

5  
2eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



**DETERMINACION DEL FACTOR VIII DE LA COAGULACION  
POR TECNICAS COAGULOMETRICAS E INMUNOQUIMICAS  
EN UN ESTUDIO REALIZADO EN UNA PACIENTE QUE  
PRESENTA UNA PROBABLE DEFICIENCIA DE DICHA  
PROTEINA PLASMATICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**NORMA BARRAGAN ANDRADE**

**ASESORES DE TESIS:**

**DR. JOSE E. GONZALEZ LLAVEN**

**DR. J. MANUEL HERNANDEZ HERNANDEZ**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO**

**1994**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
SECRETARIA ACADÉMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Dr. Manuel Enrique Oballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Determinación del Coeficiente de Fibrinógeno VIII e la coagulación  
por técnicas coagulométricas e inmunológicas en la sangre  
realizado en una paciente que presenta una probable deficiencia  
de dicha proteína plasmática.

que presenta la pasante: Norma Barragán Andrade  
con número de cuenta: 8553979-4 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 1 de Febrero de 1994.

PRESIDENTE	<u>Dr. José González Llavén</u>	
VOCAL	<u>C.F.E. Antonio Sánchez Ortega</u>	
SECRETARIO	<u>C.F.E. Idalia Avila Iyigawa</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>C.F.E. Víctor Manuel González</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>C.F.E. Annel Martínez Mora</u>	

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por guiarme en el camino más cercano a la verdad  
y al amor.*

*A mis padres con amor, que son el motivo de mi  
realización profesional, gracias por su amor, confianza  
y apoyo que me han dado toda mi vida, les amó.*

*A mis hermanos, que siempre me apoyaron con su  
cariño y comprensión:*

*Refugio*

*Rita*

*Lucía*

*Alfonso*

*Ernesto*

*Rubén*

*Especialmente a Rogelio, Leticia, Rocío y Verónica.*

Todo mi cariño a las familias: Barragán Arias, Barragán Montoya, Barragán Sánchez, Contreras Barragán, Luna Barragán, Robles Barragán, Sánchez Barragán.

A todos mis sobrinos que han estimulado mi superación profesional, gracias pequeños, especialmente a Mary, Marcos, Samuel, Beto, Edgar, Ana, Laura, Yoya, Mickey, Alejandrito, Vero, Pedrito, y José Luis.

Con amor a Mayo por su apoyo, paciencia, cariño y respeto.

A las personas que motivaron mi vida profesional.

A los profesores que participaron en mi formación profesional, especialmente los de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A todos los revisores del presente trabajo mi especial agradecimiento.

Al Dr. José E. González Llavén. Jefe del Laboratorio de Hematología Especial y Director de esta tesis. Gracias por su confianza, cariño y apoyo que siempre me brindó.

Al personal del Laboratorio de Hematología Especial del C.M.R. especialmente a la Q.F.B. Aurora García Manzano por su asesoramiento, así como su agradable amistad.

Al Q.B.P. Juan Víctor Andión por todo su cariño y apoyo.

A la Q.B.P. Rosalina Rodríguez y la Q.F.B. Edith González por sus valiosos apoyos y cariño que siempre me mostrarón.

Con especial cariño y admiración a Claudia Beltrán Ochoa.

Gracias al Banco de Sangre C.M.R. por su siempre ayuda incondicional, especialmente a los donadores de sangre.

Con especial cariño y admiración al Dr. Jesús Calderón que me abrió las puertas del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., ayudando en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Manuel Hernández Hernández por su asesoría experimental del desarrollo del presente proyecto así como su paciencia y amistad.

A todo el personal de la Unidad de Reactivos Inmunológicos y Anticuerpos Monoclonales (URIAM) a cargo del Dr. Manuel Hernández y especialmente al Biol. Armando Pérez por su apoyo técnico en la realización del presente trabajo.

A M.en C. Carlos García por su ayuda en la edición de esta tesis.

A todos mis amigos, especialmente a Laura, Eyra, Sara, Estela, María Elena, y Silvia.

Al personal de los laboratorios 15 por su ayuda y amistad incondicional.

A los integrantes de la U.T.E. por su motivación, apoyo, consideración y cariño.

El presente trabajo fue realizado en colaboración de las siguientes Instituciones:

Laboratorio de Hematología Especial del Centro Médico la Raza (H.E.C.M.R.) del Instituto Mexicano del Seguro Social  
Ubicado en Seris y Zaachita s/n Col. La Raza.

Unidad de Reactivos Inmunológicos y Anticuerpos Monoclonales (URIAM) del Departamento de Biología Celular en el Centro de Investigación y estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Ubicado en Av. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col. San Pedro Zacatenco.



# INDICE

	Hoja
1 Indice General .....	1
2 Abreviaturas .....	6
3 Introducción	
3.1 Antecedentes .....	8
3.2 Generalidades .....	11
3.3 Sistema vascular .....	12
3.4 Sistema plaquetario .....	13
3.5 Sistema de coagulación .....	14
3.6 Cofactores de la coagulación .....	19
3.7 El Complejo Factor VIII:C - Factor von Willebrand .....	20
3.11 Factor VIII:C .....	21
3.12 Estructura del Factor VIII:C .....	23
3.13 Métodos inmunológicos para determinar el Factor VIII: C .....	25
3.14 Factor von Willebrand .....	26
3.15 Inhibidores contra Factor VIII .....	28
4 Resumen caso clínico .....	30

5 Hipótesis .....	31
6 Objetivos .....	32
7 Materiales y Métodos	
7.1 Obtención de muestras .....	33
7.2 Pruebas de coagulación	
7.2.1 Tiempo de trombina (TT) .....	34
7.2.2 Tiempo de protrombina (TP) .....	36
7.2.3 Tiempo de trombotoplastina parcial activada (TTPa).....	38
7.2.4 Tiempo de sangrado (TS) .....	41
7.2.5 Cuenta manual de plaquetas .....	43
7.2.6 Dosificación de factores IX, XI, y XII .....	46
7.2.7 Determinación de Factor VIII:C .....	49
7.2.8 Determinación de inhibidor de Factor VIII:C .....	51
7.3 Cuantificación de proteína por el método de Bradford .....	54
7.4 Técnicas inmunoenzimáticas	
7.4.1 Titulación de antígeno y de anticuerpo para la determinación de Factor von Willebrand por el método de ELISA .....	57
7.4.2 Estandarización y Validación de la determinación de Factor von Willebrand por el Método de ELISA .....	60
7.4.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	62
7.4.4 Inmunolectrotransferencia .....	66

7.4.5 Tinción de papel de nitrocelulosa con anticuerpo .....	68
8 Resultados .....	71
9 Discusión .....	88
10 Conclusiones .....	95
11 Perspectivas .....	96
12 Bibliografía .....	98
13 Apéndices de soluciones .....	109

## Indice de Tablas

Tabla 1 : Sistemas involucrados en la hemostasia .....	11
Tabla 2 : Propiedades de los genes, RNAm y productos genómicos de los componentes de la coagulación .....	15
Tabla 3 : Cuantificación de proteína por el método de Bradford .....	56
Tabla 4 : Preparación de geles de poliacrilamida .....	64
Tabla 5 : Resultados de Pruebas basales de coagulación .....	71
Tabla 6 : Resultados de Pruebas especiales de coagulación .....	72
Tabla 7 : Resultados de Pruebas que valoran la enfermedad de von Willebrand .....	73
Tabla 8 : Resultados de Pruebas para valorar una enfermedad autoinmune o LES.....	74
Tabla 9 : Resultados del Estudio de los padres de la paciente .....	76
Tabla 10 : Validación de la determinación del FvW por ELISA .....	80
Tabla 11 : Determinación del FvW en el plasma de la paciente por el método de ELISA.....	82
Tabla 12 : Marcadores de peso molecular .....	85

## Indice de Figuras

Figura 1 : Vías extrínseca e intrínseca de la coagulación .....	18
Figura 2 : Estructura del Factor VIII:C .....	24
Figura 3 : Determinación de la actividad del FVIII:C y la presencia de inhibidor contra FVIII:C .....	75
Figura 4 : Curva de calibración para determinar proteína por Bradford.....	77
Figura 5 : Titulación de antígeno-anticuerpo para la determinación de factor von Willebrand por el método de ELISA .....	78
Figura 6 : Determinación del FvW por el método de ELISA en plasmas normales .....	81
Figura 7 : Determinación del FvW por el método de ELISA en plasmas normales y de la paciente en estudio .....	82
Figura 8 : Determinación del FvW por inmunoelectrotransferencia .....	84
Figura 9 : Determinación de Pesos Moleculares .....	86
Figura 10 : Determinación del FvW por inmunotransferencia .....	87

## **ABREVIATURAS**

$A_{414nm}$  : Absorbencia a 414 nanómetros.

ABT-S : 2,2' - azino-bis (6- ácido sulfónico, 3-etilbenzotiazol) sal diamonio.

ADP : Adenosin difosfato.

APS : Persulfato de amonio.

ASB : Albúmina sérica bovina.

Da : Daltones.

DAB : Diaminobencidina.

DNA : Acido desoxirribonucleico.

ELISA : Ensayo inmunoenzimático.

EvW : Enfermedad de von Willebrand.

EvWA : Enfermedad de von Willebrand adquirida.

FVIII:AgR : Factor VIII antígeno relacionado.

FVIII : C : Factor VIII proteína procoagulante.

FvW : Factor von Willebrand.

F3P : Factor 3 plaquetario.

GAM-P : Anticuerpo de burro peroxidado anti-ratón.

GAR-P : Anticuerpo de burro peroxidado anti-conejo.

GP-Ib : Glicoproteína Ib.

HMWK : Cininógenos de alto peso molecular.

**Kb** : Kilobases.

**kDa** : Kilodaltones.

**LES** : Lupus eritomatoso sistémico.

**mg** : Miligramo.

**ml** : Mililitro.

**$\mu$ l** : Microlitros.

**$\mu$ g** : Microgramos.

**MPN** : Mezcla de plasmas normales.

**PBS** : Solución amortiguadora de fosfato.

**PL** : Prueba de lazo.

**P.M.** : Peso molecular.

**RNA<sub>m</sub>** : Acido ribonucléico mensajero.

**SDS** : Dodecil sulfato de sodio

**TP** : Tiempo de protrombina.

**TT** : Tiempo de trombina.

**TTPa** : Tiempo de tromboplastina parcial activada.

**TEMED** : N,N,N,N - tetrametiletilenediamina.

**U.B.** : Unidades Bethesta.

**V/V** : Proporción volumen a volumen.

**V<sub>max</sub>** : Velocidad máxima

# INTRODUCCION

## Antecedentes

La hemofilia A y la enfermedad de von Willebrand (EvW) son los desordenes más comunes en la coagulación de la sangre. La hemofilia A ocurre con una frecuencia de 1 en 10,000 individuos (Gordon 1980, Chan 1989, Higuchi 1989).

La hemofilia A es un desorden hemorrágico congénito recesivo ligado al sexo causado por una deficiencia o anomalía del Factor VIII:C (FVIII:C), llamado originalmente Factor antihemofílico, por encontrarse una baja actividad coagulante de éste en dicha enfermedad (Higuchi 1989, White 1989).

La enfermedad es expresada en hombres, quienes heredan el gen de la hemofilia de sus padres (X'). La hemofilia es portada por mujeres, que heredan el gen de la hemofilia del padre y un gen normal de la madre. Las hijas de hemofílicos son portadoras obligadas. Fenotípicamente pacientes con hemofilia son deficientes en FVIII:C. Esta deficiencia varía de < 1% hasta 50% (White 1989).

Estudios inmunológicos han establecido que el defecto de la coagulación en la hemofilia A está asociado la síntesis de una molécula inactiva de FVIII:C, sin embargo, la actividad de Factor von Willebrand (FvW) es normal (Hoyer 1981).



Las bases moleculares de la Hemofilia A han sido descritos en varios pacientes, las cuales incluyen delección de genes, inserciones y mutaciones puntuales (Higuchi 1989).

En 1926 Erik von Willebrand, un profesor alemán describe la enfermedad hemorrágica congénita que lleva su nombre después de que estudió a varios miembros de una familia de Foglo, una isla del Archipiélago Aland en el golfo de Botnia (Zaverio 1987).

Cuarenta y cinco años después, en 1971, la proteína deficiente en la enfermedad de von Willebrand (EvW) es conocida como Factor von Willebrand (FvW). Debido a que dicha proteína fue detectada inmunológicamente fue llamado Factor VIII antígeno relacionado (FVIII:AgR). Sin embargo este concepto relacionado es válido hasta que el FvW y FVIII:C se unen no covalentemente para formar un complejo en la sangre (Zaverio 1987).

EL FvW es una proteína disminuida o alterada en la EvW, característica autosómica dominante que afecta a hombres y mujeres (Fulcher 1982, Murray 1991).

En la EvW la actividad del FVIII:C y la actividad del FvW se encuentran disminuidas. Lo que corrobora que estas dos proteínas se encuentran asociadas en plasma (Gordon 1980 Hoyer 1972).

El fenotipo clínico de la EvW sugiere heterogeneidad patogénica

significativa. La EvW tipo I y II son caracterizadas por anomalías cualitativas con ausencia consistente de formas multiméricas de alto peso molecular del FvW (Murray 1991).

En la EvW tipo II B el FvW muestra una falta de grandes multímeros, siendo que las plaquetas lisadas muestran un perfil multimérico normal (Murray 1991).

Se han identificado anticuerpos que inhiben alguna actividad del FvW o bien que se combinan con el FvW formando complejos inmunes que resultan en un catabolismo excesivo de la molécula (Goudermand 1988).

La enfermedad de von Willebrand adquirida (EvWA) es un síndrome que en contraste con la enfermedad de von Willebrand clásica ocurre en pacientes sin una historia familiar previa de tendencias hemorrágicas. Las anomalías aparecen debidas a defectos cualitativos o cuantitativos del FvW (Goudermand 1988).

También se han reportan casos de EvWA por presencia de un inhibidor de la unión del FvW a plaquetas inducido por ristocetina y por trombina. (Goudermand 1988).

La variante tipo II de la enfermedad von Willebrand adquirida es caracterizada por la ausencia de multímeros de alto peso molecular (Goudermand 1988).

## Generalidades

La hemostasia es un proceso equilibrado diseñado para mantener la fluidez de la sangre dentro de los vasos sanguíneos, ayuda en la reparación y evita la pérdida de sangre cuando hay daño vascular. La hemostasia involucra la interacción de los siguientes sistemas que nos muestra la tabla 1:

(Gonias 1986, Velázco 1991).

Tabla 1

Sistemas involucrados en la Hemostasia (Gonias 1986, Velázco,1991).

	Sistema:
1	Vascular
2	Plaquetario
3	De la coagulación
4	Fibrinolítico

Una vez que se rompe un vaso, hay vasoconstricción, la cual es controlada por impulsos nerviosos mediados por reflejo axónico, el propósito de la vasoconstricción es reducir el flujo sanguíneo en la zona afectada

(Gonias 1986).

Posteriormente debido al estímulo que ofrece la colágena expuesta en el sitio del daño vascular, las plaquetas circulantes se adhieren y agregan a la colágena del endotelio del vaso dañado liberando: Adenosin difosfato (ADP),

Trombina, tromboxano  $A_2$  y Serotonina, cuyo papel es reforzar la agregación de las plaquetas hasta llegar a la formación de un trombo plaquetario, el cual detiene en forma momentánea la pérdida de sangre simultáneamente reforzado por la formación de fibrina (Gonias 1986, Velázco 1991).

## **Sistema Vascular**

Los vasos sanguíneos además de contener la sangre, participan en el mecanismo hemostático con vasoconstricción local y la exposición de la colágena del endotelio que conduce a la adhesión y agregación plaquetaria (Gonias 1986).

El subendotelio de la pared de los vasos sanguíneos contienen colágena, elastina, glucosaaminoglucanos y proteoglucanos (Cornack 1983).

La adhesión de las plaquetas a la colágena es el primer paso en el proceso hemostático cuando un vaso sanguíneo es dañado (Morton 1989).

## **Sistema Plaquetario**

La función de las plaquetas puede dividirse en varias fases específicas:

- 1) Adhesión plaquetaria
- 2) Agregación Plaquetaria
- 3) Reacción de liberación y participación en la coagulación del plasma

(Velázquez 1991).

La adhesión se da cuando las plaquetas tienen contacto con el subendotelio dañado, se adhieren a él cambiando la configuración de la membrana plaquetaria (Glicoproteína IIb /IIIa ) quedando expuestos los sitios de unión para el fibrinógeno y el Factor von Willebrand (Velázquez 1991).

Cuando se produce la adhesión, las plaquetas sufren un cambio de su forma de disco a esfera con emisión de pseudópodos facilitando la formación de agregados plaquetarios (Velázquez 1991).

La agregación puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la intensidad del estímulo hacia la plaqueta (Velázquez 1991).

La primera onda de agregación es acompañada de una reorganización interna. Algunos cuerpos densos se mueven hacia la superficie de la plaqueta, mientras que los gránulos se colocan en el centro. La segunda onda de agregación permite la liberación de sustancias como una consecuencia de una completa contracción de la plaqueta. Pruebas bioquímicas confirman la

liberación de sustancias como: ADP, trombina, serotonina, calcio, Factor 4 plaquetario; estos son responsables de esta onda secundaria y generalmente de agregación irreversible. Posteriormente, varias sustancias son liberadas a diferentes grados. Fibrinógeno, hidrolasas a partir de los gránulos alfa y otras sustancias. (Velázco 1991, Gonias 1986).

## **Sistema de Coagulación**

En condiciones normales al haber daño endotelial se dispara el mecanismo de coagulación, cuya finalidad es la formación de un trombo estable sobre la superficie dañada lo que depende de la conversión de fibrinógeno a fibrina por acción de trombina (Gonias 1986).

Se requieren diversos factores para que se produzca la coagulación. Un comité Internacional ha identificado los factores demostrados mediante números romanos. Los factores procoagulantes del plasma son los que nos indica la tabla 2 (Furie 1988, Board 1992).

Tabla 2  
 Propiedades de los genes, RNAm, y productos genómicos de los  
 componentes de la coagulación (Furie 1988, Board 1992).

Componente	función	[en plasma] (µg/ml)	P.M. (KD)	Gen (Kb)	Cromosoma	RNAm (Kb)	Exones
Protrombina	Z.P.	100	72	21	11p11-q12	2.1	14
Factor X	Z.P.	10	56	22	13q34	1.5	8
Factor IX	Z.P.	5	56	34	Xq26-27.3	2.8	8
Factor VII	Z.P.	0.5	50	13	13q34	2.4	8
Factor VIII	C.F.	0.1	330	185	Xq28	9.0	26
Factor V	C.F.	10	330			7.0	
Factor XI	Z.P.	5	160	23			15
Factor XII	Z.P.	30	80	12	5	2.4	14
Fibrinógeno	E.	3000	340				
Proteína C	Z.P.	4	82	11		1.8	8
Proteína S	C.F.	25	80			2.4	
FvW	A.	10	225	175	12pter-p12	8.5	2
F. Tisular	CF/I	0	37		1pter-p12	2.1	
Factor XIII	E.F.	1*	320		6p24-25 1q31-32.1		15

Z.P.:Zimógeno Proteasa C.F.:Cofactor E: Estructural A: Adhesión  
 C.F./I:Cofactor de iniciación E.F.:Entrecruza Fibrina \* U/ml

La coagulación sanguínea da origen a la formación de un trombo debido a la transformación de fibrinógeno; proteína soluble en el plasma, en una red de fibrina insoluble que encierra leucocitos, eritrocitos y un trombo plaquetario para detener totalmente la hemorragia. Esta involucra una serie de proenzimas que en estado inactivo circulan en el plasma, y que activadas pasan a la forma enzimática (Velázquez 1991).

El mecanismo de la coagulación sanguínea es descrito clásicamente como vías extrínseca e intrínseca (Kenneth 1992).

La vía intrínseca es aquella que depende exclusivamente de los componentes del plasma circulante, en tanto que, la vía extrínseca depende de la entrada a la circulación de sustancias procoagulantes como la tromboplastina tisular proveniente de los vasos lesionados (Velázquez 1991).

Ambas vías convergen en una ruta final común, la producción de "Protrombinasa", la cual en presencia de iones calcio cataliza la reacción que convierte protrombina en trombina, ésta convierte al fibrinógeno en fibrina (Velázquez 1991, Kenneth 1992).

La vía intrínseca se activa cuando al haber daño endotelial, el factor XII cambia de forma al contacto con una superficie extraña de contacto (subendotelio) exhibiendo el sitio activo serina-proteasa que convierte a la precalicreína en calicreína y ésta retroalimenta en su forma más potente al

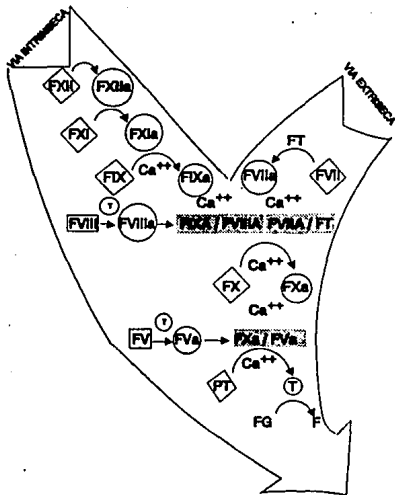


factor XII dando como resultado la activación del factor XI. Otras proteínas necesarias para la activación son el cininógeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreínas y factor XIa, iones calcio con cambios en la molécula del Factor IX, mismo que revela su sitio activo esterasa de serina que a su vez activa al Factor X. Para que esta reacción ocurra necesita formarse un complejo micelar de Factor IXa - Factor VIIIa - Factor 3 plaquetario - iones calcio - fosfolípidos llamado complejo diez-asa (Gonias 1986, Kenneth 1992, Woodliff 1981).

El Factor X también puede ser activado por un complejo de tromboplastina tisular-Factor VIIa-iones calcio a través de la vía extrínseca. El Factor X una vez activado reacciona formando un complejo micelar con el factor Va - factor 3 plaquetario - iones calcio - fosfolípidos llamado complejo protrombinasa que activa a la protrombina liberando fragmentos como F1 y F2 formando la trombina, la cual es una enzima que libera fibrinopéptidos a partir de la molécula de fibrinógeno, dejando monómeros de fibrina, los cuales se agregan para formar un coágulo (Gonias 1986, Kenneth,1992, Woodliff,1981).

Las glicoproteínas que participan en la vía intrínseca de la coagulación son; los Factores XII, XI, IX, VIII, X y V, protrombina, fibrinógeno, calicreínas, y KHWM. Las glicoproteínas que participan en la vía extrínseca de la coagulación son iniciadas por la acción de Factor tisular, localizado en la

superficie de las células, éstas incluyen al Factor VII, X y V, protrombina y fibrinógeno, y su activación proteolítica secuencial se encuentra esquematizada en la figura 1: (Gonias 1986).



F : Factor  
 Fa : Factor activado  
 Ca<sup>++</sup> : iones calcio  
 T : trombina FG:fibrinógeno  
 F : fibrina  
 PT : protrombina

Figura 1: Vías extrínseca e intrínseca de la coagulación (Gonias 1986).

## **Cofactores de la Coagulación**

Varias de las reacciones enzimáticas en la cascada de la coagulación requieren de proteínas adicionales plasmáticas, las cuales sirven como cofactores (Kane 1988).

Los factores V, VIII, HMWK, factor III o tromboplastina, así como los iones calcio son cofactores (Gonias 1986).

Los factores V y VIII funcionan como cofactores para 2 serina-proteasas dependientes de vitamina K en la cascada de la coagulación. Ambos cofactores circulan como cofactores inactivos y son activados por serina-proteasas; como trombina o Factor Xa. Los cofactores activados son subsecuentemente inactivados por otras serina-proteasas llamadas Proteína C y Proteína S (Kane 1988 William 1984).

Pacientes con deficiencia inherente de FVIII:C (Hemofilia A) o Factor V (Parahemofilia) presentan cuadros hemorrágicos anormales (Kane 1988, Kenneth, 1987).

El factor Va funciona en la coagulación como un receptor de vesículas de fosfolípidos y plaquetas para la serina-proteasa Factor Xa (William 1984).

El complejo Factor Xa, Factor Va, superficie de membrana y iones calcio cataliza el rompimiento del zimógeno de protrombina a trombina (William 1984).

En la coagulación el FVIII activo en presencia de iones calcio y fosfolípidos funciona como un cofactor para la serina-proteasa IXa en la activación del Factor X a factor Xa (William 1984).

## **El Complejo Factor VIII:C-Factor von Willebrand**

La participación del FVIII:C y del FvW en la hemostasia es de gran importancia, por las enfermedades producidas por la deficiencia de dichos factores, conocidas como: Hemofilia A y Enfermedad de von Willebrand respectivamente (Hoyer 1981).

El factor VIII plasmático es un complejo de 2 componentes que tienen diferentes funciones, propiedades bioquímicas e inmunológicas y diferente control genético (Hoyer 1981).

Un componente del complejo de factor VIII es el factor antihemofílico con actividad procoagulante usualmente designado como FVIII:C (Hoyer 1981).

El otro componente es más grande, comprende la mayor parte de la proteína en masa, interactúa con plaquetas en la vía que promueve la hemostasia primaria y pueden ser inmunoprecipitados por antisueros heterólogos. Es usualmente designado como factor VIII antigénico relativo (FVIII:AgR) o bien factor von Willebrand (FvW) (Hoyer 1981).

## Factor VIII:C

El FVIII:C es una proteína plasmática que participa en la vía intrínseca de la coagulación sanguínea (Fulcher 1982), la cual se encuentra inactiva o ausente en individuos con hemofilia clásica (Gordon 1980). El FVIII:C es una glicoproteína muy grande que en sangre circula como un complejo unido no covalentemente al FvW, en una estequiometría aproximadamente de 1 molécula de FVIII:C por un monómero de FvW, . Este complejo es estabilizado por interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas con un exceso del FvW (Debra 1992, Fulcher 1982, Higuchi 1989, White 198).

El FvW probablemente estabiliza al FVIII:C in vivo por protección a proteólisis de este último (Rotblat 1985).

El FVIII:C es activado proteolíticamente para funcionar en la vía intrínseca de la coagulación sanguínea como un cofactor del IXa en la activación del Factor X (Debra 1992).

El FVIII:C activado aumenta la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de esta reacción por 10,000 veces en presencia de cargas negativas de fosfolípidos y iones calcio (Debra 1992, Toole 1986, Rotblat 1985).

El FVIII:C es altamente susceptible a proteólisis por trombina, plasmina y otras serina-proteasas (Rotblat 1985).

Se ha reportado que la asociación del complejo FVIII:C/FvW con

fosfolípidos resulta en la disociación del FvW del FVIII:C. Demostrándose que la trombina activa al FVIII:C conservando la habilidad para unirse a fosfolípidos (Foster 1990).

Los fosfolípidos se unen al dominio del FVIII:C en su cadena ligera, lo cual se produce al conocer el sitio de rompimiento por trombina Arg-1689 (Foster 1990).

Sobre las reacciones del FVIII:C con trombina, hay en esto un rápido incremento de 50 veces en la actividad procoagulante, siendo de primer orden. La activación coincide con proteólisis de las cadenas ligera y pesada del FVIII:C (Debra 1992).

El rompimiento de la cadena ligera en los residuos 374 y 740 genera polipéptidos de 50 KDa (Dominio A) y 43 kDa (Dominio A2). La Trombina rompe a la cadena ligera en el residuo 1689 dando especies de 73 kDa (Dominios A3-C1-C2) (Debra 1992).

El rompimiento de los residuos 372 y 1689 son requeridos para activar al complejo FVIII:C-FvW. La disminución de la actividad del FVIII:C después de la activación de trombina no se aprecia como un evento proteolítico específico como se estudió in vitro (Debra 1992).

## **Estructura del Factor VIII:C**

La estructura de FVIII:C humano fue determinada por la combinación de conocer la secuencia proteica de la molécula y la información de la secuencia de los nucleótidos contando con un código de 2332 a.a. precedido por 19 residuos hidrofílicos (Hoyer 1981).

El FVIII:C es un heterodímero procesado de un polipéptido precursor muy grande, consiste de una cadena ligera de 80 kDa que en el extremo carboxilo-terminal se encuentra en asociación con el extremo amino terminal del fragmento de la cadena pesada de 90 a 200 kDa (Debra 1992).

La secuencia de aminoácidos muestra una organización de 3 estructuras dominantes que ocurren en el orden:

**A1 - A2 - B - A3 - C1 - C3**

El dominio A del FVIII:C ocurre 2 veces en la cadena pesada y una en la cadena ligera y tiene 30 % de homología con las otras estructuras, con los dominios A del Factor V y con la ceruloplasmina. El dominio C ocurre 2 veces en el carboxilo-terminal de la cadena ligera del FVIII:C y exhibe homología a Factor V y otras proteínas que son capaces de unirse a glucoconjugados y fosfolípidos cargados negativamente (Debra 1992, Toole 1986).

El dominio B es codificado por un solo exon largo de 3,100 nucleótidos no muestra homología a otras proteínas y contiene 18 de 25 sitios de unión de glicosilación de asparagina dentro del FVIII:C (Debra 1992, Toole 1986).

La estructura de Factor VIII es representada en la figura 2: (Debra 1992).

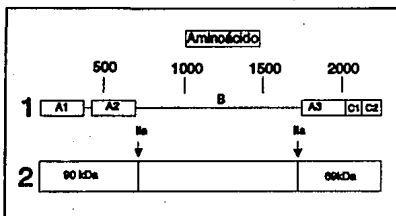


Figura 2: Estructura del Factor VIII:C

- 1: Posición relativa de los dominios descritos por Vehar.
- 2: Posición de los sitios de activación proteolítica de la molécula por trombina.

El gen que codifica al FVIII:C está en el extremo del brazo largo del cromosoma X. Comprende aproximadamente 186,000 pares de bases y constituye el 0.1% del cromosoma X. El DNA codificador del FVIII:C maduro se encuentra en 26 exones separados en un rango de tamaño de 69 a 3,106 pb.



Las regiones intermedias (intrones) que separan a los exones su rango de tamaño es de 207 a 32,4000 pb (White 1989).

La estructura y función de los carbohidratos de la proteína de factor FVIII:C humano no ha sido elucidado, pero se ha encontrado que una porción de carbohidratos del FVIII:C es importante para su función biológica. La oxidación de residuos de galactosa de FVIII resulta en la disminución de la actividad de FvW. La remoción de residuos de galactosa terminal de FVIII:C dializado causa una reducción de actividad de FvW (Howard 1981).

### **Métodos inmunológicos para determinar el Factor VIII:C**

El FVIII:C puede ser medido por métodos inmunológicos empleando:

- 1) Anticuerpos específicos contra FVIII:C que se encuentran en pacientes con hemofilia severa, tratados con concentrados de FVIII:C.
- 2) Anticuerpos monoclonales de ratón
- 3) Anticuerpos heterólogos policlonales preparados de FVIII:C altamente purificado (Hoyer 1981).

## **Factor von Willebrand**

El FvW es una glicoproteína plasmática que circula en sangre, como una serie de multímeros heterólogos que tienen un peso molecular de 850 a  $12 \times 10^3$  kDa, en asociación con FVIII:C. (Fujimura 1991, Hoyer 1981).

Algunos autores indican que consiste de una serie de oligómeros de tamaño de  $10^3$  a  $20 \times 10^3$  kDa unidos covalentemente por protómeros de 200 kDa (Rotblat 1985).

El valor estimado para el FvW en plasma humano normal ha sido entre 5 y 10 mg/ml (Hoyer 1981).

La evidencia de síntesis del FvW por células endoteliales se obtuvo en cultivo celular. Estudios de inmunofluorescencia han identificado al FvW en células endoteliales de arterias, arteriolas, capilares y venas; así como, en megacariocitos y plaquetas, por lo que el FvW se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos (Hoyer 1981, Rock 1981).

El gene que codifica para esta proteína está localizado en el cromosoma 12. El RNAm correspondiente es de 8.5 a 9 kilobases y codifica para una proteína de 2813 residuos de aminoácidos (Rock 1981).

El FvW es inicialmente sintetizado como un precursor grande constituido de un péptido señal, un propéptido grande de 80 kDa y una subunidad madura FvW de 225 kDa. La forma funcional del FvW es un complejo grande

multimérico unido por puentes disulfuro y el peso molecular (P.M.) de algunas especies es aproximadamente de  $10^4$  kDa. El FvW es sintetizado y secretado por células endoteliales por dos vías separadas: La vía constitutiva donde se produce primeramente como un FvW dimérico, con poca actividad de adhesión plaquetaria; La vía regulada libera multímeros de FvW de los cuerpos Weibel-Palade. En un proceso que requiere el propéptido, dímeros del FvW multimerizado en el trans-Golgi o gránulos secretores. El propéptido es roto y el FvW y el propéptido conocido como FvWag II circula en el plasma.

(Furie 1987, Rock 1981).

En condiciones muy drásticas de estrés se induce la adhesión plaquetaria a los sitios del daño vascular (Fujimura 1991). El antibiótico ristocetina induce la unión del FvW a glicoproteína Ib (GP-Ib) imitando el evento *in vitro*

(Fujimura 1991).

Existen dos distintos receptores sobre la membrana de la plaqueta que se unen al factor von Willebrand. La GP-Ib y el complejo heterodímero formado por las glicoproteínas IIb y IIIa (Allain 1984).

## **Inhibidores contra Factor VIII**

En el plasma también se encuentran sustancias que inhiben a los factores de coagulación. Se interpreta como inhibidor a aquellas sustancias que son capaces de interferir con la actividad de uno o varios factores de la coagulación (Ratnoff 1987).

En el caso de la hemofilia A, los inhibidores se producen como una respuesta a la transfusión del concentrado de factor VIII. Las características del inhibidor circulante es la habilidad para prolongar el tiempo de coagulación de un plasma normal control (Ratnoff 1987).

En el caso de inhibidor contra factor VIII, la prueba de Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa) puede mostrarse anormal, las diluciones seriadas del plasma del paciente con un plasma control normal puede demostrar una prolongación marcada de un control de TTPa normal (Ratnoff 1987).

El desarrollo de inhibidor contra FVIII ha sido reportado en un 5 a 20 % en hemofílicos, el inhibidor solo puede ocurrir en pacientes con hemofilia y sin causa aparente en mujeres después del parto, asociadas con neoplasias y desórdenes autoinmunes, artritis reumatoide y Lupus eritomatoso sistémico (L.E.S.). También ha sido descrito el caso de anticuerpos desarrollados por antibióticos como la penicilina (Slocumbe 1981).

Los inhibidores aunque menos comúnmente encontrados son de considerable importancia inmunológica porque aparecen en sujetos que tienen cantidad normal de FVIII:C y FvW, aproximadamente el 10% de inhibidores que aparecen sin causa aparente contra factor VIII pueden desaparecer y regresar sin terapia específica y un 45% desaparecen en asociación con esteroides y otras terapias (Slocombe 1981).

Los inhibidores de FVIII presentes en pacientes hemofílicos difieren de los presentes en pacientes sin causa aparente debido a que en los hemofílicos se tiene la cantidad de FVIII disminuida o ausente, y en ellos se desarrolla en respuesta a exposición de FVIII dada en la terapia (Slocombe 1981).

## **RESUMEN CASO CLINICO**

Se trata de una paciente de 19 años de edad. Ingresa al Servicio de Hematología Especial del Centro Médico " La Raza" en el mes de mayo de 1989, con un cuadro clínico caracterizado fundamentalmente por tendencias hemorrágicas en forma de equimosis en miembros, precedidas de dolor y edema del miembro afectado. Este cuadro inició desde el mes de abril del mismo año.

A nivel de laboratorio en primera instancia se encontró; el TTPa prolongado, la actividad de factor VIII fue de  $<1$  %. Asimismo, la determinación de inhibidor de factor VIII fue positiva (60 U.B.).

No presentaba ningún antecedente heredo-familiar relacionado con el padecimiento, únicamente, la ingesta de anticonceptivos orales (TRINORDIOL), durante 6 meses, previos a las manifestaciones clínicas. Considerando los antecedentes, se pensó que la paciente presentaba una deficiencia de Factor VIII y/o Factor Von Willebrand, por lo que el objetivo del presente proyecto se encaminó al estudio de la determinación y caracterización de dicho complejo plasmático.

## **HIPOTESIS:**

Sí la paciente presenta deficiencia de FVIII:C y/o FvW se debe probablemente al desarrollo de anticuerpos contra la parte coagulante del complejo, contra el FvW o bien contra el sitio de unión de ambos factores.

## **OBJETIVOS:**

1) Analizar fisicoquímicamente el Factor VIII:C y/o el Factor Von Willebrand de la paciente por técnicas inmunoenzimáticas: ELISA e inmunoelectrotransferencia, como alternativa para demostrar, si hay deficiencia del complejo por: a) anormalidad molecular o b) la presencia de inhibidores.



## **MATERIALES Y METODOS.**

### **Obtención de muestras:**

Las muestras que se utilizaron fueron plasmas pobres en plaquetas, y todas las muestras incluyendo las de la paciente fueron obtenidas y conservadas de la siguiente manera:

- 1) La sangre completa obtenida por venopunción se mezcló con citrato de sodio al 3.8% en una proporción 1:9 v/v.
- 2) La sangre citratada se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.
- 3) Se separó el plasma pobre en plaquetas del paquete celular con una pipeta Pasteur.
- 4) El plasma se distribuyó en alícuotas de aproximadamente 0.5 ml, una de éstas se dejó en baño de hielo o en refrigeración (4°C) para hacerle las pruebas de coagulación.
- 5) Se congelaron las demás muestras en un baño de hielo seco-acetona. Se mantuvieron las muestras congeladas a (-20°C) hasta su utilización.
- 6) Se descongelaron las muestras en un baño de agua a 37°C por 5 minutos, momentos antes de su utilización.

## **Pruebas de coagulación**

Se monitoreó en la paciente en estudio su respuesta clínica periódicamente por las pruebas de coagulación, así como la determinación de FVIII:C, y su Inhibidor.

### **Tiempo de Trombina (TT) (Bigg 1972)**

#### **Fundamento:**

Se basa en la medición del tiempo necesario para la formación de un coágulo de fibrina después de añadir una concentración estándar de trombina a un plasma testigo normal o bien al plasma problema.

#### **Material:**

Tubos de ensaye de 12 X 75 mm.

Pipetas serológicas de 0.1 y 0.2 ml.

Baño María a 37°C.

Baño de hielo-agua.

Cronómetro.

Fibrómetro.

#### **Reactivos:**

Trombina humana de 50 U/ml.

Solución salina 0.15 M.

### Técnica:

- 1) Los plasmas se mantuvieron en baño de hielo o en refrigeración.
- 2) Se hidrató la trombina con NaCl 0.15M y se ajustó la concentración óptima de ésta hasta tener un TT de un plasma testigo normal de 26 a 28 segundos.
- 3) Se puso 0.2 ml de plasma problema o testigo normal, se incubó durante 1 minuto a 37°C en el fibrómetro.
- 4) Posteriormente se puso 0.2 ml de trombina ajustada y se tomó el tiempo con un cronómetro, hasta que se formó la malla de fibrina.

Valor normal: 26 a 28 segundos  $\pm$  4 segundos.

### Interpretación:

El tiempo se considera prolongado cuando el problema tiene más de 4 segundos con respecto al testigo. Se encuentran tiempos prolongados en pacientes con hipofibrinogenemias hereditarias o adquiridas, generalmente cuando el fibrinógeno está por abajo de 100 mg/dl. También se prolonga por acción de inhibidores: antitrombina, anticoagulantes (heparina exógena, heparinoides endógenos), productos de fragmentación de fibrinógeno y fibrina y disfrinogenemias hereditarias.

## **Tiempo de Protrombina (TP)(Owen 1949)**

### **Fundamento:**

El tiempo necesario hasta la formación de un coágulo de fibrina, para el plasma recalcificado, después de la incubación con tromboplastina tisular, es una medida de la velocidad, a la cual la trombina es formada por la vía extrínseca de la coagulación.

### **Material:**

Pipetas serológicas de 0.1 y 0.2 ml.

Baño María a 37°C.

Baño de hielo-agua.

Cronómetro.

### **Reactivos:**

Tromboplastina completa activada.

Cloruro de calcio 0.025 M.

### **Método:**

- 1) Se incubó previamente la tromboplastina completa activada humana a 37°C durante 5 minutos.
- 2) Se puso 0.1 ml de plasma testigo normal o problema en una copita de plástico en el fibrómetro, se dejó durante 2 minutos.
- 3) Se añadieron 0.2 ml de tromboplastina cálcica humana y se

cronómetro el tiempo necesario hasta la formación de fibrina.

Valor normal: Índice de protrombina de 0.9 a 1.2.

Interpretación:

La prolongación de un tiempo de protrombina establece que hay: una concentración de fibrinógeno por abajo de 100 mg/dl, una deficiencia de factores de la vía extrínseca de la coagulación ( Factor II, VII, V y X), o la presencia de inhibidores, (como los vistos en lupus eritomatoso o en terapías con heparína). La diferencia entre deficiencia y inhibidor es establecida por la repetición de la prueba anormal usando una mezcla 1:1 del plasma del paciente y de un plasma normal. El plasma corrige a normal cuando se trata de una deficiencia de factor, pero cuando se mantiene prolongado es un inhibidor .

## **Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa)** (Harker 1979)

### **Fundamento:**

En la sangre el calcio es quelado por anticoagulante, lo que impide la coagulación. Después de la centrifugación, el plasma contiene todos los factores de coagulación excepto el calcio y las plaquetas. Se añade al plasma iones calcio, un sustituto de fosfolípidos; la tromboplastina parcial activada y un activador de superficie; el caolín. El resultado del tiempo de tromboplastina parcial activada es el tiempo que tarda en coagular dicho plasma.

### **Material:**

Baño María a 37°C.

Baño de hielo (4°C).

Tubos de vidrio 12 X 75 mm.

Cronómetros.

### **Reactivos:**

Mezcla de plasmas normales (obtenidas de Banco de Sangre Centro Médico "La Raza").

Tromboplastina Parcial activada.

Cloruro de calcio 0.025 M.

Caolín.

### Método:

- 1) Se mantuvo el plasma en baño de hielo o en refrigeración.
- 2) Se incubó una cantidad suficiente de cloruro de calcio 0.025M a 37°C.
- 3) Se mezcló en partes iguales la suspensión de caolín con Tromboplastina parcial activada (Pathromtin), la mezcla se mantuvo en baño de hielo.
- 4) Se agregó 0.1 ml de plasma testigo normal o problema en un tubo de ensayo.
- 5) Se agitó vigorosamente la mezcla del paso 3 y se pusieron 0.1 ml del plasma.
- 6) Se mezcló con rapidez el contenido del tubo y se colocó en el baño maría durante 2 minutos.
- 7) Una vez transcurrido exactamente ese tiempo, se añadieron en el tubo 0.1 ml de cloruro de calcio preincubado y se puso en marcha el cronómetro, se paró cuando se formó el coágulo de fibrina.
- 8) Cuando los tiempos de TTPa eran muy prolongados con respecto al testigo se hizo una corrección con plasma normal en diluciones 1:2 y 1:4 , a dichas diluciones se les realizó un TTPa. Asimismo se hicieron diluciones de los plasmas normal y problema con NaCl 0.15M 1:2 y 1:4 a las cuales también se les hizo un TTPa.

**Valor normal:** de 32 A 42 segundos

**Interpretación:**

El TTPa es usada para detectar deficiencias significativas de factores VIII, IX, XI y XII o inhibidores. Los inhibidores que afectan al TTPa incluyen heparina, anticuerpos contra Factor VIII o Factor IX y algunos pacientes con L.E.S. Si al realizar la dilución del plasma problema con plasma normal, se corrige el TTPa, hay deficiencia. Si no hay corrección se trata de un inhibidor.



## **Tiempo de Sangrado (TS)(Harker 1979)**

### **Fundamento**

Esta prueba mide el papel hemostático completo de las plaquetas in vivo determinando la duración de sangrado de una incisión estándar en la piel, mientras se mantiene incrementada la presión venosa. Es particularmente útil en la evaluación sistemática de pacientes con trombocitopenia, dada su capacidad para discriminar entre plaquetas con función normal y aquellas con una función aumentada o disminuida.

### **Material:**

Esfingmanómetro.

Bisturí estéril del No.11.

Papel filtro.

Cronómetro.

Torundas con etanol.

### **Método:**

- 1) Se infló el manguito del esfigmanómetro hasta 40 mm Hg una vez que se colocó en el brazo del individuo.
- 2) Se hicieron dos incisiones de 1 cm aproximadamente de largo con un bisturí estéril, en el antebrazo.

3) Se secó con papel filtro la sangre cada 30 segundos, sin rosar la piel y se tomó el tiempo transcurrido para cada punto, cuando se dejó de sangrar se obtiene el valor medio.

Valor Normal: 2 a 7 minutos.

Interpretación:

Generalmente hay relación entre el número de plaquetas y el tiempo de sangrado. Pacientes con menos de 50,000 plaquetas / mm<sup>3</sup> tienen tiempos prolongados de sangrado. La enfermedad de von Willebrand, trombocitopatía adquirida o hereditaria y trombocitopenia hemorrágica con cifras de plaquetas normales cursan con tiempos de sangrado prolongados .

## **Cuenta manual de Plaquetas (Harker 1979)**

### **Fundamento:**

La sangre total se diluye con solución de oxalato de amonio al 1%, el cual hemoliza completamente los glóbulos rojos y los leucocitos, las plaquetas se cuentan en la cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fases.

### **Reactivos:**

Oxalato de amonio al 1%.

Citrato de sodio 3.8%.

### **Material:**

Microscopio de contraste de fases.

Cámara de Neubauer.

Pipeta para cuenta de glóbulos rojos.

Jeringas o lanceta estéril.

### **Técnica:**

- 1) Se cargó la pipeta para cuenta de glóbulos rojos hasta la marca 0.1 ml con sangre anticoagulada.
- 2) Se completó con oxalato de amonio al 1% hasta la marca 101 (dilución 1:100).
- 3) Se agitó la pipeta por 10 minutos en el agitador mecánico para lisar eritrocitos y leucocitos.

- 4) Se desecharon las primeras 5 gotas del contenido de la pipeta.
- 5) Se llenó la cámara de Neubauer.
- 6) La cámara se colocó en una caja de petri que tenía un papel filtro húmedo.
- 7) Se dejó la cámara reposar durante 15 minutos, para que las plaquetas se sedimentaran y se pudieran contar.
- 8) En un microscopio de contraste de fases se contaron las plaquetas que se encontraron en la cuadrícula central que se destina para la cuenta de glóbulos rojos.
- 9) Se hizo el mismo procedimiento dos veces, se obtuvo una media y se procedió a realizar los cálculos para obtener el resultado en plaquetas por  $\text{mm}^3$ .

Cálculos:

$$\begin{aligned} & \text{No. plaquetas} \times \text{Factor de dilución} \times \text{factor de volúmen} \\ & = \text{no. de plaquetas/mm}^3. \end{aligned}$$

Valor normal: de 150,000 a 400,000 plaquetas / $\text{mm}^3$ .

Interpretación:

Un número de plaquetas abajo del valor normal, puede estar asociada con trombocitopenias, desordenes de destrucción plaquetaria, tales como purpura trombocitopenia inmune con la recuperación de médula ósea después

de quimioterapia.

Como la paciente tuvo un TTPa prolongado se procedió a realizar las pruebas para evaluar los factores de la primera fase de la coagulación (Vía Intrínseca de la coagulación).

## **Dosificación de Factores IX, XI, y XII (Harker 1979).**

### **Fundamento:**

El porcentaje de actividad del factor ( IX, XI Y XII) en el plasma puede ser determinado por el grado de corrección que se tiene cuando al plasma problema se le adiciona un substrato deficiente en factor ( IX, XI, XII), según el factor que se requiere determinar. El grado de corrección se determina por el tiempo de tromboplastina parcial activada TTPa. El resultado es interpolado en una curva de calibración a partir de una mezcla de plasmas normales.

### **Material:**

Baño María a 37°C.

Tubos de ensaye de 12 X 75 mm.

Pipetas serológicas de 0.2, 1.0 y 2.0 ml.

### **Reactivos:**

Substrato deficiente de Factor (IX, XI, o XII).

amortiguador veronal-Owen pH = 7.4.

Tromboplastina parcial activada.

Cloruro de calcio 0.025%.

### **Método:**

Curva de referencia:

- 1) Se diluyó un plasma normal con amortiguador veronal owren

**pH = 7.4 de la siguiente manera:**

<b>Dilución:</b>	<b>% de actividad</b>
1:5	100
1:20	25
1:80	6.5

**2) A cada dilución se le hizo la determinación de la actividad del factor (IX, XI, XII) de la siguiente manera:**

- a) Se pusieron 0.1 ml de la dilución en un tubo.
- b) Se añadieron 0.1 ml de plasma deficiente del factor (IX, XI, XII) en el mismo tubo.
- c) Se añadieron 0.1 ml de tromboplastina parcial activada mezclada con caolín.
- d) Se mezcló ligeramente y se incubó por 2 minutos a 37°C.
- e) Se añadieron 0.1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.025M, se mezcló y se tomó el tiempo hasta que se formó la primera malla de fibrina.
- f) Se graficó en papel semilogarítmico los segundos obtenidos contra el porcentaje de actividad de los factores IX, XI, XII.

g) Se hizo el mismo procedimiento para el plasma problema y se interpoló el valor de los segundos obtenidos para tener la actividad del Factor.

Valor normal: de 50 a 100 % de actividad.

Interpretación:

Cuando la actividad del factor a determinar se encuentra por debajo del 50 % se considera deficiencia de dicho factor.



## **Determinación de Factor VIII:C (Harker 1979)**

### **Material:**

Baño María a 37°C.

Baño de hielo-agua.

Pipetas de vidrio graduadas de 0.1, 0.2, 2.0, y 5.0 ml.

Tubos de ensaye de 12 X 75 mm.

### **Reactivos:**

Plasma deficiente de factor VIII:C.

Amortiguador veronal Owen pH = 7.4.

Tromboplastina parcial activada.

Cloruro de calcio 0.25 M.

### **Método:**

Curva de referencia:

- 1) Se diluyó plasma normal con amortiguador veronal owren pH = 7.4 de la siguiente manera:

Dilución:	% de actividad
1:5	100
1:20	25
1:80	6.25

2) A cada dilución se le hizo la determinación de la actividad del factor VIII:C.

- a) Se pusieron 0.1 ml de la dilución en un tubo.
- b) Se añadieron 0.1 ml de plasma deficiente del factor VIII:C en el mismo tubo.
- c) Se pusieron 0.1 ml de tromboplastina parcial activada mezclada con caolín.
- d) Se mezcló ligeramente e incubó por 2 minutos a 37°C.
- e) Se añadieron 0.1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.025M se mezcló y se tomó el tiempo hasta que se formó la malla de fibrina.
- f) Se graficó en papel semilogarítmico los segundos obtenidos contra el porcentaje de actividad del factor VIII:C.
- g) Se realizó el mismo procedimiento con el plasma problema y se interpolaron los segundos obtenidos en el gráfico para tener la actividad del Factor VIII:C.

Valor normal: 50 a 150% de actividad.

#### Interpretación:

Cuando se tienen valores abajo del 50 % de actividad, no hay corrección del plasma deficiente, lo cual nos indica deficiencia del Factor VIII:C.

## **Determinación de inhibidor de Factor VIII:C (Harker 1979)**

### **Fundamento:**

Se interpreta como inhibidor a aquellas sustancias que son capaces de interferir con la actividad de uno o varios factores de la coagulación. En el caso de la Hemofilia A, los inhibidores se producen como una respuesta a la transfusión del concentrado de factor VIII.

### **Material:**

Baño de hielo-agua.

Baño María a 37°C.

Cronómetro.

Tubos de plástico 12 X 75 mm.

### **Reactivos:**

Substrato deficiente de Factor VIII.

Tromboplastina parcial activada.

Cloruro de calcio 0.025 M.

Amortiguador Veronal-Owen pH =7.4.

### **Método:**

- 1) Se preparó una curva de referencia para calcular la actividad de Factor VIII:C residual utilizando mezcla de plasmas normales como

testigo normal y amortiguador Owren.

Diluciones:

1:10

1:20

1:40

1:80

1:160

2) Se determinó la actividades de Factor VIII:C de:

a) plasma del paciente.

b) de la mezcla de plasmas normales (MPN).

c) mezcla de plasmas normales (MPN) + amortiguador de Owren en partes iguales.

3) Se hicieron diluciones del plasma del paciente con amortiguador: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

4) En tubos de plástico se colocaron:

a) 0.2 ml de MPN + 0.2 ml de amortiguador (control)

b) 0.2 ml de MPN + 0.2 ml de plasma de paciente.

c) 0.2 ml de MPN + 0.2 ml de plasma de paciente diluido 1:2.

d) 0.2 ml de MPN + 0.2 ml de plasma de paciente diluido 1:4.

e) 0.2 ml de MPN + 0.2 ml de plasma de paciente diluido 1:8.

- f) 0.2 ml de MPN + 0.2 ml de plasma de paciente diluido 1:16.
- 5) Se incubó las mezclas anteriores a 37°C por dos horas.
- 6) Pasadas las dos horas se pasaron las muestras a un baño de hielo.
- 7) De las diluciones que fueron incubadas se tomaron 0.1 ml y se mezcló con 0.9 ml de amortiguador.
- 8) Se determinó la actividad de Factor VIII:C a las 6 mezclas incubadas.

La curva para inhibidor de Factor VIII:C se trazó en papel semilogarítmico, en el cual, el porcentaje de factor residual va en la escala logarítmica y las unidades de inhibidor en la aritmética.

Valor normal: Menos de 4 U.B.

Interpretación:

Valores por arriba de 4 U.B., nos indica la presencia de inhibidor contra Factor VIII:C. Los inhibidores son producidos in vivo más comúnmente como anticuerpos directos contra FVIII:C. Los autoanticuerpos contra FVIII:C pueden ocurrir en asociación con: a) Período post-parto b) desordenes de naturaleza inmunológica como Lupus eritomatoso, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, enteritis regional, reacciones a penicilina, etc. c) edad avanzada. El título de anticuerpo es determinado de la dilución de plasma que exhibe el 50 % de inhibición.

## **Técnicas Inmunoenzimáticas**

Debido a que las técnicas coagulométricas no nos ayudaban al diagnóstico de la paciente, se pensó en realizar estudios con técnicas más sensibles como son las inmunoenzimáticas.

Para realizar dichas técnicas fue necesario cuantificar la cantidad de proteína de las muestras; para ello se utilizó:

### **Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford (Bradford 1976)**

#### **Fundamento:**

Es un método de cuantificación de proteínas que utiliza un colorante: azul brillante de Coomassie G250, el cual en solución se encuentra cargado negativamente, predominando la forma de color rojo. Cuando dichas cargas negativas se unen a las cargas positivas de las proteínas (grupos amino libres) en solución predomina la forma color azul que es medible a de 465 a 595 nm.

La reacción es altamente reproducible, rápida y es esencialmente completa desde los dos minutos con estabilidad de color hasta de una hora. Detergentes como Dodecil Sulfato de sodio (DSS) y Triton X-100 no

interfieren con la reacción. Es un método útil para proteínas de alto peso molecular. (Bradford,1976)

### Material:

Tubos de ensayo 12 X 75 cm.

Pipetas semiautomatizadas (Pipetman-Gilson).

Pipeta graduada de 5 ml

Espectrofotómetro

### Reactivos

Albúmina Sérica Bovina (ASB)

NaCl 0.15 M

Reactivo de Bradford

### Método:

Se hizo una curva estándar para ello:

- a) Se preparó albúmina sérica bovina (ASB) 1 mg/ml en NaCl 0.15 M.
- b) Se prepararon las diferentes diluciones de ASB y pusieron 0, 5, 10, 20, 30, 40, y 50  $\mu\text{g}$  de proteína en cada tubo, se aforó a 50  $\mu\text{l}$  con NaCl en cada tubo. Se añadieron a cada tubo 2.5 ml de reactivo de Bradford.
- c) Se leyó a 595 nm la absorbencia de cada una de las muestras, como nos muestra la siguiente tabla:

**Tabla 3**

**Cuantificación de proteína por el método de Bradford.**

[ASB] ( $\mu\text{g}$ )	0	5	10	20	30	40	50
Se pusieron							
Vol. ASB ( $\mu\text{l}$ )	0	5	10	20	30	40	50
Vol. NaCl ( $\mu\text{l}$ )	50	45	40	35	20	10	0
Reactivo de Bradford (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Leer a 595 nm							

Las muestra problemas se procesaron de la siguiente manera:

Se hizo una dilución 1:10 de la muestra y se pusieron 2.5 y 5.0  $\mu\text{l}$  de dicha dilución, se aforó a 50  $\mu\text{l}$ . Se añadieron 2.5 ml de reactivo, se leyeron las muestras a 595nm y se interpoló el valor de A en la curva estándar de ASB.



## **Titulación de antígeno y de anticuerpo para la Determinación de Factor von Willebrand por el Método de ELISA (Macy 1988, Margni 1972)**

Para conocer las condiciones óptimas de trabajo para la determinación del Factor von Willebrand por el método de ELISA se hizo el ensayo siguiente.

### **Material:**

Placa de ELISA.

Refrigerador.

Pipetas semiautomatizadas (Pipetman-Gilson).

Incubadora a 37°C.

### **Reactivos:**

Bi-Car pH = 9.6.

PBS.

PBS-Tween 0.05%

Albúmina 1%.

Primer anticuerpo: anti-Factor von Willebrand humano de conejo. (Immunoglobulin to human von Willebrand factor Dakopatts A082, lot. 128, título: 35 U.I.).

Segundo anticuerpo: peroxidado anti-conejo de burro.

ABT-S.

### Método:

- 1) Se fijó el antígeno en la microplaca de ELISA, para lo cual se hicieron diluciones seriadas dobles de una Mezcla de Plasmas Normales (MPN), en amortiguador Bi-Car pH = 9.6, que van de: 320  $\mu\text{g/ml}$  a 0  $\mu\text{g/ml}$ , que van de fila 1 a fila 12. Se incubo durante 2 horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. Se puso 100  $\mu\text{l}$ /pozo.
- 2) Se eliminó el antígeno. Se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 0.05%.
- 3) Se pusieron 100  $\mu\text{l}$  de albúmina al 1% en PBS-Tween 0.05% por pozo, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear las zonas de la microplaca en las cuales no se haya pegado la proteína de interés.
- 4) Se eliminó la albúmina y se lavó con PBS-tween 0.05%, 3 veces.
- 5) Para poner el Primer anticuerpo: anti-Factor von Willebrand humano de conejo, ( Immunoglobulin to human von Willebrand factor Dakopatts A082, lot. 128, título: 35 I.U.), se hicieron diluciones seriadas dobles del primer anticuerpo en PBS-tween 0.05%, las cuales fueron de: 1:500 hasta 1:64000, se colocaron 100  $\mu\text{l}$  por pozo, se dejó durante la noche a 4°C o bien 2 horas a 37°C.
- 6) Se recuperó el primer anticuerpo, la microplaca se lavó con PBS-

3 veces.

- 7) Se puso el segundo anticuerpo peroxidado anti-conejo de burro (GAR-P para conejo). Se colocaron 100  $\mu$ l por pozo, a una dilución de 1:8000 dejándose 2 horas a temperatura ambiente o bien 1 hora a 37°C.
- 8) Se lavó con PBS-tween 0.05% ,3 veces.
- 9) Se reveló con ABT-S.

En el momento de revelar se descongeló una alícuota de ABT-S en citrato-fosfatos, se añadió 1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por cada ml de la solución de ABT-S, se puso 100  $\mu$ l de ABT-S por pozo, y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó a la densidad óptica de 414 nm.

## **Estandarización y Validación de la Determinación de Factor von Willebrand por el Método de ELISA.**

La estandarización se llevó a cabo determinando el FvW por ELISA en plasmas normales obtenidos de donadores del Banco de Sangre del Centro Médico "LA RAZA", para los cuales se consideraron los siguientes criterios, para control de ciertas variantes:

- A) Fueron obtenidos de donadores, que acudieron al Banco de Sangre del Centro Médico "La Raza", en donde se lleva un control exhaustivo en cuanto a las infecciones transmitidas por hemoderivados.
- B) Personas sanas, que no tuvieran ningún padecimiento relacionado con la coagulación.
- C) Preferentemente mujeres jóvenes, entre 18 y 30 años de edad, ya que nuestro estudio está enfocado a una mujer.

### **Método:**

Cada uno de los plasmas se trabajaron bajo las siguientes condiciones óptimas de trabajo:

- 1) Se cuantificó la concentración de protefna total de cada uno de los plasmas normales por el método de Bradford.
- 2) Se determinó del FvW por el método de ELISA, antes descrito, las determinaciones se realizaron por triplicado considerando las siguientes

condiciones que se obtuvieron al conocer la sensibilidad del método con el ensayo anterior:

- a) La concentración de proteína utilizada para la fijación de antígeno fue de 10  $\mu\text{g/ml}$ .
- b) La dilución del anticuerpo de conejo anti-FvW humano fue de 1:1000.
- c) La dilución del segundo anticuerpo peroxidado burro anti-conejo fue de 1:4000.

## **Electroforesis en gel de Poliacrilamida (Laemmli 1970)**

### **Fundamento**

Es un método de separación de alto poder resolutivo que combina la migración de un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida.

### **Material:**

Placas de cristal

Peines para muestras

Cámara de electroforesis

### **Reactivos:**

SDS 0.2%

gel separador

gel concentrador

Buffer de muestra

2-mercaptoetanol

Soluciones para tinción de geles

### **Método:**

Se utilizaron geles planos de acrilamida-bisacrilamida en gradiente discontinuo de pH, descritos por Laemmli en 1970. La polimerización y el proceso electroforético se realizaron con un sistema marca Hoeffer. Las

dimensiones de los geles fueron de 2.5 X 13 cm para el gel concentrador y de 13 X 12 cm para el gel separador, ambos con espesor de 3 mm. Se utilizaron placas de cristal de 16 X 18 cm.

- 1) Se limpiaron las placas de cristal para electroforesis primero con SDS 0.2% y luego con etanol, y se secaron muy bien.
- 2) Se montaron las celdas para electroforesis
- 3) Los geles concentrador y separador se prepararon como se indica en la siguiente tabla .

Tabla 4

Preparación de geles de poliacrilamida.

Gel	Separador	concentrador
Acrilamida 30 %	15 ml	2.8 ml
Bisacrilamida 2 %	6 ml	1.12 ml
Tris HCl 1M pH 8.8	22.4 ml	
Tris HCl 1M pH 6.8		3.5 ml
SDS 20 %	300 $\mu$ l	140 $\mu$ l
Agua	16 ml	20.4 ml
Temed	30 $\mu$ l	14 $\mu$ l
APS 10 %	180 $\mu$ l	84 $\mu$ l

4) Se colocó entre las placas de vidrio, la mezcla del gel separador se dejó aproximadamente una hora y media para que gelificara a temperatura ambiente, posteriormente, se puso el gel concentrador, se colocó el peine, el cual depende del número de muestras. En este caso se utilizaron peines de 10 o 20 carriles.

5) Una vez que el gel concentrador gelificó se procedió a aplicar las



muestras ya preparadas.

#### Preparación de muestras:

- a) Se cuantificó la cantidad de proteína de las muestras por el método de Bradford.
- b) Se puso en un tubo eppendorf el volumen necesario para tener 100  $\mu\text{g}$  de proteína y se aforó a 50  $\mu\text{l}$  con buffer de muestra de Laemmli (para tener una concentración 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).
- c) En el caso en que se tenga una muestra muy diluida es recomendable liofilizar las muestras, para ello es necesario colocar en un tubo eppendorf la cantidad de muestra, liofilizarla y poner 50  $\mu\text{l}$  de buffer de muestra.
- d) Las muestras se hirvieron durante 1 min y se les adicionó 2-mercaptoetanol a una concentración final de 5% (v/v). Se aplicaron 20  $\mu\text{g}$ . Las corridas se hicieron a temperatura ambiente a 30 volts constantes durante el tiempo en que tardó el frente del colorante de las muestras en llegar a 1 cm del borde inferior del gel separador.
- e) La tinción se hizo con la solución de azul de Coomassie durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- f) Se destiñó con solución desteñidora.

## **Inmunoelectrotransferencia (Hans 1986)**

### **Fundamento:**

Consiste en transferir las proteínas de un gel a papel de nitrocelulosa (PNC), se utilizó "Tras-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane" Cat. No. 162-0115, Laboratories Bio-Rad.

### **Método:**

- 1) Se puso el baño circulador a enfriar a  $-5^{\circ}\text{C}$ , que contenía etanol al 50%.
- 2) Se incubó el gel con amortiguador de transferencia 30 min, dos veces.
- 3) Se cortó el papel de nitrocelulosa (usando guantes).  
Medida del Gel 14.5 X 16 cm.  
Medida de PNC 15.0 X 17 cm.  
Medida papel Whatman 15.0 X 19 cm (2).
- 4) Se puso el PNC en amortiguador de transferencia durante 1 h.
- 5) Se puso el amortiguador de transferencia en una charola grande.
- 6) Se colocaron las rejillas, fibras Scotch, papeles filtro, PNC, y gel en el siguiente orden:

- a) Rejilla de la cámara que tiene el brazo.
- b) Fibra Scotch.
- c) Papel filtro Whatman.
- d) PNC.
- e) Gel.
- f) Segundo papel Filtro Whatman.
- g) Segunda Fibra Scotch.
- h) Segunda rejilla.

- 7) Se cerraron las rejillas para formar un sandwich.
- 8) Se presionó ligeramente el sandwich para eliminar burbujas.
- 9) Se llenó la cámara con amortiguador de transferencia.
- 10) Se colocó el sandwich de la manera siguiente:
  - el gel orientado hacia el cátodo (-),
  - el PNC orientado hacia el ánodo (+).
- 11) Se corrió la transferencia durante 2 horas a 0.6 volts. Verificando que no rebase este límite.
- 12) Se sacó el sandwich y se marcó el PNC como estaba el gel.
- 19) Se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  el PNC entre papel Whatman.

## **Tinción de papel de Nitrocelulosa con Anticuerpo (Hans 1986)**

### **Fundamento:**

Consiste en la identificación de una proteína transferida a un papel de nitrocelulosa por interacción con un anticuerpo específico. Los complejos antígeno - anticuerpo formados pueden ser identificados desarrollando sobre él una reacción colorada de ELISA.

### **Material:**

Placas para tinción de PNC con anticuerpos.

Vaso de precipitado de 250 ml

Embudo

Papel filtro

Probeta graduada

### **Reactivos:**

PBS

Amortiguador de Fosfatos

DAB

NiCl

CoCl

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Leche descremada

**Primer anticuerpo:** anti-Factor von Willebrand humano de conejo. (Immunoglobulin to human von Willebrand factor Dakopatts A082, lot. 128, título: 35 U.I.).

**Segundo anticuerpo:** Anticuerpo peroxidado anti-conejo de burro (GAR-P).

**Método:**

- 1) Se marcó el papel en la parte de abajo.
- 2) Se lavó el papel 3 minutos con PBS.
- 3) El enmascaramiento de los sitios de unión inespecífica, se hizo con leche descremada al 3% en PBS-tween 0.05% durante 60 minutos a temperatura ambiente y con agitación.
- 4) Se lavó 3 veces con PBS 5 minutos cada lavada.
- 5) Se incubó con el primer anticuerpo, durante toda la noche a 4°C.
- 6) Se lavó con PBS 10 minutos.
- 7) Se lavó con PBS-tween 0.05% 10 minutos.
- 8) Se lavó con PBS 10 minutos.
- 9) Se incubó con GAR-P durante una hora a temperatura ambiente.
- 10) Se lavó con PBS 10 minutos.
- 11) Se lavó con PBS-tween 0.05% 10 minutos.
- 12) Se lavó con PBS 10 minutos.
- 13) Se lavó 2 veces con fosfatos 50 mM frío, de 5 minutos cada lavada.

- 14) Se incubó con buffer de preincubación ( DAB+NiCl+CoCl+H<sub>2</sub>O), para tener las condiciones fisicoquímicas (pH=7.0) para que se lleve acabo la reacción.
- 15) Se incubó con DAB+NiCo+H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 minutos a temperatura ambiente 4 ml por tubo o carril.
- 16) Se lavó con agua 4 veces.
- 17) Se puso el papel en papel filtro para secar , y se guardaron los papeles secos.

## RESULTADOS

En mayo de 1989 se tuvieron los datos hemostáticos iniciales de la paciente en estudio, los cuales se muestran en la tabla 5.

Tabla 5  
Resultados de Pruebas Basales de Coagulación

	<i>TP (IP)<sup>1</sup></i>	<i>TT<sup>2</sup> (seg)</i>	<i>TTPa<sup>3</sup> (seg)</i>	<i>CPN<sup>4</sup> 1:2 (seg)</i>	<i>CPN 1:4 (seg)</i>
<i>Paciente</i>	<i>0.95</i>	<i>27.4</i>	<i>117.6</i>	<i>70.7</i>	<i>67.7</i>
<i>MPN<sup>5</sup></i>		<i>28.4</i>	<i>37.0</i>		

TP<sup>1</sup> Tiempo de Protrombina en Índice de Protrombina.

TT<sup>2</sup> Tiempo de Trombina.

TTPa<sup>3</sup> Tiempo de Tromboplastina Parcial activada.

CPN<sup>4</sup> Corrección con plasma normal.

MPN<sup>5</sup> Mezcla de plasmas normales.

Periódicamente se realizaron dichas pruebas coagulométricas para control de la paciente.

Se hicieron las pruebas que nos ayudaron a valorar los factores más importantes de la primera fase de la coagulación ( VIII:C, IX, XI, XII, Precalicroinas, KMHM ), posteriormente se hizo la determinación de inhibidor contra FVIII:C, resultando positivo de 60 U.B.

Los resultados se muestran en la tabla No. 6

Tabla 6

Resultados de Pruebas Especiales de Coagulación

<i>Determinación de:</i>	<i>Paciente (% de Actividad)</i>	<i>Valor Normal (% de Actividad)</i>
<i>Factor VIII:C</i>	<i>&lt; 1.0 %</i>	<i>50.0 a 150.0</i>
<i>Factor IX</i>	<i>90.0 %</i>	<i>"</i>
<i>Factor XI</i>	<i>75.0 %</i>	<i>"</i>
<i>Factor XII</i>	<i>50.0 %</i>	<i>"</i>
<i>Factor von Willebrand por Aglutinación.</i>	<i>50.0 %</i>	<i>"</i>
<i>Precalicroinas</i>	<i>42.0 %</i>	<i>"</i>
<i>Inhibidor contra FVIII:C</i>	<i>60.0 U.B.<sup>1</sup></i>	<i>&lt; de 4 U.B.</i>

U.B. <sup>1</sup> Unidades Bethesta



A la paciente se le hicieron en colaboración con Banco de Sangre C.M. "La Raza" las pruebas más importantes para evaluar la enfermedad de von Willebrand y descartar que la paciente tuviera dicha enfermedad, los resultados se reportan en la Tabla 7.

Tabla 7

Resultados de Pruebas que valoran la Enfermedad de von Willebrand

<i>Determinación de:</i>	<i>Paciente</i>	<i>Valor Normal</i>
<i>No. Plaquetas</i>	<i>119,000 plaq /mm<sup>3</sup></i>	<i>200,000 a 400,000 plaq/mm<sup>3</sup></i>
<i>Tiempo de Sangrado</i>	<i>3 min 55 seg.</i>	<i>2 - 7 min.</i>
<i>Agregación Plaquetaria con ADP</i>	<i>100 % en 1'00"</i>	<i>95 % en 4'00"</i>
<i>Agregación Plaquetaria con Adrenalina</i>	<i>90 % en 5'00"</i>	<i>100 % en 4'00"</i>
<i>Agregación Plaquetaria con Ristocetina</i>	<i>90 % en 4'00'</i>	<i>100 % en 1'00"</i>
<i>Fragilidad Capilar</i>	<i>sin petequias</i>	<i>sin petequias</i>

Para descartar que la paciente tuviera alguna enfermedad autoinmune o LES, se procedió a hacer las siguientes pruebas realizadas en los Laboratorios de Inmunología, Genética y en Banco de Sangre del CM "La Raza", cuyos resultados se muestran en la tabla No. 8.

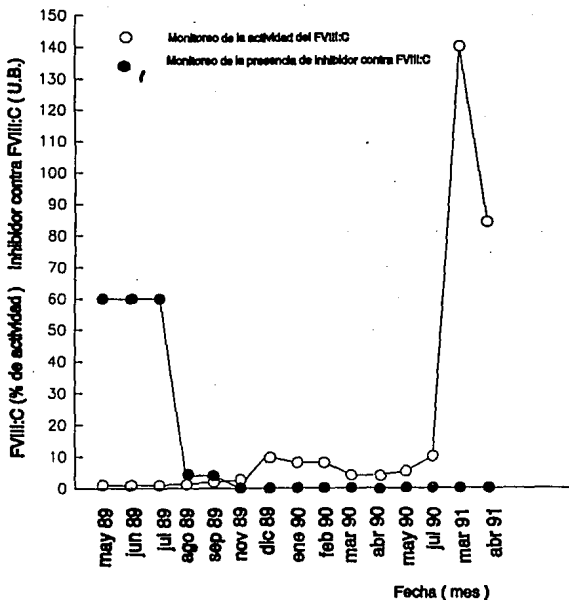
Tabla 8

Resultados de Pruebas que valoran una Enfermedad autoinmune o LES

	<i>Paciente</i>	<i>Valor Normal</i>
<i>Búsqueda de anticuerpos anti-nucleares para LES<sup>1</sup></i>	<i>Negativo</i>	<i>Negativo</i>
<i>Prueba de VDRL</i>	<i>Negativo</i>	<i>Negativo</i>
<i>Determinación de IgG</i>	<i>1178 mg%</i>	<i>784-1930 mg%</i>
<i>Determinación de IgM</i>	<i>135 mg%</i>	<i>118-434 mg%</i>
<i>Determinación de IgA</i>	<i>159 mg%</i>	<i>73-436 mg%</i>
<i>Determinación de C<sub>3</sub></i>	<i>61 mg%</i>	
<i>Determinación de C<sub>4</sub></i>	<i>18 mg%</i>	
<i>Cariotipo: XX-46 por bandas G.</i>	<i>XX-46</i>	<i>M:XX-46, H:XY-46</i>

LES<sup>1</sup> Lupus Eritomasoso Sistémico

Para control de la paciente se hicieron las pruebas de laboratorio mínimamente una vez por mes, como se muestra en la figura 3.



**Figura 3**  
**Determinación de la actividad del FVIII:C**  
**y la presencia de inhibidor contra FVIII:C.**

Se hizo un estudio a los padres de la paciente de las pruebas más importantes de coagulación, como lo muestra la Tabla 9:

Tabla 9

Resultados del Estudio de los Padres de la Paciente

<i>Determinación de:</i>	<i>Padre</i>	<i>Madre</i>	<i>MPN<sup>5</sup></i>
<i>TP<sup>1</sup> (IP)</i>	<i>1.24</i>	<i>1.25</i>	
<i>TT<sup>2</sup> (seg)</i>	<i>28.8</i>	<i>29.1</i>	<i>27.8</i>
<i>TTPa<sup>3</sup> (seg)</i>	<i>52.9</i>	<i>40.0</i>	<i>45.4</i>
<i>FVIII:C<sup>4</sup> (% act.)</i>	<i>62.0</i>	<i>100</i>	<i>50 - 100</i>

TP<sup>1</sup> Tiempo de Protrombina en Índice de Protrombina.

TT<sup>2</sup> Tiempo de Trombina.

TTPa<sup>3</sup> Tiempo de Tromboplastina Parcial activada.

FVIII:C<sup>4</sup> Determinación del FVIII:C en % de actividad

MPN<sup>5</sup> Mezcla de plasmas normales.

## Cuantificación de la concentración de Proteína por el Método de Bradford.

La proteína total fue cuantificada en cada una de las muestras de plasma por el método de Bradford. Los resultados obtenidos de la curva de calibración se visualizan en la Figura 4.

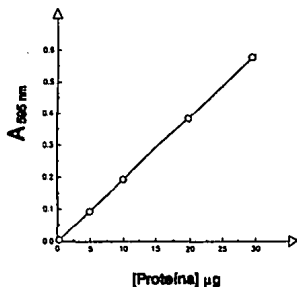


Figura 4  
Curva de calibración para  
determinar proteína por Bradford

Los parámetros de la curva de calibración fueron:

$$a = -0.002 \quad b = 0.020 \quad r = 0.999$$

Donde se observa que el comportamiento de la línea es el de una recta cuya ecuación es:  $y = ax + b$ .

## Determinación del Factor von Willebrand por el Método de ELISA.

### Estandarización del Método de ELISA

Para determinar al factor von Willebrand por el método de ELISA fue necesario la estandarización de dicho método para conocer la cantidad de proteína que nos detecta la dilución mínima de anticuerpo.

Los resultados obtenidos en el ensayo de la estandarización de la determinación del FvW por el método de ELISA se muestran en la figura 5.

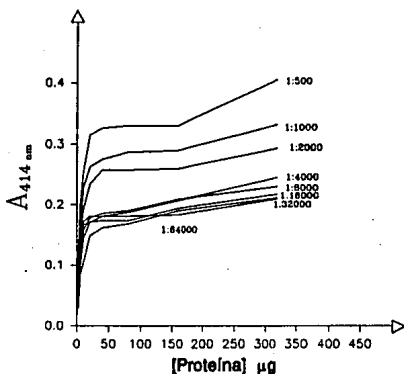


Figura 5  
Titulación de antígeno-anticuerpo para la determinación de Factor von Willebrand por el método de ELISA

## **Validación de la Determinación del FvW por el Método de ELISA**

Todas las muestras de plasma fueron obtenidas y procesadas de la misma manera, en cada uno de los plasmas se cuantificó la cantidad de proteína total, la cual varió entre 41.9 y 107  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Posteriormente, se determinó el FvW en cada uno de los plasmas de acuerdo a las condiciones de trabajo establecidas, cada determinación se realizó por triplicado, se aplicaron métodos estadísticos y los resultados son mostrados en la tabla No. 10, con los cuales se conformó la figura No. 6. Se consideró como testigo negativo: un plasma depletado de FVIII:C; como testigo positivo: un concentrado de FVIII:C.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 10

Validación de la Determinación del FvW por ELISA

MP	A <sub>414 nm</sub>	MP	A <sub>414 nm</sub>	MP	A <sub>414 nm</sub>	MP	A <sub>414 nm</sub>
t-	0.000	19	0.114	41	0.139	63	0.137
t+	1.254	20	0.127	42	0.216	64	0.183
P	0.190	21	0.137	43	0.121	65	0.253
1	0.475	22	0.116	44	0.158	66	0.201
2	0.315	23	0.153	45	0.155	67	0.138
3	0.333	24	0.163	46	0.220	68	0.158
4	0.303	25	0.265	47	0.196	69	0.175
5	0.400	26	0.184	48	0.205	70	0.215
6	0.266	27	0.201	49	0.128	71	0.186
7	0.325	28	0.186	50	0.275	72	0.209
8	0.354	29	0.192	51	0.204	P	0.235
9	0.223	30	0.194	52	0.200	t-	0.000
10	0.213	31	0.247	53	0.181	t+	1.520
11	0.231	32	0.232	54	0.154	73	0.255
12	0.407	33	0.212	55	0.190	74	0.235
13	0.352	34	0.185	56	0.185	75	0.237
14	0.361	35	0.173	57	0.188	76	0.295
15	0.287	36	0.178	58	0.216	77	0.262
16	0.260	37	0.172	59	0.160	78	0.311
17	0.233	38	0.196	60	0.216	79	0.282
18	0.246	39	0.182	61	0.125	80	0.244
P	0.141	40	0.157	62	0.180		

MP: muestra de plasma normal

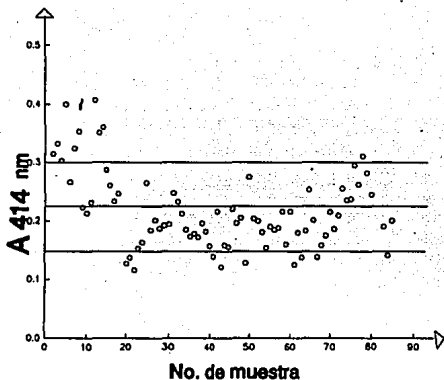
t+ : testigo positivo (concentrado de FVIII:C)

t- : testigo negativo (plasma depletado de FVIII:C)

P : plasma de la paciente

A<sub>414 nm</sub> : absorbancia a 414 nm





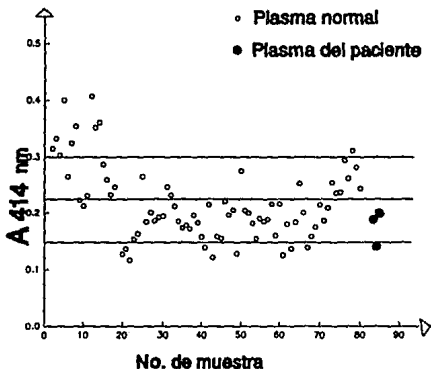
**Figura 6**  
**Determinación del FvW por el método de**  
**ELISA en plasmas normales.**

Una vez que se estandarizó el método se procedió a realizar la determinación del FvW por el método de ELISA en el plasma de la paciente de estudio, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 11**  
**Determinación del FvW en el plasma de la paciente por el método de ELISA.**

<i>No. Determinación</i>	<i>A 414 nm</i>
<i>1</i>	<i>0.190</i>
<i>2</i>	<i>0.141</i>
<i>3</i>	<i>0.200</i>

Dichos resultados se incorporaron en la figura anterior, obteniéndose la figura 7.



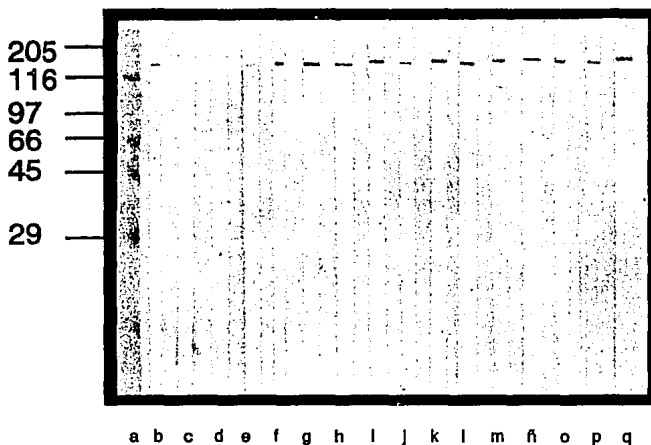
**Figura 7**  
**Determinación del FvW por el método de ELISA en plasmas normales y de la paciente en estudio.**

## **Determinación del FvW por Inmunolectrotransferencia.**

El otro método utilizado para determinar FvW en plasma fue el ensayo de Inmunolectrotransferencia. Primeramente, se hizo un corrimiento electroforético en el cual se analizaron las proteínas de un MPN, en geles de acrilamida-bisacrilamida al 7.5 %.

Se corrieron diferentes concentraciones de proteína total que fueron de 20 a 2.5  $\mu\text{g}$  por carril y el gel obtenido se transfirió a un papel de nitrocelulosa (PNC). Cada uno de los carriles fue recortado y posteriormente expuesto al anticuerpo anti-FvW a una dilución 1:500, después se pusieron en contacto con el anticuerpo peroxidado y revelado con diaminobencidina.

El mismo procedimiento se realizó con el plasma de la paciente y con un grupo de plasmas normales previamente probados por el método de ELISA. En la figura siguiente se observan los resultados obtenidos.



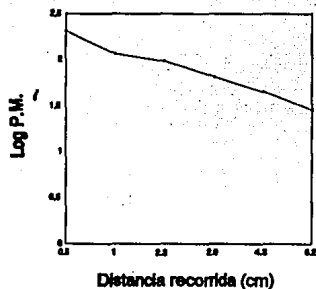
**Figura 8**  
**Determinación del FyW por**  
**inmunolectrotransferencia**

carril a : Marcadores de P.M.  
 carril b : control positivo.  
 carril c : control negativo.  
 carriles d y e : plasma de la paciente.  
 carriles del f al q : plasmas normales.

Con los marcadores de peso molecular se hizo una curva con las distancias de migración, contra el logaritmo del P.M. de los marcadores de referencia, cuyos resultados se muestran en la Tabla No. 12 y en la figura 9.

Tabla 12  
Marcadores de Peso Molecular

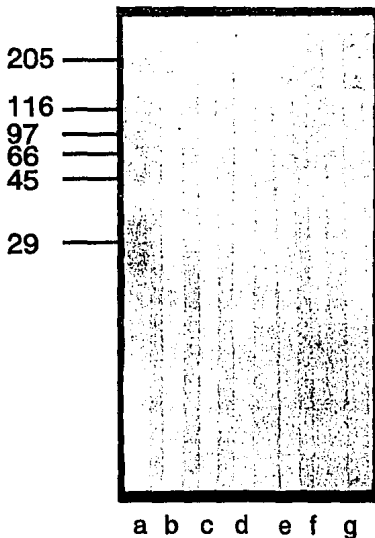
<i>Marcador de P.M.</i>	<i>kDa</i>	<i>Distancia recorrida (cm).</i>
<i>Miosina</i>	205	0.5
<i><math>\beta</math>-galactosidasa</i>	116	1.0
<i>Fosforilasa</i>	97	2.3
<i>ASB</i>	66	2.9
<i>Ovoalbúmina</i>	45	4.3
<i>Anhidrasa carbónica</i>	29	6.2



**Figura 9**  
**Determinación de Pesos Moleculares.**

En el gráfico obtenido se interpolaron los valores de distancias recorridas de las bandas identificadas por el anticuerpo, obteniéndose pesos moleculares aproximados de: 154, 150, 118, y 91 kDa.

Sin embargo, cuando se realizó un segundo inmunoblot con plasmas obtenidos cinco meses después, no se encontró diferencia entre el plasma de la paciente y los normales, como se muestra en la siguiente figura.



**Figura 10**  
**Determinación del FvW por**  
**inmunotransferencia.**  
**Carril a : Marcadores de P.M.**  
**Carril b : Control positivo**  
**Carril c : Control negativo**  
**Carril d : Plasma de la paciente**  
**Carril e al f : Plasmas normales**

## DISCUSION

En esta tesis hicimos un estudio prospectivo de un caso clínico poco frecuente, ya que desde que se inició el Servicio de Hematología hasta la fecha no se había encontrado un caso de características similares, se trató de una mujer de 19 años que presentó deficiencia de FVIII:C adquirida por presencia de algún inhibidor provocada, posiblemente, como una respuesta a la ingesta de anticonceptivos orales.

La paciente cuando ingresó al H.E.C.M. "La Raza" tuvo un cuadro clínico manifestado por tendencias hemorrágicas que se presentaron en forma de equimosis en miembros superiores que aparecieron en forma espontánea. En el laboratorio encontramos un TTPa prolongado que no corrigió con plasma normal, FVIII:C de menos de 1 % de actividad, por lo tanto la paciente presentó una deficiencia de actividad del FVIII:C.

La deficiencia de FVIII:C, se encuentra relacionada con diferentes síndromes principalmente, la hemofilia A y la Enfermedad de von Willebrand.

Debido a que la paciente no tuvo ningún antecedente heredo-familiar relacionado con su padecimiento, y su cariotipo fue normal, no pudo haber sufrido una hemofilia clásica, ya que White (White 1989) reporta que la hemofilia clásica es un desorden recesivo ligado al sexo, expresada en hombres, fungiendo la mujer como portadora de la enfermedad, la cual la padece a nivel



congénito en el caso de ser hija de padre hemofílico y madre portadora, por lo que la paciente presenta una deficiencia adquirida de FVIII:C.

Es importante considerar que debido a que presentó una deficiencia severa de FVIII:C se esperaba clínicamente que tuviera sangrados muy severos, como lo reporta Kasper (Kasper 1985) que dice: "que para el propósito clínico la deficiencia del FVIII:C es clasificado como severo (menos del 1%), moderado (1 a 5%) y leve (5 a 30%) de acuerdo al % de la actividad del FVIII ensayado en plasma normal". Schulman (Schulman 1984) dice: "que las manifestaciones clínicas incluyen sangrado espontáneos en articulaciones, músculos y cerebro; un sangrado leve pero prolongado a la menor cortada y sangrado severo en laceraciones". Los sangrados espontáneos son limitados generalmente a pacientes con menos del 5% de actividad del FVIII:C, lo cual no ocurrió en la paciente, con excepción del cuadro agudo que presentó al principio, ella siempre permaneció asintomática.

Posteriormente se detectó in vitro la presencia de algún inhibidor contra FVIII:C de 60 U.B. por lo que, pensamos que la deficiencia de FVIII:C era provocada por la presencia de inhibidor, como lo reporta Ratnoff (Ratnoff 1987), que dice: "que en el caso de presencia de inhibidor contra FVIII:C, la prueba de TTPa puede mostrarse anormal, las diluciones seriadas del plasma del paciente con un plasma normal puede demostrar una prolongación de un

control de TTPa normal". Lo cual concuerda con nuestros resultados.

A los 4 meses ya no se detectó in vitro el inhibidor, subiendo un poco el nivel de actividad de FVIII:C, manteniéndose en entre 4 y 9 % durante un año, lo cual es factible ya que Ratnoff (33), reporta que: "aproximadamente el 10 % de los inhibidores espontáneos contra FVIII:C pueden desaparecer y regresar sin terapia específica y un 45 % desaparecen en asociación con esteroides y otras terapias".

Slocombe (Slocombe 1981) reporta: "que el inhibidor solo puede ocurrir en pacientes con hemofilia clásica, usualmente en ancianos y espontáneamente en mujeres después del parto. Estos son asociados con neoplasias, desordenes autoinmunes tales como artritis reumatoide y LES". También ha sido descrito el caso de anticuerpos desarrollados por antibióticos como la penicilina; por lo que era importante descartar que la paciente tuviera un enfermedad autoinmune como es LES, para lo cual se determinó inhibidor lúpico, determinación de anticuerpos antinucleares para LES y la prueba de VDRL, las cuales resultaron negativas, por lo que, consideramos que el padecimiento de la paciente no se encontraba vinculada con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos o LES. Descartamos la posibilidad de que nuestra paciente tuviera enfermedad von Willebrand en una forma clásica, ya que su tiempo de sangrado fue normal, y los estudios para valorar agregación plaquetaria se

encontraron dentro de los valores normales. Corroborándose con la bibliografía que establece, que dicha enfermedad se caracteriza por una deficiencia del FVW detectada in vivo por un tiempo de sangrado prolongado e in vitro por una reducción en la agregación plaquetaria con el plasma de la paciente en presencia de ristocetina.

El conjunto de resultados nos condujo a pensar que la sintomatología que presentaba la paciente posiblemente se debía a una deficiencia adquirida de FVIII por presencia de algún inhibidor.

Aunque con los estudios realizados no podíamos ayudar a definir clínicamente el padecimiento de la paciente, ya que los métodos coagulométricos por ser pruebas de punto final miden únicamente la actividad funcional del FVIII:C y pueden tener interferencias, además de que nos interesaba saber si el FVIII:C además de su baja actividad, también se encontraba bajo a nivel fisicoquímico, es decir, si existía una deficiencia molecular de esta proteína. Asimismo poder esclarecer si las posibles causas de la deficiencia de dicha proteína;

- 1) Disminución en la síntesis proteica
- 2) Disfunción de la proteína
- 3) Presencia de anticuerpo contra FVIII:C no detectable por la técnica común.

Por ello, se pensó en hacer estudios basados en métodos más sensibles como son los inmunoenzimáticos.

Para lo cual era necesario considerar primero la necesidad de un anticuerpo, no se contó con el anticuerpo anti-FVIII:C y la producción de dicho anticuerpo no fue posible, debido a, que se tienen problemas como son la purificación de la proteína, para lo cual hay que considerar: la concentración en plasma del FVIII:C es extremadamente baja y está en combinación con una marcada tendencia a degradación proteolítica. Como lo establece Vehar y David (Lavergne 1976) que obtuvieron 400 µg de FVIII:C de bovino a partir de 250 l de plasma de bovino.

Por lo que como alternativa se contó con el anticuerpo anti-FvW humano de conejo.

Se considero medir el FvW en el plasma de la paciente por el método de ELISA e Inmunoelectrotransferencia. Para la determinación de ELISA previamente se hizo una titulación de anticuerpo y antígeno para establecer las condiciones de trabajo para la determinación del factor por dicho método.

Bajo dichas condiciones se realizó la validación y estandarización de la determinación del FvW por el método de ELISA. Para ello se contó con muestra de plasmas de pacientes normales que acuden al Banco de Sangre del C.M. "La Raza" en donde se tomo de mujeres jóvenes, sanas que

aparentemente no presentaban ningún problema de coagulación. Todas las muestras fueron tomadas, procesadas y conservadas de la misma manera.

Los valores normales para la determinación del FvW por el método de ELISA se encontraron dentro del intervalo de absorbencia de 0.115 a 0.475.

Los valores de absorbencia de nuestra paciente podríamos decir que entran dentro de los valores inferiores normales.

En diciembre de 1990 se realizó una inmunolectrotransferencia. Primero realizamos una curva de una MPN para saber la cantidad óptima de proteína en cada carril (20 µg). Se observó que el anticuerpo anti-FvW reconoció 4 bandas de peso molecular de: 154, 150, 118, 91 kDa. Luego se corrió el plasma de la paciente y de plasmas normales encontrándose el caso de la paciente su FvW se encuentra ligeramente mas tenue, pero al hacer el estudio comparativo con la curva de MPN se observó que se encuentra aproximadamente en un 50 % el FvW de la paciente por lo que se encuentra dentro de los valores normales inferiores, lo cual se corrobora con la actividad determinada por aglutinación, (50% de actividad), asimismo hay relación entre la concentración del FvW con su actividad.

Se repitió el ensayo en abril de 1991 encontrándose que el FvW de la paciente tiene el mismo comportamiento en que el de los pacientes normales. Lo cual se corrobora con su actividad de FVIII:C se encuentra normal 140 %

de actividad.

Finalmente debemos establecer que la paciente al ingerir anticonceptivos orales, estos posiblemente produjeron en su organismo la aparición de inhibidores del FVIII, produciendo disminución de dicha proteína en plasma, Pero no se normalizó la actividad del factor, lo cual se ha reportado en algunos casos.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos concluimos que la paciente presentó una deficiencia adquirida leve del Factor von Willebrand, la cual recupera posteriormente, lo cual se comprobó al analizar fisicoquímicamente dicho factor de la paciente por el método de ELISA e inmunoelctrotransferencia.

Asimismo que la paciente tuvo una disminución de la actividad funcional del FVIII:C, debido a la presencia de un inhibidor, que es un anticuerpo contra dicha proteína, comprobado por técnicas coagulométricas.

Se realizó la estandarización y validación de la determinación del FvW por el método de ELISA.

Las técnicas implementadas tienen una sensibilidad mas alta que las convencionales para el estudio de dicho paciente.

## PERPECTIVAS:

Producir un anticuerpo anti-factor VIII:C y realizar técnicas inmunoquímicas para esclarecer si tiene una deficiencia de dicha proteína. Asimismo si existe una anomalía físicoquímica.

Realizar estudios que nos corrobore que en ella se realizó un desorden inmunológico provocado por la ingesta de anticonceptivos orales, para ello se realizarían las siguientes alternativas: Realizar un estudio farmacológico del anticonceptivo oral (TRINORDIOL) utilizando como modelo de experimentación ratas, a las cuales se les administraría dicho medicamento para observar si produce efectos adversos, específicamente del sistema de coagulación, o bien, si hay alguna alteración en su sistema inmunológico; esto a que produzca alguna alteración que desencadene un proceso autoinmune y el desarrollo de auto-anticuerpos.

El otro estudio sería con células de la paciente, por ejemplo; cultivar sus linfocitos e inducir in vitro el contacto con el medicamento y observar como es el comportamiento, si existiera una respuesta del desarrollo de anticuerpos contra las proteínas de la coagulación, si hay tal respuesta realizar caracterización de dichos anticuerpos.

Como experiencia al encontrarse en un futuro con un caso similar es importante considerar: el tomar una muestra inicial muy grande,



y conservarla hasta el final del estudio especialmente cuando se tiene su fase aguda, para realizar todos los estudios pertinentes tanto coagulométricos, como inmunológicos, así como pruebas de caracterización molecular para ayudar al médico a establecer un diagnóstico de la enfermedad y con ello un tratamiento adecuado de la paciente.

Es importante fomentar las interacciones: Facultad, Instituciones Hospitalarias y Centros de Investigación, lo cual es de suma importancia para nosotros, ya que si existe la interacción Facultad-Institución Hospitalaria-Centro de investigación, se verían los requerimientos de conocimientos necesarios para el desarrollo profesional en este caso de los Químicos en el área hospitalaria, lo cual nos serviría como base en la Elaboración de Planes de Estudios.

La interrelación Centros de Investigación- Instituciones Hospitalarias, es una de las más importantes, ya que con ello se cubrirían las demandas que pudieran tener cualquiera de ellas y con ello poder brindar al paciente un diagnóstico más certero y con ello el tratamiento adecuado.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Allain, J.P. (1984) Non factor VIII related constituents in concentrate  
Scand Journal Haematology. 41:173-180.
- 2) Barry J. Lamphear. FAY J., Philip. (1992) Proteolytic interactions of  
Factor IXa with human Factor VIII and Factor VIIIa.  
Blood 80(12):3120-3126.
- 3) Board Philip. Coggan Marjorie Miloszawski, Kris (1992) Identification  
of a point mutation in Factor XIII a subunit deficiency. Blood 80  
(4):937-941.
- 4) Bradford M. Marion. (1976) A rapid and sensitive method for  
quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle  
of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72:248-254.

- 5) Bigg R. (1972). Blood coagulation Haemostasis and thrombosis. Black Well Scientific Publications, Oxford. 602-671.
- 6) Chan, Vivian. Chan, T.K. Tong, T.M.F. Tood, D. (1989) A novel missense mutation in exon 4 of the Factor VIII:C gene resulting in moderately severe Hemophilia A. Blood 74(8):2688-2691.
- 7) Chediak, Juan. Telfer C, Margaret. Jaojaroenkul, Thiti. (1980) Lower Factor VIII coagulant activity in daughters of subjects with hemophilia A compared to other obligate carriers. Blood 55(4):552-558.
- 8) Debra D. Pittman. Milleson Michael. Marquette Kirberly. (1992) A2 domain of human recombinant derived Factor required for procoagulant activity but not for Trombin cleavage. Blood 79(2):389-397.

- 9) Donogh P., O'Brien. Tuddenhan G.D. Edward. (1989) Purification and characterization of Factor VIII 1,689 - Cys a nonfunctional cofactor occurring in a patient with severe Hemophilia A. Blood 73(8):2117-2122.
- 10) Foster A. Paul. Fulcher A. Carol. Houghten A. Richard.(1990) Synthetic Factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of Factor VIII inhibit Factor VIII binding to phosphatidylserine. Blood 75(10):1999-2004.
- 11) Fujimura Y., Usami Y. Titani K. (1991) Studies on anti- von Willebrand Factor (vWF) monoclonal antibodies NMC-4, which inhibits both ristocetin and brotrocetin induce vWF binding to platelet glycoprotein Ib. Blood 77(1):113-120.
- 12) Fulchera, Carol. Zimmerman S.,Theodore. (1982) Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:1648-1652.

- 13) Furie, Bruce. Furie, C. Barbara (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53 505-518.
- 14) Gonias S. L. Pizzo S. V. Salvatore V. (1986) The biochemistry of haemostasis. *Clin. Lab. Haemat. (Review)* 8:281-301.
- 15) Gordon A., Vehar. Earl W. Davie.(1980) Preparation and properties of bovine Factor VIII. *Biochemistry*: 19(3):401-409.
- 16) Gouderman J., Samor B., Caron C. (1988) Acquired type II von Willebrand's disease: demonstration of a complexed inhibitor of the von Willebrand Factor-platelet interaction and response to treatment. *British Journal of Haematology*. 68:227-233.
- 17) Ham W. A. Cormack. *Tratado de Histologia*. 8a. ( Nueva Editorial Interamericana) México 1983. pp 234-250.
- 18) Hans, P. (1986). Immunoblotting with monoclonal antibodies. Importance of the blacking solution. *Analytical Biochemistry*. 159 : 386-389.

- 19) Harker, A. Laurence. Haemostasis Manual. Ed. F.A. Davis Company. Philadelphia. 1979. 2a. edición, pp. 1-8.
- 20) Higuchi, Miyoko. Kochhan, Lothar. Schwaab, Rainer. (1989) Molecular defects in Hemophilia A: identification and characterization of mutations in the Factor VIII gene and family analysis. Blood 74(3):1045-1051
- 21) Howard A., Margaret. Perkin, Jean. Koutts, Jerry. Firkin, G., Barry. (1981) Quantitation of binding of Factor VIII antigen to concavalina A. British Journal of Haematology. 47:607-615.
- 22) Hoyer Leon, W. (1972) Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, Factor VIII). Radioimmunoassay of AHF antigen. J. Lab. Clin. Med. 80(6):822-833.
- 23) Hoyer Leon, W. (1981). The factor VIII complex structure and function. Blood, 58(1):1-12.

- 24) Kane H., William. Davie W., Earl. (1988) Blood coagulation Factor V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. Blood 71(3):539-555.
- 25) Kasper C.K. Dietrich S.L. (1985) Comprehensible management of Hemophilia. Clin. Haematology. 14 489.
- 26) Kenneth A., Bayer . Mannuccio, Pier. Gringeri, Alessandro. (1992) Factor IXa- Factor VIIIa cell surface complex does not contribute to the basal activation of the coagulation mechanism in vivo. Blood 79(8):2039-2047
- 27) Kenneth G. Mann. (1987) The assembly of blood clotting complexes on membranes. TIBS 12:229-233.
- 28) Laemmli, U.K. (1979). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

- 29) Langdell R.D. Wagner R.H. Brinkhous K.M. (1953) Effect Antihemophilic Factor on one stage clotting tests. *Journal Laboratory and Clinical Medicine*. 41:637-647.
- 30) Lavergne J:M;, Meyer Dominique Reisner H. (1976) Characterization of human anti Factor VIII antibody purified by immune complex formation. *Blood* 48 (6): 931-939.
- 31) Lillicrap D. P. Taylor ,Sam. Schuringa P.C.R. (1990) Variation of the non Factor VIII sequence detected by a probe from intron 22 of Factor VIII gene. *Blood* 75(1):139-143.
- 32) Macy, Eric. Kemeny, Michael. (1988) Enhanced ELISA: how to measure less than 10 picograms of a specific protein (immunoglobulin) in less than 8 hours. *FASEB* 2:3003-3009.



- 33) Margni A., Ricardo Inmunología e inmunoquímica.  
Ed. Panamericana. Argentina 1989 (c1972) 571-572.  
644-645. 654-656.
- 34) Morton L. F. Peachey A. P. Barnes M.J. (1989) Platelet reactive sites in collagens type I and type III evidence for separated adhesion and aggregatory sites. *Journal Biochemistry* 258:151-163.
- 35) Murray, Elizabeth. Giles R., Alan. Bridge J. Peter.(1991)  
Consegregation of von Willebrand Factor gene polymorphismo and possible germinal mosaicism in type IIB von Willebrand disease.  
*Blood* 77(7):1476-1483.
- 36) Rock G. and Palmer D.S. (1981) Accumulative efect of DDAUP and heparin in increasing plasma factor VIII levels.  
*Vox Sanguinis* 41:56-60.
- 37) Ratnoff D., Oscar. (1987) Inhibitors of coagulation in children.  
*Critical Reviews in Oncology Haematology.* 7:53-68.

- 38) Rotblat, Frances. O'Brien P, Donogh. O'Brien J., Fergal.  
(1985) Purification of human factor VIII:C and its characterization  
by Western Blotting using monoclonal antibodies.  
Biochemistry. 24(16):4294-4300.
- 39) Owen PLA (1949). A quantitative one-stage method for the assay of  
protrombin. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1 (81).
- 40) Schulman S. Wiechel B. (1984) Hepatitis epidemiology and liver  
function in hemophilics in Sweden. Acta Med. Scand. 215-249
- 41) Schulman S. Wiechel B.(1984) Hepatitis, epidemiology and liver  
function in hemophilics in Sweden. Acta Med. Scand. 215-249.
- 42) Slocombe, G.W. Newland, A.C. (1981) The role of intensive plasma  
exchange in the prevention and management of haemorrhage in  
patients with inhibitors to Factor VIII. British Journal of  
Haematology. 47:577-585.

- 43) Toole J.,John. Pittman, Debra. Orr. C. Elizabeth. (1986) A large region (aprox 95 kDa ) of human Factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:5939-5942.
- 44) Towbin, Harry.Staehelin,Theophil. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.76(9):4350-4354.
- 45) Woodliff, H.J.Hematologia Clínica. Ed. El Manual Moderno. México 1981. pp. 184-229.
- 46) Weinstein Mark. Chute Leslie. Deykin Daniel. (1981) Analysis of Factor VIII coagulant antigen in normal trombin treated and hemophilic plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(8):5137-5141
- 47) Willam R. Church. Jerningan L., Robert. Toole Jay. (1984) Coagulation Factor V and Factor VIII and Ceruloplasmina constitute a family of structurally related proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Blood. 81:6934-6957.

- 48) White C., Gilbert. Shoemaker B., Charles .(1989) Factor VIII gene and Hemophilia A. Blood 73:1 1-12.
- 49) White, Gilbert. Mc Millan, Campbell W. and Blatt Philip M. (1982) Factor VIII inhibitors. A. Clinical Overview. 13:335-342.
- 50) Zaverio M. Ruggeri, Zimmerman S.Theodore. (1987) Von Willebrand Factor and von Willebrand disease. Blood 70(4):895-904.

## APENDICE DE SOLUCIONES.

### Acrilamida 30 %

Acrilamida (Serva 10675)	300 g
Agua bidestilada	1 l
Resina RG-501-X8 (Bio-Rad 142-6424)	10 g

Disolver la acrilamida en 800 ml de agua, posteriormente aforar a 1 lt. Desionizar la acrilamida con la resina RG-501-X8 durante 1 hora con agitacion continua. Filtrar por papel filtro Whatman no. 40, posteriormente por membrana 0.22 $\mu$ . Alicuotar, y almacenar en refrigeración.

### Albúmina 1 mg \ ml

Albúmina (Sigma)	10 mg
NaCl 0.15 M (Baker)	10 ml

Pesar la albúmina y disolverla en 10 ml de NaCl 0.15 M, guardar a - 20°C.

**Albúmina 1 % \ PBS-Tween**

Albúina (Sigma)	0.1 g
PBS-Tween 0.05%	10 ml

Disolver la albúmina en los 10 ml de PBS/Tween 0.05%.

**Amortiguador Bloqueador**

Leche descremada("Sveltes")	3 g
PBS-tween 0.05% c.p.	100 ml

Disolver 3 g de leche descremada con PBS-tween 0.05% y aforar a 100 ml.

**Amortiguador de Fosfatos 50 mM pH 7.4**

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1M	50 ml
Agua bidestilada	1 l

Se adicionan los 50 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 900 ml de agua, se ajusta pH = 7.4 con NaOH 10 N. Aforar a 1 litro. Guardar en refrigeración.

### Bi-Car pH=9.6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> anhidro granular (Baker)	1.56 g
NaHCO <sub>3</sub> anhidro (sigma)	2.93 g
Agua bidestilada	1 l

Las sales se disuelven en 800 ml de H<sub>2</sub>O, se ajusta el pH=9.6 y se afora a 1 litro, guardar a temperatura ambiente no más de 2 semanas.

### Amortiguador de Laemmli 1X para muestra

SDS 20%	30 ml
Tris 1 M, pH 6.8	12.5 ml
Glicerol	10 ml
Rojo de Fenol	1 g
Agua bidestilada c.b.p.	100 ml

Disolver el rojo de fenol en agua bidestilada, con el Tris 1M, pH=6.8, y el glicerol, se ajusta pH, finalmente se agrega el SDS y se afora a 100 ml con H<sub>2</sub>O. Guardar a temperatura ambiente.

### Amortiguador de Transferencia

Trizma-Base	14.5 g
Glicina	67.0 g
Metanol (grado reactivo)	1200 ml

Disolver el Trizma-base y la glicina en agua bidestilada, ajustar el pH=8.3, aforar a 4 litros, posteriormente añadir 1200 ml de metanol y finalmente aforar a 6 litros. Se necesitan aproximadamente 7 litros de amortiguador por cada corrida.

### Bis-Acrilamida 2 %.

Bis-acrilamida (Bio-Rad 161-0201)	20 g
Agua bidestilada	1 l
Resina RG-501-X8 (Bio-Rad 142-6424)	10 g

Disolver la Bis-acrilamida en 800 ml de agua, posteriormente aforar a 1 lt. Desionizar la acrilamida con la resina RG-501-X8 durante 1 hora con agitación continua. Filtrar por papel filtro Whatman no. 40, posteriormente por membrana 0.22 $\mu$ . Alicuotar. Almacenar a 4°C.



**Citrato de sodio 3.8 %.**

citrato de sodio (Baker)	3.8 g
agua bidestilada	100 ml

Disolver el citrato de sodio en el agua, aforar a 100 ml.

Filtrar a través de papel filtro Whatman no. 4 . Almacenar a 4°C.

**Cloruro de calcio 0.025 M**

Cloruro de calcio	2.77 g
Agua bidestilada	1 l

Pesar el  $\text{CaCl}_2$  y disolverlo en los 1000 ml de agua bidestilada, una vez aforada la solución filtrarla a través de papel filtro whatman No. 4. Almacenar a 4°C.

**Cloruro de sodio 0.15M**

cloruro de sodio (Baker)	9 g
Agua bidestilada	1 l

Pesar los 9 gramos de  $\text{NaCl}$  y disolverlos en agua bidestilada, y la solución pasar a un matraz aforado de 1 litro. filtrar a través de membrana de nitrocelulosa de poro de  $.22 \mu$ . Poner en alicuotas. Guardar en refrigeración.

Colorante de Cleveland para tinción de geles.

Solución para teñir:

		[Final]
Metanol	500 ml	50 %
Acido acético	100 ml	10 %
Azul de coomassie	1 g	0.1 %
Agua bidestilada c.p.	1000 ml	

Solución desteñidora.

		[Final]
Alcohol metílico puro (REASOL)	150 ml	5 %
Acido acético	300 ml	10 %

Diaminobencidina (DAB).

DAB	50 mg
Amortiguador fosfatos 50 mM, pH=7.4	100 ml

Se disuelve la DAB en el amortiguador y se agita durante 40 minutos antes de utilizarse y se filtra a través de papel Whatman.

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 20%

SDS (sodium Lauryl sulphate Bio-Rad )	20 g
Agua bidestilada	100 ml

El SDS se disuelve poco a poco, evitando que se haga espuma, se afora a 100 ml y se almacena a temperatura ambiente.

SDS 0.2%

SDS 20%	1 ml
Agua bidestilada	100 ml

Realizar una dilución 1:100 de la solución SDS 20%. Guardar a temperatura ambiente.

Oxalato de amonio 1%

Oxalato de amonio	1 g
Agua bidestilada	100 ml

Disolver el oxalato de amonio en los 100 ml de agua, filtrar a través de papel filtro. Hay que filtrar cada vez que se va a utilizar. Guardar en refrigeración.

Persulfato de amonio (APS)

APS (Bio-Rad Laboratories)	100 mg
Agua	1 ml

Disolver los 100 mg de APS en un ml de agua bidestilada.

Guardar a 4°C.

Reactivo de Bradford

	1X	5X
Azul de coomassie G-250 (PIERCE)	100 mg	500 mg
Etanol 95% (Baker)	50 ml	250 ml
Acido orto-fosfórico (Merck)	100 ml	500 ml
Agua bidestilada c.p.	1000 ml	1000 ml

Disolver el azul de coomassie en el etanol, añadir el ácido orto-fosfórico, aforar a un litro con agua bidestilada. Filtrar en un embudo con filtro No. 50.

### PBS 10 X

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dibásico	11.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> monobásico	2 g
Agua bidestilada	1 l

Se disuelven las sales en agua bidestilada, se mide pH y se ajusta a 7.4, se filtra por 0.22  $\mu$ m y se guarda a temperatura ambiente.

### PBS 1X

PBS 10 X	100 ml
Agua bidestilada	1 l

### PBS-Tween 0.05%

Tween 20	0.5 ml
PBS	1 l

Agregar 0.5 ml de tween 20 a 999.5 ml de PBS y mezclar muy bien.

Tris-HCl 1M pH = 8.8.

Trizma Base (Sigma T-1378) 121.1 g

Agua bidestilada 1 l

Pesar el trizma base y disolver en 800 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada  
ajustar el pH = 8.8 con HCl concentrado, aforar a 1 litro. Filtrar  
por membrana 0.22 $\mu$  poner en alicuotas de 200 ml.

Guardar a 4°C.

Tris-HCl 1M pH = 6.8.

Trizma Base (Sigma T-1378) 121.1 g

Agua bidestilada 1 l

Pesar el trizma base y disolver en 800 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada  
ajustar el pH = 6.8 con HCl concentrado, aforar a 1 litro. Filtrar  
por membrana 0.22 $\mu$  poner en alicuotas de 200 ml. Guardar a 4°C.