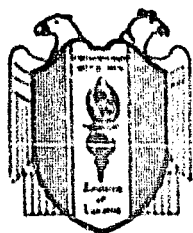


UNIVERSIDAD MOTOLINIA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



ESTUDIO ANALITICO DE CRIOPRECIPITADOS DE PLASMA HUMANO Y DE SU ACTIVIDAD HEMOSTATICA IN VITRO

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
CELIA SALINAS ZALDIVAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE
DIA 20 DE ABRIL DE 1964

PRESIDENTE: OSCAR MON DODERO
VOCAL: MA GUADALUPE CABRERA T.
SECRETARIO: RAFAEL ILLESCAS F.
1er. SUPLENTE: OLGA FERREIRA C.
2o. SUPLENTE: MA DE LOS ANGELES
RAMIREZ F.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL
TRABAJO

BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL
CENTRO MEDICO NACIONAL.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL
SUSCRIBENTE:


CELIA SALINAS ZALDIVAR

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL
ASISTENTE DEL TRABAJO:


RAFAEL ILLESCAS FRISBIE.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL
SUPERVISOR TECNICO:


DR. JOSE ANTONIO FRIBE CORTES.

A mi padre

Luz La 2. Vda de Salinas

A mi tío

Felipe de Jesús Zaldívar G.

A mi hermano.

A Carlos López Portillo G.

A la Sra. Elisa J. de Rodríguez.
A la Srta. Ma Teresa Arellano R.
por su valiosa colaboración.

Mi agradecimiento al Dr. Héctor Rodríguez M.
Jefe del departamento del Banco Central de -
Sangre del Centro Médico Nacional y al Dr. -
José Antonio Uribe C. por su acertada direc-
ción y ayuda para la elaboración de éste tra-
bajo

A mis maestros y compañeros.

CONTENIDO

- I.- INTRODUCCION.
- II.- MATERIAL Y METODOS.
- III.- RESULTADOS.
- IV.- COMENTARIOS.
- V.- RESUMEN.
- VI.- BIBLIOGRAFIA.

ESTUDIO ANALITICO DE CRIOPRECIPITADOS

DE PLASMA HUMANO Y DE SU ACTIVIDAD

HEMOSTASIA IN VITRO

INTRODUCCION.

La globulina antihemofílica (Factor VIII) (-) es una proteína esencial en el mecanismo de la coagulación sanguínea y su deficiencia congénita, produce en el hombre y en algunos animales (1,2,3) un padecimiento hemorrágico de intensidad variable, de acuerdo con el grado de carencia: la hemofilia clásica, también llamada hemofilia A, para diferenciarla de otro padecimiento semejante pero en el cual el Factor IX o Factor de Christmas es el deficiente y al cual se le ha llamado Hemofilia B.

La hemofilia A, es una anomalía transmitida por el cromosoma X, se hereda como un carácter recesivo ligado al sexo y es un padecimiento casi exclusivo del sexo masculino ya que la mujer es esencialmente portadora, aunque existen en la literatura reportes de mujeres hemofílicas, lo cual es perfectamente posible desde el punto de vista -

(-) Al factor VIII también se llamado Globulina Antihemofílica o Factor antihemofílico.

genético solo que es difícil que concurren las circunstancias necesarias para que tal hecho se presente (4).

La hemofilia aún siendo un padecimiento relativamente raro, constituye un problema social importante por las limitaciones físicas y las repercusiones psíquicas que sufren sobre todo aquellos que lo padecen en forma severa.

PROPIEDADES DEL FACTOR VIII.- Por electroforesis se ha demostrado que la globulina antihemofílica es una beta-globulina unida al fibrinógeno del cual es difícil de separar.

Es una proteína lábil que pierde actividad en la sangre almacenada a 4°C; se ha observado que después de una semana en esas condiciones se pierde alrededor de 70 por ciento de su actividad. Su estabilidad mejora en el plasma congelado a menos 30°C y Macpherson S. I. (6), ha demostrado que después de un año de almacenamiento la pérdida de actividad a bajas temperaturas es pequeña y que siendo adecuado el procesamiento y preparación del plasma es más importante el nivel del donador, de modo que aconsejan primordialmente la selección de donadores con altos niveles para la formación de las reservas de plasma fresco congelado.

La globulina antihemofílica es destruida rápidamente por acción de la enzima fibrinolítica; la plasmina y se ha supuesto que la pérdida de la actividad es concomitante a la destrucción del fibrinógeno.

El nivel de D.S.H. se eleva in vivo después del ejercicio o después de inyección de adrenalina.

La actividad del Factor VIII puede medirse por la capacidad que tiene una preparación dada para corregir in vivo o in vitro el defecto en la coagulación de un sujeto hemofílico y puede medirse por diversas pruebas de laboratorio aunque quizá la más exacta sea el ensayo de fibulina antihemofílica (23). Otras que se han usado son: el consumo de protrombina, la tromboplastina parcial y la generación de tromboplastina, sus modificaciones.

En personas normales, la concentración de fibulina antihemofílica tiene un rango variable de 50 a 200 por ciento, pero el nivel es generalmente constante en cada individuo en condiciones basales ya que como se mencionó previamente, se produce aumento de su concentración plasmática con el ejercicio. Además se ha mencionado también la posibilidad de que sufra variaciones cíclicas por lo menos en pseudohemofilia (6).

El sangrado del hemofílico se consideró por mucho tiempo un peligro para la vida del paciente y por esto se evitaban en lo posible las extracciones dentales y desde luego la cirugía mayor se consideraba impracticable. Aún con la transfusión de sangre fresca, la situación no mejoró grandemente ya que era necesario aplicar grandes volúmenes para detener el sangrado.(41). Con el descubrimiento

de que el Factor VIII se encuentra en el plasma (9), se lograron mejores resultados al usar únicamente esta fracción sanguínea, pero aún seguían necesitándose volúmenes importantes con el riesgo consiguiente de sobrecarga circulatoria.

En 1954 Macfarlane et al. lograron obtener concentrados de D.A.H. de origen animal (10) y con este recurso fue posible detener con toda seguridad la hemorragia en el hemofílico, pero tenía dos desventajas principales: su antigénicidad debida a la introducción al organismo de grandes cantidades de proteína extraña y su pérdida de eficacia en una segunda aplicación, lo cual se manifiesta por una menor respuesta clínica y bajos niveles de Factor VIII o aún por reacciones clínicas indeseables. Generalmente esto ocurre después el séptimo día de tratamiento. Por todo esto, su uso debe reservarse o se justifica solamente en casos severos de hemofilia.

Meckwick y Wolf en 1957 (11), Blomback y Nilsson en 1956 (12), eliminaron estas desventajas al lograr la obtención de concentrado humano con lo cual se pudieron realizar intervenciones de cirugía mayor sin riesgos de sangrado -- esencial al ser inerte al obtenerse en el paciente -- los hemostáticos adecuados con la aplicación de grandes cantidades de D.A.H. en pequeños volúmenes.

A partir de entonces, se han desarrollado numerosos-

métodos de purificación del factor VIII de origen animal o humano, basados en procedimientos diversos. En 1959, Soulier usó leucinato como adsorbente para separar el factor VIII del fibrinógeno (18); en 1961, Simonetti, Grassias y Ravitsky (19) obtuvieron G.A.H. humana libre de fibrinógeno con una potencia 100 veces mayor que la del plasma original.

Otros métodos emplean precipitación selectiva a base de sulfato de amonio, éter, ácido fólico, etanol, buffers de fosfato y citrato de sodio, una mezcla de etanol y glicina y mezcla de varios anticóculos (15,16,17,18,19, 20,21).

Para todos estos métodos son laboriosos o bien requieren equipos e instalaciones especiales que no están al alcance de cualquier institución hospitalaria, tanto por su costo como por el personal especializado que requieren.

Un avance importante en la solución del problema ha representado el procedimiento de Pool y Shannon (22, 23), para obtener un producto rico en G.A.H.; procedimiento simple, accesible, de bajo costo, por medio del cual puede lograrse un número importante de concentrados para la atención inmediata y adecuada de un sangrado severo o para cirugía mayor, por ejemplo la corrección de las secuelas que el padecimiento deja en el paciente hemofílico,

Este procedimiento surgió de la observación de que el plasma congelado al descongelarse en frío produce un precipitado rico en G.A.H. (24).

Por lo que se ha observado el producto obtenido es bastante estable, de gran actividad, sin riesgos mayores que los que tiene el plasma fresco y desde luego, sin el inconveniente de la antigenicidad de los productos de origen animal.

Además de estas ventajas, se han logrado buenos resultados con crioprecipitados preparados de la sangre, que en los bancos de sangre se deshechan después de 21 días de almacenamiento (25) y lo mismo se puede preparar de plasmas con A.C.D. que de plasmas con C.R.D. anticoagulante éste último, que probablemente se use ampliamente en el futuro por las ventajas que presenta (26).

En el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del I.M.S.S. inicia se la obtención del mencionado concentrado por el método de Pool y Shannon de crioprecipitación -- por descongelación lenta, como se describirá mas adelante y -- hemos considerado fundamental conocer la concentración de G.A.H. y de algunos otros elementos, con el fin de estandarizarlos y poder darles una aplicación clínica adecuada.

Desde el punto de vista práctico consideramos como mas importante, estudiar el concentrado de G.A.H. fibrinógeno, -- proteínas totales y el pH ya que de acuerdo con los estudios de los mismos autores del procedimiento (27) . la concentra--

ción de otros elementos de la coagulación es relativamente pequeña y además las deficiencias de los mismos son raras y generalmente responden a la administración de plasma -- fresco (26).

Solamente para el caso de la hemofilia B (por carencia del Factor IX), se ha obtenido un concentrado de éste factor, contaminado con otros elementos (Protrombina y Factores VII y X) pero este concentrado tiene una aplicación menos extensa y no ha sido preparado en nuestro medio. (29, 30).

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 45 crioprecipitados de globulinas anti-hemofílica, obtenidos de plasma fresco de donadores normales de ambos sexos, de los cuales 28 fueron de tipo "O", 11 de tipo "B" y 6 de grupo "A".

La técnica usada para la separación de los concentrados fué la descrita por Pool y Shannon (23) y que consiste en lo siguiente: una vez realizada la sangría en bolsa de doble de plástico, (ental J.D. 24), se hace la separación del plasma en una centrífuga refrigerada, durante 20 min. a 3000 r.p.m.

El plasma se pasa a la bolsa satélite y se congela a menos 70°C en una mezcla de hielo seco y acetona proceso que requiere de 10 a 15 min. Si se desea, la bolsa con el plasma congelado se separa de la que contiene los glóbulos rojos, la cual se almacena a 4°C para administrarse como suspensión concentrada de eritrocitos; o si no, se conservan unidas y una vez lograda la descongelación del plasma a 4°C, se centrifugan ambas 24 hs después, (-) el plasma sobrenadante se regresa al paquete de glóbulos y el crioprecipitado quedará aislado en la bolsa satélite. La sangre se administrará entonces como sangre total, sobre en G.A.H. y el crioprecipitado se almacena a menos 30°C.

(*) Recientemente se ha reportado una modificación al método de Pool y Shannon que consiste fundamentalmente en des-

congelación rápida del plasma en un baño de agua a una temperatura de 6 a 8°C ; ésta descongelación rápida se logra mediante la congelación del plasma en una bolsa de plástico de 600 ml. de capacidad, comprimida entre dos hojas metálicas - de modo que el plasma forma una copa delgada. En esta forma, la descongelación se logra en 90 minutos. (31).

En nuestro estudio, algunos de los criorrecitados se reconstituyeron con 10 ml. de solución salina 0.85% ; en otros el líquido diluyente fué el propio plasma y unos y otros se fraccionaron en 10 tubos, de 1 mililitro en cada uno, conservándose 5, a menos 30°C y los otros 5 a 4°C. Del plasma sobrenadante se prepararon otros 5 tubos en la misma forma y se congelaron a menos 30°C hasta el momento de iniciar los estudios correspondientes, que consisten en ensayo de factor VIII por el método de Biggs, Kaveling y Richards (32) modificado: determinación cuantitativa de fibrinógeno por la técnica de Knutson y Calvin Menzie (34) ; dosificación del contenido de proteínas totales por el método de Siuret y determinación del pH en potenciómetro Beckman Zero Satic.

TÉCNICAS

ANÁLISIS DE G.A.H.

REACTIVOS:

- 1)- Diluciones variables del concentrado y del plasma pobre en G.A.H en estudio . - absorbido con sulfato de bario para eliminar la presencia de protrombina y Factores VII, IX y X.
- 2)- Cefalina 1:200 (Bell y Alton) (35) como fuente de factor plaquetario.
- 3)- Suero humano envejecido, diluido 1:10 .

Este reactivo proporciona en forma óptima el Factor X.

4)- Suero bovino diluido 1:160 como fuente de --
Factor V.

Todas estas diluciones fueron hechas en Buffer de Imidazol-
con pH 7.25.

5)- Solución de cloruro de calcio 0.025M.

6)- Plasma humano normal, citratado, como sustra-
to.

En todos los casos se tomó como testigo un pool de plasma-
normal absorbido.

El fundamento de la prueba es mezclar in vitro todos-
los elementos que intervienen en la formación del activa -
dor de la protrombina, en forma constante y óptima, de mo-
do que las diluciones del Factor VIII, tanto en el testigo
como en el problema, representan la única variante, que es
la que se trata de medir.

La mezcla de generación se hace en baño maría a --
37°C y consiste en la adición en un tubo de 12X75 mm. de -
reactivos 1, 2, 3, y 4 y a la hora 0, se agrega 0.5ml. del-
reactivo 5 ; en este momento se pone en marcha un cronóme-
tro , después de tiempos variables de incubación (5,10,15-
y 20 minutos), se toman 0.2ml. de dicha mezcla, se añaden-
a un tubo que contiene 0.1ml del reactivo 6 y se pone en -
marcha otro cronómetro para medir el tiempo en que se pro-

duce la coagulación. Los tiempos ópticos para hacer una gráfica están entre 20 y 30 segundos.

Por abajo de 15 segundos, se solena la curva y los tiempos mayores de 40 segundos acercan la concentración de factor VIII a cero.

Los resultados se registran en papel logarítmico 2X2-ciclos y se obtiene una línea recta tanto para el testigo como para el problema. Se unen ambas líneas y el punto de intersección representa el nivel de G.A.H al aplicar la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Nivel obtenido en el problema}}{100\% \text{ (testigo)}} \times 100$$

Ejemplo:

$$\frac{10}{100} \times 100 = 10\%$$

Cuando se estudian concentrados como en nuestro caso, la fórmula queda invertida, por lo que el crioprecipitado tiene una actividad mayor que la del control (100%).

Ejemplo:

$$\frac{100}{10} \times 100 = 1000\%$$

ANÁLISIS DE FIBRINÓGENO.

REACTIVOS:

- 1)- Solución de cese al 10%
- 2)- Solución de carbonato de sodio al 20%
- 3)- Reactivo de Folin Ciocalteu

TÉCNICA:

- 1.- En un tubo de ensayo de 20 ml de capacidad se ponen:
 - a)- Aproximadamente 0.5 ml. de vidrio molido
 - b)- 10 ml. de solución salina al 0.85%
 - c)- 0.5 ml. del plasma o crioprecipitado
 - d)- 0.5 ml. de solución de Trombina para que se inicie el proceso de coagulación del fibrinógeno.
- 2.- Se agita el tubo con movimiento constante de rotación, para que toda la fibrina se adhiera al vidrio molido. (hasta que se observe el máximo volumen del coagulo formado).
- 3.- Se centrifuga el tubo que contiene el coagulo de fibrina durante 5 minutos a 2000 r.p.m.
- 4.- Se decanta el líquido sobrenadante.
- 5.- Se agregan 10 ml. de cloruro de sodio al coagulo de fibrina, se centrifuga y decanta repitiéndose esta operación tres veces.
- 6.- Se digiere la fibrina, agregándole solución de cese al 10% 1 ml. al tubo que la contiene.
- 7.- Se calienta el tubo en baño de agua hirviendo por 10 min.

8.- Se enfría el tubo y se le agregan 7 ml. de agua destilada, y 3 ml. de la solución al 20% de carbonato de sodio y -- 1 ml. de reactivo de Folin Ciocalteu. Se deja reposar durante 10 min. para obtener el óptimo desarrollo de color.

9.- Se toma 1 ml. de este líquido, se coloca en un tubo de 13X 100 mm y se le agregan 2 ml. de agua. El "Blanco" se prepara en la misma forma, es decir con todos los reactivos mencionados excepto el plasma.

10.- Se lee la intensidad de color contra el "Blanco", a 550 m μ (Espectrofotómetro Coleman).

MODIFICACIÓN EN REACTIVOS UTILIZADOS.-

Fundamento: debido a la presencia de la unión peptídica se produce un color violeta en presencia de iones cúpricos en medio alcalino, esta reacción se denomina del Biuret debido a que se demostró originalmente con la sustancia biuret obtenida por calentamiento de la urea.

REACTIVOS:

- 1)- Solución de cloruro de sodio al 0.85%.
- 2)- reactivo de Biuret.

TÉCNICA:

a.- En un tubo de ensayo se ponen 2.5 ml. de solución de cloruro de sodio al 0.85% y 0.5 ml. del problema. Se mezcla perfectamente.

b.- En un tubo de ensayo se ponen 2 ml. de la mezcla anterior.

- c.- In otro tubo que servirá de blanco se ponen 2ml. de solución de cloruro de sodio al 0,85%.
- d.- A cada tubo se le agregan 8 ml. de reactivo de - Biuret y se mezclan por inversión.
- e.- Se ponen los tubos en Baño María a 25°C durante - media hora.
- f.- Se lee la intensidad de color contra el "Blanco" a 540 m μ (Espectrofotómetro Coleman).

Medida de pH:

se determinó el pH en el aparato de Beckman Zeronatic pH meter.

RESULTADOS

La concentración de G.A.H encontrada en los crioprecipitados conservados a menos 30°C y preparados de plasmas de tipo "O", presentó variaciones entre 178.5 por ciento y 1923 por ciento. En los de tipo "A", la concentración de Factor VIII osciló entre 400 y 2409 por ciento y en los de tipo "B", las concentraciones extremas fueron de 400 a 2500 por ciento. Las concentraciones del factor VIII, según el tipo sanguíneo, están expresados en la tabla 1 en ella se observa que los promedios respectivos fueron: el de tipo "O" 769 por ciento; el de tipo "A" 1096 por ciento y el de tipo "B" 1237 por ciento. El promedio global para todos los crioprecipitados conservados a menos 30°C fue de 1034 por ciento.

Como se mencionó previamente, se conservaron muestras de los crioprecipitados a 4°C con el objeto de conocer la estabilidad del producto a esa temperatura y los resultados fueron los siguientes: las concentraciones de factor VIII en los crioprecipitados "O" variaron entre 297 a 1923 por ciento, con un promedio de 753 por ciento; en los de tipo "A" se encontraron valores de 322 a 1562 por ciento con una cifra promedio de 727 por ciento y en los de tipo "B", la actividad encontrada fue de 217 a 1639 por ciento con una media de 927 por ciento. Considerando en conjunto a todos los crioprecipitados que permanecieron a 4°C, el promedio de concentra --

ción fué de 802 por ciento.

En el plasma sobrenadante, una vez separado el producto en estudio, queda una concentración muy pequeña de Globulina Antihemofílica, ya que esta dió cifras entre 4.3 y 77 por ciento con valor medio de 13.7 por ciento, en los plasmas-pobres en G.A.H. de los crioprecipitados de tipo "O". En los de tipo "A", las variaciones fueron entre 7 y 32.5 por ciento (14.3% de promedio) y en los de tipo "B", las concentraciones estuvieron entre 4.6 por ciento y 40 por ciento (promedio 12.9%).

Concentrados	-30°C	4°C	Plasma sobrenadante
"O"	769%	753%	13.7%
"A"	1096%	727%	14.3%
"B"	1237%	927%	12.9%
Promedio global	1034%	802%	13.6%

Tabla 1.- Concentración de G.A.H. en crioprecipitados y en plasma sobrenadante.

Comparando los niveles promedio de G.A.H. en los productos que permanecieron a temperatura de congelación y los

obtenidos a 4°C se encontró que la pérdida de actividad es de 2 por ciento para los crioprecipitados de tipo "O" y que esta pérdida es mayor para los de tipo "A" y "B" (33.6% y 25% respectivamente), con una disminución de 20.2 por ciento considerando en conjunto los tres tipos sanguíneos.

Estos datos pueden observarse en la tabla 2.

Concentrados	Pérdida de actividad a 4°C
"O"	2%
"A"	33.6%
"B"	25%
Promedio global de actividad de G.A.H	20.2%

Tabla 2.- Promedio de pérdida de actividad de G.A.H en crioprecipitados conservados a 4°C.

En la tabla 3 se agrupan los crioprecipitados de acuerdo con la actividad de G.A.H encontrada en los estudios de laboratorio. En 21 de los 45 concentrados estudiados, es decir 57.7 por ciento, se encontró una concentración de 100 a 800 por ciento.

En 7 de ellos (15.5%), se encontró una actividad que -
varió de 801 a 1400 por ciento.

En 10 (22.2%), la actividad encontrada fue de 1500 a -
2500 por ciento. Solamente 2 crioprecipitados tuvieron entre -
200 y 300 por ciento.

Grupos de concentración de S.A.H	Crioprecipitados a - 30°C	Crioprecipitados a 4°C
200, %	1	----
201 - 300, %	1	2
301 - 400, %	6	11
401 - 500, %	3	5
501 - 600, %	5	1
601 - 700, %	7	6
701 - 800, %	5	4
801 - 900, %	1	1
901 - 1000, %	2	3
1001- 1100, %	1	---
1101- 1200, %	1	1
1201- 1300, %	1	1
1301- 1400, %	1	3
1401- 1500, %	---	1
1501- 1600, %	3	4
1601- 1700, %	2	1
1701- 1800, %	1	---
1900- 2000, %	1	1
2400- 2500, %	3	---

Tabla 3.- Grupos de crioprecipitados de acuerdo con la concen-
tración de S.A.H encontrada.

Con el objeto de averiguar la estabilidad de los crioprecipitados a 4°C y la pérdida de actividad que esto pudiera representar, se estudiaron a tiempos variables de almacenamiento después de su preparación y así puede verse en la tabla 4 que el tiempo de permanencia a esa temperatura varió desde 1 - 2 días hasta 7 meses y aparentemente la pérdida de actividad no puede relacionarse directamente con esta situación ya que de los 45 crioprecipitados estudiados solo en 21 (46.6%) se encuentra disminución de actividad y en los 24 restantes el nivel encontrado inicialmente en la muestra a menos 30°C .

De los 45 crioprecipitados, 10 de ellos (22.2%) estuvieron almacenados a 4°C entre 20 días y 7 meses; los 35 restantes (77.8%) fueron estudiados menos de 10 días después de su preparación.

Días de almacenamiento	CRIOPRECIPITADOS "0"	
	Concentración de G.A.H	
	-30°C	4°C
1 - 2	1120	1120
	1351	1351
	737	657
	454	646
	425	769

	1613 ²	1388
	1923	1923
3 - 4	316	325
	555	648
	526	454
	666	454
5 - 6	363	322
	1288	1288
	952	909
7 - 9	312	370
	322	363
	1515	1515
14- 16	769.3	869.5
	769.3	689.7
	178.5	297
20- 30	793	645
	606	310
	588.1	719.4
90	617	639
	787	657
180	925	333
	275	400
210	606	769

GRUPAS CIPITANOS "A"

Días de almacenamiento	Concentración de G.A.H.	
	-30°C	4°C
3 - 4	1075	900
7 - 9	2409	922
14- 16	1750	1562
17- 18	416	469
20- 30	529	529
	400	500

GRUPAS CIPITANOS "B"

1 - 2	640	1538
	545	952
7 - 9	400	434
	1600	1425
	2500	1639
	625	363
10- 11	1623	1798
	699	333
	1538	1538
17- 18	609	322
20- 30	2500	217

Tabla 4.- Concentraciones de G.A.H. a menos 30°C y a 4°C después de tiempos variables a partir de su preparación.

Los productos obtenidos, como era de esperarse, debido a la unión tan firme que existe entre los factores I y VIII, son ricos en fibrinógeno cuya concentración presentó cifras entre 463 mg. por ciento y 2340 mg. por ciento en los crioprecipitados de tipo "C" conservados a menos 30°C, con un valor promedio de 1113 mg. por ciento. Para los que se conservaron a -4°C, las cifras variaron entre 456 mg. por ciento y 2340 mg. por ciento (promedio 1023 mg. por ciento). La cantidad menor de fibrinógeno encontrada en el plasma sobrenadante fue de 108 mg. por ciento y la mayor de 333 mg. por ciento, con una cifra media de 399 mg. por ciento.

En los concentrados de tipo "A" las cifras variaron entre 833 mg. por ciento y 2340 mg. por ciento para los que permanecieron almacenados a menos 30°C y su promedio fue de 1276 mg. por ciento. Cuando se estudió el contenido de factor I en los que se almacenaron a 4°C, se encontró que el fibrinógeno estaba entre 772 mg. por ciento y 2340 mg. por ciento y que la media fue de 1196 mg. por ciento. En el plasma sobrenadante de estos crioprecipitados, la cifra promedio fue de 210 mg. por ciento y sus variaciones fueron de 77.2 mg. por ciento y 456 mg. por ciento.

En los 11 concentrados de tipo "B", la determinación de fibrinógeno arrojó los siguientes resultados: cuando se conservaron a temperatura de menos 30°C, las cifras variaron entre 798 mg. por ciento y 2340 mg. por ciento, con un contenido

promedio de 1030 mg. por ciento, las muestras conservadas en el refrigerador (4°C). presentaron rangos de concentración variable entre 570.3 mg. por ciento y 2240 mg. por ciento. Para el plasma sobrenadante, la cifra mínima de fibrinógeno fue de 54.6 mg. por ciento y la máxima fue de 868 mg. por ciento, dando un promedio de 369.6 mg. por ciento.

Considerando en conjunto todos los crioprecipitados conservados a menos 30°C. estos dieron un promedio global de 1339 mg. por ciento de fibrinógeno y ese promedio fue de 1280 mg. por ciento para las que pertenecieron a la temperatura del refrigerador. El contenido promedio en los plasmas sobrenadantes fue de 342 mg. por ciento.

Estos datos se han concentrado en la tabla 5 y concuerdan con los referencias a la concentración de G.A.H en que las cifras mayores corresponden a los crioprecipitados de tipo "B", siguiéndole los de tipo "A" y finalmente los de tipo "O".

Concentrados	-30°C	4°C	Plasma sobrenadante
"O"	1111 mg%	1093 mg%	599 mg%
"A"	1276 mg%	1196 mg%	210 mg%
"B"	1630 mg %	1551 mg%	389 mg%

Promedio global	1339mg%	1280mg%	322mg%
-----------------	---------	---------	--------

Table 5.- Promedios de concentración de Fibrinógeno en Crioprecipitados conservados a -30°C . a 4°C y en plasma sobrenadante.

En la tabla 6, se observan los resultados promedio en lo referente a contenido de proteínas totales, las cuales varían de 3.56 g. por ciento a 4.18 g. por ciento, con diferencias poco apreciables en las cifras correspondientes a las temperaturas estudiadas. En el plasma sobrenadante los valores oscilan entre 6.01 a 6.68g. por ciento.

Concentrados	-30°C	4°C	Plasma sobrenadante
"O"	3.56 g.%	3.54 g.%	6.01 g.%
"A"	3.91 g.%	3.66 g.%	6.38 g.%
"B"	4.09 g.%	4.18 g.%	6.68 g.%

Table 6.- Contenido promedio de proteínas totales en Crioprecipitados.

En la tabla 7, están resumidos los datos de las cifras de pH encontrados en los diferentes concentrados y a diferen-

tes temperaturas, observándose que este parámetro se mantiene entre 7.3 y 7.4 en los crioprecipitados conservados a menos -30°C y es de 7.5 a 7.6 en los que se mantuvieron a 4°C. En el plasma sobrenadante el pH fue de 7.1.

Concentrados	-30°C	4°C	Plasma sobrenadante
"C"	7.43	7.52	7.15
"A"	7.37	7.60	7.14
"B"	7.35	7.60	7.15

Tabla 7.- Cifras promedio de pH en los Crioprecipitados.

En 23 plasmas congelados se investigó igualmente el pH y se encontró que este presentó variaciones de 6.95 a 7.2 , - con un promedio de 7.06. Este dato es interesante ya que la Dra J. G. Pool demostró que la mayor o menor producción de -- C.A.H está en relación con el pH; si éste es bajo, la producción es menor, siendo óptima entre 6.8 y 8.0.

COMENTARIOS

Al analizar los resultados obtenidos al estudiar los --
crioprecipitados encontramos que su actividad, en relación con
la G.A.H se encontró elevada en todos los casos, tomando como
base la mezcla de plasmas que fue considerada como 100 por --
ciento. Las cifras promedio para aquellos conservados a menos-
30°C fue por lo menos 10 veces superior a la normal y para los
que se conservaron a 4°C fue 3 veces superior.

aún en un caso en el que aparentemente quedó una canti-
dad importante de G.A.H en el plasma sobrenadante (77%) se en-
contró una buena actividad en el crioprecipitado (277%) o sea-
2.7 veces mayor que el testigo normal.

Es conveniente hacer notar que nuestros datos son con-
gruentes con gran número de estudios practicados con anteriori-
dad para apreciar la riqueza de G.A.H en los crioprecipitados-
(23, 39, 40). Por otro lado, en relación con la cantidad de --
G.A.H cosechada de los plasmas de los cuales se obtiene el pre-
cipitado, en esos mismos estudios (23, 39, 40) se ha visto que
ha variado entre 52 por ciento a 96 por ciento; en nuestros --
concentrados no buscamos esta relación ya que nuestra primera-
intención fue simplemente el apreciar la magnitud de su activi

dad.

En relación con la pérdida de actividad en los crio-precipitados de tipo "O" conservados a 4°C la cual resultó ser de 2 por ciento ello sería sugestivo de que el factor VIII obtenido de tal plasma es más estable que el de otros grupos sanguíneos. no podemos afirmar que esto sea exacto ya que los procedimientos para fosificación de este producto puede tener variaciones atribuibles a la técnica, a la persona que lo realiza y al donador del plasma (40), independientemente de que el número de muestras que se estudiaron puede no ser suficiente para considerarlo así.

Es interesante observar que los crio-precipitados de tipo "B" demostraron tener una concentración mayor de G.A.H., a diferencia de lo reportado por algunos autores (41), quienes han encontrado mayor actividad en los plasmas y concentrados de tipo "A".

En relación con el remanente de G.A.H. en el plasma restante después de la crio-precipitación nuestros resultados son semejantes a los de otros autores (39).

Acerca de el decaimiento de concentración de G.A.H. en concentrados conservados a 4°C no podemos tener conclusiones definitivas en vista de que solo en 7 de los 45 concentrados se observó una disminución notable de su actividad y en 24 la concentración resultó igual o un poco mayor.

Es muy probable que existan varias explicaciones para -

estos resultados; por lo pronto, solo podemos surones que --
 aparentemente el envejecimiento afecta poco la concentración
 de D.A.H tanto a 4°C como probablemente menos 30°C; el de--
 cimiento importante en un número limitado de ellos, puede --
 deberse a varias causas;

- a) Variaciones en la técnica de dosificación y --
 probablemente a error en las mismas.
- b) Alteraciones de la proteína por manipulación
 y....
- c) Labilidad individual de la proteína atribuible
 a alteraciones de su síntesis normal. (42).
- d) presencia en la muestra de crioprecipitado de
 sustancias capaces de dar lugar a alteracion--
 es de la D.A.H por ejemplo: producción de fi--
 brina en cantidades mínimas que pueden dar lu--
 gar a un consumo de Factor VIII.

Una observación importante hecha en este trabajo, es--
 que al conservar los crioprecipitados a 4°C por lo menos en
 el lapso de estudio (20 días a 3 meses) la actividad del --
 factor VIII se conserva adecuadamente. Esto tiene la utili --
 dad práctica de que facilite su manipulación, por ejemplo --
 para poder enviarlos de un lugar a otro, ya que probablenmen--
 te si se empacan en un recipiente aislante que los mantenga--
 a una temperatura de aproximadamente 4°C, puede conservarse--
 su actividad y hacer útil su aplicación en pacientes ubica--

dos en sitios distantes al laboratorio de producción.

En relación con el fibrinógeno, resulta notable la pérdida mínima de actividad en los crioprecipitados conservados a 4°C que fué de 4.4 por ciento ósto es sugestivo de que la buena estabilidad de la O.A.H. en los crioprecipitados conservados a 4°C - puede guardar alguna relación con la del fibrinógeno.

Cada unidad de crioprecipitado contiene aproximadamente - 200 mg. por ciento de fibrinógeno ya que el volumen aproximado de cada una de ellas es de 20ml.

La cantidad total de proteínas encontrada en los crioprecipitados es de aproximadamente 0.3 g. por unidad. Esto es interesante ya que se suministra a razón de una unidad por cada 10 kilogramos de peso corporal cuando se emplea en el tratamiento de los pacientes; en esta forma desde el punto de vista del poder oncótico de las proteínas la cantidad suministrada en un tratamiento, frecuentemente no es mayor a la que se suministra cuando se emplea plasma total.

La determinación de pH es también muy importante, ya que el producto en cuestión al ser empleado en terapéutica, puede tener influencia en el equilibrio ácido básico de los pacientes.

Por ese motivo se determinó este, y el rango de variación que se encontró, tanto en los crioprecipitados conservados a menos 30°C como en los conservados a 4°C es bastante aceptable.

Además la determinación del pH en los plasmas originales obtenidos de sangre recién extraída se encontró semejante a lo -

que ha sido reportado en muestras de sangre similares (43); esto como se mencionó en la sección de resultados, es importante porque las investigaciones de la Dra. Pool el pH óptimo del plasma empleado para obtener crioprecipitados ricos en -- G.C.H. varía entre 6.0 y 6.5; lo cual significa que por lo menos en la sangre extraída empleando como anticoagulante A.C.D fórmula A como la que contienen los equipos empleados en este estudio, se cuenta con un pH adecuado para la extracción de -- crioprecipitados ricos en factor VIII.

Como corolario podemos decir que para su administración los concentrados de Globulina Antihemofílica, deben cumplir, tomando en cuenta que es una solución inyectable, con los requisitos que estos productos demandan y que son los siguientes:

- 1).- Volumen, adecuado.
- 2).- pH.
- 3).- Identificación de los principios activos y pruebas de su potencia.
- 4).- Esterilidad.
- 5).- Prueba de pirógenos.
- 6).- Prueba de toxicidad o inocuidad.

Volumen.- Deben administrarse volúmenes mínimos que no causen trastornos circulatorios (Hipervolemia) a los dosis adecuadas. La dosis empleada por el médico es siempre determinada para cada paciente. El volumen de los crioprecipitados -- es mínimo (20 ml.) , lo que ha sido determinante para no pro -

ducir hipervolemia.

PH.- Cercano al normal y que con las cantidades administradas la reserva alcalina del organismo pueda estabilizarlo--- sin ocasionar trastornos, requisito que se llena satisfactoriamente en nuestro producto.

Identificación de los principios activos.- Se identificó la existencia de la substancia fundamental de este producto que es el factor VIII (G.L.H) por el método de generación de Frop boplastina de Biggs y Douglas modificada, que resultó adecuada; además, se identificó y cuantificó la existencia de fibrinógeno substancia secundaria de este producto por medio de la técnica de Ratnoff.

Prueba de esterilidad y de pirógenos.-Considerando que - el sistema en que se elabora este producto es cerrado y de antemano estéril y libre de pirógenos, el concentrado de Globulina antihemofílica no fué sometido a estas pruebas.

Prueba de toxicidad o inocuidad.- Hasta cierto punto fue ra del riesgo conocido de transmisión de enfermedades por medio de la transfusión sanguínea este producto es inocuo. Debe tenerse la precaución de transfundirlo de acuerdo con el grupo sanguíneo AB0, ya que se ha comprobado que algunas personas presentan reacciones indeseables, cuando se les administran concentrados de globulina antihemofílica de grupos diferentes (36,37).

RESUMEN

1.- Se obtuvieron concentrados de G.A.H a partir de sangre humana, por el método de Pool y Shannon, con el fin de -- conocer las características del producto.

2.- Se estudiaron 45 concentrados, de los cuales 28 fueron de tipo "C", 6 de tipo "A" y 11 de tipo "B".

3.- Los concentrados de G.A.H se fraccionaron en 10 tubos de 1 ml. cada uno almacenándose 5 a menos 30°C y 5 a 4°C, fraccionándose también el plasma sobrenadante en 5 tubos de un mililitro cada uno que se almacenaron a menos 30°C.

4.- Se les hizo la identificación de G.A.H (Factor VIII) por la técnica de generación de Trombolitina de Biggs y Douglas modificada; identificación de fibrinógeno por el método de -- rnatoff; identificación de Proteínas totales por la técnica de -- biuret; y determinación de pH en potenciómetro Beckman Zeromatic.

Se encontró un promedio de G.A.H para los concentrados -- de grupos "A", "B" y "C" almacenados a menos 30°C, de 1096 -- por ciento, 1237 por ciento y 769 por ciento, respectivamente.

En los concentrados de grupos "A", "B" y "C" conservados a 4°C, el promedio fue de 727 por ciento, 927 por ciento y 753 por ciento respectivamente.

4.- En los plasmas remanentes después de la obtención de los crioprecipitados, la concentración de G.A.H en cifras prome

tio, fue de 14.2 por ciento, 12.9 por ciento y 13.7 por ciento, respectivamente, para los de tipo A, B y C.

5.- Hubo una pérdida de actividad relativamente pequeña - en los concentrados de L.A.H almacenados a 4°C con respecto a los que se almacenaron a menos 30°C y fue, para los de grupo "A" 13.6 por ciento, para los de grupo "B" 25 por ciento y para los de grupo "C" 2 por ciento.

6.- Con respecto al fibrinógeno, las cifras promedio encontradas para los concentrados de grupos "A", "B" y "C" fueron de 1276 mg. por ciento, 1470 mg. por ciento y 1,111 mg por ciento, respectivamente.

En el plasma remanente de los grupos "A", "B" y "C" se encontraron cifras promedio de fibrinógeno de 210 mg. por ciento, 309.6 mg. por ciento y 399 mg. por ciento, respectivamente.

7.- En cuanto a las proteínas totales las cifras promedio para los concentrados de L.A.H de grupos "A", "B" y "C" conservados a menos 30°C fueron de 3.91 g. por ciento, 4.18 g. por ciento y 3.50 g. por ciento, respectivamente.

Para los concentrados de grupos "A", "B" y "C" conservados a 4°C el promedio fue de 3.66 g. por ciento, 4.18 g. por ciento y 3.54 g. por ciento, respectivamente.

Los plasmas remanentes de los concentrados de grupos "A", "B" y "C" arrojaron un promedio de proteínas de 6.68 g. por ciento, 6.68 g. por ciento y 6.01 g. por ciento, respectivamente.

8.- En lo que respecta al pH las cifras promedio para los-

concentrados de G.A.H de grupos "A", "B" y "O" conservados a menos 30°C tuvieron un promedio de 7.37 , 7.35 y 7.43, respectiva-
mente.

Los concentrados conservados a 4°C de grupos "A", "B" y -
"O" tuvieron un promedio de 7.60 , 7.60 y 7.52, respectivamente.

Los plasma remanentes de los concentrados de G.A.H de --
grupos "A", "B" y "O" dieron un promedio de 7.14, 7.15 y 7.15 --
respectivamente.

9.- se encontró que el envejecimiento afecta poco la con-
centración de G.A.H tanto a 4°C como a menos 30°C y que el fi-
brinógeno también se conserva debidamente, por lo que se supone-
que la estabilidad en la G.A.H en los crioprecipitados puede te-
ner alguna relación con el fibrinógeno.

10.- respecto a las proteínas totales se encontró que los
concentrados de globulina antihemofílica tiene una cantidad míni-
ma de estas, lo que puede ser ventajoso desde el punto de vista-
clínico ya que en aplicaciones sucesivas de concentrados, no se-
corre ningún riesgo si se toma en cuenta que la cantidad de pro-
teínas totales suministradas en un tratamiento no es mayor a la-
que se suministra cuando se emplea plasma total.

11.- El pH en las muestras de plasma original es un prome-
dio 7.06 el cual está dentro del rango de 6.8 a 8.0 que ha sido-
considerado como óptimo para la obtención de crioprecipitados de
G.A.H.

Bibliografía

- 1.- Hessel H.L., H.K. Archer, H.G. Macferlane; Equine haemophilia: report of a case and its response to multiple infusions of heterospecific A.H.G.
Brit. J. Haemat. 3: 335 (1962).
- 2.- Field H.W., C.T. Richard F.B. Hutt; Hemophilia in a family of dogs.
Cornel Vet. 36: 285 (1964).
- 3.- Didisheim P., Sauting D.L.; Hemophilia canine.
Thromb. et Diat. haem. 12: 337-81 (1964).
- 4.- Kersley C.; The occurrence of hemophilia in the human female.
Quart. J. Med. N.S. 20: 299. (1951).
- 5.- Sampson, J.I. M.J. Patch y F.J Moore; The anti-hemophilic globulin in plasma.
Calif. Med. 93: 203. (1960).
- 6.- Herbert A., Perkins, M.R. Roles., D.J. Acra.; The stability of factor VIII (Antihemophilic Globulin) in fresh-frozen blood Bank Plasma.
Transfusion. 2: 313. (1962).
- 7.- C.L. Henkey, H.S. Ansell., M.H. Rasmussen.; A study of comparative antihemophilic factor levels in fresh-frozen plasma in vitro and in vivo.
Transfusion 2: 94. (1962).
- 8.- Dorantes M.S., Perez C., B. de F. Inés., Soto Refuel; Variación en el nivel de Globulina Antihemofílica en 7 pacientes con Pseudohemofilia.

- Memories VI Jornada anual de la A.S.H.A., page 19-26. (1965).
- 9.- Patek and Taylor: Haemophilia II. Some properties of a substance obtained from normal human plasma effective in accelerating the coagulation of haemophilic blood.
J. Clin. Inv. 16: 113. (1937).
- 10.-Macfarlane, R.G., Biggs R., Bidwell, S.: Bovine antihaemophilic globulin in the treatment of haemophilia.
Lancet 1. 1316.
- 11.-Kockwick A.A. and Wolf P.: A concentrate of human antihaemophilic factor, its use in six cases of haemophilia.
Lancet 1, 647, (1957).
- 12.-Blomback, H. Nilsson, I.B.: Note on the purification of human antihemophilic globulin.
Acta Med. Scand. 12: 1678, (1958).
- 13.-Sollier J.P.: Separation du fibrinogène du facteur antihémophilique A II à l'aide de Bentonite.
Path. Biol. 7: 2451. (1959).
- 14.-Greveld G. Van et al: The separation of A.H.F from fibrinogen II.
Thrombos. Diatnes. Haemorr. (Stuttg) 4: 211. (1960).
- 15.-Langstaff, R.C., G.H. Wagner, J. M.H. Brinkman.: Effect of antihemophilic factor on one stage clotting test.
J. Lab. Clin. Med. 41: 487, (1953).
- 16.-Kockwick, A.A., G.S. Leckey et al: The purification of human fibrinogen.
Biochem. J. 40: 571. (1955).

- 17.-Sironetti, C., G. Casillas., A. Pavlovsky; Purification du facteur VIII antihemophilique (F.VIII).
Hemostasie I: 57, (1961).
- 18.-Cohn, K.J., L.B. Strong et al; Preparation and properties of serum and plasma proteins. VI. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.
J. Am. Chem. Soc. 68: 459, (1946).
- 19.-Sidwell, E. ; The purification of bovine antihemophilic globulin.
Brit. J. Haemat. I: 35, (1955).
- 20.-Blomback, B., M Blomback ; Purification of human and bovine fibrinogen.
Ark. Keml. I: 415, (1954).
- 21.-H. Jagner., Robert, F.D. Mc Lester., M. Smith and K.W. -- Brinkous; Purification of antihemophilic factor (Factor - VIII) by aminoacid precipitation.
Throm. Diath. Haemorr. (Stutt) II: 64, (1964).
- 22.-Pool, J.G., Hershgold , E.J. and Pappenhagen A.R.; High-potency antihemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate.
Nature, (London) 203: 312, (1964).
- 23.-Pool and Shannons; Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system; assay in vitro and in vivo.
New. Eng. J. Med: 273: 1443-7, (1965).

- 24.-Pool J.G. and Robinson J.: Observation on plasma banking-
and transfusion procedures for hemophilic patients using-
quantitative assay for antihemophilic globulin.(A.H.F).
Brith, J. Haemat. 5: 24. (1959).
- 25.-Jesner R.A., Gabriel D.A., Langdell R.D.: Concentrated An-
tithemophilic Factor (A.H.F) from outdated blood.
Transfusion 7 168. May-Jun (1967).
- 26.-Judith Graham Pool: The effect of several variables on --
cryoprecipitated Factor VIII.(A.H.G) concentrates.
Transfusion 7: 165. May-Jun (1967).
- 27.-Biggs R. and Macfarlane R.G.: Treatment of haemophilia --
and other coagulation disorders.
F.A Davis Co. Phil. (1966).
- 28.-Didisheim P., Soulier J.P.: Preparation of a human plasma-
fraction rich in Prothrombin, proconvertin, Stuart-factor
and P.F.C and a study of its activity and toxicity in re-
bits and men.
J. Lab. Clin. Med. 53 (2):322-30 Feb.(1959).
- 29.-Larriou H.J., Coen J. Soulier J.P., Bernard J.: Treatment
of haemophilia B with a plasma fraction rich in antihae-
mophilic B factor.
Path. Biol. (Paris) 7: 2507-13. Dec. (1959).
- 30.-Prou Martello O., Soulier J.P.: Fractions of human plas-
ma rich in factor IX (Antihemophilic Factor B).
Path Biol (Par.) 7: 244-505. Dec. (1959).

- 31.-Soulter J.P., Bietrix,C., Prou-Martelle O and Vignal A.
Preparation d'une fraction serique riche en Convertine-
(VII), facteur Stuart (X) et facteur antihemophilique B.
Nouv. Rev. Franc. Hemat. 2: 27. (1962).
- 32.-Biggs R., Bidwell E., Handley D.D., Macfarlane R.G., --
Trueta J., Elliot-Smith A., Dike G.V.R and Ash B.J.;The
preparation and assay of a Christmas-Factor (F IX) con-
centrate and its use in the treatment of two patients.
Brith. J. Haemat. 7: 149. (1961).
- 33.-Ethel Bidwell J.M., Booth J.W.R., Dike and K.W.F. Denson
The preparation for therapeutic use of a concentrate of
factors II, VII, and IX.
Britn. J. of Haemat. 13: 568-79. (1967).
- 34.-Brown D.L., Hardisty A.M., et al; Antihemophilic globu-
lin; preparation by an improved cryoprecipitation me--
thod and clinical use.
Brith. Med. J. 2: 79. (1967).
- 35.-Biggs R., Eveling J. and Richards G; The assay of anti-
hemophilic globulin activity.
Brith. J. Haemat. 1: 20. (1955).
- 36.-Kutnoff and Calvin Kenzie A.B., Baltimore M.D.; A new -
method for the determination of fibrinogen in small sam-
ples of plasma.
J. Lab. Clin. Med. 37: 316. (1951).
- 37.-Bell W.N. and Alton H.; A brain extract as a substitu-
te for platelets suspensions in the thromboelastin gene

ration test.

Nature London 174, 580, (1954).

38.-Osoi-Farrar: Antihemophilic Globulin.

The Dispensatory of the United States of America 85th Edition.
tion. pag 607, (1955).

39.-Bennett, E., Dormandy, E.M. et al: Cryoprecipitate and the
plastic blood-bag system: provision of adequate replacement
ment the key for routine treatment of haemophilia,
Brit. Med J. 2, 88-91, April (1967).

40.-Hattersley., Paul G.: The treatment of classical haemophil-
ia with cryoprecipitates.
Lancet. 1967, 243-7 Oct. (1966).

41.-A.J. Macfarlane and Rosemary Higgins: Thromboplastin Genera-
tion with particular reference to Haemophilia.

42.-Kerr, C.B.: Genetical Aspects of Carrier Detection in Haem-
philia; Proc 3rd Congr. 8114, held Knoxville, Tenn 1965
Sibl. Haemat., fasc. 26 fasc. 26, Knoxville Tenn (1966) pages
4-9

43.-Sucker J.P.: Genetic effect of blood transfusion,
Haematology 12, 27, pag 100, 1964 (1964).

44.-Scott Graham: The effect of severe haemophilia on
Cryoprecipitated Factor VIII, Haematology,
Transfusion 12, 1, 1967.