

Lej: 29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"Z A R A G O Z A"

DETERMINACION DEL FACTOR VON WILLEBRAND
POR LOS METODOS DE AGLUTINACION EN PLACA
Y AGREGOMETRIA.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MANUEL SANTOS RODRIGUEZ SOTELO



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.

C O N T E N I D O

	PAG.
CAPITULO UNO:	
INTRODUCCION	1
Introducción	2
Objetivos	4
Hipótesis	5
Planteamiento del Problema	6
 CAPITULO DOS:	
ANTECEDENTES CIENTIFICOS	7
Antecedentes Científicos	8
Evolución Histórica del Concepto de la EVW	8
Métodos de Diagnóstico	14
Factor VIII Celular en la Enfermedad de von Willebrand	22
 CAPITULO TRES:	
MATERIAL Y METODOS	24
Material y Equipo	25
Métodos:	
Tiempo de sangrado de IVV	29
Cuentas de Plaquetas	31
Adhesividad Plaquetaria	33
Tiempo de Protrombina	35
Tiempo de Tromboplastina Parcial	37
Determinación de la Fracción Antigénica del Factor VIII ...	39
Fracción Procoagulante del Factor VIII	41
Agregación Plaquetaria	43
Aglutinación Plaquetaria	46

PAG.

CAPITULO CUATRO:	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS ...	49
	Resultados	50
	Análisis de Resultados	55
CAPITULO CINCO:	CONCLUSIONES	57
	Conclusiones	58
BIBLIOGRAFIA		60
	Bibliografía	61

CAPITULO UNO

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El conjunto de mecanismos biológicos que interactúan entre sí que hacen cesar una hemorragia se conoce con el nombre de hemostasis, mecanismo que posee un delicado balance en el que participan tanto elementos celulares como el endotelio vascular, las plaquetas y elementos plasmáticos, representados, por un lado, por factores procoagulantes y por el otro lado inhibidores naturales. El equilibrio que se establece entre los factores señalados mantiene fluida a la sangre dentro de los vasos, lo que podemos considerar como un estado de normocoagulabilidad. Cualquier desequilibrio en alguno o algunos de los elementos que conforman la hemostasis podría inclinar la balanza hacia un estado de hipocoagulabilidad cuya expresión clínica sería la hemorragia o hacia un estado de hipercoagulabilidad que se expresaría clínicamente como trombosis.

Para su mejor comprensión, el mecanismo de la hemostasis se divide en dos partes importantes: La hemostasis primaria, en la cual participan el capilar y las plaquetas y la hemostasis secundaria, conocida también como etapa bioquímica o coagulación propiamente dicha, en la cual participan una serie de globulina y elementos plasmáticos.

La enfermedad de von Willebrand, que fue descrita en el año de 1926, (1) es hoy en día una diátesis hemorrágica congénita mas o menos frecuente, cuya detección nos proporciona una gran ayuda para descartar otro tipo de alteraciones de la coagulación; se caracteriza por su heterogenicidad biológica y clínica, la disminución o ausencia de la síntesis de la subfracción de von Willebrand del factor VIII, de las células endoteliales, y un patrón genético complejo, que puede ser autosómico dominante o recesivo. (2)

El estudio de la enfermedad de von Willebrand debe comenzar con el conocimiento de las actividades de la molécula del factor VIII, el cual es el responsable, cuando tiene algún defecto, de la diátesis en cuestión; la detección de éste defecto es

lo que nos llevó a estudiar esta molécula y a tratar de estandarizar el método para la determinación del mismo. Aunque se puede sospechar por antecedentes familiares y manifestaciones clínicas, el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand se establecerá primordialmente por datos de laboratorio.

La determinación del factor von Willebrand es de suma importancia en la evaluación diagnóstica de los pacientes, para ello se debe contar con un método confiable y reproducible para su detección, es necesario probar dos métodos y así determinar cuál de ellos es mas confiable y sencillo.

El método que se emplea tradicionalmente es el de agregometría con ristocetina, que representa un mayor costo debido a que el agregómetro es un aparato de importación, al igual que el agente agregante, lo que dificulta tenerlo como un recurso a la mano.

El otro método lo constituye la aglutinación en placa, un método novedoso y práctico, lo que lo hace mas accesible. De allí que es necesario tener su valor para la evaluación diagnóstica de los pacientes con esta enfermedad. (3)

OBJETIVOS

- 1) Demostrar que la determinación del factor von Willebrand por el método de aglutinación en placa es tan eficiente como el método que utiliza la agregación plaquetaria in ducida por ristocetina.

- 2) Señalar la importancia de la prueba en la batería para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand.

- 3) Plantear problemas de diagnóstico diferencial de la enfermedad de von Willebrand con cuadros hemofílicos y con trombopatías.

- 4) Detectar a los portadores de la enfermedad, para efectuar un estudio familiar.

- 5) Aportar un método nuevo y más accesible para la determinación del factor VIII.

HIPOTESIS DE TRABAJO

El método de aglutinación en placa y el método de agregación plaquetaria para la determinación del factor von Willebrand son semejantes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el conjunto de pruebas para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand comprende:

Tiempo de sangrado, retención de plaquetas por el cristal, la adhesividad plaquetaria, recuento de plaquetas, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial, dosaje de la actividad coagulante del factor VIII (VIII:c), determinación semicuantitativa de la actividad antígeno del factor VIII (VIII:Ag) y agregación plaquetaria inducida por ristocetina. Con lo que respecta a esta última prueba, el Laboratorio de Coagulación Especial del Hospital General Centro Médico "La Raza" carece del aparato específico para su determinación y constituye una prueba esencial; la introducción del método de aglutinación en placa para la determinación del factor von Willebrand viene a sustituir el método del Agregómetro y además nos permite incluir a esta prueba, la cual es de suma importancia y que es de especial interés en el diagnóstico de la enfermedad.

CAPITULO DOS

ANTECEDENTES CIENTIFICOS

GENERALIDADES

Existe en el momento actual una confusión sobre el concepto de la enfermedad de von Willebrand (EVW), ocasionado por el progreso técnico en el conocimiento del factor VIII, del que se derivan hechos positivos y otros no tan singulares, que dificultan su encuadre en la definición de la afección, hasta el punto de que las observaciones halladas bien merecen un período de análisis y reflexión sobre las mismas.

Como hallazgos positivos se pueden señalar:

- 1.- Algunas hemofilias clásicas, clínicamente no graves, han pasado a no ser tales, para encuadrarse dentro de la EVW.
- 2.- El modelo de EVW, aunque persiste como tal, se ha visto enriquecido por variantes en su representación biológica, que empiezan a perfilarse con alguna seguridad, si bien aún hay muchos aspectos que deben ser afianzados y aclarados.
- 3.- Es posible ahora establecer patrones de formas von Willebrand adquiridas.
- 4.- El progreso logrado ha motivado que conozcamos mejor las relaciones entre los componentes de la pared vascular, plasma y plaquetas. La repercusión que ello pueda tener en el mecanismo de la arterioesclerosis y fenómenos trombóticos vasculares está por dilucidarse.

Aún con lo anterior, podría referirse que un trasfondo genético, no muy firme, ha venido a complicar la ya muy confusa regulación genética del factor VIII. Es de esperar que el estudio de múltiples familias, a la luz de la metodología actual, permitirá esclarecer el problema en los próximos años.

EVOLUCION HISTORICA DEL CONCEPTO DE LA EVW

Algunas consideraciones históricas pueden ser necesarias para definir el concepto actual de la EVW.

Siguiendo a HOYER (1), tres períodos pueden distinguirse:

- 1.- Las primeras observaciones

Alcanzan desde 1926 a 1956, destacándose aquí la descrip-

ción de la enfermedad por Eric von Willebrand (1926), caracterizada por hemorragia de piel y mucosas, tiempo de sangría alargado, y normal retracción del coágulo y tiempo de coagulación, junto a una herencia autosómica. Denomina a la enfermedad "Pseudohemofilia", nombre que después parece desafortunado y que hoy podría readmitirse. En 1933, von WILLEBRAND y JURGENS revisan los mismos pacientes de las islas Aaland, Finlandia, merced a un ingenioso método que mide la duración del estado fluido de la sangre en un capilar ("tiempo del trombocontador capilar"), observando que la prueba es normal en la hemofilia y alargada en su pacientes, por lo que determinan que tales enfermos tienen una "trombopatía constitucional".

Transcurren dos décadas, con descripción de nuevos casos con las características referidas antes, y en el año 1953 un nuevo hallazgo se inserta en el conocimiento de la enfermedad, al comprobarse que estos enfermos tienen una doble alteración hemostática, el tiempo de hemorragia alargado descrito por von Willebrand y una disminución de la globulina antihemofílica (AHF). Los trabajos de NILSSON y colaboradores (2) y JURGENS y colaboradores (3) de los años 1956-1957 confirman en los mismos pacientes de las islas Aaland la deficiencia del factor VIII, por lo que puede establecerse por aquel entonces que el tiempo de hemorragia alargado y el bajo nivel de factor VIII, junto a la herencia autosómica y síndrome hemorrágico, definen a la EVW.

2.- Período de consolidación (1957-1970)

A partir de las descripciones anteriores, el diagnóstico de EVW basado en tales parámetros se extiende por otros países, viéndose que era tan frecuente como la hemofilia A.

Dos nuevos hitos claves vienen a añadirse en el conocimiento de la afección:

a) La corrección del tiempo de hemorragia alargado tras la transfusión de plasma o fracciones I-O del mismo, con una respuesta distinta en el nivel de AHF respecto a la hemofilia. En la EVW el nivel sanguíneo del factor VIII tras la transfusión, eleva más lentamente que en los hemofílicos y se mantiene elevado más tiempo. Curiosamente, el plasma hemofílico también corregía el tiempo de hemorragia (4,5).

b) Descubierta la adhesividad de las plaquetas al --- vidrio por HELLEM (6), se logra estudiar esta propiedad 'in vivo' por BORCHGREVINK (7) en 1961, e 'in vitro' por la técnica de --- Salzman, comprobándose una reducida adhesividad con ambos métodos, hecho que fué corroborado ampliamente (8,9).

3. Período de los nuevos métodos inmunobiológicos (1970-1978)

La introducción de nuevas técnicas inmunológicas al -- estudio de la coagulación, durante la década actual, ha producido una revolución en la biología del factor VIII, ampliando el - concepto de la enfermedad, complicando las posibles formas de -- herencia y definiéndola como un proceso heterogéneo formado por múltiples variantes.

Los hallazgos claves más destacados son:

a) El logro por ZIMMERMANN y colaboradores de inmunizar conejos con proteína purificada del factor VIII, obteniendo un heteroantisuero, capaz de neutralizar la actividad coagulante del factor VIII y de ser a la vez neutralizada la potencia del - antisuero por plasma normal, plasma hemofílico y no por plasma - Willebrand (10). Esto vino a probar que los hemofílicos sintetizaban la proteína del factor VIII, pero que era aberrante desde el punto de vista funcional en la coagulación, y que los pacientes Von Willebrand apenas sintetizan esta proteína o su síntesis es casi nula.

b) HOWARD y FIRKIN (11) demuestran que la ristocetina -antibiótico que previamente se observó producía trombocitopenia- agregaba las plaquetas de sujetos normales, pero no las de los enfermos Von Willebrand, sugiriendo que el plasma de estos - pacientes carece de un factor -cofactor de la ristocetina (CoR)- necesario para que la agregación se efectúe. Más tarde se desarrolla incluso un método cuantitativo basado en este principio (1973) (12).

c) La aplicación de técnicas de inmunofluorescencia por HOVER y colaboradores (13) y BLOOM y colaboradores (14) para conocer el lugar de síntesis de la proteína del factor VIII, se probó que tenía lugar en las células endoteliales de todos los vasos sanguíneos. Hallazgos similares han sido logrados en megacariocitos y plaquetas (15,16). Todo ello ha sido corroborado por JAFFE y colaboradores (17), quienes detectaron proteína del factor VIII en medio de cultivo de células endoteliales de vena del cordón umbilical, así como actividad biológica del CoR. Incluso hay evidencia de que las células endoteliales pueden también sintetizar el componente procoagulante, al observarse fluorescencia positiva con antisuero de conejo contra la porción de bajo peso molecular del complejo del factor VIII, antisuero obtenido por inmunización tras disociación del complejo en 0.25 M de CaCl_2 y posterior cromatografía (18). Este antisuero inactiva la fracción coagulante, pero no precipita el antígeno, ni inhibe el CoR.

d) Se ha comprobado también que existen diversas movilidads electroforéticas con la técnica de inmunoelectroforesis cruzada de Freedman y Clarke o inmunoelectroforesis bidimensional (BIE) en pacientes con EVW lo que habla en pro de distintas estructuras moleculares del antígeno del factor VIII (19).

e) El reciente hallazgo de que la concavalina A reacciona con las proteínas que contienen carbohidratos, ha motivado se establezcan mejor los perfiles de las variantes de la enfermedad, añadiendo una nueva propiedad diagnóstica en el conocimiento de la EVW (20).

f) Han surgido muy diversas formas de cromatografía del factor, apoyadas en propiedades diferentes de los eluyentes, lo que permite conseguirlo con cierta pureza, a la par que separa fracciones distintas de su molécula (21,22,23). Esta vía abierta al futuro tiene posibilidades insospechadas.

El diagnóstico biológico de la enfermedad de Von --- Willebrand procede abordarlo partiendo del conocimiento de las entidades de la molécula de factor VIII. En la molécula de factor VIII se distinguen tres entidades: La capacidad antigénica (VIII:AG) y las actividades procoagulante (VIII:C) y Willebrand (VIII:WF).

La capacidad antigénica se pone de manifiesto por la --- reacción de precipitación con antisuero heterólogo de conejo inmunizado con factor VIII humano. La actividad procoagulante es la primera conocida del factor VIII, la cual es necesaria para la formación intrínseca de la trombina. La actividad Willebrand, se requiere para la normal adhesión de las plaquetas al subendotelio, fundamentalmente a las microfibrillas y a la membrana basal, lo que contribuye a que el tiempo de sangría no sea anormalmente prolongado. Asimismo es necesaria para que las plaquetas agreguen normalmente con ristocetina y sean retenidas por el cristal; aunque probablemente la agregación inducida con ristocetina y la adhesión de las plaquetas al subendotelio no se correlacionan --- exactamente.

La capacidad antigénica y las funciones coagulante y --- Willebrand están estrechamente relacionadas, sin embargo la actividad coagulante se desliga más fácilmente de las otras dos; aun que no se conoce exactamente si tiene soporte proteínico, si está unida mediante enlaces no covalentes a la proteína que soporta las actividades antigénica y Willebrand o si constituye con estas una --- sola molécula o complejo molecular.

Teniendo en cuenta las entidades del factor VIII y los conocimientos de la enfermedad de Von Willebrand, deben catalogarse como tal los trastornos hemorrágicos en que existe deficiencia de las actividades antigénica y Willebrand, con lo que frecuentemente también se manifiesta una deficiencia de la actividad coagulante. Este criterio permite diagnosticar formas moderadas que hasta ahora no eran catalogadas, y coincide con el progresivo conocimiento que a través de la historia se ha tenido de la --- enfermedad:

1. La prolongación del tiempo de sangría, que fué el primer signo que se describió de la enfermedad de Willebrand (24) (1926), se explica por la deficiencia de la actividad Willebrand del factor VIII, que impide que las plaquetas se adhieran de sub-endotelio.

2. La deficiencia de la actividad coagulante del factor VIII, que se describió en el año de 1953 (24,25,26), se explica porque si son anormales o disminuidas las actividades antígeno y Willebrand, la actividad coagulante, íntimamente relacionada con ellas, no se pone de manifiesto.

3. En el año de 1957 se observó que la transfusión del plasma normal o fracción de factor VIII corrige la tasa de actividad coagulante y el tiempo de sangría de los enfermos (27), ello se explica porque se transfundía no sólo la actividad coagulante, sino también la actividad Willebrand responsable de la normalidad del tiempo de sangría.

4. En 1959 se demostró que la transfusión de plasma o fracción de factor VIII de enfermos hemofílicos también corrige la actividad coagulante y el tiempo de sangría (24), lo que se explica teniendo en cuenta que en la hemofilia el VIII:WF es normal, y al transfundirlo a pacientes afectados de enfermedad de von Willebrand pondría de manifiesto la propia actividad coagulante de éstos o se modificaría la molécula, de tal modo que adquirirla esta actividad.

5. En 1963 se describió la falta de retención de las plaquetas por el cristal, que aparece simultáneamente con la prolongación del tiempo de sangría (28).

6. En el año de 1971 se descubrió un déficit de agregación plaquetaria inducido con el antibiótico ristocetina (29), lo que se explica porque la proteína del factor VIII con actividad Willebrand se requiere para que las plaquetas agreguen por este inductor.

7.- Finalmente en 1974 se observó, por medio de la técnica de Boumgartner, que las plaquetas de la enfermedad de von Willebrand no se adherían al subendotelio al circular sangre en contacto con la arteria de conejo desendotelizada, y que esta propiedad se recuperaba al añadir a la sangre plasma normal o de hemofilia A (30), lo que explica la prolongación del tiempo de sangría, que es el primer signo descrito de la enfermedad.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Además de las determinaciones del tiempo de sangría y la prueba de retención de las plaquetas por el cristal, la enfermedad de von Willebrand se debe diagnosticar mediante la dosificación de la actividad Willebrand (VIII:WF) por la prueba de agregación plaquetaria inducida con ristocetina y valorando la actividad antígeno del factor VIII (VIII:AG) por el método inmunoelectroforético de Laurell. (Figura I)

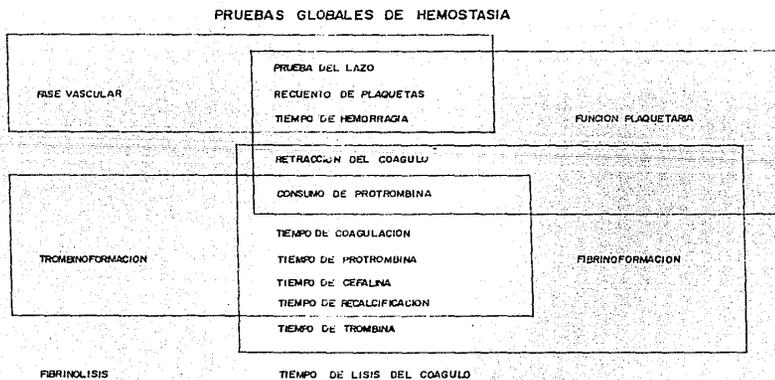
TIEMPO DE SANGRIA

La prolongación del tiempo de sangría fue el signo que primero se descubrió en la enfermedad de von Willebrand, y uno de los que más se ha tenido en cuenta para el diagnóstico. Sin embargo, el tiempo de sangría es difícil de estandarizar y varía frecuentemente en un mismo enfermo. El método más aconsejable es el de IVY (31), modificado por BORCHGREVINK (32), cuyos valores normales oscilan entre tres y diez minutos.

La relación entre el tiempo de sangría y la adhesión de las plaquetas al subendotelio se pone de manifiesto por el método de BAUNGARTNER (33), haciendo pasar la sangre mediante una bomba de perfusión a través de aorta de conejo desendotelizada, y se mide la adhesión de las plaquetas al subendotelio mediante microscopía óptica o electrónica. (Figura II y IX)

En la enfermedad de von Willebrand la adhesión está disminuida, aunque las plaquetas que se adhieren se agregan normalmente (30). El origen plasmático del defecto se demuestra

FIGURA I
 ESQUEMA DE PRUEBAS DIAGNOSTICAS



REFERENCIA: NAVARRO, J. L., Y COLS (1978), pag. 668

porque se corrige al añadir a la sangre problema plasma normal.

Al contrario de lo que ocurre en la enfermedad de Bernard y Soulier, en que el defecto de adhesión es de origen plaquetario (34).

RETENCION DE LAS PLAQUETAS POR EL CRISTAL

Es un proceso equiparable al tiempo de sangría. Se basa en el recuento de las plaquetas de la sangre antes y después del paso a través de una columna de plástico con perlas de cristal.

El procedimiento es difícil de estandarizar, ya que depende de la velocidad de paso de la sangre, del tamaño de las perlas de cristal, del tipo de plástico de la columna y del tipo de anticoagulante empleado. (Figura III)

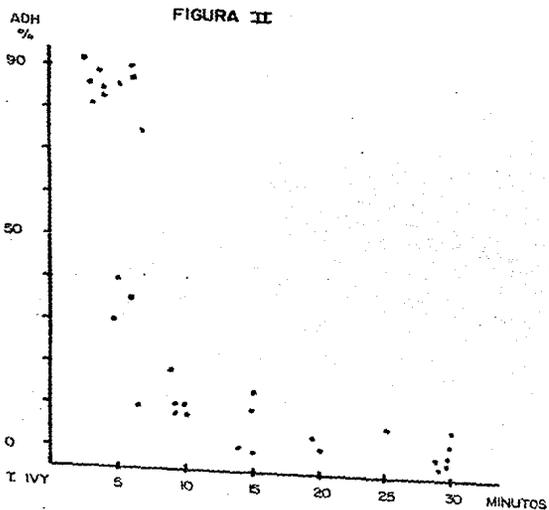
La técnica más utilizada es la de HELLEM (35), modificada por SALZMAN (28), con pequeñas variantes introducidas por BOWIE (36), lo que permite emplear sangre heparinizada. De este modo se observa disminución de la retención de plaquetas por el cristal en la mayoría de casos de enfermedad de von Willebrand.

AGREGACION PLAQUETARIA INDUCIDA CON RISTOCETINA

Las plaquetas aisladas normales no agregan o agregan deficientemente en presencia del plasma de enfermedad de Willebrand. En un principio HOWARD Y FIRKIN en (37) 1971 observaron que el antibiótico ristocetina inducía la agregación de plasma rico en plaquetas (PRP) normal, pero el PRP de enfermos diagnosticados de von Willebrand no agregaba o lo hacía deficientemente.

Posteriormente se demostró que el defecto se debía a un déficit plasmático que se corregía 'in vivo' e 'in vitro' con plasma desplaquetizado (PPP) o fracción de factor VIII normales o de hemofílicos (38, 39, 40, 41, 42). (Figura IV)

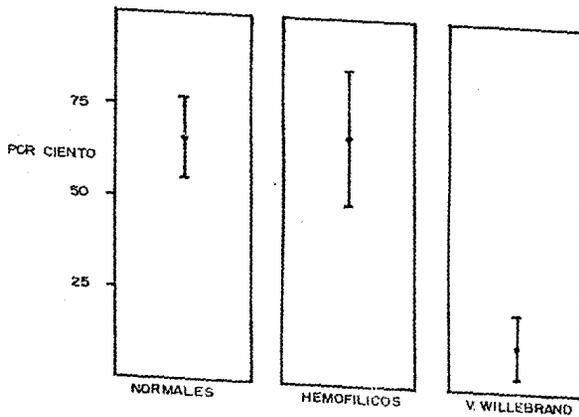
En la enfermedad de von Willebrand clásica la corrección 'in vivo' de la agregación plaquetaria inducida con ristocetina no se corresponde exactamente con la normalización del tiempo de sangría. En algunos pacientes con forma moderada de EVW la



RELACION ENTRE TIEMPO DE HEMORRAGIA Y ADHESIVIDAD PLAQUETARIA

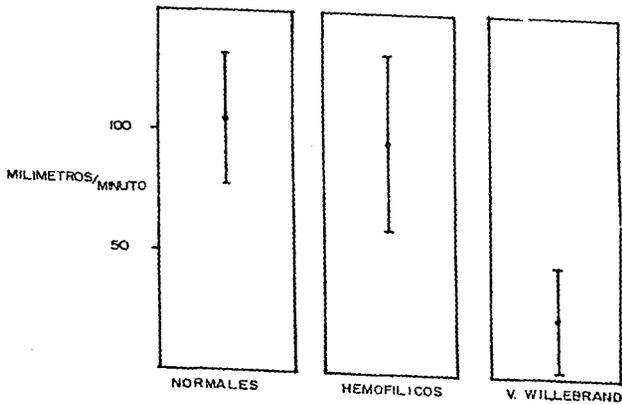
REFERENCIA: NAVARRO, J. L., Y COLS. (1978), pag. 677

FIGURA III



ADHESIVIDAD PLAQUETARIA. HELLEM II MODIFICADO

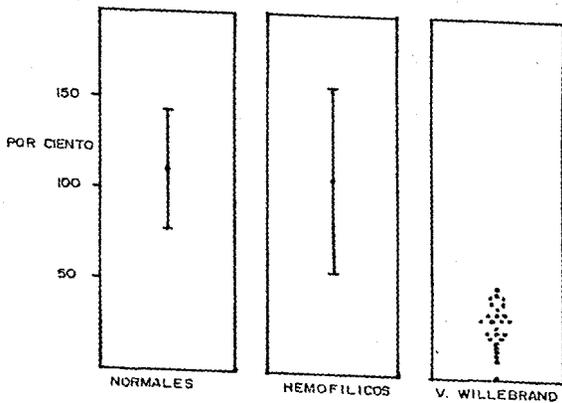
FIGURA IV



VELOCIDAD DE AGREGACION CON RISTOCETINA

REFERENCIA: NAVARRO, J. L., Y COLS. (1978), pag. 679

FIGURA V



ANTIGENO DOSIFICADO CON ANTIFACTOR VIII DE CONEJO

REFERENCIA: NAVARRO, J. L., Y COLS. (1978), pag. 679

agregación con ristocetina se observa normal en PRP, pero no --- constituyen una forma separada de la enfermedad (24,38,39,43,44). Por tanto, el defecto de la agregación plaquetaria inducida con ristocetina en PRP es útil como procedimiento de "screening", pero el hallazgo de valores normales no elimina el diagnóstico de enfermedad de von Willebrand (45).

DOSIFICACIÓN DEL FACTOR WILLEBRAND

El factor del plasma necesario para la agregación plaquetaria inducida con ristocetina puede ser cuantificado. El procedimiento sistemáticamente empleado se basa en que las plaquetas normales lavadas, que no agregan con ristocetina, lo hacen si se añade plasma normal (fuente de VIIIIR:WF) (46,47). La dosificación de la actividad Willebrand se realiza determinando la agregación de plaquetas lavadas normales con plasma del enfermo, sirviendo la curva de referencia la obtenida con las mismas plaquetas y distintas diluciones de un pool de plasmas normales. Los valores normales oscilan entre 80 y 140%. Las plaquetas liberadas de cofactor de ristocetina se obtienen por lavados sucesivos en solución de albúmina (47,48), o por aislamiento de las plaquetas por filtración a través de sefarosa 2B (49) y un posterior lavado.

DOSIFICACION DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DEL FACTOR VIII

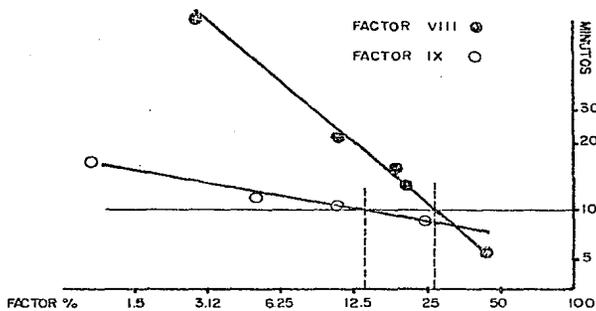
Se determina por la técnica de tromboplastina en un tiempo utilizando plasma de hemofilia como sustrato.

La actividad coagulante del factor VIII está disminuida en la enfermedad de von Willebrand, variando los niveles de 1 a 50% (normal, de 60 a 160%). (Figuras VI, VII y VIII)

DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIGENO DEL FACTOR VIII (VIIIIR:AG) (Figura V)

Se basa en la inmunoprecipitación obtenida con antisuero heterólogo de conejo frente a factor VIII humano mediante la téc-

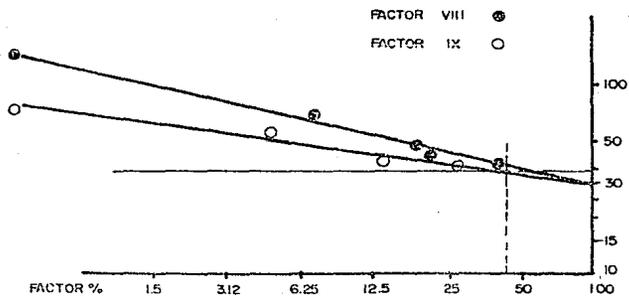
FIGURA VI



NIVEL DE FACTOR ANTIHEMOFILICO Y TIEMPO DE COAGULACION

REFERENCIA: NAVARRO Y COLS., (1978), pag. 669

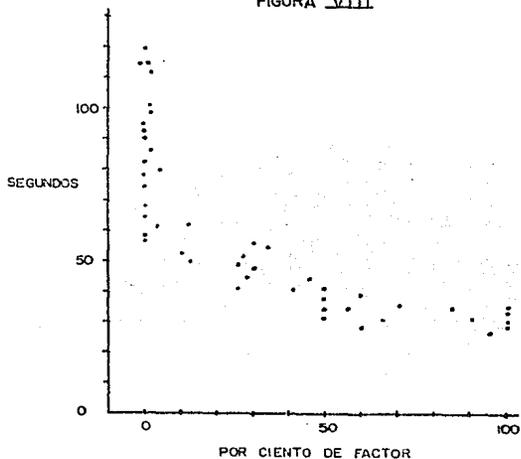
FIGURA VII



NIVEL DE FACTOR ANTIHEMOFILICO Y PTT

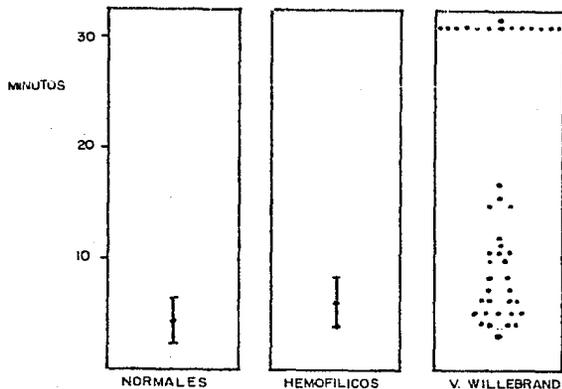
REFERENCIA: NAVARRO Y COLS., (1978), pag. 671

FIGURA VIII



RELACION DEL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL Y NIVEL DE FACTOR ANTIHEMOFILICO

FIGURA IX



TIEMPO DE HEMORRAGIA IVY

REFERENCIA : NAVARRO Y COLS , (1978), pgs. 672 y 676

nica de inmunoelectroforesis de LAURELL (50). La dosificación se realiza comparando la precipitación del plasma problema con la obtenida con distintas diluciones de un pool de plasmas normales.

Los valores normales oscilan entre 60 y 160%. Por este procedimiento, una disminución marcada de la precipitación permite afirmar que existe un déficit cuantitativo de VIII:AG.

Sin embargo, si la molécula tiene un cambio de la carga que hace que se movilice más rápidamente en el campo eléctrico, podría valorarse más cantidad de VIII:AG del que existe en realidad (51, 52, 53).

FACTOR VIII CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

Las relaciones entre los déficits plasmáticos del factor VIII, la deficiencia de las plaquetas para adherir al subendotelio y la prolongación del tiempo de sangría no se conocen exactamente.

En la enfermedad de von Willebrand, la corrección 'in vitro' e 'in vivo' (por transfusión) de la agregación plaquetaria inducida con ristocetina y la corrección 'in vitro' de la adhesión de las plaquetas al subendotelio con plasma y fracción de factor VIII normal y de hemofilia (47, 54), ha apoyado la idea de que el tiempo de sangría prolongado se corrige también con tratamientos substitutivo, y por lo tanto la normalización de la agregación con ristocetina es el todo en la hemostasia. Sin embargo, estas suposiciones carecen de consistencia, debido a que:

1.- El tiempo de sangría en ocasiones permanece permanentemente prolongado después de transfusión de factor VIII, que corrige la agregación plaquetaria con ristocetina (54, 55).

2.- En caso de que se logre normalización del tiempo de sangría, ésta es mucho menos duradera que la corrección de la agregación inducida con ristocetina (56, 57).

Es decir, se intuye que en la enfermedad de von Wille-

brand ocurre algo más que la simple alteración plasmática que produce un defecto de agregación plaquetaria con ristocetina (24,58).

En favor de ello está el hecho de que en las formas severas el factor VIII en las plaquetas y en las células endoteliales está ausente (24,47, 59). En aparente contradicción con ello, en algunos enfermos afectados de forma moderada de Willebrand el tiempo de sangría muy prolongado estaba asociado con la presencia de VIIIIR:AG en las células endoteliales y en las plaquetas (24,60). Sin embargo puede ocurrir que el factor VIII celular tenga un defecto cualitativo que impida el normal funcionamiento de las plaquetas sobre el subendotelio. De este modo se explicaría que defectos de la molécula de factor VIII con cofactor de la ristocetina (VIIIIR:WF) normal dieran lugar a un defecto de adhesión de las plaquetas al subendotelio, y por tanto, se podría considerar enfermedad de von Willebrand cualquier trastorno de la molécula de factor VIII, como ocurre en aquellos casos que presentan como única alteración una inmunoelectroforesis cruzada anormal.

Por otra parte, transfundiendo factor VIII a enfermos afectados de enfermedad de von Willebrand severa no se halla aumento de VIIIIR:AG en las células endoteliales ni VIIIIR:AG y VIIIIR:WF en las plaquetas (24,59), por lo que se deduce que no existe paso del factor VIII desde el plasma a las células. Sin embargo, dadas las aparentes semejantes características del factor VIII plasmático y celular (61), se podría suponer que las formas severas de enfermedad de von Willebrand se deberían a un déficit de síntesis de factor VIII, y las formas moderadas a un déficit de paso del factor VIII de las células al plasma.

CAPITULO TRES

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

Material Humano

Grupo I o Control
30 sujetos sanos.

Grupo II

30 pacientes con diagnóstico de enfermedad hemorrágica relacionada al factor VIII de la coagulación.

Métodos

A ambos grupos se les realizan las siguientes pruebas:

- 1.- Tiempo de sangrado
- 2.- Cuenta de plaquetas
- 3.- Tiempo de protrombina
- 4.- Tiempo de tromboplastina parcial
- 5.- Adhesividad plaquetaria
- 6.- Actividad antigénica del factor VIII (VIII:Ag)
- 7.- Actividad procoagulante del factor VIII (VIII:C)
- 8.- Actividad del factor von Willebrand (VIII:Cofactor:Ristocetina]

Los procedimientos para cada una de estas técnicas se menciona a continuación.

- Centrífuga a temperatura ambiente, centrífuga refrigerada, equipadas con un contador de revoluciones, termómetro para graduación de temperatura y un cronómetro. (Modelo Eprendorf 3200 Brinkman Instruments Inc., Westburg, N.Y.).
- Baño de agua a 37°C con gradilla para tubos de ensayo, equipado con control automático de temperatura. (Modelo MAPSA BMT-4).
- Agitador mecánico, equipado con contador de revoluciones y cronómetro. (Modelo Tektator-V R4139-1).
- Microscopio de contraste de fase. (Modelo Olympus BHA).
- Incubadora de aire a 37°C con gradilla para tubos de ensayo, equipada con graduador para temperatura y fuente de iluminación. (Modelo Clay-Adams Co. Inc.).
- Fibrómetro con termoblock de calentamiento a 37°C, equipado con probe de 0.3 ml y pipetas automáticas; fibrocopas y fibrotips. (Modelo 331 Fibrosistem).
- Equipo para electroforesis, equipado con cámara de difusión, fuente de poder, incubador, microdispensador, cables conductores, aplicadores, base de alineamiento. (Modelo Gelman, Gelman Instrument Co.).
- Agregómetro Bryston, equipado con registrador gráfico, cubetas desechables con agitadores especiales, papel de registro y plumeros para su grabación. (Bryston Manufacturing Limited).

MATERIAL Y EQUIPO

Lancetas estériles
Torundas con alcohol
Papel filtro
Gasa, gradilla y agitador
Jeringa estéril de 5 y 10 ml
Papel milimétrico, log-log, semi-log
Esfigmomanómetro
Cronómetro
Caja de Petri
Tubo de ensayo de 13 x 100 mm (vidrio)
Tubo de ensayo de 12 x 75 mm (plástico)
Tubo de ensayo de 10 x 75 mm (vidrio)
Placa-test (portaobjetos)
Cámara de Neubauer
Pipeta de Thoma para glóbulos rojos
Embudo de vidrio
Vasos de 50, 100, 250 ml
Matríz volumétrico de 100 ml
Matríz volumétrico de 250 ml
Pipeta automática de 0.1 ml
Pipeta automática de 50, 100, 250, 500 μ l
Pipetas de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml
Contador (perforador de gel)
Armazones y cámara de difusión
Charolas para tinción

REACTIVOS

Agua destilada estéril

Solución de alcohol al 70%

Solución de EDTA al 5% (sal disódica)

Solución de oxalato de amonio al 1%

Solución de cloruro de sodio al 0.85%

Solución de cloruro de calcio 0.025 M

Reactivo de tromboplastina humana conteniendo calcio

Solución amortiguadora de barbital 0.2M, pH 8.6

Colorante de Coomassie-Azul Brillante

Solución decolorante

Agarosa

Antisuero anti-factor VIII

Reactivo de tromboplastina parcial

Plasma sustrato deficiente en factor VIII

Solución amortiguadora de dietilbarbiturato-acetato

0.05M, pH 7.6

Ristocetina

Reactivo de von Willebrand

METODO DE TIEMPO DE SANGRADO DE IVY

El tiempo de sangrado es una prueba para estudiar desórdenes en la función plaquetaria y para la enfermedad de von - - - Willebrand y es independiente del mecanismo de la coagulación aunque con daño nuevo de este el tiempo de sangrado puede estar prolongado.

PRINCIPIO.- Una punción estandar es hecha en la piel y el tiempo hasta que cesa el sangrado es medido.

EQUIPO.- Esfigmomanómetro
Cronómetro
Papel filtro
Torundas con alcohol
Lancetas estériles

PROCEDIMIENTO

- 1.- Colocar en el brazo del paciente el esfigmomanómetro a una presión de 40 mm de Hg, mantener esta presión durante toda la prueba.
- 2.- En el antebrazo del paciente buscar un área libre de cicatrices, vello y venas superficiales.
- 3.- Limpiar con la torunda y con una lanceta efectuar una punción, en el momento en que aparece la primera gota de sangre marcar el tiempo en el cronómetro, con intervalo de 30 segundos y con el papel filtro secar la gota procurando no tocar la piel.
- 4.- En el momento en que el papel ya no se mancha, o se mancha con suero, parar el cronómetro.
- 5.- Remover el dispositivo de presión.

VALORES DE REFERENCIA.- 2 a 5 minutos.

NOTAS: La ingestión de compuestos que contienen aspirina pueden afectar la función plaquetaria; es imperativo conocer los fármacos que el paciente esté tomando, con las dosis y las fechas de toma de los fármacos.

En casos de trombocitopenia el tiempo de sangrado puede estar prolongado.

METODO DE CUENTA DE PLAQUETAS
TECNICA DE BRECHER

PRINCIPIO.- Se destruyen los eritrocitos con una solución de oxalato de amonio al 1% y se hace cuenta directa de plaquetas con el microscopio de contraste de fase en una cámara de Neubauer de fondo plano.

MATERIAL

Jeringa estéril de 10 ml
Sangre venosa con anticoagulante
Tubo de ensayo de 13 x 100 mm
Pipeta de Thoma para glóbulos rojos
Cámara de Neubauer
Caja de Petri
Gasa, gradilla y agitador
Torundas con algodón

REACTIVOS

Alcohol al 70%
EDTA al 5% (sal disódica)
Oxalato de amonio al 1%

PROCEDIMIENTO

- 1.- Extraer 5 ml de sangre venosa
- 2.- Pasar a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm que contenga 0.07 ml de EDTA al 5%.
- 3.- Mezclar homogéneamente bien la sangre.
- 4.- Llenar con sangre la pipeta de Thoma para glóbulos rojos hasta la marca de 1.
- 5.- Limpiar la sangre adherida en el exterior de la pipeta con gasa.

- 6.- Completar hasta la marca de 101 con líquido diluyente de plaquetas (Oxalato de amonio al 1%).
- 7.- Homogeneizar durante tres minutos en el agitador de pipetas.
- 8.- Colocar el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer.
- 9.- Descartar las primeras 4 ó 5 gotas de la pipeta, llenar la cámara de Neubauer por uno de los bordes.
- 10.- Se deja que el líquido penetre lentamente en la superficie de la cámara.
- 11.- Dejar reposar durante 15 minutos en una caja de petri la cual contenga en la base un papel filtro humedecido.
- 12.- Observar al microscopio con objetivo de 10X con contraste de fase.
- 13.- Las plaquetas se cuentan en los cuadrantes para recuento de los leucocitos.

VALORES DE REFERENCIA.- de 150,000 a 450,000 por mm³

METODO DE ADHESIVIDAD PLAQUETARIA

PRINCIPIO.- La adhesividad plaquetaria es la propiedad que tienen las plaquetas de adherirse a superficies extrañas. Cuando se lesiona un vaso, el subendotelio constituye una superficie extraña para las plaquetas las cuales se van adheriendo - progresivamente a él.

MATERIAL Y EQUIPO

Cronómetro

Pipetas de Thoma para glóbulos rojos

Lancetas

Oxalato de amonio al 1%

Torundas con alcohol

Agitador mecánico

Cámaras de Neubauer

Caja de Petri

Papel Filtro

Microscopio con contraste de Fase

PROCEDIMIENTO

- 1.- Asear con una torunda con alcohol el pulpejo del dedo o el lóbulo de la oreja.
- 2.- Hacer con una lanceta una punción hasta el tope de su punta.
- 3.- En el momento que aparece la gota de sangre poner en marcha el cronómetro.
- 4.- No hacer presión, la sangre debe escurrir espontáneamente. Con intervalos de 30 segundos tomar sangre con una pipeta para conteo de glóbulos rojos. Llevar con sangre hasta la marca de 1 y luego con oxalato de amonio al 1% hasta la marca 101.
- 5.- Repetir esto hasta que la sangre deje de fluir.

6.- Se cuentan las plaquetas por el método descrito anteriormente.

RESULTADOS Y CALCULOS

Se cuentan las plaquetas de cada toma y se divide entre el número de cuentas. El resultado se resta del número de plaquetas de sangre venosa y se averigua el porcentaje de adhesividad.

Por ejemplo: Suponiendo que se hayan hecho 5 tomas, el cálculo debe de ser de la siguiente manera:

- 1.- 230,000
- 2.- 200,000
- 3.- 178,000
- 4.- 177,000
- 5.- 130,000

Sumando el total tendremos: 915,000; que dividido entre el número de cuentas da: 183,000. Suponiendo que la cuenta en sangre venosa haya sido de 235,000 la cual tomamos como 100%, entonces, se le resta el valor de 183,000 por lo que quedan 52,000 y se efectúa una regla de tres:

$$235,000 - 183,000 = 52,000$$

cantidad de plaquetas adheridas

$$\begin{array}{r}
 235,000 \text{ ----- } 100\% \\
 52,000 \text{ ----- } x \\
 \times \qquad \qquad \qquad = \qquad \qquad \qquad 22, \text{ que es el porcentaje de} \\
 \qquad \text{adhesividad}
 \end{array}$$

VALORES DE REFERENCIA.- de 20 a 40%

METODO DE TIEMPO DE PROTROMBINA

TECNICA DE QUICK

PRINCIPIO.- El tiempo de protrombina es una prueba de investigación para las vías extrínsecas y común del sistema de la coagulación. La coagulación es iniciada por la adición de una cantidad en exceso de un factor tisular (tromboplastina de cerebro) al plasma problema citratado en presencia de iones calcio. El tiempo de protrombina es sensible en detectar aún mínimas reducciones en las actividades de los factores VII, X, V y protrombina, pero detectará sólo reducciones mayores en la concentración de fibrinógeno (usualmente menos de 80 mg/dl).

MUESTRA.- Sangre total citratada (1 parte de citrato de sodio al 3.8% a 9 partes de sangre). Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos a temperatura de centrifuga refrigerada o a temperatura ambiente. Transferir el plasma pobre en plaquetas a un tubo de plástico rotulado y colocar en baño de hielo.

NOTA: Llevar a cabo la prueba dentro de las 3 horas después de la preparación del plasma.

REACTIVOS

- 1.- Tromboplastina humana conteniendo calcio. Disolver el reactivo en la cantidad de agua destilada indicada en la etiqueta; transferir a un tubo de plástico, incubar al menos 15 minutos a 37°C antes de su uso.
- 2.- Solución de cloruro de calcio 0.025M
- 3.- Mezcla de plasmas normales. Preparar igual que plasma problema y colocar en baño de hielo.

EQUIPO

- 1.- Fibrómetro con probe de 0.3 ml y pipeta automática, fibrocopas y fibroindicadores.

- 2.- Tubos de plástico 12 x 75 mm cronómetro.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Pipetear dentro de una fibrocopa precalentada a 37°C 0.1 ml de plasma citratado.
- 2.- Incubar por un minuto a 37°C.
- 3.- Adicionar al sistema 0.2 ml de el reactivo de tromboplastina precalentado a 37°C.
- 4.- Con la adición de la tromboplastina accionar el cronómetro o el reloj del fibrómetro y determinar el tiempo de coagulación de la muestra.
- 5.- Realizar la misma serie de pasos para la mezcla de plasmas normales.

INTERPRETACION

El tiempo de protrombina es reportado en segundos y como un porcentaje de tiempo de protrombina. Los valores de referencia oscilan entre 11.00 y 13.5 segundos o un porcentaje de actividad mayor al 60%.

Estos valores varían de acuerdo con el lote de reactivos y con la muestra de plasmas normales y serán establecidos por el laboratorio que realiza las pruebas.

METODO DE TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL

PRINCIPIO.- El tiempo de tromboplastina parcial es una prueba de la coagulación simple, rápida y reproducible similar al tiempo de recalcificación excepto por 2 variables importantes, la disponibilidad de activar la superficie de contacto y fosfolípido plaquetario 3, son controlados por la adición de un potente activador del factor XII (como el caolín, sílica, ácido elálgico) y fosfolípido (tromboplastina parcial).

Si bien el tiempo de tromboplastina parcial es teóricamente afectado por alteraciones en la actividad de alguno de los factores de la coagulación (excepto los factores VII y XIII), es lo suficientemente sensible sólo para detectar anomalías de la concentración o actividad de los factores participantes en la vía intrínseca de la coagulación (factores XII, XI, VIII, etc.), debido al hecho de que las velocidades de activación de estos factores son mucho más lentas que las de aquellos factores implicados en la vía común (factores X, V, protrombina y fibrinógeno).

MUESTRA.- La misma que para el tiempo de protrombina.

REACTIVOS

- 1.- Reactivo de tromboplastina parcial (Neothromtin, Behringwerke AG, Marburg, W. Germany). Disolver el contenido del frasco vial en el volumen de agua destilada señalado en la etiqueta, mezclar y homogeneizar; conservar a temperatura ambiente.
- 2.- Solución de cloruro de calcio 0.025M
- 3.- Mezcla de plasmas normales, igual que para el tiempo de protrombina.

EQUIPO

El mismo equipo que para la prueba de tiempo de protrombina. Para la determinación del tiempo de tromboplastina parcial, el plasma citratado es mezclado con el reactivo, y después de un período de incubación de dos minutos a 37°C la coagulación se inicia por la adición de la solución con iones calcio.

PROCEDIMIENTO

- 1.- En una fibrocopa o un tubo precalentado a 37°C colocar 0.1 ml del plasma del paciente y 0.1 ml del reactivo de tromboplastina parcial precalentado a 37°C.
- 2.- Incubar la mezcla a 37°C por dos minutos; con ello se activa el sistema de coagulación endógena completamente.
- 3.- Adicionar al sistema 0.1 ml de la solución de cloruro de calcio precalentado a 37°C.
- 4.- Con la adición del cloruro de calcio accionar el cronómetro o el reloj del fibrómetro y determinar el tiempo de coagulación de la muestra.
- 5.- Realizar la misma serie de pasos para la mezcla de plasmas normales.

INTERPRETACION

Los valores de referencia oscilan entre 30 a 45 segundos. Los valores de referencia varían de acuerdo con el lote de reactivos y con la muestra de plasmas normales y serán establecidos por el laboratorio que realiza las pruebas.

METODO PARA LA DETERMINACION DE LA FRACCION
ANTIGENICA DEL FACTOR VIII
TECNICA DE LAURELL

PRINCIPIO.- Un método ingenioso de los métodos - - electroforéticos en combinación con la inmunoprecipitación fue armado por Laurell para la cuantificación de antígenos. El - antígeno migra gracias a la corriente eléctrica (electroforesis) dentro de un agar que contiene un antisuero específico. Como el antígeno migra, entonces reacciona con la cantidad constante del anticuerpo en el gel, y donde existe la proporción óptima entre el antígeno y el anticuerpo, la precipitación ocurrirá. El resultado final es una línea de precipitación en forma de cohetes; la ventaja de esta técnica es que la altura de la banda (así como el área bajo ella) es directamente proporcional a la concentración del antígeno. Consecuentemente este método es admirablemente - apropiado para la cuantificación de antígenos presentes en bajas concentraciones.

MUESTRA.- La misma que para el tiempo de protrombina.

REACTIVOS

- 1.- Solución amortiguadora de barbital 0.2M, pH 8.6
- 2.- Solución de cloruro de sodio al 0.9%
- 3.- Agarosa
- 4.- Colorante de Coomassie-Azul Brillante
- 5.- Solución decolorante
- 6.- Antisuero anti-factor VIII
- 7.- Mezcla de plasmas normales

EQUIPO

- 1.- Equipo para electroforesis
- 2.- Cortador (perforador de gel)

- 3.- Armazones y cámara de difusión.
- 4.- Charolas para tinción.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Preparar 20 ml de agarosa al 1% en el amortiguador de barbital.
- 2.- Llevar a ebullición para disolver la agarosa, agitar. Dejar enfriar hasta 56°C.
- 3.- Adicionar el antisuero para conseguir una concentración de 0.4%.
- 4.- Mezclar bien. Colocar la mezcla sobre placas, nivelar para obtener una distribución uniforme del gel de agarosa.
- 5.- Dejar solidificar. Después de reposar un momento hacer orificios sobre el gel de aproximadamente 3 mm.
- 6.- Con micropipeta colocar 10 ul de cada muestra y del normal en los orificios del gel, procurando no tocar las paredes de este.
- 7.- Colocar en la cámara de electroforesis, poner 400 ml de la solución amortiguadora de barbital en las cámaras correspondientes.
- 8.- Poner como puente papel filtro; correr aproximadamente por 15 hrs. con una corriente de 30 mA.
- 9.- Después de la electroforesis colocar la placa en solución salina por 30 minutos. Secar perfectamente. Teñir con colorante de coomasie y posteriormente decolorar.
- 10.- Secar perfectamente y evaluar los picos de precipitación.

INTERPRETACION DE RESULTADOS.- Los picos de precipitación son medidos con una regla de precisión y se comparan con respecto a los controles normales. Los valores normales se determinan con lo anterior y se reportan como un porcentaje del normal.

METODO PARA LA DETERMINACION DE LA FRACCION.
PROCOAGULANTE DEL FACTOR VIII

PRINCIPIO.- Una mezcla de plasmas normales es diluida a varias concentraciones y adicionadas a un plasma sustrato que esta deficiente en factor VIII, y un tiempo de tromboplastina parcial es determinado. El plasma sustrato contiene niveles normales de los demás factores de la coagulación y por lo tanto el grado de coagulación de cada dilución es proporcional a la concentración de factor VIII en la mezcla. Estas concentraciones son graficadas contra el tiempo de coagulación. Una muestra de plasma del paciente es tratada en la misma forma, entonces puede ser comparada con la curva normal para establecer la concentración en esa muestra.

MUESTRA.- La misma que para el tiempo de protrombina.

REACTIVOS

- 1.- Plasma sustrato deficiente en factor VIII. Disol ver el contenido del frasco vial en el volumen de agua destilada señalado en la etiqueta.
- 2.- Solución de cloruro de calcio 0.025M.
- 3.- Reactivo de tromboplastina parcial (igual que para el tiempo de tromboplastina parcial).
- 4.- Mezcla de plasmas normales.
- 5.- Solución amortiguadora de dietilbarbiturato - acetato 0.05M, con pH de 7.6.

EQUIPO

- 1.- Baño de agua a 37°C con gradilla para tubos de ensaye.
- 2.- Tubos de vidrio de 10 x 75.
- 3.- Pipetas automáticas de 0.1 ml.
- 4.- Cronómetro.
- 5.- Papel log - log.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Colocar en el baño de agua los tubos de vidrio, los suficientes para trabajar todas las diluciones de la prueba por duplicado.
- 2.- Hacer diluciones de cada una de las muestras en la solución amortiguadora, inmediatamente antes de usar. Para ello se pueden emplear tubos de plástico.
- 3.- Mezclar en un tubo de vidrio precalentado 0.1 ml de la solución de plasma sustrato deficiente en factor VIII, 0.1 ml del plasma del paciente (diluido 1:10) y 0.1 ml del reactivo de tromboplastina parcial.
- 4.- Mezclar e incubar a 37°C. Durante el tiempo de incubación agitar aproximadamente cada dos minutos.
- 5.- Agregar 0.1 ml de la solución de cloruro de calcio precalentado a 37°C.
- 6.- Agitar un poco más y determinar el tiempo de coagulación de la manera acostumbrada.
- 7.- Hacer la prueba para cada dilución por duplicado - - simultáneamente.
- 8.- Leer el contenido de factor VIII en la curva de referencia.

VALORES DE REFERENCIA.- de 50 a 150%

METODO DE AGREGACION PLAQUETARIA PARA LA DETERMINACION
DEL FACTOR VON WILLEBRAND
(FACTOR VIII-COFACTOR-RISTOCETINA)

PRINCIPIO.- En presencia del factor de von Willebrand, la ristocetina induce la aglutinación de plaquetas en un plasma rico en ellas.

MUESTRA.- Se precisa:

- 1.- Plasma del paciente.- Mezclar 1 parte de solución también citrato 0.11 mol/l y 9 partes de sangre venosa, evitando la formación de espuma.
 - 2.- Plasma rico en plaquetas (PRP).- Centrifugar la sangre citratada por 10 minutos a 1500 rpm. Transferir una porción de 1 a 2 ml del plasma rico en plaquetas a un tubo de plástico inmediatamente después de - - centrifugar. Rotular como PRP.
 - 3.- Plasma pobre en plaquetas (PPP).- Recentrifugar los remanentes de la sangre citratada ahora a 3000 rpm por 20 minutos. Transferir el plasma inmediatamente después de centrifugar a un tubo de plástico. Rotular como PPP.
- Hacer la cuenta de plaquetas del PRP del paso 2.
 - Ajustar la cuenta de plaquetas de ese PRP con su PPP autólogo, para obtener un plasma con cuenta de plaquetas en un rango de 250,000 - 300,000 /mm³. Usar este nuevo PRP para la prueba de agregación.
 - Para ajustar la concentración plaquetaria del PRP a 300,000 /mm³ hacer los cálculos según el ejemplo - siguiente:

DATOS

Supongamos que tenemos un plasma con una cuenta de plaquetas de 400,000 /mm³ y necesitamos 1.5 ml de

plasma con una cuenta de plaquetas de $300,000 /\text{mm}^3$.

Entonces, planteamos la siguiente relación:

$$1.5 \text{ ml} \text{ ---- } 300,000 = x \text{ ml} \text{ ---- } 400,000 \quad x = 1.12 \text{ ml}$$

Entonces a 1.12 ml de PRP con cuenta de plaquetas de $400,000 /\text{mm}^3$ agregar 0.38 ml de PPP autólogo. Esto dará 1.5 ml de PRP con una cuenta de plaquetas de $300,000 /\text{mm}^3$. No es necesario efectuar la cuenta de plaquetas de la muestra nueva.

- NOTAS. -
- Usar equipo de plástico para transferir y conservar las muestras de sangre, PRP y PPP.
 - Manipular las muestras cuidadosamente.
 - La preparación de las muestras es crítica. El PRP debe ser rápidamente obtenido y se debe ensayar tan pronto como sea posible, no después de 3 horas de obtener la muestra.
 - Preservar las muestras a temperatura ambiente.
 - Instruir al paciente de abstener la ingestión de aspirina, antihistamínicos, medicinas de patente, cuando menos 7 días antes de la prueba.

REACTIVOS

- 1.- Ristocetina (Bio-Data Corporation). Añadir 1 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85% a un vial que contiene 15 mg de ristocetina liofilizada. Conservar en alícuotas congelado hasta su uso.
- 2.- Solución de cloruro de sodio al 0.85%.
- 3.- Agua bidestilada.

EQUIPO

- 1.- Agregómetro Chrono/Log (Chrono-Log Corp., - - - - - Haventown Pa., U.S.A.).
- 2.- Pipetas de 1, 5, 10 ml.; de 50, 100, 250, 500 μ l.
- 3.- Tubos de plástico
- 4.- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

- 1.- Ajustar la temperatura del aparato a 37°C y la agitación a unas 1,100 rpm.
- 2.- Calibrar el agregómetro con PPP a 100%.
- 3.- Calibrar el agregómetro con PRP a 10%.
- 4.- Colocar un volumen de 0.5 ml de PRP en una cubeta; añadir una barra magnética, colocar en el compartimento del agregómetro. Dejar correr por un minuto.
- 5.- Añadir un volumen dentro de un rango de 0.05 a 0.1 ml de la ristocetina y dejar agregar por 7 minutos. Al añadir el volumen de ristocetina en el rango anterior se tiene una concentración final en el sistema de 0.75 al 1.5 mg del agente agregante, esto al añadir la ristocetina al volumen de 0.5 ml del PRP del paciente.

VALORES DE REFERENCIA.- Se consideran como normales las pruebas que dan un porcentaje de agregación por encima del 50%. Las muestras de los pacientes de enfermedad de von Willebrand deberán correrse conjuntamente con las de un pool de donadores sanos como una referencia para la prueba.

METODO DE AGLUTINACION EN PLACA PARA LA DETERMINACION
DEL FACTOR VON WILLEBRAND
(FACTOR VIII-COFACTOR-RISTOCETINA)

PRINCIPIO.- En presencia del factor de von Willebrand y el antibiótico ristocetina, las plaquetas estabilizadas son aglutinadas.

MUESTRA.- La misma que para el tiempo de protrombina.

REACTIVOS

- 1.- Reactivo de von Willebrand.- Disolver el contenido de un frasco del reactivo con 1 ml. de agua destilada. Antes de su utilización resuspender agitando a mano o con un agitador mecánico.
- 2.- Solución salina isotónica, 0.85%.
- 3.- Agua destilada.

EQUIPO

- 1.- Placa-test (protaobjetos).
- 2.- Pipetas de 1 ml; de 50, 200, 500 ul.
- 3.- Tubos de plástico.
- 4.- Cronómetro.
- 5.- Agitador mecánico.

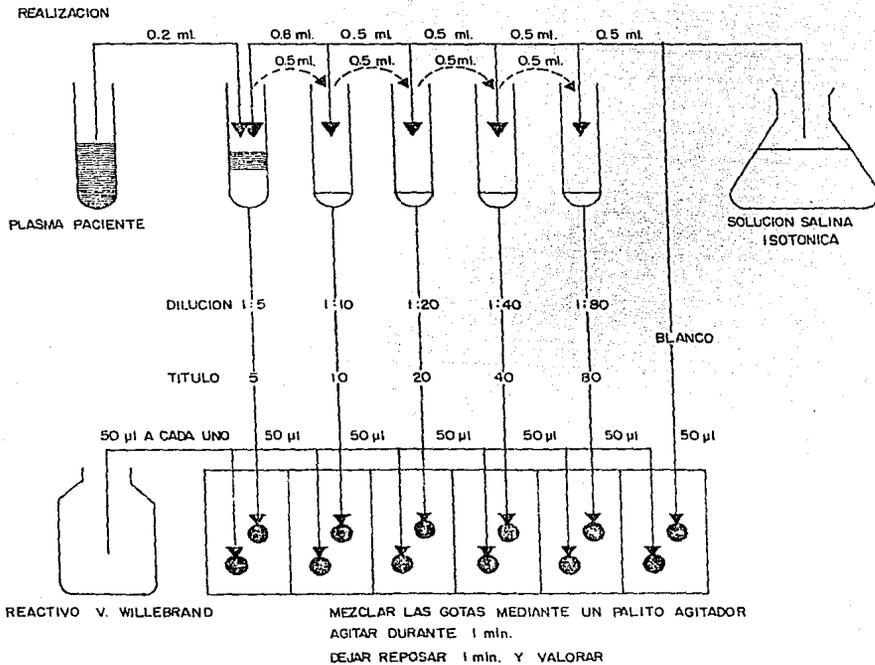
PROCEDIMIENTO

- 1.- Elaborar en los tubos de ensayo una serie de diluciones geométricas, empleando plasma del paciente y -- solución salina isotónica.
- 2.- Colocar por separado en la placa-test de la prueba 50 ul de cada una de las diluciones y 50 ul del reactivo de von Willebrand.
- 3.- Mezclar las gotas con un palillo mezclador.
- 4.- Agitar durante 1 min. (manualmente o con la ayuda

de un agitador mecánico).

5.- Dejar reposar 1 minuto y valorar.

6.- Observar con la ayuda de una lámpara si es necesario.



INTERPRETACION.- La dilución más alta que aún presenta aglutinación frente al blanco, es el título de la prueba. El título multiplicado por la sensibilidad del reactivo proporciona el contenido del factor de von Willebrand de la prueba.

Si sólo muestra aglutinación en la primera dilución (1:5), debe repetirse la determinación con plasma sin diluir. En caso de tener que determinar el contenido del factor en márgenes más estrechos, elegir los correspondientes pasos de dilución más pequeños.

El rango de referencia es 50 - 150%.

CÁPITULO CUATRO

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

TABLA I Resultados para las pruebas de laboratorio del grupo control

PRUEBA	NORMALES * (30)	INTERVALO DE VALORES DE REFERENCIA
T.S.	4 minutos	2 - 5 minutos
C.P.	337,400/mm ³	150,000-450,000/mm ³
T.P.	86%	más del 60%
T.T.P.	30.2 segundos	30-40 segundos
A.P.	30%	20 - 40%
VIII:C	93.1%	50-150%
VIII:Ag	97.8%	50-150%

NOTAS

* (30): Media aritmética de 30 casos normales.

(T.S.: Tiempo de sangrado; C.P.: Cuenta de plaquetas; T.P.: Tiempo de protrombina; T.T.P.: Tiempo de tromboplastina parcial; A.P.: Adhesividad plaquetaria; VIII:C: Fracción procoagulante del factor VIII; VIII:Ag: Fracción antigénica del factor VIII).

TABLA II

Resultados para la prueba de RIPA por los métodos de aglutinación en placa y agregometría para el grupo control. *(30)

RIPA (AGREGACION PLAQUETARIA INDUCIDA CON RISTOCETINA)		
AGREGOMETRIA	AGLUTINACION PLAQUETARIA	VALORES DE REFERENCIA
81%	85%	50 - 150%

NOTAS *(30) Media aritmética de 30 casos normales

TABLA III

Resultados para las pruebas de laboratorio de los pacientes con enfermedad hemorrágica relacionada al factor VIII. Se incluye un diagnóstico en base a estos datos.

PRUEBA	ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND CASOS				HEMOFILIA' (10)	RANGO DE VA- LORES DE REFERENCIA
	1	2	3	4		
T.S.	8 min.	15 min.	9 min.	12 min.	5 min.	2 - 5 min.
C.P.	305,000	280,000	160,000	220,000	237,800	150,000-450,000/
T.P.	100%	64%	83%	64%	73.9%	más del 60%
T.T.P.	28.5seg.	38.8seg.	53.8seg.	38.8seg.	81.9seg.	30-40seg.
A.P.	10%	12%	6%	16%	30%	20-40%
VIII:C	50%	43.5%	4.3%	45%	4%	50-150%
VIII:Ag	55%	73.5%	63%	52%	153.5%	50-150%
VIII:WF Agrego- metría	10%	5%	40%	20%	73%	50-150%
VIII:WF Agluti- nación plaque- taria.	5%	5%	30%	15%	80%	50-150%

NOTAS (10) Media aritmética de 10 casos de hemofilia
 (T.S.: Tiempo de sangrado; C.P.: Cuenta de plaquetas;
 T.P.: Tiempo de protrombina; T.T.P.: Tiempo de trombo-
 plastina parcial; A.P.: Adhesividad plaquetaria; VIII:C:
 Fracción procoagulante del factor VIII; VIII:Ag: Fracción
 antigénica del factor VIII; VIII:WF: Factor von Willebrand).

TABLA IV VALORACION DE LA PRUEBA DE RIP A POR LOS METODOS DE AGLUTINACION PLAQUETARIA Y AGREGOMETRIA PARA LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD HEMORRAGICA. RELACIONADA AL FACTOR VIII.

CASO	AGLUTINACION PLAQUETARIA	AGREGOMETRIA	VALORES DE REFERENCIA
<u>EVW</u>			
1	5%	10%	
2	5%	5%	50 - 150%
3	30%	40%	
4	15%	20%	
HEMOFILIA ' (10)	80%	73%	50 - 150%
NORMALES * (30)	85%	81%	50 - 150%

NOTAS EVW Enfermedad de von Willebrand

' (10): Media aritmética de 10 casos de hemofilia.

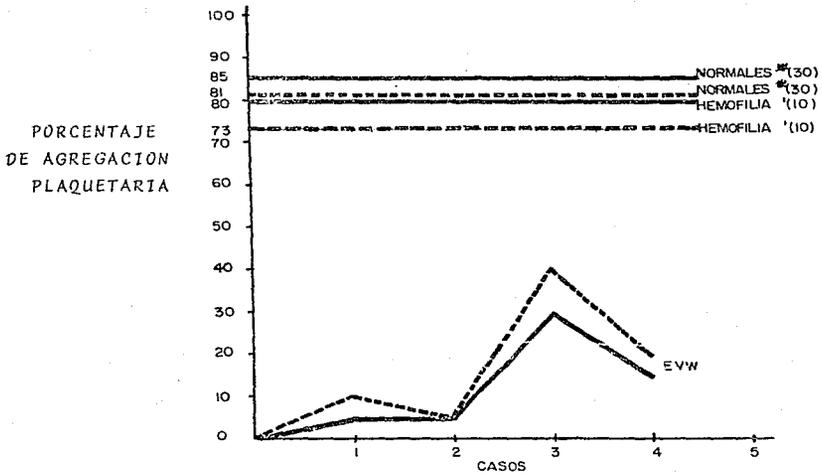
* (30): Media aritmética de 30 casos normales.

(T.S.: Tiempo de sangrado; C.P.: Cuenta de plaquetas;

T.P.: Tiempo de protrombina; T.T.P.: Tiempo de tromboplastina parcial; A.P.: Adhesividad plaquetaria; VIII:C: Fracción

procoagulante del factor VIII; VIII:Ag: Fracción antigénica del factor VIII; VIII:WF: Factor von Willebrand).

GRAFICA 1 COMPORTAMIENTO DE LA PRUEBA DE RIPA EFECTUADA POR LOS METODOS DE AGLUTINACION PLAQUETARIA Y AGREGOMETRIA PARA EL GRUPO CONTROL Y LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD HEMORRAGICA RELACIONADA AL FACTOR VIII.



NOTAS

- *(10) Media aritmética de 10 casos de hemofilia.
- *(30) Media aritmética de 30 casos normales.
- EVW Enfermedad de von Willebrand. (casos 1,2,3,4)
- Curva para aglutinación plaquetaria.
- - - - - Curva para agregometria.

ANALISIS DE RESULTADOS

- Como se menciona en la descripción de resultados, se observa que se han elaborado una serie de tablas y una gráfica donde se describen las caracterizaciones para nuestro grupo control y los individuos con enfermedad hemorrágica relacionada al factor VIII de coagulación.
- Las tablas 1 y 2 mencionan las determinaciones para el grupo del estudio, presentando los valores para la batería de laboratorio planteada en un principio y dando un énfase especial a la prueba de RIPA efectuada por los métodos de agregación plaquetaria y aglutinación en placa. Es importante mencionar que para los fines de este estudio no se han considerado parámetros como el sexo o la edad, ya que la enfermedad se presenta en ambos sexos y a cualquier edad.
- En las tablas 3 y 4 se mencionan los valores para la batería de laboratorio en el grupo de pacientes con enfermedad hemorrágica relacionada al factor VIII. Por una parte, la tabla 3 menciona 7 de las pruebas, con excepción del valor para la RIPA, que se ve en la tabla No. 4. Ambas tablas permiten, en base a los resultados obtenidos, establecer ya un diagnóstico para cada uno de los casos en cuestión, notándose que con esta batería es posible identificar el trastorno que padece el paciente, bien sea hemofilia, EVW u otro problema afín a estos.
- Es notorio que en base a esto, sólo encontramos casos de pacientes con padecimientos de hemofilia y EVW y que no se encontró ningún caso con alguna diátesis - afín (p. ej. Síndrome de Bernard-Soulier).
- Por último, se hace una gráfica donde se analiza en forma muy especial a la prueba de RIPA y su comporta

miento en ambos grupos al efectuarse por los métodos de agregación plaquetaria y aglutinación en placa.

Se observa que el comportamiento es semejante para ambos métodos y esto tiene una explicación, pues se está determinando el mismo analito, tomando en cuenta que se tienen como recursos a estas dos valiosas técnicas.

CAPITULO CINCO

CONCLUSIONES

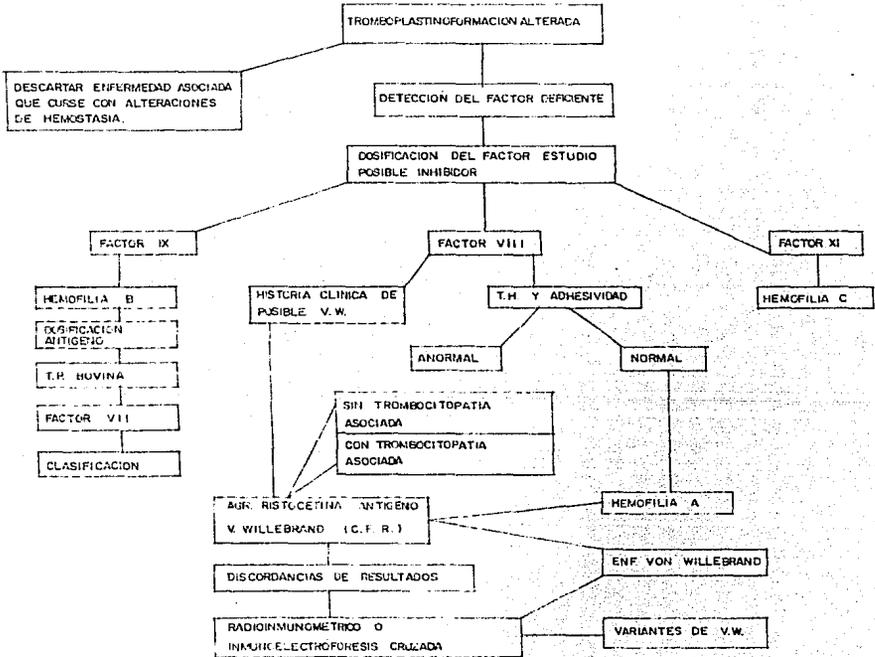
CONCLUSIONES

- La EVW es un padecimiento heterólogo que presenta un patrón distinto a otras diátesis hemorrágicas como la hemofilia y ésto se evidencia por los datos obtenidos con la metodología de laboratorio utilizada para su clasificación.
- Se debe recalcar la importancia de la prueba de RIPA para el diagnóstico diferencial de los pacientes en estudio, ya que nos da la pauta para detectar los diferentes padecimientos por la alteración del factor VIII.
- El paso a seguir es la diferenciación de las subclases de EVW; para ello es necesario tomar en cuenta estudios recientes de multímeros del factor VIII (62), inhibidores en pacientes con esta enfermedad (63), EVW adquiridos (64) y otros.

Cada vez que aparece una nueva técnica diagnóstica nos acerca más al conocimiento de todas estas enfermedades, pero ello no quiere decir que aparte nuestras dudas y simplifique nuestros esquemas; por el contrario, ponen en evidencia la mayor complejidad de estos padecimientos, ya que estamos tratando con procesos moleculares muy complejos, con posibles influencias enzimáticas y regulados posiblemente por varios genes. Cada vez estamos más cerca del diagnóstico, pero cada vez este grupo de enfermedades muestra una peculiaridad nueva e insólita; esto hace que sobre ellas se pueda decir tanto, pero se puede afirmar, sin riesgo a error, tan poco.

RESUMEN DE CONDUCTA DIAGNOSTICA EN HEMOFILIAS

ESQUEMA DE PAUTAS DIAGNOSTICAS EN HEMOFILIAS



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

1. HOYER, L. W.: Von Willebrand's disease. En: "Progress in Hemostasis and Thrombosis". Ed. Spaet, T. H., vol. 3, p. 231. Graune & Stratton. New York, 1976.
2. NILSSON, I. M.; BLOMBACK, M.; JORPES, E., y colaboradores: Von Willebrand's disease and its correction with human plasma fraction I-O. Act. Med. Scand. 159: 179, 1957.
3. JUERGENS, R.; LEHMAUN, W.; WEGELTUS, O., y colaboradores: Von Willebrand's disease. Thromb. Diath. Haemorrh. 1: 257, 1957.
4. NILSSON, I. M.; BLOMBACK, M. y VON FRANCKEN, I.: On an inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic -- globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time. Act. - Med. Scand. 159: 35, 1957.
5. LOPEZ BORRASCA, A.; VICENTE, V.; ALBERCA, I.; BATLLE, J.; SANCHEZ, S. Concepto actual de la enfermedad de Von Willebrand. SNGRA, 23(5-B), 708-727, 1978.
6. HELLEM, A. J.; The adhesiveness of human platelets in vitro. Scand. J. Lab. Invest. 12(suppl.): 1, 1960.
7. BORCHGREVINK, C.F.: platelet adhesion in vivo in patients with bleeding disorders. Acta Med. Scand. 170: 231, 1961.
8. BOWIE, E.J. W., y OWEN, C.A., Jr.: Platelet abnormalities in Von Willebrand's disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 201: 400, 1972.
9. MEYER, D.: In vitro platelet adhesiveness. Methods of study and clinical significance. Adv. Exp. Biol. Med. 34: 123, 1972.
10. ZIMMERMAN, T. S.; RATNOFF, O. D., y POWELL, A. E.: Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and Von Willebrand's disease. J. Clin. Invest. -- 50: 244, 1971.

11. HOWARD, M. A., y FIRKIN, B. G.: Ristocetin: A new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 26: 362, 1971.
12. WEIS, H. J.; HOYER, L. W.; RICKLES, F. R., y colaboradores: Quantitative assay of a plasma factor, deficient in Von Willebrand's disease, that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. *J. Clin. Invest.* 52: 2708, 1973.
13. HOYER, L. W.; DE LOS SANTOS, R. P., y HOYER, J. R.: --- Antihemophilic factor antigen: localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy. *J. Clin. Invest.* 52: 2737, 1973.
14. BLOOM, A. L.; GIDDINGS, J. C., y WILKS, C. J.: Factor VIII on the vascular intima: possible importance in haemostasis and thrombosis. *Nature (new Biol.)* 241: 217, 1973.
15. JAFFE, E. A., y NACHMAN, R. L.: Factor VIII binding protein in human platelets. *Clin. Res.* 23: 276A, 1975.
16. NACHMAN, R. L., y JAFFE, E. A.: Subcellular platelet factor VIII antigen and Von Willebrand factor. *J. Exp. Med.* 141: 1101, 1975.
17. JAFFE, E. A.: Endothelial cells and the biology of factor VIII. *New Engl. J. Med.* 269: 377, 1977.
18. RICK, M. E., y HOYER, L. W.: Immunologic studies of ----- antihemophilic factor (AHF, factor VIII). V. Immunologic -- properties of AHF subunits produced by salt dissociation. -- *Blood.* 42: 737, 1973.
19. ZIMMERMAN, J. R., y EDGINTON, T. S.: Factor VIII related antigen: Multiple molecular forms in human plasma. *Proc. -- Nat. Acad. Sci. USA.* 72: 5121, 1975.
20. GRALNICK, H. R.; COLLER, B. S., y SULTAN, C.: Carbohydrate deficiency of the factor VIII/Von Willebrand factor protein - in Von Willebrand disease variants. *Science.* 192: 56, 1976.

21. AUSTEN, D. E. G.: Factor VIII of small molecular weight and its aggregation. *Brit. J. Haematol.* 27: 89, 1974.
22. COOPER, H. A., y WAGNER, R. H.: The defect in hemophilic and Von Willebrand's disease plasmas studied by a ----- recombination technique. *J. Clin. Invest.* 54: 1039, 1974.
23. RATNOFF, O.: Discussion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 240: 78; 1975.
24. CASTILLO, R.; MARAGALL, S.; LIENDO, F.; ORDINAS, A.: Diagnóstico biológico de la enfermedad de Von Willebrand. *SNGRA*, 23(5-B), 728-745, 1978.
25. ALEXANDER, B., y GOLDSTEIN, R.: Dual hemostatic defect in -- pseudo-hemophilia. *J. Clin. Invest.* 32: 531, 1953.
26. QUICK, A. J., y HUSSEY, C. V.: Hemophilic condition in the female. *J. Lab. Clin. Med.* 42: 929, 1953.
27. NILSSON, I. M.; BLOMBACK, M.: Von Willebrand's disease in -- Sweden. Its pathogenesis and treatment. *Acta Med. Scand.* -- 164: 3, 1959.
28. SALZMAN, E. W.: Measurement of platelet adhesiveness: a -- simple in vitro technique demonstrating an abnormality in von Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.* 62: 734, 1963.
29. HOWARD, M. A.; SAWERS, R. J., y FIRKIN, B. G.: Ristocetin: a means of differentiating von Willebrand's disease into two - groups. *Blood.* 41: 687, 1973(b).
30. TSCHÖPP, T. B.; WEISS, H. J., y BAUMGARTNER, H. R.: ----- Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von --- Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.* 83: 276, 1974.
31. IVY, A. C.; NELSON, D., y BUCHER, G.: The standardization of certain factors in the cutaneous "venostasis" bleeding time -- technique. *J. Lab. Clin. Med.* 26: 1812, 1943.
32. BORCHOREVINK, C. F.: A method for measuring platelet adhesiveness in vivo. *Acta Med. Scand.* 168: 157, 1960.

33. BAUMGARTNER, H. R.: *The role of blood flow in platelet --- adhesion (fibrin deposition and formation of mural thrombi. -- Microv. Res. 5: 167, 1973.*
34. WEISS, H. J.; TSCHOPP, T. B.; BAUMGARTNER, H. R.; SUSSMAN, I. I.; JOHNSON, M. M.; EGAN, J. J.: *Decreased adhesion of giant (Bernard-Soulier) platelets to subendothelium. --- Further implications on the role of the von Willebrand factor in hemostasis. Am. J. Med. 57: 920, 1974.*
35. HELLEM, A. J.: *The adhesiveness of human blood platelets in vitro. Scand. J. Clin. Lab. Inv. 12: 51, 1960.*
36. BOWIE, E. J. W.; OWEN, C. A.; THOMPSON, J. H., y DIDISHEIM, P.: *Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. Am. J. Clin. Path. 52: 69, 1969.*
37. BLOOM, A. L., y PEAKE, I. R.: *Molecular genetic of factor - VIII and its disorders. Brit. Med. Bull. 33: 3, 219, 1977.*
38. HOYER, L. W.: *Von Willebrand's disease. Prog. Hem. Thromb. 3: 231,*
39. MEYER, D.; JENKINS, C. S. P.; DREYFUS, M. D.; FRESSINAUD, E., y LARRIEU, M. J.: *Willebrand factor and ristocetin. II. Relationship between Willebrand factor, Willebrand antigen and factor VIII activity. Brit. J. Haem. 28: 579, 1974.*
40. MEYER, D.; DREYFUS, M., y LARRIEU, M. J.: *Willebrand factor immunological and biological study. Path. Biol. 21: 66, -- 1973(b).*
41. WEISS, H. J.; ROGERS, J., y BRAND, H.: *Defective ristocetin-induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and -- its correction by factor VIII. J. Clin. Inv. 52: 2697, --- 1973(b).*
42. BARBUI, T.; BATTISTA, R., y DINI, E.: *Relationship between -- ristocetin-induced platelet aggregation and factor VIII activity and antigen in von Willebrand's disease. Blut. 29: 260, 1974.*

43. SANDERSON, J. H.; BURN, A. M., y COOKE, S.: Platelet --- responses to ristocetin in von Willebrand's disease. *Scand. J. Haem.* 12: 249, 1963.
44. WEISS, H. J.: Abnormalities of factor VIII and platelet -- aggregation. Use of ristocetin in diagnosing the von ----- Willebrand syndrome. *Blood.* 45: 403, 1975(a).
45. MEYER, D.: Von Willebrand's disease. Recent advances in blood coagulation. Edat. by L. Poller. Churchill Livingstone --- Edimburg, London and New York, 183, 219, 1977.
46. JENKINS, C. S. P.; MDYER, D.; DREVFUS, M.; LARRIEU, M. J.: Willebrand factor and ristocetin. I. Mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation. *Brit. J. Haem.* 28: 561, 1974.
47. TANGEN, O.; BERMAN, H. J., y MARFEY, P.: Gel filtration: a new technique for separation of blood platelets from plasma. - *Thromb. Diath. Haem.* 25: 268, 1971.
48. HUTTON, R. A., y HOWARD, M. A.: The aggregability of ---- separated platelets. *Nouv. Rev. Franc. Hemat.* 13: 543, 1973.
49. WEISS, H. J.; PHILLIPS, L. L., y ROSNER, W.: Separation of subunits of antihemophilic factor (AHF) by agarose gel ----- chromatography. *Thromb. Diath. Haem.* 27: 212, 1972.
50. LAURELL, C. B.: Quantitative estimation of proteins by --- electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. - Bio.* 15: 45, 1966.
51. GUIASOLA, J. A.; COCKBURN, C. G., y HARDISTY, R. M.: --- Plasmin digestion of factor VIII characterization of the ----- breakdown products with respect to antigenicity and von --- Willebrand activity. *Blood*, 1978 (in press).
52. LARRIEU, M. J.; MEYER, D., y ARDAILLON, N.: Syndrome de -- Willebrand. *Nouv. Rev. Franc. Hemat.* 18: 371, 1977.
53. PEAKE, I. R., y BLOOM, A. L.: The use of an immunoradiometric assay for factor VIII related antigen in the study of atypical von Willebrand's disease. *Thromb. Res.* 10: 27, 32, 1977.

54. GREEN, D., y POTTER E.: Evidence for the presence of the von Willebrand factor on platelets. Abstract, Am. Soc. Hemat. 88, 1974.
55. RATNOFF, O. D., y BENNETT, B.: Clues to pathogenesis of bleeding in von Willebrand's disease. New Eng. J. Med. 289: 1182, 1973.
56. BIGGS, R., y MATTHEWS, J. M.: The treatment of haemorrhage in von Willebrand's disease and the blood level of factor VIII (AHG). Brit. J. Haemat. 9: 203, 1963.
57. CORNU, P.; LARRIEU, M. J.; CAEN, J., y BERNARD, J.: Transfusion studies in von Willebrand's disease: effect on bleeding time and factor VIII. Brit. J. Haemat. 9: 189, 1963.
58. CAEN, J., y SULTAN, Y.: Von Willebrand's disease as an - - - endotheliacell abnormality. Lancet. 2: 1129, 1975.
59. SULTAN, Y., JEANNEAU, C.; LAMAZIERE, O.; MAISONNEUVE, P., y CAEN, J.P.: Platelet factor VIII related antigen: Studies in vivo after transfusion in patients with von Willebrand's disease. Blood. 71: 4, 751, 1978.
60. BOUMA, B. N.; HORDIJK-HOS, J.M.; DE GRAAF, S.; SIXMA, J. J., y VAN MOURIK, J.A.: Presence of factor VIII related antigen in blood platelets of patients with von Willebrand's disease. Nature. 257: 1510, 1975.
61. JAFFE, E.A., y NACHMAN, R.L.: Subunit structure of factor VIII antigen synthesised by cultured human endothelial cells. J. Clin. Inv. 56: 698, 1975.
62. WEISS, H. J.; PHILLIPS, L. L., y ROSNER, W.: Separation of subunits of antihemophilic factor (AHF) by agarose gel - - - chromatography. Thromb. Diath. Haem. 27: 212, 1972.
63. KASPER, C., y colaboradores: A more uniform measurement of Factor VIII inhibitors. Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 869, 1975.
64. JOIST, J.H.; COWAN, J. F., y ZIMMERMAN, T. S.: Acquired Von Willebrand's disease. New Eng. J. Med. 298: 988, 1978.