



**Universidad Nacional Autónoma de México**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE FACTOR VIII,  
DEL CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES,  
FIBRINOGENO, ANTICUERPOS AGLUTINANTES Y  
HEMOLITICOS EN LOS CRIOPRECIPITADOS  
OBTENIDOS EN EL BANCO CENTRAL DE SANGRE  
DEL CENTRO MEDICO NACIONAL

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARTHA OLIVIA TEJERO GONZALEZ

Director Q. F. B. Elisa Quintar García



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## I N D I C E

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
GENERALIDADES.....	7
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL Y METODOS.....	30
RESULTADOS.....	54
DISCUSION.....	64
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	68

## RESUMEN

Con el fin de hacer una evaluación en nuestro país sobre una buena técnica, en la cual se obtenga un mayor contenido de Factor VIII, en los crioprecipitados, obtenidos en el banco central de sangre del Centro Médico Nacional, se analizaron 60 crioprecipitados, 35 fueron obtenidos por la técnica de E.C. Mason (1978) y 25 obtenidos por la técnica de Pool y Shannon (1965).

A estos dos grupos de crioprecipitados se les determinó la actividad de Factor VIII en Unidades por el método de Biggs y colaboradores, así como el contenido de proteínas totales por el método de Biuret, fibrinógeno, por el método de Ratnoff y Menzie, anticuerpos aglutinantes y hemolíticos por métodos inmunológicos.

Los resultados obtenidos demostraron que se obtiene un mayor contenido de actividad de Factor VIII en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Mason, así también se observó que en los crioprecipitados obtenidos de plasma de grupo sanguíneo A contienen un mayor contenido de actividad que los grupos O y B.

Esto también ocurre por la técnica de Pool y Shannon pero el contenido de actividad de Factor VIII es menor.

Los crioprecipitados obtenidos por la técnica de E. C. Mason presentaron un mayor contenido de proteínas totales y de anticuerpos aglutinantes y hemolíticos y un menor contenido de fibrinógeno. En cambio en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Pool y Shannon presentaron un menor contenido de proteínas totales y de anticuerpos hemolíticos y un mayor contenido de fibrinógeno. Aunque no fue una diferencia estadísticamente significativa.

## INTRODUCCION

Un crioprecipitado es un derivado protéico del plasma humano, que contiene factor VIII o Globulina Antihemofílica en forma concentrada, que es de utilidad para el tratamiento de pacientes con hemofilia A (deficiencia de factor VIII) (11).

En 1955, Bidwell elaboró los primeros concentrados de Globulina Antihemofílica a partir tanto de sangre bovina como porcina (1,2); posteriormente Kekwick y Wolf en 1957 y Blomback en 1958 elaboraron concentrados de Globulina Antihemofílica a partir de sangre humana (3,4,5). Pool y Robinson en 1959 observaron que en el plasma al estar almacenado en refrigerador precipitaba una sustancia insoluble en frío (crioprecipitina), encontrando que contenía una cantidad importante de Globulina Antihemofílica (6); con base a esto, Pool, Hershgold y Pappenhagen en 1964 (7) elaboraron una técnica para producir concentrados a gran escala, aunque se presentaron algunos problemas que principalmente consistían en una muy baja recuperación de la Globulina Antihemofílica del plasma tratado, además de problemas relacionados con la esterilidad durante el proceso del producto.

Valiéndose del sistema cerrado de las bolsas de plástico, de las centrifugas refrigeradas y tomando como base las experiencias anteriores, Pool y Shannon en 1965 desarrollaron una técnica para obtener concentrados de Globulina Antihemofílica humana, dentro de los límites más estrictos de esterilidad, con

la que se recupera un buen porcentaje de la Globulina Antihemofílica y se puede hacer a gran escala (8,9). Esta técnica consiste fundamentalmente en congelar el plasma rápidamente por inmersión en un medio de hielo seco-alcohol y se almacena en un refrigerador a 4°C durante 24 horas aproximadamente, tiempo suficiente para obtener un descongelamiento y la precipitación del Factor VIII.

Para el tratamiento de pacientes hemofílicos se cuenta con el plasma fresco (no más de 6 horas de haber sido separado de la sangre recién extraída). Este producto contiene una unidad de Globulina Antihemofílica por ml; es decir, de una donación de sangre de 500 ml se obtienen 250 ml de plasma y por lo tanto 250 unidades de globulina antihemofílica.

Los crioprecipitados contienen entre 60 y 80 unidades de Factor VIII en un volumen aproximado de 25 ml. En un estudio practicado en 1968 en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional (10), se estimó que los concentrados contenían 120 unidades  $\pm$  29 unidades de Factor VIII, mediante su evaluación en algunos pacientes.

En los últimos 10 años en varias partes del mundo se ha intentado mejorar la técnica para la obtención del crioprecipitado a fin de obtener un mejor rendimiento de Factor VIII. Esta técnica es la de E. C. Mason (11), que pretende obtener un mejor rendimiento y reducir la técnica de preparación de 24 horas a aproximadamente 2 horas, y cuya característica fundamental es la descogelación acelerada del plasma mediante la inmersión del plasma en agua corriente a 4°C.

También se cuenta con el factor VIII purificado preparado por la Industria Farmacéutica (26) y del que aproximadamente 50ml contienen de 250 a 500 unidades de Factor VIII, con la ventaja que se presenta liofilizado. El alto costo de éste, lo ha hecho poco accesible. En países en desarrollo como México, el crioprecipitado es empleado en más del 90 por ciento de los casos de hemofílicos que requieren tratamiento..

En 1983 el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional, puso en marcha la técnica de E. C. Mason para la preparación de los crioprecipitados, y uno de los propósitos de esta tesis es el de definir las diferencias de contenido de factor VIII, en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Pool y Shannon (1968) y la de E.C.Mason (1978). De acuerdo con lo reportado en la literatura mundial los concentrados de Factor VIII preparados en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional con la técnica de E.C. Mason deben de contener una proporción mayor de Factor VIII que los que contienen los preparados con la técnica de Pool y Shannon (12).

Este estudio fue realizado en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional, en un período comprendido del mes de septiembre de 1983 a julio de 1984.

Los análisis del laboratorio de los concentrados de factor VIII incluyeron:

1. Dosificación del factor VIII.
2. Determinación de fibrinógeno.

3. Determinación de proteínas totales
4. Determinación de anticuerpos aglutinantes y hemolíticos del plasma del grupo sanguíneo ABO.

## GENERALIDADES

La primera información de Hemofilia apareció alrededor de 500 años A.C. en el Talmud y escritos rabínicos. La ley hebrea excusaba al niño del rito de la circuncisión si sus hermanos habían sangrado copiosamente después de la misma (13).

Hacia el siglo XII, Maimonides reconoció que la enfermedad era transmitida por la madre asintóticamente, y no fue sino hasta 1828 que Hopff, introdujo el término de "Hemofilia" (que significa amor a la sangre), y en el que se agrupan una gran cantidad de pacientes con problemas hemorrágicos.

Como había sido mostrado previamente que el tiempo de coagulación de la sangre de un hemofílico era anormalmente prolongado, en 1910 Addis estableció mediante experimentos in vitro e in vivo, el acortamiento del tiempo de coagulación al adicionar plasma normal al plasma hemofílico. Además definió que el defecto en la coagulación en la hemofilia estaba condicionado por el retraso en la conversión de protrombina a trombina y la corrección del tiempo de coagulación prolongado en Hemofílicos, con transfusión de sangre normal. (14,15)

En 1911, Bullock y Fildes establecieron a la hemofilia como una entidad clínica específica que debía llenar algunos requisitos para el diagnóstico y que incluían cierta facilidad para el sangrado excesivo desde la infancia, restricción al sexo masculino, historia familiar de hombres afectados en la misma forma, la transmisión del padecimiento por mujeres aparentemente sanas,

un tiempo de coagulación alargado y la ausencia de otra anomalía que pudiera ser la causa del sangrado (16).

En 1937 Patek y Taylor (17), designaron a la fracción del plasma normal que corregía las alteraciones de la coagulación de la sangre de los hemofílicos como Globulina Antihemofílica.

En 1952, se realizó un nuevo ensayo para la cuantificación de la Globulina Antihemofílica, hoy conocida como prueba de generación de tromboplastina, encontrándose por medio de ésta que había una deficiencia de Globulina Antihemofílica actualmente conocida como factor VIII.

En este mismo año se distinguió a la hemofilia A de la B en laboratorios diferentes casi al mismo tiempo y fue de mucha importancia ya que se demostró que la fracción del plasma que corregía el plasma de la hemofilia B no tenía efecto sobre el de la hemofilia A y viceversa (18, 19, 20).

A la deficiencia de factor VIII se le da el nombre de Hemofilia Clásica o Hemofilia A. Mientras que a la deficiencia de factor IX se le conoce como enfermedad de Christmas o Hemofilia B. En 1953, Rosenthal describió casos que parecían ser de hemofilia pero en los cuales ni el factor VIII ni el IX eran deficientes, atribuyendo el defecto de la coagulación a otro factor diferente de los anteriores y al que llamó Antecedente Tromboplastico del plasma (PTA), factor XI o factor antihemofílico C. Su deficiencia ocasiona la enfermedad de Rosenthal.

La Hemofilia A o Hemofilia Clásica es una enfermedad hemo-

rrágica hereditaria, producida por un trastorno genético resultante de la mutación ocasional de un gen del cromosoma sexual X; esta mutación da lugar a la ausencia de un elemento importante en el proceso de la coagulación sanguínea (factor VIII-C) motivando que las hemorragias provocadas o espontáneas se prolonguen y en ocasiones sean incontenibles.

La enfermedad se presenta exclusivamente en el hombre y es menos frecuente en las mujeres (21), se caracteriza por una disminución en la actividad biológica del factor VIII-C. Es transmitida a través de las mujeres portadoras del gen afectado por la hemofilia el cual está localizado en el cromosoma sexual X (22). Las mujeres portadoras frecuentemente no muestran efectos clínicos y transmiten la enfermedad al 50 por ciento de sus hijos varones siendo portadoras el 50 por ciento de sus hijas (23,24).  
Figura No. 1

Las características de transmisión de la deficiencia de la fracción procoagulante del (F-VIII-C), pueden ser de varios grados, clasificándose usualmente como: severa, moderada y leve dependiendo de la cantidad de F-VIII-C biológicamente activo que esté presente. El nivel plasmático de F-VIII-C es de 50 a 200 por ciento de actividad. Los hemofílicos severos tienen 1% o menos de actividad y están expuestos a sangrados espontáneos en músculos, articulaciones y membranas mucosas. (24,25,26)

La forma moderada aparece con niveles de F-VIII-C del 2 al 5% y se asocia a una tendencia franca a sangrar, no hay hemorra

gias graves ni hemartrosis en este nivel (27,28).

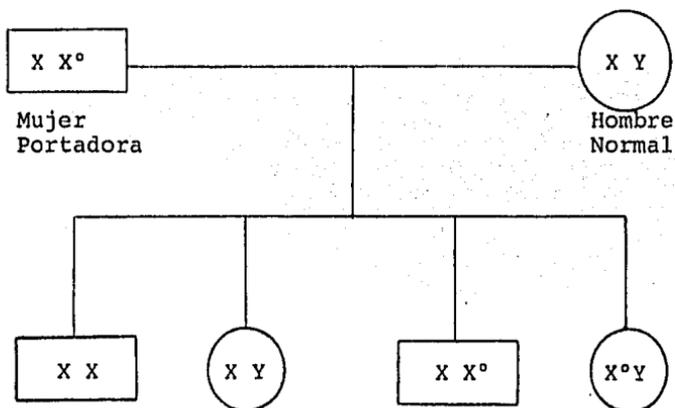
Los hemofílicos leves alcanzan niveles de F-VIII-C del 5 al 30% y no sufren sangrados espontáneos ni tampoco hemartrosis; únicamente tienen dificultad cuando los mecanismos hemostáticos son alterados por extracciones dentarias o procedimientos quirúrgicos (29)

La Hemofilia A es una enfermedad relativamente poco común, que se presenta con una incidencia total de 1 por cada 13,000 a 14,000 hombres (30). Encontrándose que la forma severa se encuentra en 1 de cada 25,000 varones (31). La Sociedad Mexicana de Hemofilia sólo ha registrado a 1 Hemofílico por cada 77, habitantes.

En la Hemofilia A se encuentra afectada la fracción F-VIII-C del complejo molecular F-VIII, en cambio la fracción F-VIII<sup>R</sup>-WF se encuentra presente en cantidades y funciones normales (29).

## TRANSMISION GENETICA DE LA HEMOFILIA

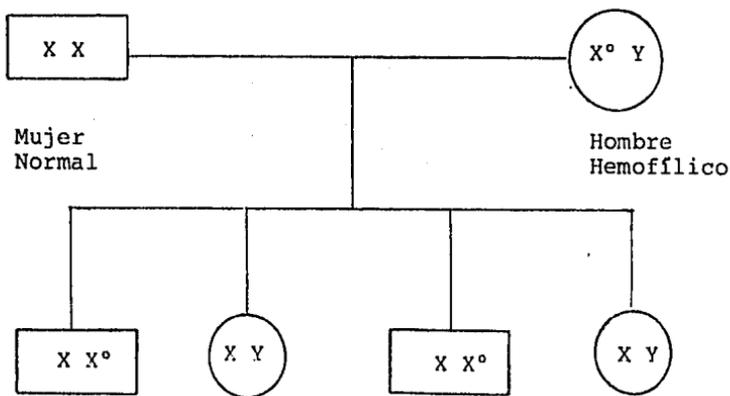
Figura No. 1



Conclusiones:

1.- El 50% de las hijas son portadoras

2.- El 50% de los hijos son hemofílicos



Conclusiones:

1.- Todas las hijas son portadoras

2.- Todos los hijos son normales

 $X^\circ$  = Cromosoma afectado.

## SINTESIS DE FACTOR VIII

El sitio de síntesis de la Globulina Antihemofílica continúa siendo en la actualidad un enigma, pese a las numerosas investigaciones que se han realizado tratando de aclarar su sitio exacto de producción.

Estudios de perfusión y transplante de tejidos sugieren que el F-VIII-C es producido por el hígado bajo algunas condiciones (32,33,34,35). Hay conjeturas sobre la función importante que juega el hígado en la producción de F-VIII-C, ya que en enfermedades hepáticas severas se encuentran valores normales o altos, lo que apoya el concepto de que existe una fuente extrahepática de esta proteína. Algunos estudios sugieren que se produce predominantemente en hígado y en menor cantidad en bazo, pulmón nódulos linfáticos y riñón (36).

Estudios realizados de inmunofluorescencia (37,38,39) y técnicas de inmunoperoxidasa (40,41), han identificado que la fracción de F-VIII<sub>R</sub>-WF es sintetizada en células endoteliales de arterias, arteriolas, capilares y en venas a lo largo de todo el cuerpo, así como de megacariocitos y plaquetas.

El factor VIII o Globulina Antihemofílica es una glucoproteína compleja presente en el plasma y con peso molecular dependiendo del grado de contaminación con fibrinógeno se ha reportado hasta 2 millones de Daltons, y participa en la vía intrínseca de la coagulación. Está disminuida o ausente en la Hemofilia Clásica.

El Factor VIII per se, no es capaz de activar al factor X en ausencia de trombina; la activación del factor X por el Factor VIII requiere de la presencia de Factor IX activado el cual es un complejo formado por Factor IX activado, Factor VIII, fosfolípido plaquetario o factor plaquetario 3 (FP<sub>3</sub>) y calcio iónico (42).

Se han encontrado dos funciones importantes del Factor VIII ya purificado.

- 1.- Una actividad procoagulante, que tiene la propiedad de corregir el tiempo de tromboplastina parcial activada del plasma hemofílico A, y que está dada por F-VIII-C, con un peso molecular de 285,000 Daltons, y se encuentra en una concentración de 222 nanogramos/ml en el plasma, siendo su vida media de 8 a 12 horas (43,44,45).

Su función es acelerar la coagulación de la sangre por su función de cofactor en la activación enzimática del factor X por el Factor IX activado, en presencia de fosfolípidos y calcio iónico. En ausencia del Factor IX activado el Factor VIII-C no tiene capacidad intrínseca para activar al Factor X (46,42). La trombina desempeña un papel importante en la regulación de la actividad coagulante del F-VIII-C. Pequeñas cantidades de trombina (aproximadamente .01 U/ml) son suficiente para incrementar la actividad coagulante del Factor VIII 20 veces, pero en presencia de grandes cantidades de trombina el Factor VIII es rápidamente destruido (42).

- 2.- El Factor Von Willebrand que tiene la propiedad de co-

rregir in vitro la agregación plaquetaria anormal de las mismas con ristocetina, y se encuentra ausente o con función anormal en la enfermedad de Von Willebrand, en cambio el Factor VIII-C puede encontrarse en condiciones normales o disminuido.

El peso molecular del Factor VIIIIR-WF es de 800,000 a 12,000,000 Daltons y está constituida a partir de subunidades básicas idénticas de diferente grado de polimerización (47,48), el valor estimado para el Factor VIIIIR-WF en el plasma humano es de 5 a 10 Microgramo/ml, este valor es aproximadamente 100 veces mayor que la concentración en el plasma de Factor VIII-C (49). Su función es promover la hemostasia primaria, manteniendo el control en las funciones de las plaquetas normales.

#### PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

El Factor VIII humano migra electroforéticamente entre las alfas y las betas globulinas, ha sido descrito por varios autores como una alfa 2 lenta, una pre beta e incluso como una beta globulina. Su coeficiente de sedimentación se ha estimado que oscila entre 7S y 21S, tiene un espectro de absorción en el campo ultravioleta distinto a la mayoría de las proteínas con valores que van entre los 255 y 278 nm ésto puede ser debido a dos factores; el efecto de dispersión de la luz de una gran molécula o bien su contenido relativamente bajo de tirosina (50).

Su actividad no se presenta en el suero, ni puede ser absorbido por absorbentes inorgánicos, lo que facilita una buena

obtención de éste para el estudio de su actividad en el plasma (25). La actividad del factor VIII precipita en el plasma, junto con el fibrinógeno, en una saturación de sulfato amónico al 25%. El factor VIII del plasma se inactiva más tempranamente por una congelación lenta o por el almacenamiento a 4°C, que por una congelación rápida y almacenamiento por debajo de -20°C. Su actividad disminuye con la trombina, tripsina y agentes fibrinolíticos. También se puede precipitar del plasma junto con el fibrinógeno con alcohol, o por procedimientos con éter, precipitándolo del plasma junto con otras crioproteínas a bajas temperaturas.

#### COMPOSICIÓN QUÍMICA

El análisis químico realizado por varios autores demostró que la Globulina Antihemofílica, contiene aproximadamente un 75% de aminoácidos, un 11% de carbohidratos y un 11% de lípidos neutros (51,52,53).

Los carbohidratos que la constituyen son principalmente hexosas, hexosaminas, ácido neuramínico y ácido siálico.

Entre los aminoácidos que lo constituyen se encuentran lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, tirosina, fenil alanina y triptofano.

## ESTRUCTURA MOLECULAR

Hasta hace pocos años eran escasos los conocimientos sobre la estructura molecular del factor VIII, pero actualmente en hallazgos genéticos, clínicos y de laboratorio de las distintas enfermedades de Von Willebrand y la Hemofilia, se ha aceptado que el factor VIII es un complejo bimolecular.

1.- Una molécula de bajo peso molecular responsable de la actividad coagulante (F-VIII-C) y 2.- Una molécula de alto peso molecular responsable de la actividad Von Willebrand (F-VIIIIR-WF).

Estas tienen distintas características en sus propiedades biológicas, bioquímicas, inmunológicas y de control genético. Algunas observaciones indican que en el plasma hay interacción de estos dos componentes F-VIII-C y F-VIIIIR-WF por medio de fuerzas electrostáticas para formar el complejo de factor VIII (54).

El primer componente es la fracción coagulante de la molécula conocida como F-VIII-C o factor antihemofílico contiene la propiedad coagulante y es inactivada por anticuerpos humanos contra este factor, puede ser medido por métodos inmunológicos como antígeno de factor VIII coagulante (F-VIII-C Ag) cuando estos reactantes son empleados en inmunoensayos.

El segundo componente es el factor VIIIIR-WF, o factor Von Willebrand, es la fracción que constituye la mayor parte de la

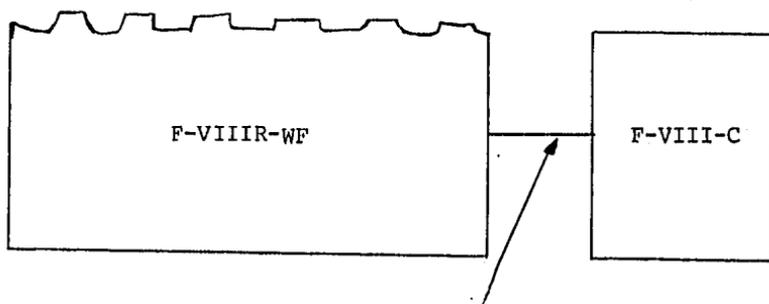
masa protéica, el cual interactúa con las plaquetas de manera que promueve la hemostasis primaria, puede ser inmunoprecipitado por antisueros heterólogos específicos, se encuentra ausente o con función anormal en la enfermedad de Von Willebrand.

El Comité Internacional de Trombosis y Hemostasia adoptó una terminología uniforme para describir las varias actividades atribuidas al factor VIII<sub>R</sub>-WF (55), de acuerdo a los subtipos clínicos de la enfermedad de Von Willebrand:

<u>Nombre propuesto</u>	<u>Definición</u>
VIII <sub>R</sub> -Ag	Actividad antigénica relacionada al factor VIII.
VIII <sub>R</sub> -WF(BT)	Actividad relacionada al factor VIII que está asociada con el comportamiento del tiempo de sangrado.
VIII <sub>R</sub> -WF(GB)	Actividad relacionada al factor VIII que está asociada con la retención de plaquetas en columnas de perlas de vidrio.
VIII <sub>R</sub> -WF(RCF)	Actividad relacionada al factor VIII que está asociada con la agregación de plaquetas por ristocetina.

INTERPRETACION ESQUEMATICA QUE INDICA LA INTERACCION DE  
LOS DOS COMPONENTES, FUNCION Y CONTROL GENETICO DEL FACTOR.

## VIII.



Unidos por fuerzas electrostáticas

## 1.- SITIO DE SINTESIS

F-VIIIIR-WF

- a) Células del endotelio
- b) Megacariocitos, plaquetas

F-VIII-C

Hígado  
Bazo  
Pulmón ?  
Nódulos Linfoides  
Riñón

## 2.- OTRAS CARACTERISTICAS

F-VIIIIR-WF

Gen: Autosoma  
Anticuerpos: Heterólogo  
Act. VIIIIR-Ag  
Act. VIIIIR-WF (BT)  
Act. VIIIIR-WF (GB)  
Act. VIII-WF (RCF)  
P.M. 800,000 a 12,000,000 Daltons

F-VIII-C

Cromosoma X  
Homólogo  
Act. VIII-C  
Act. VIII-C Ag  
P.M. 285,000 Daltons.

PREPARACIONES TERAPEUTICAS DE LA GLOBULINA ANTIHEMOFILICA  
(FACTOR VIII) PARA LA HEMOFILIA "A".

El plasma, elemento sanguíneo empleado en la terapia de la Hemofilia "A", debe usarse solamente en situaciones de emergencia donde ninguna otra fuente de factor Antihemofílico está disponible. Los progresos recientes han hecho que exista una variedad de preparaciones potentes y estables disponibles para el médico, variando su grado de purificación, En cuanto a las reacciones adversas con las diferentes preparaciones los datos disponibles indican que hay poca diferencia (56).

El primer producto para su uso en los Estados Unidos fue la fracción I de Cohn (precipitado con 8% de etanol) preparado de plasma fresco (57). La potencia de este producto era de 50 unidades/g de proteínas de Factor VIII, y un 60% de fibrinógeno este producto cayó en desuso. Más tarde se introdujo la fracción Blombäck I-0 incrementando la purificación a 100 unidades/g de proteínas y tuvo un éxito mayor debido a un más adecuado manejo de las pruebas y un mejor conocimiento de la Globulina Antihemofílica. Otra proteína predominante en esta preparación fue el fibrinógeno (de 80 a 90%), también se encontró una globulina fría insoluble que se cree es una proteína de la membrana celular hallada en el plasma y de función desconocida(4).

En 1965 se empezaron a obtener los crioprecipitados de factor VIII, por medio de la técnica de Pool y Shannon y en estudios realizados posteriormente han reportado un promedio de 70

unidades por bolsa (7.8). Y por la técnica de E.C. Mason que es la que actualmente se está utilizando en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional, la literatura reporta de 140 a 150 unidades obteniendo un promedio de 120 unidades por bolsa de crioprecipitado (11,58,59).

#### FACTORES QUE AFECTAN LA RECUPERACION DE GLOBULINA ANTIHEMOFILICA

Entre los factores que afectan la recuperación de la Globulina Antihemofílica se incluyen: el contenido de globulina anti hemofílica del plasma original, el tiempo entre la extracción de la sangre y el proceso de congelamiento del plasma para la obtención de la Globulina Antihemofílica, el tipo de anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio, dextrosa) o CPD(citrato de sodio, fosfato, dextrosa), condiciones de centrifugación del plasma, grupo sanguíneo del donador y la edad de los plasmas iniciales (58,60).

#### VENTAJAS DE LA OBTENCION DEL CRIOPRECIPITADO POR UNIDADES

Una ventaja clave del crioprecipitado es que se obtiene de un solo donador y cualquier unidad tiene una probabilidad muy baja de estar contaminadas con agentes infecciosos. Para el hemofílico leve y moderado que raramente necesitan terapia de reemplazo, el crioprecipitado podría ser el tratamiento de elección. Para hemofílicos severos que son tratados frecuentemente,

esto es una ventaja menor puesto que eventualmente serán expuestos a una muy grande cantidad de donadores diferentes. Otra ventaja es la de administrar crioprecipitados del mismo grupo sanguíneo y eliminar la anemia hemolftica producida después del tratamiento intensivo con crioprecipitados de grupo sanguíneo ABO diferentes (incompatibles) al receptor.

PRINCIPIOS Y FUNDAMENTOS DE LOS METODOS Y TECNICAS UTILIZADOS.  
TECNICA DE POOL Y SHANNON PARA LA OBTENCION DE CRIOPRECIPITADOS.

Esta técnica consiste fundamentalmente en congelar el plasma en una mezcla de hielo seco-alcohol y descongelarlo lentamente a 4°C durante 24 horas.

DESCONGELACION POR SIFONEO PARA LA OBTENCION DE CRIOPRECIPITADOS POR LA TECNICA DE E. C. MASON.

Esta técnica consiste en congelar el plasma en una mezcla de hielo seco-alcohol y descongelarlo rápidamente por sifoneo mediante la inmersión del plasma en agua corriente a 4°C.

ENSAYO EN DOS ETAPAS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE FACTOR VIII.

(Método de Biggs y col.) (61).

Este método está basado en la generación de tromboplastina que se obtiene en una primera etapa; y en la segunda se realiza un tiempo de coagulación con esta tromboplastina generada sobre un plasma sustrato normal.

La mezcla de reactivos para generar la tromboplastina debe contener, constante y en exceso, todos los factores necesarios salvo el Factor VIII cuya actividad se desea medir.

La tromboplastina generada se prueba por duplicado sobre un plasma sustrato normal (de 10 donadores mínimo). Esta estimación se lleva a cabo después de recalificar la mezcla de reac-

tivos incubada durante 15 a 20 minutos, y debe ser determinado para cada lote de reactivos empleados.

Se asume que el tiempo de coagulación obtenido debe ser inversamente proporcional a la actividad del factor VIII en la mezcla de reacción. A mayor tiempo de coagulación menor actividad del Factor VIII.

En la primer etapa o generación de la tromboplastina, intervienen los siguientes factores:

- Factor V de origen bovino.
- Fosfolípidos, sustituto de fosfolípidos de plaquetas.
- Suero Envejecido (que contiene los Factores VII, IX, X, XI, XII).
- Plasma absorbido (que contiene principalmente Factor VIII)
- Calcio 0.05 M.

En la segunda etapa intervienen los siguientes factores:

Calcio 0.025 M.

Plasma fresco (fuente de los Factores I,II).

La primera etapa conocida como generación de tromboplastina es activada por la vía intrínseca o por vía lenta, que se lleva a cabo al ser activado el Factor XII por contacto de superficie ejemplo vidrio, transformándolo a XII<sub>a</sub> (activado), esta proteasa actúa sobre el Factor XI dando lugar al Factor XI<sub>a</sub>, proteasa que actúa sobre el Factor IX en presencia de calcio, dando la proteasa IX<sub>a</sub> ésta con el Factor VIII modificado más fosfolípidos y calcio forman un complejo (F IX<sub>a</sub> +

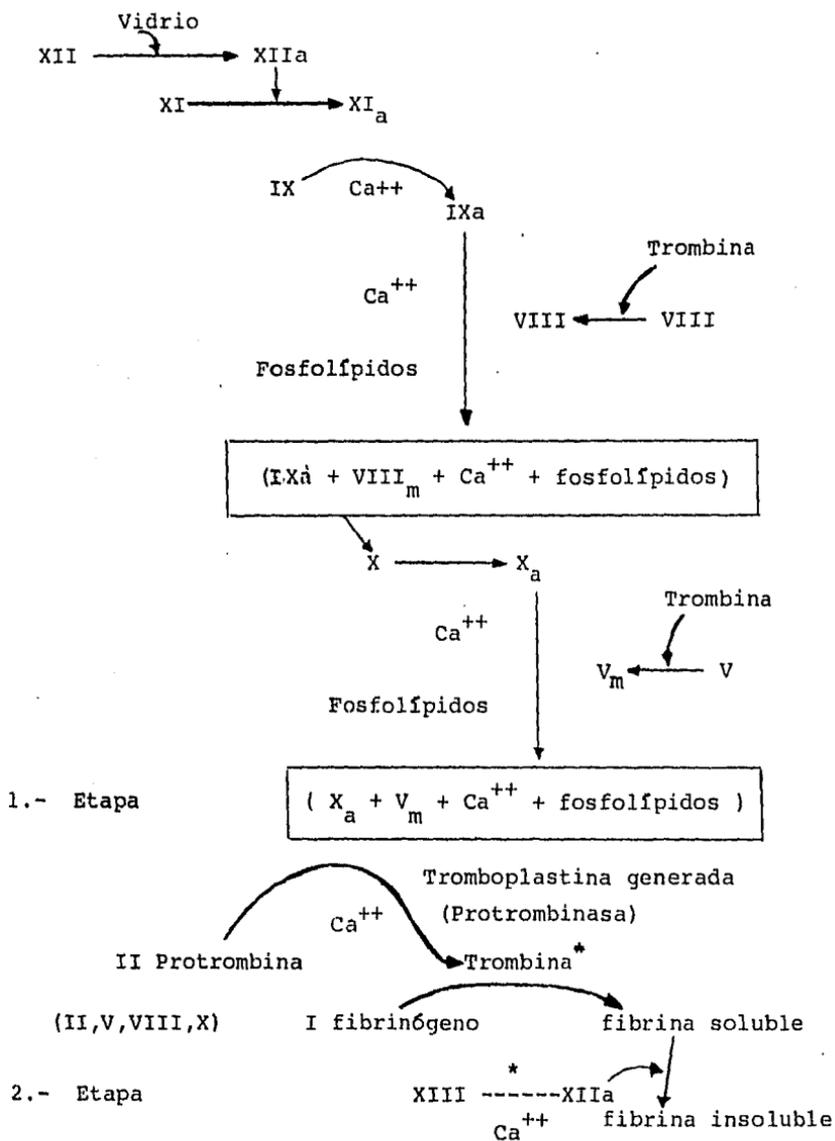
VIII<sub>m</sub> + fosfolípidos y calcio) que actúa proteolíticamente sobre el Factor X convirtiéndolo a factor X<sub>a</sub> proteasa, siendo el lugar de unión dos grupos gama carboxil glutámico del N terminal de las cadenas ligeras del Factor IX<sub>a</sub>; el fosfolípido actúa como una superficie micelar que favorece la reacción (62), y el Factor VIII actúa como cofactor acelerando la reacción 1000 veces mediante la trombina.

El Factor X<sub>a</sub> proteasa con el Factor V<sub>m</sub>, calcio y fosfolípidos forman la tromboplastina generada, este complejo se forma de una manera similar al complejo anterior donde el papel del Factor V como cofactor es similar a la del Factor VIII.

En la segunda etapa la tromboplastina generada o protrombina (X<sub>a</sub> + calcio + fosfolípidos) va a actuar sobre la protrombina, transformándola en una enzima altamente específica para el fibrinógeno, llamada trombina. Esta transformación es catalizada por el calcio y está condicionada por la acción de la tromboplastina generada en la primer etapa, sobre la protrombina. Para que esta reacción se lleve a efecto correctamente se requiere la participación del Factor II, V, VIII, X lo que se conoce como complejo protrombínico.

Esta trombina, actúa sobre el fibrinógeno (factor I) para dar fibrina soluble. (I<sub>s</sub> soluble) y ésta es activada por el factor XIII<sub>a</sub> (a su vez activado por trombina y calcio) dando fibrina insoluble (I<sub>1</sub> insoluble) (63,64).

INTERPRETACION ESQUEMATICA DE LA ACTIVACION DE LA COAGULACION  
POR LA VIA INTRINSECA EN QUE SE FUNDAMENTA ESTE METODO



a = activado

m = modificado

## DETERMINACION DE FIBRINOGENO POR EL METODO DE RATNOFF Y MENZIE.

(65).

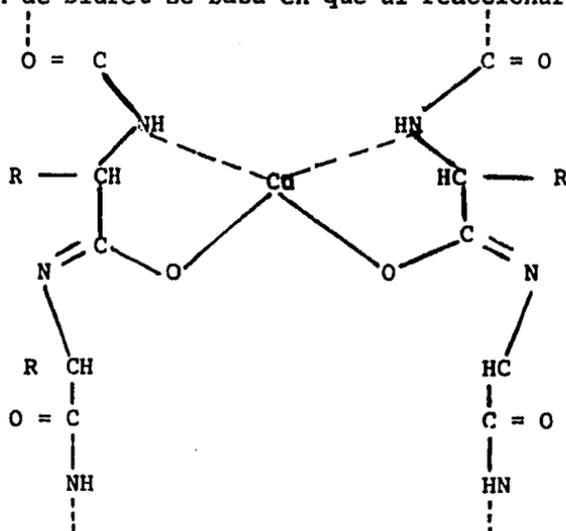
El fibrinógeno del plasma se convierte en fibrina por acción de la trombina. Esta fibrina se hidroliza y se cuantifica la cantidad de tirosina que contiene, con el reactivo de fenol de Folin Cicalteau. En solución alcalina estos compuestos son reducidos dando una coloración azul directamente proporcional a la tirosina presente.

La cantidad de tirosina que contiene el fibrinógeno es relativamente constante por lo que se puede calcular la cantidad de éste.

## DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES POR EL METODO DE "BIURET"

(66)

La reacción de Biuret se basa en que al reaccionar un reac



tivo alcalino de cobre con una sustancia que contiene dos o más

enlaces peptídicos, se produce un color azul violeta debido al complejo que se forma entre el ion cúprico y dos enlaces peptídicos adyacentes.

La intensidad del color es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos. Se mide en una longitud de onda de 540 nm.

#### DETERMINACION DE ANTICUERPOS AGLUTINANTES Y HEMOLITICOS (67).

Los anticuerpos "naturales" del grupo sanguíneo ABO, se encuentran en el plasma regularmente.

Estos pueden aglutinar y/o hemolizar los eritrocitos A y/o B cuando se ponen en contacto in vivo o in vitro en condiciones adecuadas de concentración, temperatura, complemento, etc.

Se titularon los anticuerpos aglutinantes y se buscó anticuerpos hemolíticos Anti A y/o B en los crioprecipitados.

## OBJETIVOS

Debido a que en nuestro país en la actualidad no se ha realizado ningún trabajo sobre este tema, que es muy importante ya que los crioprecipitados se utilizan en más de un 90% como terapia para los Hemofílicos debido a que su costo es relativamente económico, da niveles adecuados de Factor VIII, se obtiene de un número reducido de donantes, menor incidencia de hepatitis y no se ha descrito ningún caso de SIDA, en relación con los concentrados liofilizados comerciales preparados por la Industria Farmacéutica, su costo es elevado, además que éstos presentan un mayor riesgo de transmisión de hepatitis y un posible desarrollo de SIDA, posible desnaturalización de Factor VIII y un mayor número de isoaglutininas y de hemólisis, y son preparados de un mayor número de donadores.

Por lo tanto es importante definir una técnica adecuada para un buen rendimiento de Factor VIII en los crioprecipitados y su grado de pureza, determinando las proteínas que pueden precipitar al mismo tiempo como son: el contenido de proteínas totales, fibrinógeno y anticuerpos aglutinantes y hemolíticos. Para tener una mejor referencia sobre estos parámetros y un mejor rendimiento y aprovechamiento para los pacientes hemofílicos.

Por lo que nos planteamos los siguientes Objetivos:

- 1.- Definir las diferencias de contenido de Factor VIII, proteínas totales, fibrinógeno y anticuerpos anti AB agluti-

nantes y hemolíticos de los crioprecipitados preparados con la técnica de Pool y Shannon.

- 2.- Realizar lo mismo pero en los crioprecipitados preparados por la técnica de E. C. Mason.

## MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL BIOLOGICO.

El presente trabajo representa el estudio de 60 crioprecipitados de los cuales 35, fueron obtenidos por la técnica de E. C. Mason en el Banco Central de sangre del Centro Médico Nacional y 25 fueron obtenidos por la técnica de Pool y Shannon en el Banco de Sangre del Hospital de Urgencias y Especialidades No. 25 y enviados al Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional y en cuyo laboratorio se realizaron los ensayos correspondientes al estudio de dichos concentrados.

## TECNICA DE POOL Y SHANNON PARA LA OBTENCION DE CRIOPRECIPITADOS.

## PROCEDIMIENTO:

Los crioprecipitados son preparados de una donación sanguínea de 500 ml, de donadores habituales sin seleccionarlos, de la siguiente manera:

Se colocan asépticamente 500 ml de sangre en un sistema triple de bolsa de circuito cerrado que contiene 75 ml de solución anticoagulante ACD, (que está constituido por 2.45 g. de Dextrosa:, 800 mg de Acido Cítrico:, 2.2 g de Citrato Trisódico:, Agua inyectable c.b.p. 100 ml) se debe de agitar constantemente de 30 a 40 rpm durante la recolección. (En un agitador Hemolator "Fenwall").

El plasma se separa del paquete globular centrifugándolo

a 3000 rpm por 20 min. en una (centrífuga refrigerada "Sorvall") a 4°C, y es separado mediante el (extractor del plasma "Fenwall") pasándolo en una segunda bolsa del sistema y la primer bolsa que contiene el paquete globular, es eliminado del sistema y se reserva para el uso clínico.

Una segunda bolsa que contiene el plasma se congela a temperaturas inferiores de menos 80°C con hielo seco-alcohol y es posteriormente colocada en un cuarto a 4°C toda la noche para su descongelación.

Ya descongelado el crioprecipitado se observa como una masa blanca gelatinosa suspendida del plasma líquido, se separa el crioprecipitado del plasma centrifugándolo a 3000 rpm por 10 minutos en una (centrífuga refrigerada "Sorvall") a 4°C.

Por último se separa el sobrenadante en una tercera bolsa del sistema, y la bolsa donde queda el crioprecipitado, es separada, congelada y almacenada a menos 30°C hasta que se requiera para su uso.

#### TECNICA DE DESCONGELACION POR SIFONEO PARA LA PRODUCCION DE CRIOPRECIPITADOS (E. C. MASON).

#### PROCEDIMIENTOS:

Los crioprecipitados son preparados de una donación sanguínea de 500 ml, de donadores habituales sin seleccionarlos, de la siguiente manera:

Se colocan asépticamente 500 ml de sangre en un sistema triple de bolsa de circuito cerrado que contiene 75 ml de solución anticoagulante ACD, (que está constituido por 2.45 g de Dextrosa; 800 mg de Acido Cítrico:, 2.2 g de Citrato de Trisódico:, Agua inyectable c.b.p. 100 ml) se debe agitar constantemente de 30 a 40 rpm durante la recolección, en un (agitador Hemolator "Fenwall").

El plasma se separa del paquete globular centrifugándolo a 3000 rpm por 20 minutos en una (centrífuga refrigerada "Sorvall") a 4°C, y es separado mediante el (extractor de plasma "Fenwall") pasándolo en una segunda bolsa del sistema y la primer bolsa que contiene el paquete globular, es eliminado del sistema y se reserva para el uso clínico.

Una segunda bolsa que contiene el plasma se congela a temperaturas inferiores de menos 80°C con hielo seco-alcohol y posteriormente se coloca en un baño de agua que se mantiene entre 3 y 5°C.

Una tercera bolsa cuelga fuera del baño de agua, y alrededor de 10 minutos principia la descongelación por sifoneo (de la segunda bolsa que está en el baño, a la tercera bolsa que cuelga) hasta que la masa rectangular congelada de la segunda bolsa en el baño de agua ha disminuido a un volúmen alrededor de 25 ml. El crioprecipitado se observa como una matriz sólida fuertemente compactada en la masa congelada, este estado se alcanza de 1 hora a 1:30 de la introducción de la bolsa del

plasma congelado dentro del baño de agua.

La segunda bolsa donde se encuentra el crioprecipitado es cortada de la tercer bolsa, congelada inmediatamente y almacenada a temperaturas de menos de  $30^{\circ}\text{C}$ , hasta que se requiera para su uso.

ENSAYO EN DOS ETAPAS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE FACTOR VIII  
(Método de Biggs y col.).

A los crioprecipitados obtenidos tanto por la técnica de Pool y Shanon y la de E.C. Mason se les determinó el contenido de actividad de Factor VIII por el método de Biggs.

CURVA ESTANDAR DE FACTOR VIII

Primera etapa Generación de Tromboplastina.

Se hacen tres diluciones con citrato salino (se prepara citrato de sodio al 3.8% en agua destilada. Se toma una parte y se mezcla con 5 de cloruro de sodio al 0.9%) del estandar de trabajo plasma bovino absorbido (se toma 1 ml de plasma bovino y se le agrega 0.1 ml de gel de hidroxido de aluminio se mete a baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos, se centrifuga y se separa). Los tiempos obtenidos de estas diluciones deben estar entre 18 y 32 segundos. Estas diluciones se hacen por duplicado.

Se diluye el Factor V (Se hacen diluciones del Factor V bovino de 1:5 a 1:10 con solución salina fisiológica 0.9% y se prueba su actividad con un tiempo de tromboplastina parcial de

la siguiente manera):

0.1 ml de plasma deficiente de Factor V

0.1 ml de plasma V bovino diluido 1:5 a 1:10

Se incuba durante 3 minutos a 37°C y se le añade 0.1 ml de tromboplastina cálcica y se toma el tiempo de coagulación. Se hace también una determinación de Factor VIII para ver si no se encuentra contaminado con este factor.

El fosfolípido (extracto clorofórmico de cerebro de conejo) se diluye con solución salina fisiológica 0.9% 1:10 a 1:40 dependiendo de su actividad que se prueba con un tiempo de tromboplastina parcial de la siguiente manera:

0.1 ml de fosfolípido diluido 1:10 a 1:40

0.1 ml de plasma normal fresco (10 donadores mínimos)

0.1 ml de Caolín (5 mg de caolín en 1 ml de agua destilada).

Se mezclan y se incuba durante 3 minutos a 37°C y se le adiciona 0.1 ml de cloruro de calcio 0.025 M y se toma el tiempo de coagulación.

Suero Envejecido (se toma sangre de 10 donadores en condiciones estériles se incuba durante 6 horas a 37°C, después a 4°C toda la noche, se separa el suero con pipeta estéril en alícuotas de 1 ml y se liofiliza. Antes de emplearse se hace una dilución de 1:10 (o dilución óptima) con una solución amortiguadora de imidazol pH 7.3 (se pesa 0.68 g de imidazol y 1:17 g de cloruro de sodio se disuelve en 100 ml de agua destilada aproximadamente, se agregan 37.2 ml de HCl 0.1 N y se afo

ra a 200 ml con agua destilada y se mide el pH). Se guarda a 4°C durante 24 horas para su activación completa: Su actividad se prueba haciendo un tiempo de tromboplastina parcial de la siguiente manera:

0.1 ml de plasma deficiente de factor X

0.1 ml de suero envejecido 1:5 a 1:30 con solución amortiguadora de imidazol a pH de 7.3. Se mezcla y se incuba durante 3 minutos a 37°C y se le añade 0.1 ml de tromboplastina cálcica y se toma el tiempo de coagulación.

Ya preparadas las diluciones del estandar de trabajo y las diluciones óptimas de Factor V, fosfolípidos y suero envejecido se procede de la siguiente manera para la generación de tromboplastina.

Se coloca en 6 tubos nuevos de 10 x 75 mm 0.1 ml de Factor V, 0.1 ml de fosfolípido y 0.1 ml de suero envejecido, esto se realiza sobre hielo y se mezcla perfectamente el contenido de estos tubos. Este procedimiento se indica en el (cuadro No. 1).

Se agrega 0.1 ml de cada una de las diluciones del estándar de trabajo a cada uno de los 6 tubos de la mezcla anterior (cada dilución se hace por duplicado) este paso se realiza también sobre hielo y se empieza por la dilución más alta como se indica en el (cuadro No. 2).

Se mezcla perfectamente el contenido de los tubos (que se presentan en el cuadro No. 2) y se le añade cloruro de cal-

cio 0.05M en el rango de 0 a 5 minutos este procedimiento se realiza en un baño María a 37°C. Esto se indica en el cuadro No. 3).

A los 15 minutos se colocan en el baño María a 37°C 6 tubos de 10 x 75 mm (nuevos) conteniendo cada uno 0.2 ml de cloruro de calcio de 0.025 M, y un tubo con 1.4 ml de plasma sustrato (figura No. 2).

La segunda etapa se lleva a cabo de la siguiente manera: Al minuto 17 con 40 segundos, se pasa 0.1 ml de la mezcla del tubo No. 1 al tubo que contiene cloruro de calcio enfrente de él. Al minuto 18 a este mismo tubo se agregan 0.2 ml de plasma sustrato y simultáneamente se acciona el cronómetro.

Se observa la formación del coágulo y se para el cronómetro y se reporta el tiempo obtenido (que no debe exceder de 32 segundos).

Al minuto 18 con 40 segundos se repite la operación con el tubo No. 2 y así sucesivamente hasta el tubo No. 6 (figura No. 3).

El tiempo de coagulación de los dos últimos tubos deben dar un tiempo mínimo de 18 segundos.

Se grafica tiempo (en segundos) contra dilución (en %) en un papel semilogarítmico tomando la dilución más concentrada como 100% (Gráfica No. 1).

Para determinar la actividad de Factor VIII en los crioprecipitados se realizó de la siguiente manera:

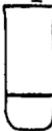
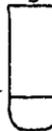
Se descongelan en un baño María a 37°C y se restituyeron con 10 ml de solución salina fisiológica (0.9%). Se hacen las diluciones y se procede de la misma forma que para la curva estándar.

Para calcular las unidades de Factor VIII en los crioprecipitados analizados se hace de la siguiente manera:

Se interpolan los datos obtenidos de las diluciones correspondientes (en segundos) y se obtiene el resultado en % de factor VIII este valor obtenido se multiplica por el volumen total que contiene la bolsa de crioprecipitado y se divide por 100.

$$\text{UNIDADES DE FACTOR VIII} = \frac{\% \text{ de Factor VIII} \times \text{Volumen Total}}{100}$$

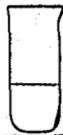
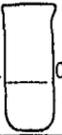
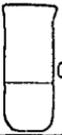
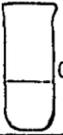
CUADRO No. 1  
MEZCLA DE FACTOR V, FOSFOLIPIDO Y SUERO ENVEJECIDO  
PARA LA PRIMER ETAPA

Tubo No.	1	2	3	4	5	6
						
	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml
	0.3 ml mezcla de Factor V + Fosfolípido Suero Envejecido					
Factor V dil.	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
Fosfolípido "	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
Suero Env. "	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml

Este procedimiento se realizó sobre hielo a 4°C.

CUADRO No. 2

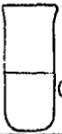
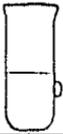
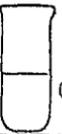
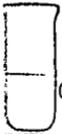
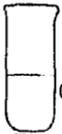
A la mezcla de los tubos del cuadro No. 1 se le añade 0.1 ml de cada una de las diluciones del estándar de trabajo o problema.

	Tubo No 1	2	3	4	5	6
Dil. del estándar de trabajo	 0.4ml	 0.4ml	 0.4ml	 0.4ml	 0.4ml	 0.4ml
	0.3 ml de la mezcla realizada en el Cuadro No. 1 + 0.1 ml del estándar diluido.					
1:256	0.1ml	0.1ml				
1:128			0.1ml	0.1ml		
1:64					0.1ml	0.1ml

Esto se realizó sobre hielo a 4°C.

CUADRO No. 3

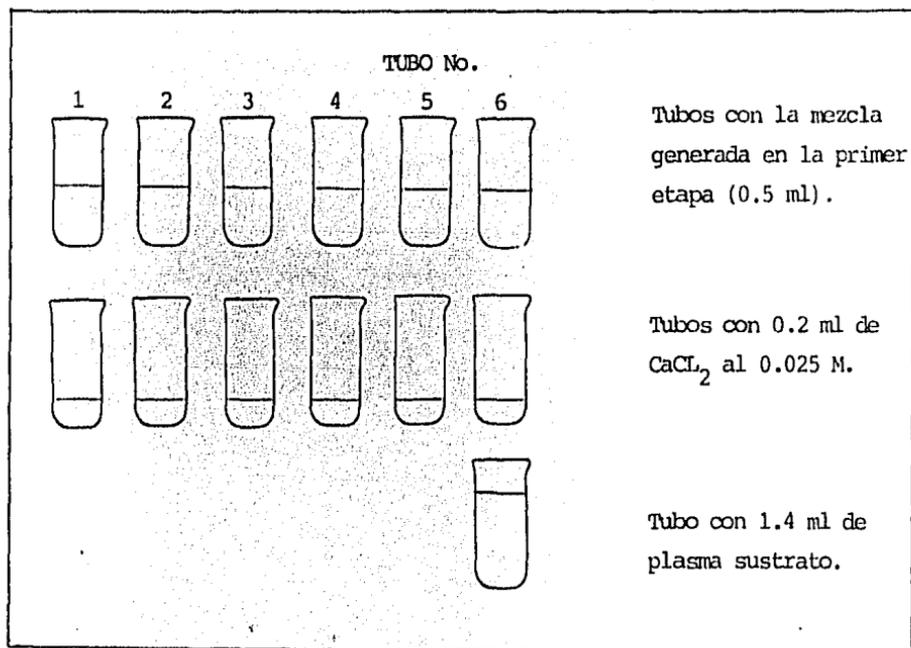
A los tubos del Cuadro No. 2 se le añade cloruro de calcio 0.05 M.

	Tubo No. 1	2	3	4	5	6
	 0.5ml	 0.5ml	 0.5ml	 0.5ml	 0.5ml	 0.5ml
Minutos	0.4 ml de la mezcla del Cuadro No. 2 + 0.1ml de $\text{CaCl}_2$ 0.05M.					
0	0.1ml					
1		0.1ml				
2			0.1ml			
3				0.1ml		
4					0.1ml	
5						0.1ml

Este procedimiento se realizó en un baño María a 37°C.

FIGURA No. 2

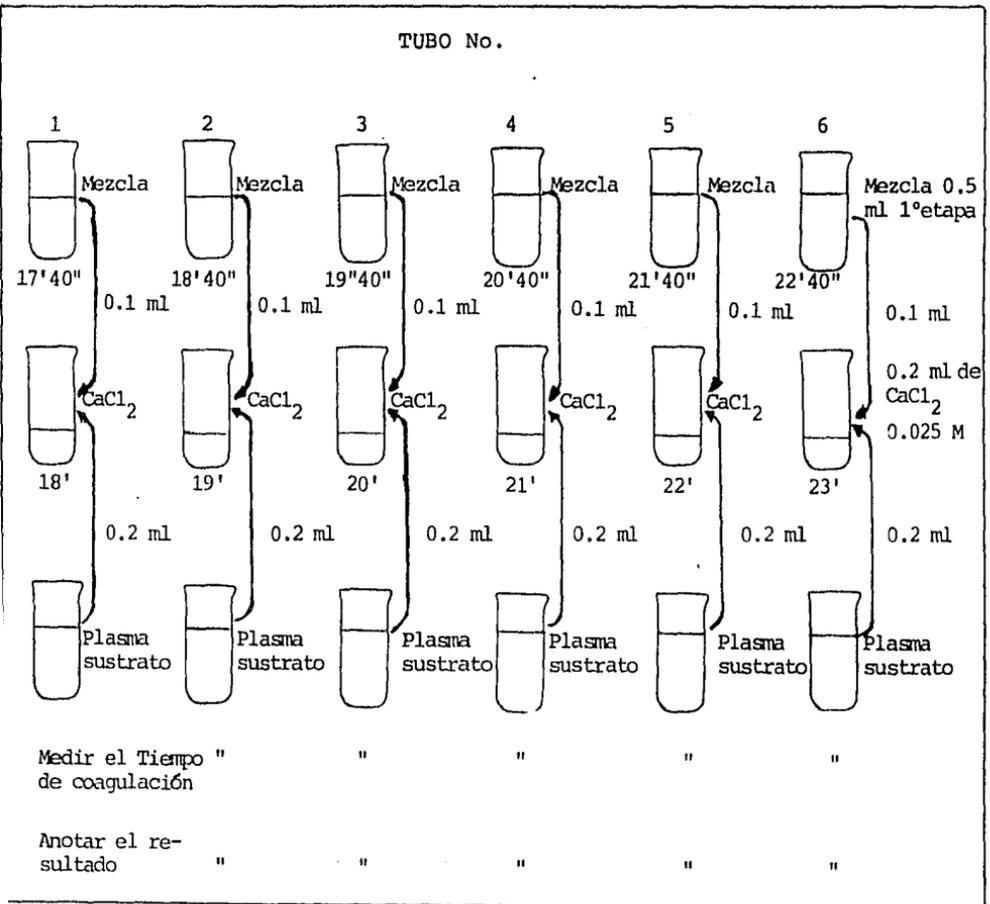
Esta figura nos indica como quedan los tubos en el baño María para iniciar la segunda etapa.



Esto se realizó dentro de un baño María a 37°C.

FIGURA No. 3

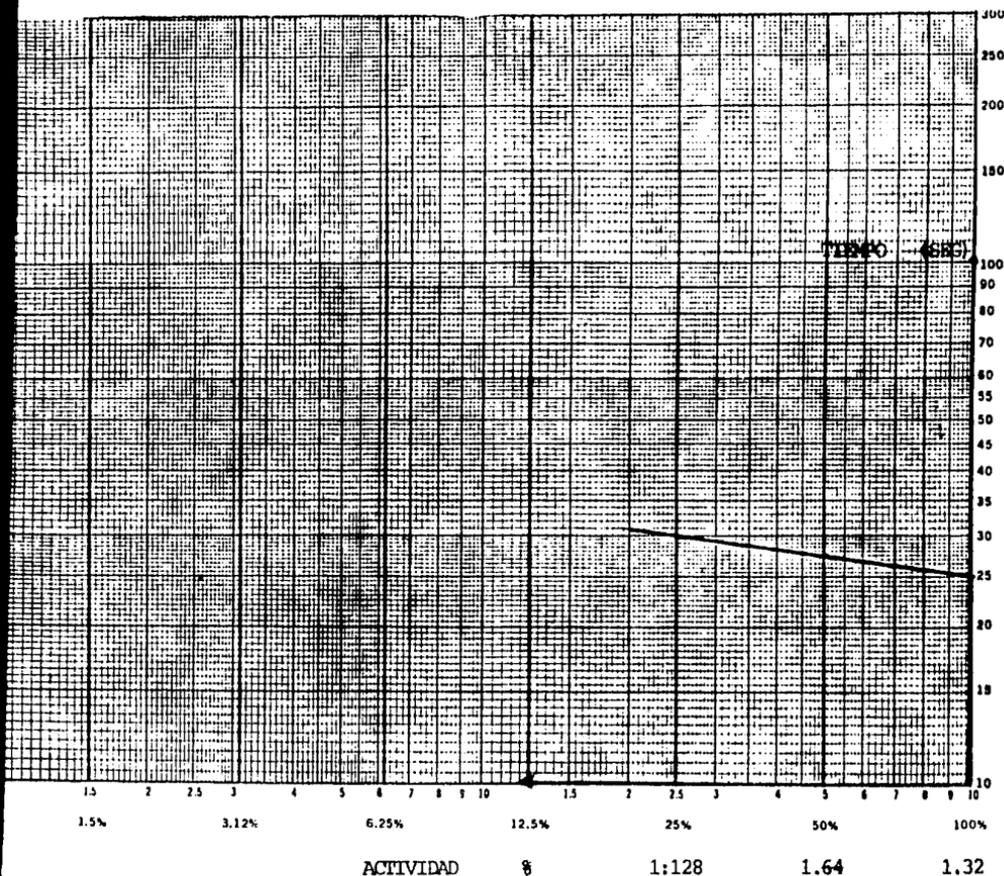
Esta figura nos indica como se realizó el tiempo de coagulación (segunda etapa) que nos mide la tromboplastina generada en la primer etapa.



Los resultados se obtienen en segundos se grafica contra la dilución (en %) (Gráfica No. 1).

## GRAFICA No. 1

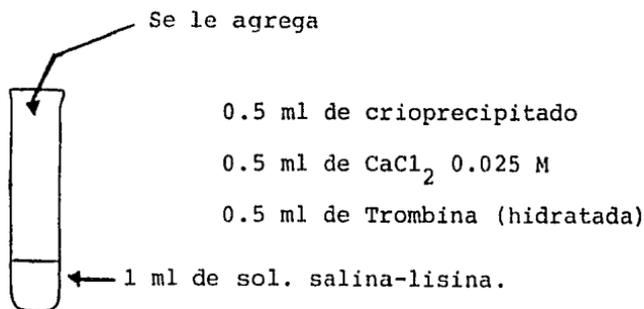
Curva estandar para la actividad de Factor VIII



Esta curva estandar se realizó con un estandar de Factor VIII bovino, haciendo 3 diluciones 1:32, 1:64, 1:128. Los resultados obtenidos en segundos se grafica contra la dilución (%) tomando la dilución más concentrada como 100%.

## DETERMINACION DE FIBRINOGENO POR EL METODO DE RATNOFF Y MENZIE.

En un tubo de ensayo 13 x 75 mm se coloca 1 ml de solución salina-lisina (se pesan 50 mg de L-lisina (sigma Chemical) y se colocan en 100 ml de 0.15 M de cloruro de sodio (se pesan 8.7 g de cloruro de sodio y se afora a 100 ml) y se agrega 0.5 ml de crioprecipitado (disuelto en 10 ml de solución salina fisiológica y se homogeniza) más 0.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.025 M (se hace una dilución 1:40 a partir de  $\text{CaCl}_2$  1 M). Y a todo esto se agrega 0.5 ml de trombina (trombina humana Fibrindex MR 50 Us).



Se agita con una varilla de vidrio lentamente y la fibrina que se empieza a formar en la varilla (aproximadamente a los 5 minutos) debe enrollarse cuidadosamente, para evitar que se rompa, después que se termina de formar completamente el coágulo éste es prensado entre la varilla y el tubo cuidadosamente.

El coágulo de fibrina es lavado con solución salina-lisina, prensando la varilla que contiene la fibrina dentro del tubo de ensayo de 13 x 100 mm, que contiene la solución salina-lisina y se deja reposar durante 10 minutos dentro del tubo, este procedimiento se hace dos veces.

Se pasa la varilla con la fibrina ya lavada y escurrida sobre una gasa a un tubo de 15 ml cónico graduado y se le agrega 1 ml de NaOH 2.5 N (se pesan 100 g de NaOH y se afora a 100 ml), la fibrina debe quedar sumergida. Así se coloca en un baño María a ebullición durante 10 minutos, para que se disuelva la fibrina. Después de este tiempo se le agrega 2 ml de HCl 1 N (Merck), la varilla de vidrio se remueve lavándola con agua destilada. Otra vez se homogeniza muy bien y de ésto, se toma una alicuota de 2.5 ml se le añade 1.5 ml de carbonato de sodio al 20% (se pesan 23.3 g de carbonato de sodio hidratado y se disuelve en 100 ml en agua destilada) más 2.5 ml de reactivo de fenol diluido (del reactivo de fenol 2 N se hace una dilución 1:10 quedando una normalidad de 0.2 N).

La mezcla se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para desarrollo de color y se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 710 nm en celdillas de vidrio de 12 x 75 mm. Se lleva a 100% de transmitancia la aguja del espectrofotómetro con un blanco de reactivo trabajado en la misma forma que el problema (sin plasma).

En cada determinación se usó como control una mezcla de plasma de 10 donadores habituales.

La lectura de cada problema se transforma a mg de fibrinógeno por dl, utilizando la curva de referencia, que es trazada en un papel milimétrico, colocando los mg de tirosina o su conversión a fibrinógeno en las ordenadas y la absorbancia en

las abcisas (Gráfica No. 2).

#### PREPARACION DE LA CURVA DE REFERENCIA PARA FIBRINOGENO.

El fibrinógeno contiene 8.547 de tirosina. La reacción de color empleada en la determinación de fibrinógeno es debido a la fracción de tirosina que contiene. La solución Madre se prepara en esta sustancia y por lo tanto debe quedar asentado que 1 mg de tirosina equivale a 11.7 mg de fibrinógeno.

$$\frac{100}{8.547} = 11.7 \text{ mg de fibrinógeno}$$

Esto se prepara inicialmente de una solución madre de tirosina (se pesan 20 mg de L-Tirosina (Fisher) y se colocan en 100 ml de HCl 0.05 N (se hace una dilución de 1:50 a partir de HCl 1 N).

En 6 tubos de ensayo de 13 x 75 mm se colocan 7.0 ml de agua destilada, luego se le agrega a cada tubo (0,0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml) respectivamente de la solución madre de tirosina. Se le añade a cada tubo 1 ml de NaHO 2.5 N y 2 ml de HCl 1 N, homogenizando perfectamente el contenido de cada tubo. De esta mezcla se pasan 2.5 ml a tubos de ensayo de 18 x 100 mm y se le agrega 1.5 ml de carbonato de sodio al 20% más 2.5 ml de fenol diluido.

Se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 710 nm, llevando a 100% de transmitancia con la muestra No. 1

Cálculos para la curva estandar de fibrinógeno.

Tubo No.	Mg. de tirosina	<sup>a</sup> mg/dl de fibrinógeno
1	0.0	0.0 (Blanco de reactivo)
2	0.04	93.6
3	0.08	187.2
4	0.12	280.8
5	0.16	374.4
6	0.2	468.0

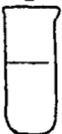
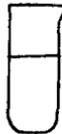
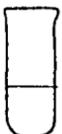
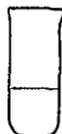
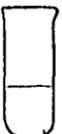
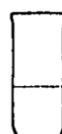
<sup>a</sup> Este resultado fue obtenido después de multiplicar la concentración de tirosina en cada tubo x 2 que es el factor para tener 1 ml de la muestra) x 11.7 (ya que un mg de tirosina tiene 11.7 mg de fibrinógeno) x 100 para obtenerlo en mg/dl.

Ejemplo:

mg de tirosina x 2 x 11.7 x 100 = mg / dl de fibrinógeno.

FIGURA No. 4

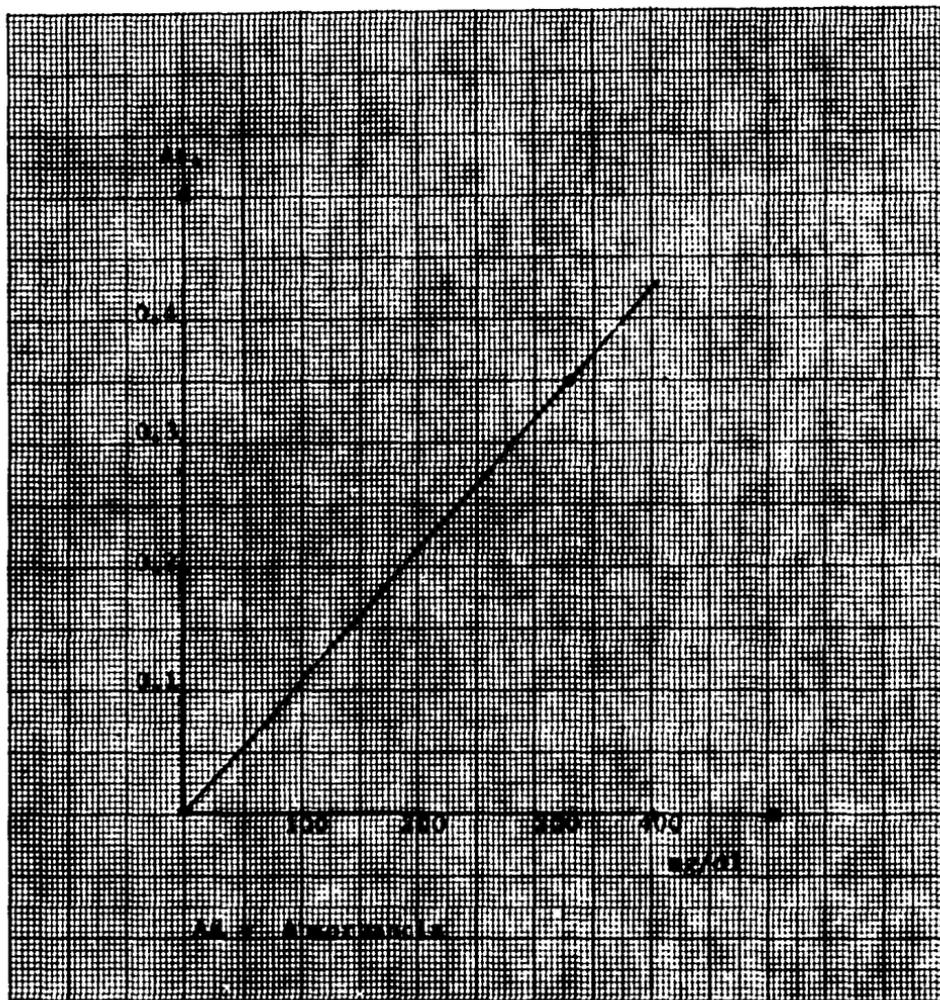
## REPRESENTACION ESQUEMATICA PARA EL METODO DE FIBRINOGENO.

TUBO No.					
1	2	3	4	5	6
					
AGUA DESTILADA					
7 ml	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml
SOLUCION DE TIROSINA MADRE					
0.0 ml	0.2 ml	0.4 ml	0.6 ml	0.8 ml	1.0 ml
HIDROXIDO DE SODIO 2.5 N					
1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
ACIDO CLORHIDRICO 1 N					
2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Se mezcla muy bien y de esto se pasa 2.5 ml a otros 6 tubos					
2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
					
CARBONATO DE SODIO					
1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
FENOL DILUIDO					
2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml

Se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente y se lee a una longitud de onda de 710 nm.

## GRAFICA No. 2

CUERVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE FIBRINOGENO



Esta curva estandar se realizó a partir de una solución madre de tirosina de 20 miligramos haciendo 5 diluciones diferentes de ésta. Y se leyó a una longitud de onda de 710 nanómetros.

## DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES POR EL METODO DE "BIURET"

Se colocan 3 tubos de ensayo de 18 x 100 mm y se numeran del 1 al 3. Al tubo No. 1 se le agrega 9.5 ml de NaCl al 0.85% y 0.5 ml de la muestra diluida (1:20) del tubo No. 1. Al tubo No. 3 que es el blanco de reactivo se le agrega 2 ml de NaCl al 0.85%. A cada tubo se le agregan 8 ml del reactivo de Biuret y se mezclan por inmersión, y se dejan reposar todos: problema y blanco 30 minutos a temperatura ambiente y se lee el cambio de color azul desarrollado a una longitud de onda de 450 nm usando celdillas de vidrio de 12 x 75 mm.

Ajustando previamente a 100% de transmitancia con el contenido del tubo No. 3 que es el blanco de reactivo (no contiene proteínas) Los resultados se interpolan en la curva estandar preparada con diluciones del control de proteínas (Monitor-1 MR Dade).

## CURVA ESTANDAR PARA PROTEINAS TOTALES

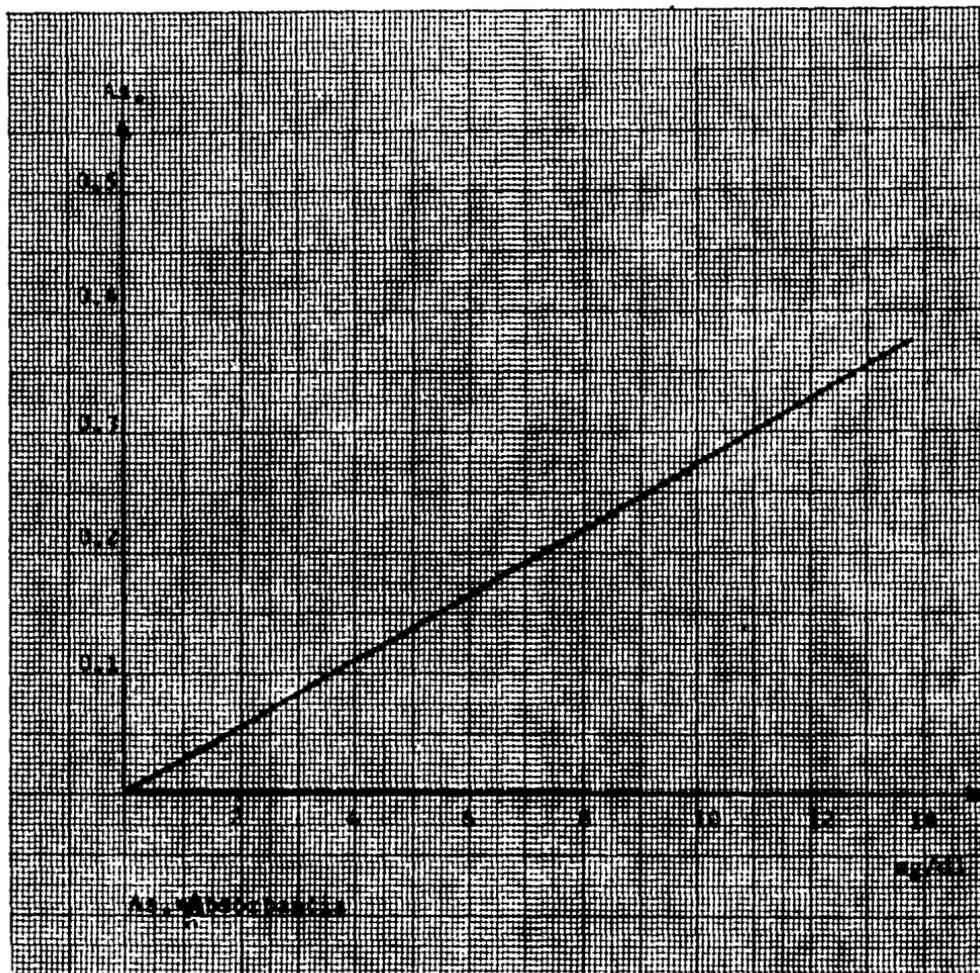
De un control químico de concentración conocida (Monitor-1 MR que contiene 6.5 gramos en 100 ml, de proteínas totales), se hizo una dilución 1:10 (1.0 ml de monitor-1 MR más 9 ml de NaCl 0.85%) y se colocaron de la siguiente manera en tubos de 18 x 100 mm.

<u>Tubo No.</u>	<u>Sol. Salina</u>	<u>Monitrol-1 MR</u>	<u>Concentrado de protefna gr/dl</u>
1	2.0 ml	0.0 ml	0.0
2	1.5 ml	0.5 ml	3.25
3	1.0 ml	1.0 ml	6.50
4	0.5 ml	1.5 ml	9.75
5	0.0 ml	2.0 ml	13.00

Después de esto se le agregó 8 ml del reactivo de Biuret y se mezclan por inmersión. Se dejan reposar 30 minutos a temperatura ambiente y se lee el color azul desarrollado a una longitud de onda de 450 nm en celdillas de vidrio de 12 x 75 mm. Ajustando previamente a 100% de transmitancia con el contenido del tubo No. 3 y se hacen las lecturas de los demás tubos. En un papel milimétrico se traza la curva de la siguiente manera. Los gr/dl de proteínas totales en las abcisas y las absorban-  
cias en las ordenadas (gráfica No. 3).

## GRAFICA No. 3

CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES.



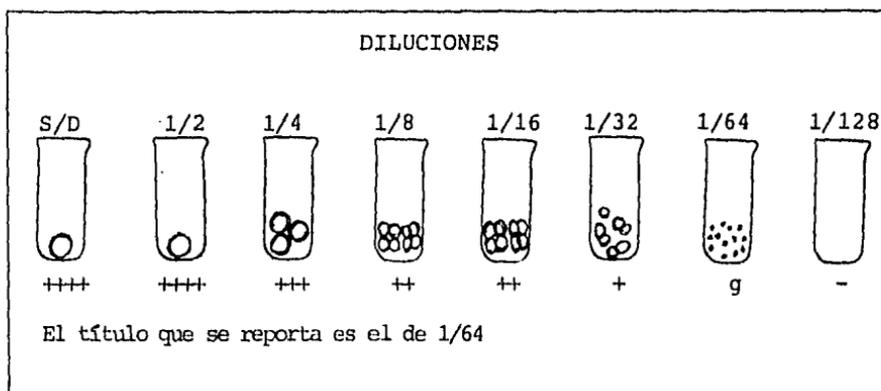
Esta curva estandar se realizó a partir de un control químico de Monitrol-1 MR que contiene 6.5 gramos en 100 mililitros de proteínas totales haciendo 5 diluciones diferentes de ésta, y se leyó a una longitud de onda de 540 nanómetros.

### PROCEDIMIENTO PARA ANTICUERPOS AGLUTINANTES

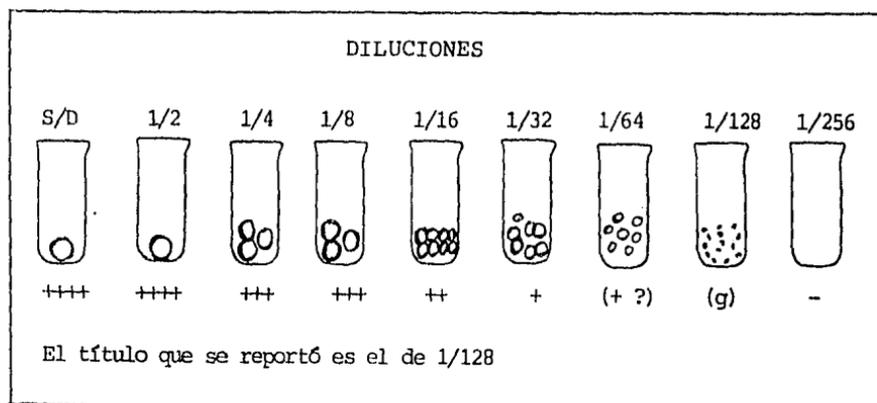
Se colocan una serie de tubos de 12 x 75 mm marcados con la dilución respectiva del crioprecipitado S/D, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512. A partir del segundo tubo se agregan 2 gotas de solución salina fisiológica (0.9%) a cada uno de los tubos. Luego de este paso, al primer y segundo tubo se le agregan dos gotas de crioprecipitado (ya homogenizado con 10 ml de solución salina fisiológica (0.9%). El segundo tubo se homogeniza perfectamente y de este se pasan 2 gotas al tercer tubo y así sucesivamente. Las diluciones quedan como sigue:

Tubo No. 1	Tubo No. 2	Tubo No. 3	Tubo No. 4	Tubo No. 5
Sin diluir	1/2	1/4	1/8	1/16
Tubo No. 6	Tubo No. 7	Tubo No. 8	Tubo no. 9	Tubo No. 10
1/32	1/64	1/128	1/256	1/512

A cada uno de estos tubos se le agregan 2 gotas de suspensión al 2% de eritrocitos lavados de grupo conocido y se mezclan perfectamente el contenido de los tubos. Se centrifugan a 2500 rpm por 30 segundos, después de esto se resuspenden los botones celulares de cada uno de los tubos por agitación moderada y se observa contra una fuente de luz blanca, el grado de aglutinación, anotándose de inmediato. El título se reporta como el inverso de la última dilución que de graniento (g) macroscópicamente. Ejemplo:



Una vez leídos los tubos se incuban a 37°C, se centrifugan a 250 rpm por 30 segundos, y se lee de nuevo y se reporta de la manera anterior. Ejemplo:



#### PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACION DE ANTICUERPOS HEMOLITICOS

En un tubo de ensayo de 12 x 75 mm se colocan 2 gotas de crioprecipitado (ya homegenizado con 10 ml de solución salina fisiológica 0.9%). Después se le adicionan dos gotas de eritrocitos de grupo conocido lavados y suspendidos al 5% en solución salina fisiológica 0.9%). Y a esto se le adiciona 1 go

ta de suero AB como fuente de complemento (fresco o liofilizado) y se mezcla perfectamente.

Con este mismo método se montan 3 tubos: Uno con eritrocitos A uno con eritrocitos B y otro con los propios del mismo grupo del crioprecipitado o eritrocitos del grupo O (autotestigo). Se incuban a 37°C durante 2 horas; cuando transcurra 1 hora se mezcla el contenido de los tubos con agitación moderada y se dejan otra hora dentro del baño María a 37°C.

Pasadas las dos horas se observa si hay hemólisis, según el aspecto del sobrenadante en los tubos que contengan los eritrocitos A o B y el auto testigo.

**INTERPRETACION:**

**HEMOLISIS PARCIAL:** los tubos con las células A o B muestran un grado ligero de hemólisis, comparado con el autotestigo.

**HEMOLISIS TOTAL:** No se observan eritrocitos suspendidos en el sobrenadante, ya que se encuentran totalmente hemolizados.

**NEGATIVO:** sin hemólisis.

**RESULTADOS:**

Se determinó el contenido de Factor VIII (en unidades) en 60 crioprecipitados, 35 fueron obtenidos por la técnica de E. C. Mason y 25 por la técnica de Pool y Shannon, a estos resultados se les determinó el valor promedio ( $\bar{x}$ ), la desviación estandar (D.E.) y la prueba t de student, para comparar la diferencia entre los promedio con un nivel de significancia del 5%.

En la tabla No. 1 y 2 se observa un promedio mayor de actividad en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de E. C. Mason que los obtenidos por la técnica de Pool y Shannon. También se representa el promedio ( $\bar{x}$ ) de actividad de Factor VIII por grupo sanguíneo de cada crioprecipitado según la técnica, obteniendo un mayor contenido de actividad, en los del grupo sanguíneo A, O, B respectivamente (gráfica No. 4).

Se puede observar que la probabilidad es menor de 0.05 esto nos indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de cada técnica. Se puede deducir que el incremento de Factor VIII en los crioprecipitados al utilizar la técnica de E.C. Mason es probablemente significativo.

También a cada crioprecipitado se les determinó el contenido de proteínas totales y de fibrinógeno, se encontró un contenido mayor de proteínas totales y un contenido menor de fibrinógeno en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de

E. C. Mason, siendo lo contrario para los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Pool y Shannon ya que se obtuvo un menor contenido de proteínas totales y un mayor contenido de fibrinógeno (tabla No. 3).

La probabilidad obtenida fue mayor de 0.05, lo que nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los dos métodos utilizados.

Para estos dos métodos se realizaron 12 controles normales (mezcla de plasma de 10 donadores como mínimo) a los cuales se les determinó el promedio  $\bar{x}$  y la desviación estandar (D.E.) (tabla No. 3).

De los anticuerpos aglutinantes en solución salina que se determinaron en los crioprecipitados, aquellos con título mayor de 1/200 se pueden considerar como peligrosos.

Por la técnica de Pool y Shannon se obtuvieron los siguientes resultados: De 8 crioprecipitados del Grupo A, sólo se obtuvo 1 anti B con un título de 1/256, de 4 crioprecipitados del grupo B no se obtuvo ninguno, de 13 crioprecipitados del grupo O se obtuvieron 2 anticuerpos anti B, uno con un título de 1/256 y otro de 1/512 (tabla No. 4).

Por la técnica de E. C. Mason se obtuvieron los siguientes resultados: De 11 crioprecipitados del grupo se obtuvieron 2 anticuerpos anti B con títulos de 1/256 y otro con un título de 1/2048. De 17 crioprecipitados del grupo B se obtuvieron

ron 2 anticuerpos anti A con un título de 1/256. de 7 crioprecipitados del grupo O se obtuvieron un anticuerpo anti B con un título de 1/256 y 2 anticuerpos anti A con títulos de 1/512 (tabla No. 5).

En cuanto a la actividad de los anticuerpos hemolíticos determinados en los crioprecipitados según la técnica de obtención, tenemos los siguientes resultados: Técnica de Pool y Shannon: De 8 crioprecipitados del grupo A no se encontró actividad de anticuerpos hemolíticos. De 4 crioprecipitados del grupo B no se encontró actividad de anticuerpos hemolíticos. De 13 crioprecipitados del grupo O se encontraron 2 crioprecipitados con actividad de anticuerpos hemolíticos anti B con títulos de 1/256 y 1/512 (tabla No. 6).

Técnica de E. C. Mason: De 11 crioprecipitados del grupo A no se encontró actividad de anticuerpos hemolíticos. De 17 crioprecipitados del grupo B se encontraron 2 crioprecipitados con actividad de anticuerpos hemolíticos anti A con títulos de 1:128 y 1/256. De 7 crioprecipitados del grupo se encontraron 5 crioprecipitados con actividad de anticuerpos hemolíticos, 3 anti A con títulos de 1 con 1/128 y 2 con 1/512 y 2 anti B con títulos de 1/64 y 1/256 (tabla No. 7).

TABLA No. 1

## TECNICA DE E. C. MASON

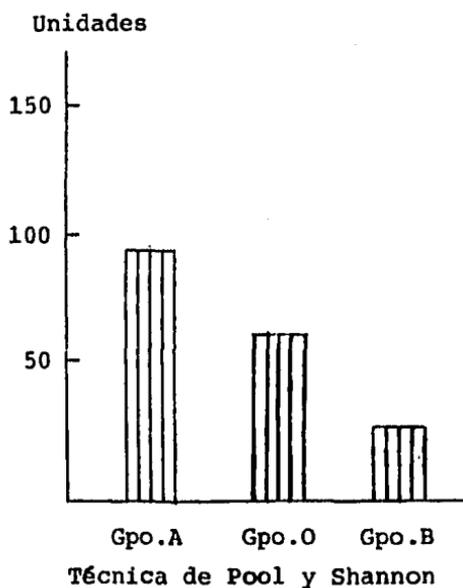
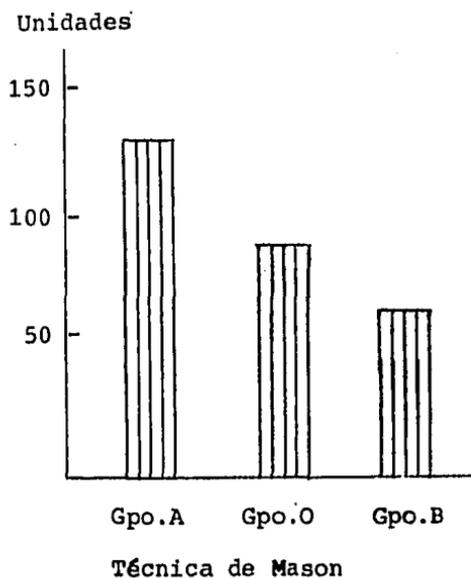
Grupo Sanguíneo	No. de Muestras	$\bar{x}$	D.E.	Valor de p
A	11	146.68	64.89	$p < 0.05$
O	17	88.56	28.82	$p < 0.05$
B	7	79.58	52.53	$p < 0.05$
A,B,O	35	108.44	85.68	$p < 0.05$

TABLA No. 2

## TECNICA DE POOL Y SHANNON

Grupo sanguíneo	No.de muestras	$\bar{x}$	D. E.	Valor de p
A	8	95.42	60.54	$p < 0.05$
O	4	58.71	26.38	$p < 0.05$
B	13	32.33	24.89	$p < 0.05$
A,B,O	25	71.08	66.91	$p < 0.05$

GRAFICA No. 4



Representación gráfica del contenido de actividad de Factor VIII (en unidades) obtenidas según el grupo sanguíneo ABO, y la técnica de obtención. Se puede observar que el grupo sanguíneo que contiene mayor actividad de Factor VIII en los crioprecipitados es el "A", en ambas técnicas.

TABLA No. 3

CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES Y DE FIBRINOGENO EN LOS CRIOPRE  
PITADOS SEGUN LA TECNICA DE OBTENCION.

PROTEINAS TOTALES

<u>TECNICA DE POOL</u>		<u>TECNICA DE MASON</u>		Valor de p
$\bar{x}$	D.E.	$\bar{x}$	D.E.	
4.27 g/dl	1.09	3.69 g/dl	1.34	p > 0.05
<u>FIBRINOGENO</u>				
$\bar{x}$	D.E.	$\bar{x}$	D.E.	Valor de p
411.33 mg/dl	232.83	539.14 mg/dl	300.87	p > 0.05

VALORES CONTROLESPROTEINAS TOTALESFIBRINOGENO

$\bar{x}$	D. E.	$\bar{x}$	D. E.
6.09 g/dl	0.401	282.93 mg/dl	24.88

TABLA No. 4

TITULOS DE ANTICUERPOS AGLUTINANTES DE CRIOPRECIPITADOS OBTENIDOS POR  
LA TECNICA DE POOL Y SHANNON

TITULOS															
		ANTI B						ANTI A							
GRUPO	No.DE	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	<u>1/32</u>	<u>1/64</u>	<u>1/128</u>	<u>1/256</u>	<u>1/512</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	<u>1/32</u>	<u>1/64</u>	<u>1/128</u>	<u>1/256</u>	<u>1/512</u>
<u>SANGUINEO</u>	<u>MUESTRA</u>														
A	8		4	2	1		<u>1</u>								
B	4								1	2	1				
O	13	3	1	3	2	2	<u>1</u>	<u>1</u>		2	5	2	3		<u>1</u>

De 25 crioprecipitados obtenidos por esta técnica, 4 presentaron títulos mayores de 1/200.

TABLA No. 5

TITULOS DE ANTICUERPOS AGLUTINANTES DE CRIOPRECIPITADOS OBTENIDOS

POR LA TÉCNICA DE E.C. MASON

		TITULOS																		
		ANTI B									ANTI A									
<u>Gpo. san- quíneo</u>	<u>No. de muestras</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	<u>1/32</u>	<u>1/64</u>	<u>1/128</u>	<u>1/256</u>	<u>1/512</u>	<u>1/1024</u>	<u>1/2048</u>	<u>1/2</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>	<u>1/16</u>	<u>1/32</u>	<u>1/64</u>	<u>1/128</u>	<u>1/256</u>	<u>1/512</u>	
A	11		1	2	1	4	<u>2</u>			<u>1</u>										
B	17										1		2	3	3	1	5	<u>2</u>		
O	7			3	1	1	<u>1</u>					1	1				2		<u>2</u>	

De 35 crioprecipitados obtenidos por esta técnica, 8 presentaron títulos mayores de 1/200

TABLA No. 6  
 ANTICUERPOS HEMOLITICOS DE CRIOPRECIPITADOS OBTENIDOS POR LA  
 TECNICA DE POOL Y SHANNON

<u>GRUPO SANGUINEO</u>	<u>No. DE MUESTRAS</u>	<u>ANTICUERPOS HEMOLITICOS</u>	
		<u>ANTI A</u>	<u>ANTI B</u>
A	8	—	Todos los crioprecipitados analizados, negativos.
B	4	Todos los crioprecipitados analizados, Negativos.	—
O	13	Todos los crioprecipitados analizados negativos	Dos crioprecipitados presentaron Hemólisis parcial: 1/256 y 1/512.

De 25 crioprecipitados obtenidos por esta técnica, 2 crioprecipitados presentaton actividad Hemolítica.

TABLA No. 7

ANTICUERPOS HEMOLITICOS DE CRIOPRECIPITADOS OBTENIDOS POR LA  
TECNICA DE E.C. MASON

GRUPO SANGUINEO	No. DE MUESTRAS	ANTICUERPOS HEMOLITICOS	
		ANTI A	ANTI B
A	11	—	Todos los crioprecipitados analizados, negativos.
B	17	Dos crioprecipitados con hemolisis parcial: 1:128, 1:256.	—
O	7	Tres crioprecipitados con hemolisis parcial: 1-1/128 y 2-1/512.	Dos crioprecipitados con hemolisis parcial: 1/164 y 1/256.

De 35 crioprecipitados obtenidos por esta técnica, 5 crioprecipitados presentaron actividad Hemolítica.

## DISCUSION

La actividad del F-VIII de los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Pool y Shannon en este estudio presentaron una actividad menor que los preparados por la técnica de Mason (tabla No. 1 y 2). Esta diferencia puede ser debida a la descongelación lenta a 4°C durante 24 horas, que sumado al tiempo de centrifugación para separarlo del plasma residual lo que prolonga el tiempo de procesamiento (68). La temperatura de centrifugación es crítica durante esta etapa, ya que si no está rigurosamente controlada puede causar una pobre obtención y/o degradación con pérdida de actividad (69). Por el contrario la descongelación rápida en la técnica de E. C. Mason y la eliminación y separación continua del plasma sobrenadante por sifoneo se lleva a cabo en aproximadamente una hora a temperatura de 3°C, reduciendo el tiempo de contacto entre el precipitado y el plasma residual, factores que pudieran permitir una mejor cosecha del crioprecipitado o una mínima degradación.

Una observación interesante hecha previamente por otros grupos (53) es la relación entre la actividad de Factor - VIII de los crioprecipitados, con los grupos sanguíneos del sistema ABO del donador (figura No. 1) ya que el crioprecipitado obtenido de plasma, particularmente el grupo sanguíneo A presenta una mayor actividad de Factor VIII y siguiendo un orden los obtenidos del grupo O y B. No se analizaron del grupo sanguíneo AB, dado que este grupo es sumamente raro en el valle de Méxi-

co, y su disponibilidad es muy reducida (70).

No tomando en cuenta el grupo sanguíneo de los donadores en los crioprecipitados se obtuvo un promedio en la técnica de Pool y Shannon  $\bar{x} = 71.08$  Unidades y en la técnica de Mason un promedio de  $\bar{x} = 108.44$  Unidades. Existe una diferencia altamente significativa entre estas dos técnicas ya que existe una probabilidad menor de 0.05 (tabla No. 1 y 2).

En cuanto a la determinación de proteínas totales por el método de Biuret se comprobó que existe menor cantidad de éstas en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Mason, en los que se obtuvo un promedio de  $\bar{x} = 3.69$  g/dl y los obtenidos por la técnica de Pool y Shannon el promedio fue de  $\bar{x} = 4.27$  g/dl no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambas técnicas ya que la probabilidad es mayor de 0.05 (tabla 3).

El contenido de fibrinógeno determinado por el método de Ratnoff y Menzie, en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Pool y Shannon fue de  $\bar{x} = 411.33$  mg/dl y en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Mason fue de  $\bar{x} = 539.14$  (tabla No. 4) no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos métodos ya que la probabilidad fue mayor de 0.05.

El título de anticuerpos aglutinantes anti A y anti B así como de anticuerpos hemolíticos es un parámetro a considerar en especial en la administración de dosis masiva de criopreci-

pitados a pacientes hemofílicos de grupo sanguíneo ABO diferente.

En relación a lo anterior, están descritas reacciones hemolíticas atribuibles a esos anticuerpos si sus niveles son elevados (71).

Por este motivo es necesario la determinación del título de anticuerpos aglutinantes y la búsqueda de anticuerpos hemolíticos.

En los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Mason los anticuerpos aglutinantes encontrados con títulos mayores de 1/200 fueron en mayor grado que los encontrados en la técnica de Pool y Shannon (tabla No. 4,5). También se encontraron mayor número de anticuerpos hemolíticos en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de Mason y un menor número en los obtenidos por la técnica de Pool y Shannon (tabla No. 6,7).

## C O N C L U S I O N E S

- 1.- Los crioprecipitados obtenidos por la técnica de "Mason" presentaron una mayor actividad, que los obtenidos por la técnica de "Pool y Shannon", lo que es importante en la terapéutica de los pacientes hemofílicos.
- 2.- Se debe considerar que los crioprecipitados de grupo sanguíneo A muestran mayor actividad de factor VIII por ambas técnicas, lo que es recomendable para su empleo terapéutico.
- 3.- La cantidad de proteínas totales es mayor en los crioprecipitados obtenidos por la técnica de "Pool y Shannon" que los obtenidos por la técnica de "Mason". Por el contrario la cantidad de fibrinógeno obtenida por la técnica "Pool y Shannon" es menor que la obtenida por la técnica de "Mason".
- 4.- La cantidad de anticuerpos hemolíticos encontrados en la técnica de "Mason" pueden ser una desventaja para su empleo en transfusiones masivas a pacientes de grupo sanguíneo ABO incompatible.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bidwell, E.  
The purification of bovine antihaemophilic globulina.  
Brit J. Haemat, 1:35, 1955 (a).
- 2.- Bidwell, E.  
The purification of antihaemophilic globulina from animal plasma.  
Brit J. Haemat, 1:386, 1955 (b).
- 3.- Kekwock, R.A. and Wolf, P.  
A concentrate of human antihaemophilic factor its use in six cases of haemophilia.  
Lancet, 1:647, 1957.
- 4.- Blombäck, M.  
Purification of antihaemophilic globulina I. Some studies on the stability of the antihaemophilic globulin activity in fraction I-0 and a method for its partial separation from fibrinogen.  
Ark Kemi, 12:328, 1958.
- 5.- Blombäck, B., Blombäck, M. and Nilson, I.M.  
Note on the purification of human antihaemophilic globulin.  
Acta Chem Scand, 12:1878, 1958.

- 6.- Pool, J. G. and Robinson, J.  
Assay of plasma antihaemophilic globulin (AHG).  
Brit J. Haemat, 5:17, 1959.
- 7.- Pool, J. G. Heragold, E. J. and Pappenhagen, A.R.  
High-potency antihaemophilic factor concentrate prepared  
from cryoglobulin precipitate.  
Nature (London) 203:312, 1964.
- 8.- Pool J. G. and Shannon, A.E.  
Production of high-potency concentrates of antihaemophi-  
lic globulin in a closed-bag system, assay in vitro in-  
vivo.  
New England Journal of Medicine, 273:1443-7, Dec.30,1965.
- 9.- Pool, J.G. and Shannon, A.E.  
Simple production of high-potency antihaemophilic globu-  
lin (AHG) concentrates in closed bag system.  
Fed. Proc. 24:512, 1965.
- 10.- Tesis presentada por Francisco Hidalgo Guerrero. "Uso  
clínico de concentrados de globulina antihemofílica obte-  
nidos por crioprecipitación de plasma humano", 1968.
- 11.- E. C. Mason.  
Thaw-Shiphon Technique for production of cryoprecipitate  
concentrate of factor VIII.  
The lancet 15-17 July 1, 1978.

- 12.- C.V. Prowse and A. Mc Gill.  
Evaluation of the "Mason" (Evaluation of the "Mason"  
(continuous-thaw siphon) method for cryoprecipitate  
production.  
Vox Sang. 37:235-243, 1979.
- 13.- Rosner F.  
Haemophilia in the talmud and rabbinic writings.  
Ann. Inter. Med. 70, 833-837, 1969.
- 14.- Addis T.  
Hereditary haemophilia: Deficiency in the coagulability  
of the blood the only immediate cause of the condition.  
Quart J. Med. 4:14, 1910.
- 15.- Addis T.  
The pathogenesis of hereditary haemophilia.  
J. Pathol Bacteriol 15:427-452, 1911.
- 16.- W. Bulloch and P. Fildes.  
Haemophilia treasury of human inheritance-Partes V and  
VI, Dulau C. London, 1911.
- 17.- Patek, A.J. and Taylor, F.H.L.  
Haemophilia, II. Some properties of a substance obtained  
from normal human plasma effective in accelerating the  
coagulation of haemophilic blood.  
J. Clin. Inv. 16-113, 1937.

- 18.- A Pavlovsky.  
Contribution to the pathogenesis of hemophilia.  
Blood, 2:185, 1947.
- 19.- R. Biggs, A.S. Douglas. Rg. Mac Farlane, J.V. Dacie, W.  
R. Pitney, C. Merskey and J.R.O Briem.  
Christmas disease : a condition previously mistaken for  
haemophilia, Brit, Med. J. 2:1378, 1952.
- 20.- Aggeler P. M. Sg., White, MBB, Glendening, Ew Page, TB  
Leake, G. Bates.  
Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency; a new  
disease resembling hemophilia.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79:692, 1952.
- 21.- Merskey C.  
The occurrence of haemophilia in the human female.  
Quart J. Med. N.S. 20:299, 1951.
- 22.- Ratnoff, Oscar D. and Jones, Paul K.  
The detection of carriers of classic hemophilia.  
Am. J. Clin, Pathol 65:129-135, 1976.
- 23.- G. Ralnick M.R. Collier B.S. Shulman N.R. Andersen J.C.  
And Hilgartner. R.M.  
Factor VIII.  
Ann Inter, Med. 86:598, 1977.
- 24.- Federico Gerzo Rivera, Ruben Palomares Martínez.  
Enfermedades hemorrágicas.  
Pág. 73-77, 1983.

- 25.- Davishon, I.  
Diagnóstico clínico por el laboratorio.  
Tood Sanford Salvat pág. 436-38, 1978.
- 26.- Rapaport  
Introduction to hematology  
Pág. 345-359 Copyright, 1971.
- 27.- Hoffbrand, A.  
Hematology Tutorial in posgraduate Medicine Vol. II-pág.  
577-87, 1971.
- 28.- Weis, A.  
Handbook of hemophilia.  
Excerta Médica pág. 629-46, 1975.
- 29.- Mammen  
Factor VIII Abnormalities  
Seminars in Thrombosis and Hemostasis  
Vol. 9, Bo. 1 pág. 22-27, 1983.
- 30.- E. Ikkala  
Haemophilia A. Study of its Laboratory, Clinical Genetic  
and Social Aspects based on known Haemophiliaes in Fin-  
land.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 12 Suppl. pags. 45-46, 1960.
- 31.- R. Biggs  
Human Blood Coagulation Haemostasis and Thrombosis  
Segunda Edición, Blackwell Sc. Publ. Londres,  
Pags. 236-237, 1976.

- 32.- Webster Wp. Zukosky CF. Hutchin P, Reddick RL, Mandel ST. Penick GD.  
Plasma Factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation.  
Am. J. Physiol 220: 1147-1154, 1971.
- 33.- Owen Ca. Jr., Bowie EJW, Fass DN.  
Generation of Factor VIII coagulante activity by isolated, perfuse neonatal pig liver and adult rat livers.  
Br. J. Haematol 43: 307-315, 1979.
- 34.- Shaw E. Giddings JC, Peake LP, Bloom AL.  
Synthesis of procoagulante Factor VIII, Factor VIII related antigen and other coagulation factors by the isolated perfused rat liver.  
Br. J. Haematol 41:585-596, 1979.
- 35.- Bloom AL.  
The biosynthesis of Factor VIII.  
Clin. Haematol 8:53-77, 1979.
- 36.- Kelly, D.A.  
Localization of Factor VIII-C: antigen in Guinea Pig Tissues and isolated liver cell fractions.  
Br. J. Haematol 54: 535-536, 1984.

- 37.- Hoyer LW, de los Santo R, Hoyer Jr.  
Antihemophilic factor antigen. Localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy.  
J. Clin. Invest. 52:2737-2744, 1973.
- 38.- Jaffe EA. Hoyer LW, Nachman RL.  
Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells.  
J. Clin. Invest. 52:2557-2764, 1973.
- 39.- Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL.  
Synthesis of Von Willebrand factor by cultured human endothelial cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:1906-1909, 1974.
- 40.- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG.  
The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes.  
J. Histochem Cytochem 18:315-333, 1970
- 41.- Andrew J. Wilson, M.D.  
Factor VIII-related Antigen Staining by immunoperoxidase Technic in Smaller Laboratories: A Potential Problem.  
Am. J. Clin. Pathol Vol. 81:117-120, 1984.

- 42.- Hultin, M.  
Activation of factor X by factor IX and Factor VIII; a specific assay for factor IX<sub>a</sub> in the presence of thrombin activated Factor VIII.  
Bloos 52:928, 1978.
- 43.- Gralnick, H.R. Marchesis S.L. Boller B.S.  
Theoretical approach to molecular biology of Factor VIII-heterogeneity of molecule.  
Ann. N.Y. Academic, Sci. 240:378, 1975.
- 44.- Rocha, E. Fernández J. Solana J.M. Pérez J.A.  
Síntesis bioquímica y Estructura Molecular del Factor VIII.  
Sangre 25 (5B) 642; 1978.
- 45.- Switzer ME. Mc Kee Pa.  
Studies on human antihemophilic factor.  
J. Clin. Invest. 57:925-937, 1978.
- 46.- Suomela H, Blomback M. Blomback B.  
The activation of factor X evaluated by using synthetic substrates.  
Thromb Res, 10:267-281, 1977.
- 47.- Hoyer LW, Shainoff Jr.  
Factor VIII-Related Protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers.  
Blood 55:1056-1059, 1980.

- 48.- J.R. Cabrera, M.C. Regidor, L. Barbolla, I. Sanjuán,  
P. Zavala, J.L. Díez y MN. Fernández.  
Trombocitopatías y Enfermedad de Von Willebrand.  
Tratado de Medicina Práctica "Medicine".  
Segunda Edición No. 9 Pág. 100-103, Sept., 1985.
- 49.- Olson JA, Brockway WJ, Fass DN, Bowie, Mann KG.  
Purification of porcine and human ristocetin-Wille  
brand factor.  
J. Lab. Clin. Med. 89:1278-1294, 1977.
- 50.- Eurkan  
Antihemophilic factor (Factor VIII) in alpha 2 globulin  
Brith, J. Hematol 9: 1963.
- 51.- Hershgold E.J. Davison. A.M. Janzen M.  
Isolation and some chemical properties of human Factor  
VIII (antihemophilic factor).  
J. Lab. Clin. Med. 77:206, 1971.
- 52.- Marchesi SL, Shulman NR, Gralnick HR.  
Studies on the purification and characterization of  
human Factor VIII.  
J. Clin. Invest. 51:2151:2161, 1972.
- 53.- Legazme, Schmer G, Counts RB, Daiv EW.  
Isolation and characterization of human Factor VIII  
(Antihemophilic factor).  
J. Biol. Chem. 248:3945-3955, 1973.

- 54.- Hoyer W. Leon.  
The Factor VIII Complex: Structure and Function.  
Blood 58, No. 1 1-12, July, 1981.
- 55.- Hau C. Kwaan.  
"Hemostasis and Thrombosis"  
Current Hematology Vol. 1, Cap. 15-567-569, 1981.
- 56.- David L. Aronso M.D.  
Factor VIII (Antihemophilic globulin).  
Seminars in Thrombosis and hemostasis Vol.VI, No. 1  
Pag. 12-34, 1979.
- 57.- Cohn, E.J.  
A. System for the separation of the components of human  
blood: Quantitative procedures for the separation of  
the protein components of the human plasma.  
J. Amer. Chem. Soc. 72-465-424, 1950.
- 58.- Mason, E.C. Harden P.A. and Shaw A.E.  
The "Thaw-Siphon" procedure for cryoprecipitate pro-  
duction: an alternative pathway to a improved interme-  
diate AHF concentrate within a closed.  
Pack system. Jt. Congr. Int. Soc. of hematology and Int.  
Soc. of blood transfusion, Paris, 1978.
- 59.- Ernest C. Mason, Duncan S. Pepper and Brenda Griffin.  
Production of cryoprecipitate of Intermediate Purity  
in a closed system thaw siphon process.  
Trombos. Haemostas. (Stuttgart) 46, 2:543-546, 1981.

- 60.- Report of a working of the regional transfusion: Directors committee.  
Variable involved in cruopricipitate production and their effect and Factor VIII activity.  
The Journal Haematology, 43, 287-295, 1978.
- 61.- Biggs, R.J. Eveling, and Richards.  
The assay of antihaemophilic globulin activity.  
Br. J. Haematol 1:20, 1955.
- 62.- T.A. Strup P. Brakman and J. Nissen  
The estimation of fibrinogen.  
Scandinav. J. Clin. Lab. Investigation 57, 65:15-, 1963.
- 63.- Instituto Mexicano del Seguro Social.  
Subdirección Médica.  
Laboratorio Clínico. Procedimiento.  
Edición 1978 págs. 287-289.
- 64.- Kathleen E. Boorman, Barbara E. Dodd, P.J. Lincoln.  
Blood Groups Serology, Theory, Techniques, Practical applications.  
Fifth edition pags. 28-29, 343, 1977.
- 65.- Zwall R.F.A.  
Membrane and Lipid involvement in blood coagulation.  
Biochim Biophy I. 5515:163, 1978.
- 66.- A. Escriba and M.P. Malueda Carrillo.  
Hematología (1). Fisiología de la Hemostasia.  
Primera serie págs. 60-90, abril, 1982.

- 67.- J.M. Menituve. L.J. Mc Carthy.  
Hemostatic Disorders and the blood Bank technical  
workshop.  
American Association of blood banks, Arlington.  
Pags. 15-20, Virginia, 1984.
- 68.- Rock, G. and Tittley, P.  
Variation in cryoprecipitate production.  
Transfusion 17, 5053, 1977.
- 69.- C.V. Prowse, and A. Mac Gill.  
Evaluation of the "Mason" (continuous-thaw siphon)  
method for cryoprecipitate production.  
Vox. Sang. 37, 237-247, 1979.
- 70.- Instituto Mexicano del Seguro Social.  
Sub-general Médica.  
Anuario de actualización en medicina.  
Vol. IX fascículo No. 25 Hematología págs. 99-100, 1977.
- 71.- Orringer, E.P. Kourv, M.J. Blat P.M., Roberts, H.R.  
"Hemolysis caused by Factor VIII concentrates".  
Archs. Intern. Med. 136:1018, 1976.