasma adsorto; realizar PT con veneno de víbora de Russell.
  - (B) Si TC, consumo de protombina, TTP con caolín y/o prueba de generación de tromboplastina son anormales, realizar TGT, prueba de inhibidores en TGT o TTP con caolín, usando mezclas de plasma normal y plasma de prueba.
  
- 2.- Si se sospecha de un defecto de plaquetas: resistencia capilar, TS, consumo de protombina y/o retracción del coágulo son anormales:
  - (A) si la cuenta de plaquetas es baja, examinar M.O.
  - (B) si la cuenta de plaquetas es normal realizar adhesión y agregación plaquetaria.
  
3. Si se sospecha de un síndrome de desfibrinación debido a:

Coágulo pequeño, baja cuenta de plaquetas, y PT prolongado. Realizar determinación de I; TT, FDP.

Si las pruebas anteriores no revelan la naturaleza del trastorno: considerar la posibilidad de una deficiencia de factor XIII.

## **PRUEBAS CUANTITATIVAS**

### **1.- DEFECTOS DE COAGULACION**

(A) Determinación de Factores II, V, VII y X.

(B) Determinación de Factores VIII, IX, XI, y XII.

### **2.- DEFECTOS PLAQUETARIOS**

Pruebas de función plaquetaria.

### **3.- SINDROME DE DESFIBRINACION**

Determinación de I, Lisis de Euglobulinas, Determinación de Plasminógeno y Factores V y VIII, dímeros D.

Las pruebas de laboratorio recomendadas para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand, son:

- ⇒ Tiempo de sangrado y de coagulación.
- ⇒ Tiempo de protrombina (TP).
- ⇒ Índice de consumo de protrombina.

- ⇒ **Tiempo de tromboplastina parcial (TTP).**
- ⇒ **Retracción del coágulo (agregación plaquetaria).**
- ⇒ **Recuento plaquetario.**
- ⇒ **Resistencia de la capilaridad Rumpel-lude o del lazo.**
- ⇒ **Tiempo de trombina (TT).**
- ⇒ **Tiempo de lisis de englobulina.**
- ⇒ **Nivel de Fibrinógeno.**
- ⇒ **Determinación de la actividad del cofactor de la ristocetina.**

Las siguientes son las pruebas sugeridas (78, 79, 80).

### **TIEMPO DE SANGRADO**

Es la medida combinada de la función capilar, número de plaquetas y la habilidad de las plaquetas para adherirse a la pared vascular y formar el coágulo, se mide cuidadosamente desde el momento que se hace una punción en la piel y el tiempo que tarda en coagular.

#### **Método Ivy**

La bolsa de aire del esfigmomanómetro se coloca alrededor del brazo del paciente y se infla a 40 mm Hg. La superficie epitelial se limpia con etanol al 70%. Se practican dos punciones de 1 mm. con lanceta (B-D microlance de 2.5 mm.), separadas 5-10 cm. Se absorbe con papel filtro a intervalos de 15 seg. Se registran los tiempos de coagulación en cada punción y el más largo se reporta.

Valores de referencia 2-7 min.

#### **Interpretación:**

Esta prueba ha sido usada por Borchgrevink para medir la adhesión plaquetaria, se compara el conteo plaquetario de la sangre venosa y la sangre emitida en la lesión. La diferencia en la adhesividad plaquetaria y resulta que esta prueba da mayor información que el tiempo de coagulación el cual si es prolongado se debe a que las plaquetas no se adhieren para formar el tapón hemostático.

## **TIEMPO DE COAGULACION (METODO LEE Y WHITE)**

### **Fundamento**

El tiempo requerido para la formación de un coágulo es la medida de la coagulación.

### **Material:**

- Crónómetro.
- 4 tubos de ensayo 10x75mm.
- Jeringa hipodérmica de 3 ml.
- Baño María a 37°C.
- Sangre venosa.

### **Técnica:**

Extraer 0.5 ml de sangre venosa, poner en marcha el cronómetro en cuanto la sangre penetra a la jeringa; se coloca la sangre en los tubos de ensayo que estarán en baño María. Después de 3 min de reposo, observar cada 30 segundos hasta la formación del coágulo mediante la inclinación de los tubos de ensayo y registrar este tiempo final en cuando menos 2 de los cuatro tubos. Los tubos de ensayo deben ser examinados al finalizar 1 hora para apreciar la retracción del coágulo y la lisis del tapón hemostático; se colocan 2 tubos en la centrífuga y el suero se pipetea y se coloca en otro tubo de ensayo al que se adiciona citrato de sodio y se emplea para la prueba de consumo de protombina; los demás tubos se

dejan en el baño María y se inspecciona para observar la lisis durante las siguientes 24 horas.

**Valores de referencia:**

5 a 8 min

**Interpretación:**

La prolongación del tiempo de coagulación se debe a deficiencia de los factores de coagulación o a la presencia de anticoagulantes circulantes (incluyendo heparina), o en trombocitopenias severas, hemofilia (deficiencia del factor VIII), la enfermedad de Christmas (deficiencia del factor IX), y raramente la deficiencia de factor XII.

## TIEMPO DE PROTROMBINA (METODO QUICK) (Ref. 80)

### Fundamento:

Existe en la sangre una sustancia producida por el hígado, que es la protombina que circula en forma inactiva, pero que activada por un complejo enzimático denominado protrombinasa en presencia de calcio ionizado, la convierte en una sustancia insoluble, que es la fibra (armazón del coágulo).

La teoría clásica de la coagulación determina el proceso mediante:



### Material:

Tubos de ensayo de 10 x 75 mm.

Pipetas de 1 ml graduadas en 0.1 ml.

Reactivos: Patrón de plasma normal.  
Cloruro de calcio 0.02 M.  
Oxalato de sodio anhidro 0.1 M.

Suspensión de tromboplastina

Cronómetro.

Centrífuga

Solución de protombina

Se suspende el extracto de cerebro seco de conejo-acetona (0.03 g) en 5 ml de una solución de NaCl 9 g/l y calentado a 37°C por 15 a 30 min con ocasional agitación.

**Técnica:**

Se corren la muestra y el patrón de la misma forma. Los. 2.25 ml de sangre venosa se vierten en tubo de centrifuga que contenga 0.25 ml de anticoagulante citrato de sodio al 3.8%, se mezcla y centrifuga a 3000 x 10 m.

En tubo de ensaye se pipeta 0.1 ml. de suspensión de tromboplastina, se agrega 0.1 ml del plasma oxalatado e incubar a 37°C por un min. Sin sacar del baño María se agrega 0.1 ml de cloruro de calcio previamente calentado a 37°C y poner en marcha el cronómetro, se agita el tubo durante 2 o 3 segundos y dejar reposar 10 segundos, se mantiene en observación hasta la formación del coágulo.

El tiempo de protombina resultante puede convertirse en por ciento de protombina activa, por medio de una tabla en la que ambos valores esten en la siguiente fórmula:

$$TP = \frac{TP \text{ de patrón}}{TP \text{ de plasma problema}} \times 100$$

**Valores de referencia:**

80 a 100% de actividad, 10 a 14 seg.

**Interpretación:**

El tiempo de protombina está aumentado cuando existe una deficiencia de protombina, Factor V, VII, X o una combinación y en Policitemia vera.

El tiempo de protombina es un indicador no específico del mecanismo de coagulación sanguínea extrínseco.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Como ya se indicó, la deficiencia en alguno de los factores eleva el tiempo, también cuando hay heparina en sangre e hipofibrinogenemia.

Las causas comunes de un tiempo prolongado son: terapia con drogas como cumarina e indanodione, enfermedad hemorrágica del recién nacido, enfermedad del hígado.

Las causas menos comunes son: terapia con heparina, pérdida de proteínas vía enfermedad renal, síndrome nefrótico, deficiencia congénita de uno o más factores II, V, VII o X, deficiencia de fibrinógeno y estados de mala absorción.

## INDICE DEL CONSUMO DE PROTROMBINA.

### **Fundamento:**

Durante la coagulación normal, la producción de trombina y la utilización de protombina, continúa después de que la sangre o plasma ha coagulado. Si el suero se prueba 1 h después de la coagulación, se encontrará que prácticamente toda la protombina ha sido consumida en la formación de la trombina (enzima proteolítica activa que induce la transformación del fibrinógeno en fibrina). Si hay una deficiencia de alguno de los factores requeridos para la coagulación *in vitro*, la protombina no se habrá consumido y estará presente a 1 hora del evento, aún si la sangre coaguló en tiempo normal.

El consumo de protombina es una prueba no específica de la eficiencia de la coagulación. En la práctica se puede utilizar para esta prueba, las muestras utilizadas en la determinación del tiempo de coagulación de la sangre completa.

### **Material:**

Plasma con citrato.

Suero- se separa de la sangre coagulada de 1 h. al que se le agregará el citrato (1/9 de 31.3 g/l de citrato) para inhibir la conversión de más protombina. Cloruro de calcio 0.025 M., Baño Ma., Pipetas serológicas 0.2 ml., tubos de plástico nuevos 13 x 100, fibrinógeno humano o bovino, emulsión de cerebro humano con acetona.

**Técnica:**

Suficiente cantidad de cloruro de calcio y fibrinógeno se colocan en baño Ma. a 37°C antes de empezar la prueba. En un tubo de ensaye de 75 x 12 se pone 0.1 ml. de plasma al que se agrega 0.1 ml de emulsión de cerebro y se pone a baño Ma. para que el plasma y la tromboplastina se calienten. Se agrega 0.1 ml del cloruro de calcio, se incuban en reposo por 1 h. Se añade 0.2 ml de anticoagulante a cada tubo para detener el proceso de consumo y se despega suavemente el coágulo adherido a la pared del tubo con un palillo de madera.

Centrifugar a 2500 rpm x 10 min y separar los sueros.

Para calcular la protombina consumida, se considera arbitrariamente el valor de protombina en plasma en estudio como 100% y se determina el porcentaje en el suero reposado 1 h.

Por ejemplo: si el suero tiene el 150% (o sea 100% arbitrario y el suero reposado al 50%, la protombina residual es 33.4% y la consumida 66.6%.

**Valores de referencia:**

10% o más, consumida en 1 h. La variabilidad de los duplicados no debe sobrepasar el 6%.

**Interpretación:**

Tiene valor en la diferenciación de trombocitopatías no trombocitopénicas. Se encuentra alterada en coagulopatías por deficiencias de los factores mencionados en el fundamento.

## **TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL (PTT).**

### **Fundamento:**

Como el extracto de cefalina no coagula el plasma hemofílico tan rápidamente como el normal, se le llamó tromboplastina parcial para diferenciarlo de la tromboplastina completa, la cual coagula ambos plasmas en el mismo tiempo.

Esta prueba es sensible a la deficiencia de todos los factores plasmáticos de la coagulación excepto al factor VII y al plaquetario. Se fundamenta esta prueba en la medición de tiempo de coagulación del plasma en presencia de una "tromboplastina parcial" (cefalina), la cual sustituye la acción del factor plaquetario. El tiempo de cefalina refleja la integridad global del sistema intrínseco de la coagulación, siendo especialmente sensible a los defectos de los factores que intervienen en la primera fase.

### **Material:**

- Centrífuga
- Cronómetro.
- Baño Ma. 37°C
- Tubos de ensaye de 10 x 75
- Tromboplastina parcial (cefalina)
- Solución de cloruro de calcio 0.02 M
- Solución de citrato de sodio al 3.8%
- Plasma con anticoagulante
- Pipeta graduada de 0.2 ml.

**Técnica:**

El plasma con anticoagulante se obtiene de mezclar 0.25 ml. de anticoagulante para protombina con 2.25 ml de sangre y se centrifuga a 3000 rpm por 10min, se decanta el plasma a otro tubo y se conserva (4-8°C). Se coloca a 0.1 m. de tromboplastina parcial reconstituída en un tubo de 10 x 75 y se le añade 0.1 ml de plasma, se mezcla e incuba a 37°C por 3 min con cronómetro en mano.

Añadir 0.1 ml. de solución de cloruro de calcio precalentado, mezclar e incubar por 30 seg. midiendo el tiempo, inclinar con suavidad el tubo de ensaye hasta aparición de un gel y detener el cronómetro.

**Valores de referencia:**

30 a 50 seg.

**Interpretación:**

El tiempo parcial de tromboplastina alargado se encuentra en las deficiencias de uno o más de los factores XII, XI, X, IX, VIII, V, protombina y fibrinógeno. Un tiempo prolongado puede deberse a la presencia de un anticoagulante circulante.

## **RETRACCIÓN DEL COAGULO. METODO ADDLER Y LUCIA**

### **Fundamento:**

La retracción del coágulo depende del fibrinógeno y esencialmente la calidad de las plaquetas sanguíneas, la prueba permite apreciar indirectamente no solo las variaciones cuantitativas de estos elementos sino algunos trastornos funcionales.

### **Material:**

Jeringas siliconadas de 5 ml  
Baño Ma. a 37°C.  
Tubos de centrifuga graduados.  
5 ml de sangre sin anticoagulante.

### **Técnica:**

Dejar coagular los 5 ml de sangre venosa en un tubo de centrifuga y taparlo con un tapón. Incubar en baño Ma. por una hora, se retira el tapón y el coágulo. El volumen del suero y el de las células que forman el coágulo se leen directamente en el tubo de centrifuga graduada. El resultado se expresa como porcentaje del volumen inicial de 5 ml de acuerdo a la fórmula

$$\text{Retracción del coágulo} = \frac{\text{Suero residual (sin coágulo)} \times 100}{\text{VT (volumen total de la sangre)}}$$

**Valores de referencia:**

48 a 64%

**Interpretación:**

La retracción del coágulo es función de la actividad normal de las plaquetas así como de la formación y retracción de la trombostenina (proteín-fibrilar contráctil producida por las plaquetas). Si estos factores son normales, la retracción varía en función inversa del hematocrito.

Si faltan plaquetas o fibrinógeno, la retracción se dificulta; las fibrinolisinás que disuelven la fibrina, también pueden alterar la retracción, lo que se observa en las disglobulinemias.

## RECuento PLAQUETARIO

### Fundamento:

El líquido de dilución empleado es el oxalato de amonio, que destruye a los eritrocitos facilitando la cuenta directa de plaquetas en una cámara Newbawer, se hace la observación al microscopio con el objetivo seco fuerte. Este método nos permite determinar tanto el número de plaquetas como sus características, si el campo microscópico donde se hace la observación presenta grupos de plaquetas, se puede afirmar que su número no está abajo de lo normal, ya que hay una cantidad suficiente de tal manera que se permite su agregación.

### Material:

Cámara de Newbawer.

Caja de Petri.

Discos de papel filtro.

Pipeta para glóbulos rojos

Anticoagulante

Diluyente:

Oxalato de amonio            1 g

H<sub>2</sub>O destilada                100 ml

0.5 ml de sangre venosa con anticoagulante.

### Técnica:

Se carga la pipeta de glóbulos rojos con la sangre con anticoagulante hasta la marca 0.5 y se llena con el diluyente hasta la marca 101. Se mezcla perfectamente durante 5 min.

Se carga la cámara de Neubauer y se deja sedimentar por 10 min en una caja de Petri que contenga un disco de papel filtro impregnado con agua en su fondo.

Hacer el conteo de plaquetas igual que cuando se hace la de glóbulos rojos (los mismos cuadros de la cuadrícula central de la cámara); como el factor de dilución es de 10, la suma de las plaquetas se multiplica por mil para obtener la cifra por milímetro cúbico. Contar con un microscopio de contraste de fases, facilita la observación.

**Valores de referencia:**

250-400X10<sup>3</sup>/nal

**Interpretación:**

Hay trombocitosis en: anemia posthemorrágica reciente, algunas infecciones agudas (escarlatina, fiebre reumática, mononucleosis infecciosa, etc.), después de la esplenectomía, artritis reumatoide y colitis ulcerosa.

Hay trombocitopenias en: destrucción plaquetaria periférica excesiva o prematura; administración de medicamentos como: quinina, sulfas, fenilbutazona, clorotiazida, meprobamato, ácido acetil salicílico; lupus eritematoso diseminado, síndrome linfoproliferativo, hiperesplenismo y esplenomegalia con destrucción plaquetaria; quemaduras, anemia perniciosa, depresión de médula ósea y aplasias medulares.

## **RESISTENCIA DE LA CAPILARIDAD**

### **PRUEBA DE RUMPEL LUDE O PRUEBA DEL LAZO**

#### **Fundamento:**

Esta prueba consiste en interrumpir la circulación de retorno en uno de los miembros superiores mediante una ligadura que permite la circulación arterial y se impide la venosa.

Cuando aparecen petequias hacia abajo de la ligadura, en un tiempo determinado (5 min), se dice que aumenta la fragilidad capilar.

#### **Material:**

Mango de esfigmomanómetro, lugol.

#### **Técnica:**

Se aplica lugol al antebrazo para una mejor observación.

Se prepara (el antebrazo) como para la toma de presión y el esfigmomanómetro se insufla a 80 mm de Hg o la ligadura se tensa a una presión similar; se mantiene así por 5 minutos, se quita la presión y se cuenta el número de petequias por abajo de la línea de presión.

**Valores de referencia:**

De 0 a 5 petequias a nivel del pliegue del codo. La positividad se puede expresar entre una y cuatro cruces.

**Interpretación:**

Se encuentra aumentada la fragilidad capilar en: trombocitopenias, tromboastenia de Glanzmann, trombocitopatías, púrpuras, diabetes mellitus, disproteinemias, hipertensión, sepsis, artritis reumatoide, hiperesplenismo y en anemias.

## **TIEMPO DE TROMBINA**

### **Fundamento:**

Este método mide el tiempo durante el cual el fibrinógeno presente en el plasma se transforma en fibrina por la adición de una cantidad estandarizada de trombina. Los resultados de la prueba son influenciados por:

- ⇒ Cantidad de fibrinógeno en el plasma.
- ⇒ Presencia de anticoagulantes tipo antitrombina (heparina y productos de degradación de fibrinógeno a fibrina).
- ⇒ Uremia, hepatopatías y fibrinógenos anormales corregidos por la adición de cloruro de calcio.

### **Material:**

Tubos de ensaye de 12 x 75 mm.  
Pipetas de 1 ml graduadas en 0.1 ml y de 0.2 ml. graduadas en 0.01 ml.  
Baño Ma. a 37°C.  
Cronómetro.  
Tubos de plástico de 12 ml.  
Plasma citratado 1:10.  
Trombina de origen bovino.  
Solución salina.

**Técnica:**

Tomar una muestra de la sangre y citrarla 1 a 10 (4.5 de sangre con 0.5 de citrato) y centrifugarla a 3,500 rpm por 10 min, separar el plasma y mantenerlo a 4°C en refrigeración hasta la prueba. Trabajar por duplicado. Colocar en tubos de ensaye 0.02 ml de c/u de los plasmas y poner en baño Ma.

Tomar de la solución patrón de trombina una alícuota y diluirla en la solución salina en tubos de ensaye de plástico, para obtener dilución. Agregar 0.1 ml de la solución de trombina a cada tubo y activar el cronómetro en cada uno; marcar el tiempo en que aparezca el coágulo de fibrina.

**Valores de referencia:**

13-17 seg.

**Interpretación:**

El tiempo de trombina se considera prolongado cuando resulte más de 2 seg. largo que el tiempo de control de ese día.

Se observa prolongado en: hipofibrinogenemia congénita, coagulación intravascular diseminada, fibrinólisis primaria, presencia de antitrombinas, especialmente heparina o similares, y en pacientes con uremia, hepatopatías y en algunas anomalías moleculares de fibrinógeno.

## **NIVEL DE FIBRINOGENO**

**(por precipitación con calor)**

### **Fundamento:**

Esta técnica determina cuantitativamente la cantidad de fibrinógeno del plasma en 20 min, y es una modificación del método Ruiz-Reyes hecha por el Doctor Javier Pizzuto.

### **Material:**

Tubos capilares de 7.5 cm. de longitud.  
Ocular de microscopio seco débil (10x).  
Reglilla de microescala  
Baño Ma. a  $58^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .  
Centrífuga.

### **Técnica:**

Se marca un tubo capilar a 4 cm y se llena con plasma hasta esa marca. Se cierra el capilar con calor (a la flama); el extremo distante se centrifuga para que el plasma se empaquete, se cierra a la flama este otro extremo, y se introduce al baño Ma. por 15 min, se centrifuga el capilar por 3 min para que el fibrinógeno precipitado se empaque en el fondo del tubo.

Se mide la altura del precipitado de fibrinógeno (HF) y la altura del plasma (HP) con la reglilla y con ayuda del objetivo seco débil (10x).

Se emplea la fórmula

$$\frac{HF}{HP} \times 100 = \text{Fibrinocrito}$$

**Valores de referencia:**

$$\text{Fibrinocrito} \times 92.4 (\text{constante}) = \text{Fibrinógeno mg\%}$$

**Interpretación:**

La constante de 92.4 puede variar para cada laboratorio según la escala usada en la reglilla y el número de muestras de control empleadas.

Valor disminuído puede deberse a:

- ⇒ Fibrinólisis anormal primaria o secundaria.
- ⇒ Defecto en la síntesis.
- ⇒ Defecto congénito.

Valor aumentado indica:

- ⇒ Procesos inflamatorios crónicos.
- ⇒ Embarazo, nefropatías y procesos tromboembólicos.

## TIEMPO DE LISIS DE EUGLOBULINA

### Fundamento:

En la técnica empleada por el Dr. Javier Pizzuto se basa en la mezcla del plasma enfermo con uno normal con el objeto de descartar la aparición de una lisis falsa positiva o anormalmente acortada por la deficiencia (y aún ausencia) de fibrinógeno, ya que la mezcla de plasmas deberá dar un resultado con valor de referencia normal puesto que se adiciona el fibrinógeno.

### Material:

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
- Pipetas de 5ml.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Pipetas de 0.2 ml.
- Abatelenguas o palillos de madera.
- Baño Ma. a 37°C.
- Agua destilada.
- Acido clorhídrico 0.1 N.
- Amortiguador de imidazol pH 7.3 (buffer).
- Trombina diluída.

### Técnica:

En un tubo de ensaye de 13 x 100 colocar (previamente incubados en el baño Ma) 4.2 ml. de agua destilada, 0.15 ml de HCl 0.1N y 0.3 ml de plasma (uno con el problema, otro de plasma testigo normal y otro con la mezcla); tapar el

tubo con parafilm, agitar por inversión suavemente y centrifugar a 3000 rpm por 5 min. Desechar sobrenadante y agregar 0.3 ml del amortiguador (imidazol).

El precipitado se resuspende con un aplicador de madera previamente mojado en el amortiguador de imidazol.

Se agrega al tubo 0.1 ml de trombina vigilando la formación de coágulo.

Agitar suavemente, taparlo con parafilm y dejarlo en baño Ma. Vigilar la formación del coágulo y luego su lisis (desaparición del coágulo) cada 10 min.

**Valores de referencia:**

El coágulo normal debe permanecer formado más de 90 min.

**Interpretación:**

Un resultado acortado indica fibrinólisis anormal por presencia de actividades del plasminógeno y/o de plasmina, lo que se confirma si la lisis de la mezcla del plasma enfermo con uno normal también resulta disminuido.

O puede indicar hipo o afibrinogenemia de cualquier origen o falsa positiva, rarificado por la normalidad de la lisis de la muestra del plasma enfermo con uno normal. También puede deberse a un error en la técnica por falla en la visualización de él.

En resultados de tiempo elevado se puede deber a la disminución anormal de la actividad fibrinolítica.

## **DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL COFACTOR DE LA RISTOCETINA (FvW) BEHRING**

### **Fundamento:**

Es un medio de diagnóstico *in vitro* para la determinación de la actividad del cofactor de la ristocetina del factor von Willebrand en el plasma humano por medio de la aglutinación de las plaquetas. Las plaquetas estabilizadas se aglutinan en presencia del factor vW y del antibiótico ristocetina A. Util en el monitoreo preoperatorio de pacientes con tendencias hemorrágicas.

Se puede hacer por dos métodos: aglutinación y agregómetro.

### **Material:**

Reactivo Behring von Willebrand en 5 ampolletas de 1 ml.

Placa de vidrio.

Solución de citrato de sodio.

Plasma Patrón para los factores de coagulación.

Ristocetina A.

### **Técnica para el método de aglutinación:**

Se mezcla una parte de solución de citrato de sodio 0.11 mol/l con 9 partes de sangre venosa evitando la formación de espuma. Centrifugar por 10 min a 3000 rpm, retirar el plasma sobrenadante y mantenerlo a 15-25°C.

Para el método de aglutinación: se diluye la muestra del plasma con solución isotónica de cloruro de sodio de acuerdo a la tabla:

			500µl	500µl	500µl	250µl	
Muestra o dilución			50µl	500µl	500µl	500µl	250µl
Solución isotónica de NaCl	250 µl	950µl	500µl	500µl	250µl	250µl	250µl
Grados de dilución	testigo	1:20	1:40	1:80	1:120	1:160	1:160
Título	-	20	40	80	120	160	160

Pipetar sucesivamente en cada uno de los 6 campos de la placa de vidrio.

50µl de la dilución de plasma o de la solución testigo y 50µl de reactivo y mezclar. Agitar durante 1 min y dejar reposar 1 min. Leer la aglutinación contra un fondo oscuro comparándola con el testigo. El título de la muestra es la dilución en la cual se observa una aglutinación. El contenido en cofactor de ristocetina en % del valor normal se obtiene multiplicando el título por el límite de sensibilidad. Si el contenido del cofactor debe ser determinado dentro de límites estrechos, los intervalos entre las diluciones tendrán que ser más pequeños.

**Técnica para el método del agregómeto, siendo este un "APALT" de la Fa. Labor.**

La calibración es con plasma rico en plaquetas (PRP) en el 0% de transmitancia, y con plasma pobre en plaquetas (PPP) en el 100% de transmitancia, a partir de reactivo y plasma humano estándar.

Para el trazado de la curva estándar, puede utilizarse plasma humano estándar o mezcla de plasmas frescos de por lo menos 10 donantes sanos. El plasma se utiliza sin diluir (100% del valor normal) y en las diluciones 1:2 (50%), 1:4 (25%), 1:8 (12.5%) y 1:16 (6.3%). Para la dilución se emplea solución isotónica de cloruro de sodio.

Se grafican los valores leídos de transmitancia por min. en papel logarítmico contra el logaritmo del contenido en % del valor normal; y con los puntos se obtendrá una línea recta. La muestra de plasma se aplica sin diluir. la variación máxima de la transmitancia leída en el agregómetro por minuto es calculada por el equipo o se puede interpolar en la curva estándar:

	Microprueba	Semimicroprueba
Reactivo vW	450 $\mu$ l	900 $\mu$ l
Incubación (37°C)	2 min	3 min
Muestra	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l

**Valores de referencia:**

Entre 50 y 150% del valor normal

Actualmente para hacer un estudio de determinación de la enfermedad vW, se someten a prueba a 3 generaciones de la familia, la sangre de cada persona se colecta y se adiciona citrato de sodio, se centrifuga a 3000 rpm por 15 min, se refrigera a 4°C para separar el plasma; el Ag del factor vW se ensaya de acuerdo al método de electroinmunodifusión de Laurell y la actividad del cofactor ristocetina - factor vW se mide usando plaquetas fijadas con formalina. Los tiempos de coagulación se miden con el método Ivy. La organización multimérica del factor vW se analiza por electroforesis en gel de agarosa (1.4%) en presencia de 0.1% de SDS.

Los multímeros del factor vW pueden identificarse después de incubación en geles de agarosa con anti IgG del fvW humano desarrollado en conejo y marcado con  $I^{125}$ , visualizado por autoradiografía.

## **CAPITULO IX**

## **CONCLUSIONES**

La función del factor vW es mediar la adhesión plaquetaria al interactuar con GPIbA y la formación del trombo ya que interactúa con los componentes del subendotelio y con los receptores plaquetarios.

Sin el factor vW el factor VIII no puede circular en el plasma. El factor vW es una proteína, se sintetiza a partir del DNA de la transcripción del gen 12; la estructura de los dominios y orden de actividad es: D1-D2-D1-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2 y se traduce en una proteína precursora de más de 2000 aminoácidos.

A1 y A3 son similares, hay puentes disulfuro, en el dominio A1 es donde ocurren las mutaciones lib.

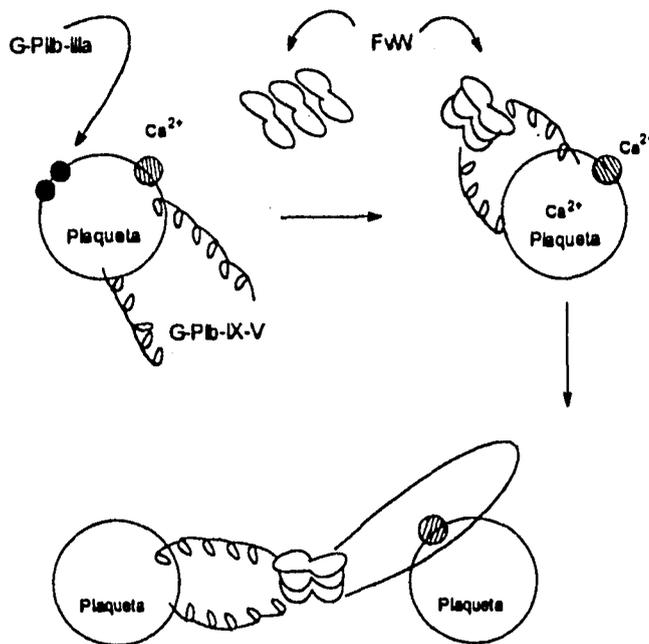
La biosíntesis ocurre en dos tipos de células: endoteliales que lo liberan a la circulación y megacariocitos que lo envía a las plaquetas liberándolo hasta que está maduro (DNAc incluye proproteína y proteína) y cuando la plaqueta detecta daño vascular. Se ha estudiado el fvW en células endoteliales porque es más fácil su cultivo.

Una vez sintetizada la proteína los propolipéptidos se ensamblan en dímeros conocidos como AgII de vW que tiene interacción con el colágeno, estos dímeros formarán multímeros que presentan forma lineal o granular.

La facultad de la proteína de adquirir tamaños muy grandes en una propiedad que le dá características de adhesión en diferente grado; el fvW acarrea al FVIII y al unirse con colágeno puede actuar con el cofactor en la generación del trombo, la unión fvW/FVIII lo protege de la lisis por FVIII.

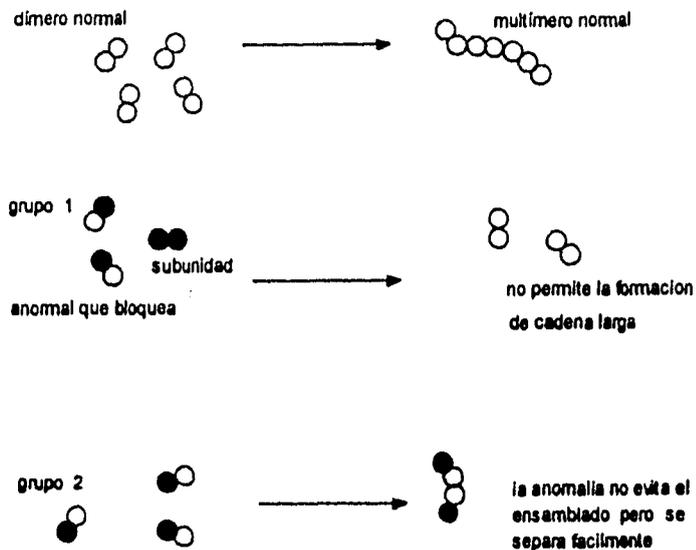
Hay mutaciones en el factor vW que ocasionan disminución de afinidad con el FVIII y la formación de fibrinas es anormal, a esto antes se le llamó hemofilia atópica y hoy se caracteriza como subgrupo Normandía; en la porción amino terminal es donde se hace la unión (afinidad), las mutaciones resultan en una unión anormal, esta unión es la actividad coordinada de GPIb del colágeno y los sitios GPIIb-IIIa del extremo carboxilo.

Solo el FvW inicia la formación de trombo en condiciones de alto flujo sanguíneo.



Los subtipos se deben a alteraciones funcionales del fvW, como en:

- I. Defecto cuantitativo del factor en sangre circulante.
- IIb. Mutaciones funcionales, incrementan la actividad para GPIII-a, la alteración es en el dominio A2 que se degrada rápidamente, mutaciones en IIB-IIA dan genotipos confusos.
- IIA. La alteración es en el dominio A2 en la unión de péptidos dependientes de  $Ca^{2+}$  dando una subunidad inestable que tiene dos mecanismos.



La gama de variedades (subtipos) permite explicar la diferente afinidad, cuando la unión de las moléculas grandes se evita al endotelio se tendrá una deficiencia.

El tratamiento de la enfermedad de vW es mediante la corrección del defecto en el factor vW o en el FVIII, y para esto hay dos opciones:

- Sustancias con concentrados plasmáticos.
- El uso de DDVAP (acetato de desmopresina)

**Concentrados:** En 1956 se utilizó la fracción 1-0 del plasma normal que se ha comprobado tienen fracciones de multímeros y su tiempo de vida media es menor a 24h; en la actualidad esta fracción ya no se emplea debido a que no se le puede inactivar la fracción viral que puede contener.

**Crioprecipitados:** Promueve la adherencia plaquetaria al subendotelio pero su uso es controvertido debido a la dificultad para eliminar los virus.

**Plasma fresco:** También ha sido de utilidad, el problema es su adquisición y la no inactivación de virus.

Sin embargo, los concentrados no contienen los multímeros grandes, y se emplean en lesiones tipo hemofilia y enfermedad vVIII, no en sangrado de mucosa.

Considerando la información abordada en este trabajo, nos encontramos todavía en el umbral del conocimiento pleno de esta enfermedad, lo cual hace necesario continuar profundizando sobre la materia.

## **CAPITULO X**

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Ambriz Fernández R. *et al.*  
Enfermedad de von Willebrand. Informe de 60 casos de 24 familias en México.  
Revista Médica IMSS; México, 1984, 22:241-7
2. Assouline Z, *et al.*  
The human gene for von Willebrand factor. Identification of repetitive Alu sequences 5' to the transcription initiation site.  
Biochem Biophys Res Commun., Jun. 30, 1988, 153(3):1159-66.
3. Aznar J. Salatti, *et al.*  
Differential localization of von Willebrand factor, fibronectin and 13-HODE in human endothelial cell cultures.  
Histochemistry (Germany, West) 1990, 93(5):507-11.
4. Badimon Lina, *et al.*  
Platelet thrombus formation on collagen type I. A model of deep vessel injury. Influence of blood rheology, von Willebrand factor and blood coagulation.  
Circulation, Dec. 1988, 78(6):1431-42.
5. Badimon L. *et al.*  
Role of von Willebrand factor in mediating platelet-vessel wall interaction at low shear rate; the importance of perfusion conditions.  
Blood, Mar. 1989, 73(4):961-7
6. Barnett T.B., Benditt, E.P.  
Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Apr. 1988, 85(8):2810-4.
7. Bello A. *et al.*  
Yatrogenia en hemofilia y enfermedad de von Willebrand.  
Boletín Médico, Hospital Infantil México, Vol. 39, Número 1, Enero, 1982. p. 23-28.
8. Berndt M.C.; Du XP, Booth W.J.  
Ristocetin-dependent reconstitution of binding of von Willebrand factor to purified human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex.  
Biochemistry Jan. 26, 1988. 27(2):633-40.
9. Bolhuis P.A.; Sokariasse, K.S.; Sander H.J.; Bouma B.N.; Sixma. Binding of factor VIII von Willebrand factor to human arterial subendothelium precedes increased platelet adhesion and enhances platelet spreading.  
J. Lab Clin Med. Apr., 1981, 97(4):568-76.
10. Bruggeman C.A. *et al*  
Cytomegalovirus alters the von Willebrand factor content in human endothelial cells.  
Thromb Haemost Apr. 8, 1988 59(2):264-8.

11. Byrd S. Leavell.  
Hematología Clínica, 4a. ed.  
Ed Interamericana, 1978, México.
12. Cattaneo, M. *et al.*  
Conditions influencing the interaction of asialo von Willebrand factor with human platelets- the effects of external ionized calcium concentration and the role of arachidonate pathway.  
Thromb Haemost, Oct. 31, 1988, 60(2):280-8
13. Chu M.L., Zhang R.Z., Pan T.C., *et al.*  
Mosaic structure of globular domains in the human type VI collagen alpha 3 chain similarity to von Willebrand factor, fibronectin, actin, salivary proteins and aprotein type proteasa inhibitors.  
Embo J (England) Feb 1990, 9(2):385-93.
14. Cooper H.A., Bennett W.P., Kreger A. *et al.*  
Proteolysis of human fixed, washed platelets by gram (-) bacterial metalloproteases: effect on von Willebrand factor-human platelet interactions.  
Ann N.Y Acad. Sci. 1981,370:179-90.
15. Cooper H.A., Bennett W.P., Kreger A., Lyerly D., Wagner, R.H.  
The effect of extracellular proteases from Gram(-) bacteria on the interaction of von Willebrand factor with human platelets.  
J. Lab Clin Med. Mar. 1981, 97(3):379-89.
16. Coobi A.L.; Kishimoto, T.K., Miller L.J. Springer T.A.  
The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1(complement receptor type 3, CD1b) a subunit cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B.  
J. Biol Chem. Sep. 5, 1988, 263 (25):12403-11.
17. De Groot P.G., *et al.*  
von Willebrand factor synthesized by endothelial cells from a patient with type II B von Willebrand disease supports platelet adhesion normally but has an increased affinity for platelets.  
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 1989, May. 86 (10):3793-7.
18. Donner Mikael, L. Holmberg, A.C. Kristoffersson and Inga M. Nelson.  
An HphI-polymorphism in exon 28 of the von Willebrand factor gene, and its frequency among patients with various forms of von Willebrand's disease.  
British Journal of Haematology 1991, 78,403-407.
19. Duperray A. Tranqui L., Alix J.L., Cordonnier D.  
Effect of mitomycin C on prostacyclin synthesis by human endothelial cells.  
Biochem Pharmacol, Dec. 15, 1988, 37(24):4753-7.
20. Fay P.J.  
Reconstitution of human factor VIII from isolated subunits.  
Arch Biochem Biophys, May 1, 1988, 262(2):525-31
21. Fay P.J., Smedzin T.N.  
Topography of the human factor VIII-von Willebrand factor complex.  
J. Biol. Chem. USA, Apr. 15, 1990, 265(11):6197-202

22. Finlay T.H., Marcus D.L., Kowalski S., Silber P.  
Interaction of porcine von Willebrand factor (Platelet aggregating factor) with human platelets.  
*Biochem Biophys Acta*, Jan 7, 1981, 672(1):79-88.
23. Fujimoto T., Ohara S., Haviger J.  
Thrombin-induced exposure and prostacilin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets.  
*J. Clin Invest.*, Jun, 1982, 69(6):1212-22.
24. Furlan M., Perret, B.A., Beck, E.A.  
Von Willebrand activity of low molecular weight human factor VIII increases by binding to gold granules.  
*Thromb Haemost*, Jun 30, 1981, 45(3):242-6
25. Gaucher C., Jorieux S., B. Mercier, D. Oukfir and C. Mazurier.  
The "Normandy" variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene.  
*Blood*, Vol 77, No. 9 (may 1) 1991: pp 1937-1941.
26. George J. N., Onofre A.R.  
Human platelet surface binding of endogenous secreted factor VIII - von Willebrand factor and platelet factor IV.  
*Blood*, Jan 1982, 59 (1):194-7
27. Gerard J. M. *et al.*  
A reassessment of the bleeding time: association of age, hematocrit, platelet function, von Willebrand factor and bleeding time thromboxane B<sub>2</sub> with the length of the bleeding time.  
*Chemical and Investigative Medicine, Canada*, 1989. Vol. 12, No. 3:165-171.
28. Giddings J.C., Brookes, L.R., Piovella F., Bloom A.L.  
Immunohistological comparison of platelet factor IV (PF4), Fibronectin (Fn) and factor VIII related antigen (VIII:Ag) in human platelets granules.  
*Br. J. Haematol*, Sep. 1982, 52 (1):79-88.
29. Gringeri A., Mannucci, P.M.  
National survey of human immunodeficiency virus infection in Italian hemophiliacs: 1983-1987. The medical Scientific Committees of the Fondazione dell'Emofilia.  
*Rec Clin Lab*, Oct-Dec 1988, 18(4):275-80
30. Hamilton, H.K. Rose M.B.  
*Diagnóstico Clínico*  
Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., 1985, México.
31. Harris R.B., Johnson A.J., Hodgins L.T.  
Partial purification of biologically active, low molecular weight, human antihemophilic factor free of von Willebrand factor II. Further purification with thiol-disulfide interchange chromatography and additional evidence for disulfide bonds susceptible to limited reduction.  
*Biochim Biophys Acta*, May 29, 1981, 668 (3):471-80.

32. Lars Holmberg and Inga Marie Nelsson  
Von Willebrand disease  
Clinics in Haematology.  
Vol 14 No. 2, June 1985, U.S.A.
33. Jeanneau C., Sultan Y.  
Localization of factor VIII/vWf antigen by immunoelectron microscopy in human endothelial cells using Fab fragments coupled to peroxidase.  
J. Histochem Cytochem., Nov. 1982, 30 (11):1091-6
34. Kadhom N. Wolfrom C., Goutier M. Allain J.P., Fromm D.  
Factor VIII procoagulant antigen in human tissues.  
Thromb Haemost, Apr 8, 1988, 59 (2):289-94.
35. Katagiri Y, Hayashi Y, Yamamoto K. *et al.*  
Localization of von Willebrand factor and thrombin-interactive domains on human platelet glycoprotein Ib.  
Thromb Haemost (Germany, West), Feb 19, 1990, 63 (1):122-6.
36. Kashiwagi S., *et al.*  
Prevalence of human immunodeficiency virus (HIV) infection among hemophiliacs in Fukuoka, Japan.  
Microbiol Immunol, 1988, 32(8):851-5.
37. Katzman J.A., Mujwid D.K. Miller R.S., Fass D.N.  
Monoclonal antibodies to von Willebrand's factor: reactivity with porcine and human antigens.  
Blood. Sep 1981, 58(3):530-6.
38. Kaufman R.J, Wasley L.C. Dorner A.J.  
Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells.  
J. Biol. Chem, May 5, 1988, 263(13):6352-62.
39. Kaufman Randal J, D.D. Pittman, K.A. Marquete, L.C. Wasley and A.J. Dorner.  
Factors limiting biosynthesis and secretion of factor VIII in mammalian cells  
Genetics Institute, 87 Cambridge Park Dr Cambridge M.A. 02140, U.S.A., 1990.
40. Kaufman Randal J. and Israel David I.  
Retroviral-mediated transfer and amplification of a functional human factor VIII gene.  
Blood, Vol. 75, No. 5 (March 1), 1990:pp1074-1080.
41. Kaufman Randal J.  
Genetic engineering of factor VIII.  
Reprint from Nature Vol. 342, No. 6246 pp207-208, 9th Nov. 1989.
42. Kaufman Randal J., R.J. Wese, P.J. Barr, P.A. Wong, M.C. Kiefer, A.J. Brake.  
Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 87 pp 9378-9382. Dec. 1990. Biochemistry.

43. Kessler C.M., Floyd C.M. Frants S.C., Orhner C.  
Critical role of the carbohydrate moiety in human von Willebrand factor protein for interactions with type I collagen  
Thromb Res. U.S.A., Jan. 1, 1990, 57(1):59-76.
44. Kirby,, E.P.  
The agglutinin of human platelets by bovins factor VIII:R  
J. Lab. Clin Med. Dec. 1982, 100(6):963-76.
45. Koedam J.A. *et al.*  
Inactivation of human factor VIII by activated protein C cofactor activity of protein S and protective effect of won Willebrand factor.  
J. Clin Invest, Oct. 1988, 82(4): 1236-43
46. Lajmanovich A. *et al.*  
Human factor VIII procoagulant activity and phospholipid interaction.  
Biochim. Biophys Acta, Nov. 18, 1981, 678(1):132-6.
47. López-Fernández M.F. *et al.*  
Secretion of von Willebrand factor from platelets.  
Methods Enzymol. 1989, 169:244-51.
48. Marti T., Rosselet J.J., Titani K, Walsh, K.A.  
Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor.  
Biochemistry, Dec. 15, 1987, 26(25):8099-109.
49. Maxwell M. Wintrobe, B.A., M.D. *et al.*  
Clinical Hematology, 8th ed.  
Lea and Febiger, Philadelphia, U.S.A., 1981.
50. Mejan, O. *et al.*  
Immunopurification of human factor VIII/vWf complex from plasma.  
Thromb Haemost, Jun 16, 1988, 59(3): 364-71.
51. Murray W. Elizabeth, A. R. Giles, P. J. Bridge, I. R. Peake and D Lillicrap.  
Cosegregation of von Willebrand factor gene polymorphisms and possible germinal mosaicism in type II B von Willebrand disease.  
Blood, Vol. 77 No. 7 (april 1), 1991: pp1476-1483.
52. Norkraus G. *et al.*  
Acute hepatitis non -A, non-B following administration of factor VIII concentrates.  
Vox Sang, Sep 1981, 41(3):129-33.
53. Nozaki H.  
Aminoacid analysis of human von Willebrand factor fragments cleaved by porcine calpain II.  
Tokai J. Exp. Clin. Med, Nov. 1987, 12(4):223-7.

54. Ohmoni K., Fretto L.J. Harrison R.L., *et al.*  
Electron microscopy of human factor VIII/ von Willebrand glycoprotein: effect of reducing reagents on structure and function.  
J. Cell Biol, Nov. 1982, 95(2 pt1): 632-40.
55. Pankowsky D.A., Ziots N.P., *et al.*  
Morphologic characteristics of adsorbed human plasma proteins on vascular grafts and biomaterials.  
J. Vasc. Surg., U.S.A., Apr. 1990, 11(4):599-606.
56. Rand J.H., Gordon, R.E., Sussman J.C., Chu S.V., Solomon V.  
Electron microscopic localization of factor VIII-related antigen in adult human blood vessels.  
Blood, Sep. 1982, 60(3):627-34.
57. Ruan C, *et al.*  
Monoclonal antibody to human platelet glycoprotein I,II; effects on human platelet function.  
Br. J. Haematol, Dec 1981, 49(4): 511-9
58. Shekhonin B. U; Tararak E. M; Samakhin G.P, *et al.*  
Visualization of apo B, fibrinogen/fibrin, and fibronectin in the intima of normal human aorta and large arteries and during atherosclerosis.  
Atherosclerosis, Ireland, Jun 1990, 82(3): 213-26
59. Silber P; Finlay T. H.  
Binding of porcine von Willebrand factor to human platelets in the presence of ristocetin. Thromb Res, Jun 1, 1982, 26(5): 351-8
60. Skidmore S. J; Pasi K. J; Mawson S. J; *et al.*  
Serological evidence that dry heating of clotting factor concentrates prevents transmission of non A, non B hepatitis  
J Med Virol, USA, Jan 1990, 30(1): 50-2
61. Sola B; Avner P; Sultan Y; Jeanneau C; Maisonneuve P.  
Monoclonal antibodies against human factor VIII molecular neutralize antihemophilic factor and ristocetin cofactor activities.  
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Jan 1982, 79(1): 183-7
62. Takahashi H., *et al.*  
Coagulation studies in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to von Willibrand factor and Protein S.  
American Journal of Hematology, 1989, 30: 14-21
63. Takahashi K; Sawasaki Y; Hata J; Nukai K; Goto T.  
Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells.

In Vitro Cell. Dev. Biol. USA, Mar 1990; 26(3 Pt1): 265-74

64. Takahashi K, T. Goto, K. Mukai, Y Sawasaki, J. Hata.  
Cobblestone monolayer cells from human omental adipose tissue are possibly mesothelial, not endothelial.  
In Vitro cellular and Developmental Biology Vol 25, number 2, Feb 1989, USA.
65. Takeuchi M. Nagura H, Kaneda T.  
DDAVP and epinephrine-induced changes in the localization of von Willibrand factor antigen in endothelial cells of human oral mucosa.  
Blood, Sep 1988, 72(3): 850-4
66. Tannenbaum S. H; Galvick H. R.  
Gamma-interferon modulates von Willebrand factor release by cultured human endothelial cells.  
Blood, USA, Jun 1, 1990, 75(11): 2177-84
67. Tarnawsky A, Stachura J, Gergely H, Hollander D.  
Microvascular endothelium--a major target for alcohol injury of the human gastric mucosa, Histochemical and ultrastructural study.  
J. Clin. Gastroenterol, 1988, 10 Suppl 1p S: 53-64
68. Thuy L. P; Bangh R. F; Brown J. E; Hongie C.  
Identification of platelet receptors for bovins von Willebrand factor on human platelets by a new platelet receptor test.  
Biochem Biophys Acta, Dec4, 1981, 678(2): 187-193
69. Tsai H. M; Sussman I; Nagel R. L; Kaul D. K.  
Desmopressin induces adhesion of normal human erithrocytes to the endothelial surface of a perfused microvascular preparation.  
Blood, USA, Jan 1, 1990, 75(1): 261-5
70. Tuddenham E. G; Lane R. S; Rotbat F; et al.  
Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease.  
Br. J. Haematol, Oct 1982, 52(2): 259-67
71. Verweij C. L.  
Biosynthesis of human von Willebrand factor.  
Haemostasis, 1988, 18(4-6): 224-45
72. Verweij, Cornelis Lammert.  
Structure and biosynthesis of human von Willebrand factor. A molecular biological study.  
Amsterdam, 1987, Tesis para obtener el grado de Doctor.

73. Wagner D. D; Olmsted J. B; Marder V. J.  
 Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel Palade bodies of human endothelial cells.  
 J. Cell. Biol, Oct 1982, 95(1): 355-60
74. Weiss H. J; et al.  
 Pseudo-von Willebrand's disease.  
 An intrinsic platelet defect with aggregation by inmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high molecular-weight multimers  
 N. Engl. J. Med, Feb. 11, 1982, 306(6): 326-33
75. William J. Williams.  
 Hematología Tomo II  
 Salvat editores, 1975, España, pag. 1242-1246.  
 Hematology, 3rd de.  
 Mc Graw Hill Book Company, 1983, U.S.A., pag 1428-32.
76. Wintrobe Maxwell, B.A., MD et al.  
 Clinical Hematology, 8th de.  
 Lea and Febiger, Philadelphia, 1981, 412-416.
77. Behring Haemate P. booklet.  
 Behringwerke AG  
 P.O. Box 1140  
 D35001 Marburg, Germany, 1944, page 12.
78. Abstracts of XXI International Congress of the World Federation of Hemophilia.  
 México, 1994.  
 -Structure and function of von Willebrand factor.  
 Zaverio M. Ruggeri.  
 -Phenotypic and Genotypic heterogeneity of vW disease Dominique Meyer.  
 -Treatment of von Willebrand disease.  
 Inga Marie Nilsson.
79. Técnicas de Hemostasia y Trombosis  
 Grupo CLAHT (Cooperativo Latino-Americano de Hemostasia y Trombosis.  
 Editor M. Pavlosky, 1975, Argentina.
80. Practical Haematology (5a. ed, cap. 13)  
 Dacie J.V., Lewis S.M.  
 De. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, 1975. (p. 315-401).