

52
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**EL PLASMA Y SUS DERIVADOS: METODOS DE
OBTENCION Y USOS TERAPEUTICOS**

T E S I S

que para obtener el titulo de:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

presentan:

**MARIA RODRIGUEZ LEON
CELIA RODRIGUEZ ORTIZ**

asesora:

Q. F. B. Idalia Avila Miyazawa



Cuautitlán, Izcalli,

Estado de México,

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

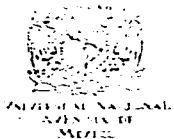


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION PROFESIONAL
DEPARTAMENTO DE EXAMENES Y PROFESIONALIDAD

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
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:
El plan a y sus derivadas : Métodos de Obtenido y una derivada

que presenta lo pasante: María Beatriz
con número de cuenta: 20100000 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Básica ; en colaboración con :
Celia Rodríguez Ortiz

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"
Cuautilian Izcalli, Edo. de Méx., a 21 de Setiembre de 1992

PRESIDENTE G.F.B. Ramón García Rodríguez

VOCAL G.F.B. Idalia Angila Mayana

SECRETARIO G.F.B. Antonio Sánchez López

PRIMERO SUPLENTE Ing. C. María M. Del Pilar Rodríguez

SEGUNDO SUPLENTE G.F.B. José Carlos Santos



FACULTAD DE ESTUDIOS INTERMEDIOS CUAUTITLÁN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBADOS



DR. JAIME FELLER TORRES
DIRECTOR DE LA F.E.I. CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.I. - C.

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

El plan y sus derivadas: El Plan de Ingeniería y sus derivadas

que presenta la pasante: Doña María Rodríguez
con número de cuenta: 80704375 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica : en colaboración con:
María Rodríguez

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"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 21 de Octubre de 1997

PRESIDENTE	<u>Dr. E. Ramón Centella Paz</u>	
VOCAL	<u>Dr. E. Idalia Avila Nizcora</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. E. Antonio Sánchez Ortega</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dr. E. Víctor M. Rodríguez Castro</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dr. E. René Carlos Castro</u>	

**NUESTRO AGRADECIMIENTO
A LA PROFESORA
IDALIA AVILA MIYAZAWA
POR SU ASESORIA
EN LA ELABORACION
DE ESTA TESIS**

MARIA

DEDICO ESTA TESIS A:

MIS PADRES

MIS HERMANOS

MIS AMIGAS

CELIA

AGRADEZCO A:

MIS PADRES

MIS HERMANOS

MIS AMIGAS

MIS PROFESORES

D I O S

POR HABERME BRINDADO LA OPORTUNIDAD DE TERMINAR ESTA TESIS *

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
OBJETIVOS	I
RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	V
CAPÍTULO I. GENERALIDADES	1
I.1. Antecedentes históricos	1
I.2. Plasma. Características generales	4
CAPÍTULO II. DONACIÓN SANGUÍNEA	12
II.1. Selección de donadores	13
II.2. Obtención de sangre del donador	15
II.2.1. Venipuntura	18
II.3. Pruebas de Laboratorio	19
II.3.1. Determinación de grupos sanguíneos ABO y Rh ...	19
II.3.2. Prueba serológica para el diagnóstico de hepatitis B	22
II.3.3. Hepatitis no-A, no-B	23
II.3.4. Sífilis	24
II.3.5. Brucelosis	25
II.3.6. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	25
CAPÍTULO III. PLASMAFÉRESIS	33
III.1. Selección de donadores en plasmaféresis	35
III.2. Procedimiento de plasmaféresis	36
III.2.1. Plasmaféresis manual	36
III.2.2. Plasmaféresis automatizada	39

III.3. Comparación entre plasmaféresis manual y automatizada	46
III.4. Reacciones adversas a la plasmaféresis	48
CAPÍTULO IV. FRACCIONAMIENTO DEL PLASMA	50
IV.1. Fraccionamiento por precipitación	52
IV.1.1. Precipitación con sulfato de amonio	52
IV.1.2. Precipitación con etanol	53
IV.1.3. Precipitación con rivanol	58
IV.1.4. Precipitación con polietilenglicol (PEG).....	59
IV.2. Fraccionamiento por filtración en gel	59
IV.3. Fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico	60
IV.4. Fraccionamiento por afinidad cromatográfica	61
CAPÍTULO V. OBTENCIÓN DE DERIVADOS DEL PLASMA DE USO TERAPÉUTICO	63
V.1. Crioprecipitado	64
V.2. Concentrado de factor VIII	68
V.3. Concentrado de complejo de factor IX	75
V.4. Concentrado de antitrombina III	81
V.5. Albúmina	88
V.6. Inmunoglobulinas	99
CAPÍTULO VI. USOS TERAPÉUTICOS Y REACCIONES ADVERSAS DEL PLASMA Y SUS DERIVADOS	107
VI.1. Plasma	108
VI.1.1. Usos terapéuticos	108
VI.1.2. Reacciones adversas	112

VI.2. Crioprecipitado	114
VI.2.1. Usos terapéuticos	115
VI.2.2. Reacciones adversas	116
VI.3. Concentrado de factor VIII	117
VI.3.1. Usos terapéuticos	118
VI.3.2. Reacciones adversas	120
VI.4. Concentrado de complejo de factor IX	122
VI.4.1. Usos terapéuticos	123
VI.4.2. Reacciones adversas	125
VI.5. Concentrado de antitrombina III (AT III)	131
VI.5.1. Usos terapéuticos	132
VI.5.2. Reacciones adversas	135
VI.6. Albúmina humana	136
VI.6.1. Usos terapéuticos	137
VI.6.2. Reacciones adversas	139
VI.7. Inmunoglobulinas	140
VI.7.1. Usos terapéuticos	140
VI.7.2. Reacciones adversas	148
BIBLIOGRAFÍA	149
ÍNDICE DE ABBREVIATURAS	163

OBJETIVOS

- 1.- CONOCER A LOS COMPONENTES DEL PLASMA QUE TIENEN IMPORTANCIA MÉDICA EN LA TERAPIA DE TRANSFUSIÓN

- 2.- INTEGRAR A LOS PRINCIPALES MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL PLASMA Y DE SUS DERIVADOS

- 3.- DESCRIBIR LOS PRINCIPALES USOS TERAPÉUTICOS DEL PLASMA Y DE SUS DERIVADOS, ASÍ COMO SUS POSIBLES REACCIONES ADVERSAS

RESUMEN

A través de los tiempos la sangre ha sido considerada como la sede del alma y las grandes virtudes. Desde las antiguas civilizaciones se le consideraba como un líquido vital (13).

William Harvey, en 1628, describió la circulación sanguínea. En 1665, Richard Lower, médico inglés, llevó a cabo sus experimentos de transfusión en perros. James Blundell, en 1818, llevó a cabo una serie de transfusiones en mujeres que sufrían hemorragias durante el parto (45).

Un importante suceso fue el descubrimiento de los grupos sanguíneos A, B y O por Karl Landsteiner en 1900. Loutit y Mollison en 1943, describieron la solución ACD como anticoagulante y preservativo (109).

Con el fin de evitar posibles riesgos transfusionales, el donador de sangre deberá ser reconocido mediante una historia médica y un examen físico general antes de la donación (89).

A las unidades de sangre donadas, se les deberán practicar pruebas de laboratorio para determinar los grupos sanguíneos ABC y Rh, así como también pruebas serológicas para el diagnóstico de hepatitis B, hepatitis no-A, no-B, sífilis, brucelosis y síndrome de inmunodeficiencia humana (151,208).

La plasmaféresis es un procedimiento mediante el cual se extrae sangre total de un donante, se impide su coagulación inmediatamente después de extraerla, se separa el plasma del paquete celular y éste es devuelto al donador por vía intravenosa (47).

Las primeras técnicas de plasmaféresis fueron métodos manuales difíciles de manejar y no tenían propósitos terapéuticos. Fue en 1960, cuando se dispuso de máquinas de plasmaféresis con las que se podían obtener grandes volúmenes de plasma (77).

La selección de donantes de plasma es la misma que para sangre completa, además de los siguientes exámenes cuando éste ingresa en un programa de plasmaféresis; determinación de proteínas séricas totales, electroforesis de proteínas séricas y valoración de inmunoglobulinas G y M (104,208).

Los métodos de plasmaféresis actualmente disponibles se basan en métodos de separación por centrifugación y separación por filtración (151,161).

En el proceso llamado fraccionamiento un producto es separado de un "pool" de plasma para obtener un derivado como concentrado de factor VIII, antitrombina III, albúmina ó inmunoglobulinas (104,179).

Los principales métodos de fraccionamiento del plasma son: precipitación de proteínas, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, afinidad cromatográfica (20,35,179).

El plasma puede ser empleado para su uso clínico en forma de numerosos productos como son: plasma fresco congelado, plasma congelado, plasma de recuperación, plasma envejecido y crioprecipitado (104).

Existen otros productos derivados del plasma que actualmente se encuentran en investigación, como son: alfa-I antitripsina, proteína C reactiva, proteína S, entre otros que en un futuro podrán estar disponibles para su uso clínico (13).

Debido al incremento a nivel mundial en la demanda de productos derivados del plasma, consideramos importante realizar esta investigación bibliográfica para conocer cuales son los derivados del plasma de mayor importancia en la terapia de transfusión; así como los principales métodos de obtención de cada uno de ellos. Además de hacer una descripción de sus principales usos terapéuticos y sus posibles reacciones adversas.

La información que se encuentra sobre este tema es escasa y muchos de estos productos no se elaboran en nuestro país por falta de tecnología y re-

recursos adecuados por lo que es de especial interés integrar la información disponible, esperando pueda ser de utilidad a quienes se interesen en ésta área de la terapia de transfusión.

INTRODUCCIÓN

A través de los tiempos, la sangre ha ejercido una especie de fascinación sobre el ser humano. Desde la época de las cavernas hasta muchos siglos después, este fluido se consideró como la sede del alma y de las grandes virtudes (42,195).

Mucho tiempo después (1665), se realizaron experimentos de exsanguinotransfusión en el perro, y se comienza a perfilar la idea de recurrir al hombre como presunto donante al tratar de reanimar a otro ser humano (42).

En 1818, James Blundell, utilizó transfusiones de sangre en pacientes que habían presentado hemorragias postparto y así se desarrolló el interés en este campo (24).

La era moderna de las transfusiones de sangre se inició en 1900 a partir del descubrimiento del sistema ABO de grupo sanguíneo por Karl Landsteiner (193,195).

En los últimos años, la transfusión de sangre y sus productos han pasado a ser indispensables en la terapéutica. La transfusión con componentes ha reemplazado en gran parte la transfusión con sangre completa evitando así el desperdicio innecesario de la sangre (37,78).

Los avances tecnológicos durante la pasada década han culminado con la introducción de sofisticados separadores "in vivo" que resueven diferentes fracciones de la sangre y los componentes sanguíneos restantes son retornados al donador (148).

Los mejoramientos en el tratamiento médico han conducido a incrementar los requerimientos de productos sanguíneos tanto celulares como derivados del plasma. El fraccionamiento del plasma representa el desarrollo más importante en la transfusión sanguínea en las recientes décadas (165).

VI

En la actualidad, la demanda del plasma como fuente necesaria para productos fraccionados ha excedido la necesidad de componentes celulares. Esto se debe grandemente al aumento en la demanda de factor VIII y de albúmina humana (19).

Edwin J. Cohn, en los años cuarenta desarrolló un método para la separación de proteínas del plasma en fracciones específicas definidas. Por este hecho, el fraccionamiento con etanol frío representa la principal tecnología para la producción de concentrados de factores de coagulación, de inmunoglobulinas y soluciones de albúmina (24).

Las técnicas para la purificación de factores de coagulación han ganado un gran interés en años recientes, ofrecen el prospecto de preparaciones altamente purificadas de factor VIII y factor IX (19).

En algunos países desarrollados como Reino Unido y Suiza, existe una deficiencia en algunos productos derivados del plasma, particularmente concentrado de factor VIII y albúmina (23).

El uso de estos concentrados conlleva ciertos riesgos como son: transmisión de enfermedades infecciosas como la hepatitis y probablemente el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), o la sensibilización a proteínas extrañas; por lo que es necesario poner a consideración los peligros potenciales que la transfusión de plasma o sus derivados implica (6).

C A P I T U L O I

G E N E R A L I D A D E S

CAPÍTULO I. GENERALIDADES

I.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Desde la antigüedad la sangre ha estado rodeada de un ambiente de superstición y magia; se le consideraba como un tónico reconstituyente a través del cual se podían transmitir grandes virtudes (13).

Los antiguos egipcios sometían a baños de sangre de animales a hombres importantes, enfermos o de edad avanzada. Los romanos cuando asistían a los juegos circenses se lanzaban a la arena tras la muerte de los gladiadores y bebían su sangre, tal como lo describen Plinio el Viejo y Celso (67).

La historia no menciona nada más al respecto, hasta el verano de 1492 cuando el papa Inocencio VIII, viejo y enfermo bebió la sangre de tres jóvenes muchachos de su corte, poco tiempo después falleció al igual que los tres muchachos (219).

Algunos años más tarde (1505-1576), Hieronimus Dardanus de Milán y Magnus Pegelius de Rastok, fueron los primeros en sugerir que la transfusión de sangre de un individuo a otro podía ser posible (219).

En 1615, Andreas Libavius, químico de Halle en Francia, hizo una descripción detallada de una técnica de transfusión directa con tubos de plata que se introducían en las arterias del donador y receptor respectivamente (106, 128).

Se dió un gran paso adelante cuando en 1628, William Harvey describió la circulación sanguínea. Esta importante contribución abre el camino a investigadores de todo el mundo y se comienza a experimentar con infusiones de diversas sustancias a través de la sangre (45).

Francesco Folli, un médico florentino, en 1654, afirmó haber realizado

la primera transfusión sanguínea en presencia del gran Duque de Toscana, Fernando II, aunque más tarde confesó no haber realizado jamás un acto de este tipo, solo describió el método (106).

En el año de 1656, Sir Christopher Wren, médico inglés, fué el primero que utilizó la vía intravenosa en perros (106).

Uno de los pioneros en la práctica de la transfusión fué Richard Lower médico inglés, quien en 1665, llevó a cabo sus experimentos de transfusión directa en el perro (128).

Estos trabajos motivaron que los médicos de la época intentaran perfeccionar la técnica y los instrumentos. Comienza a perfilarse la idea de recurrir al hombre como presunto donante cuando se trata de reanimar a otro ser humano (106,128).

James Blundell, fisiólogo y obstetra inglés, en 1818, revive el interés de los investigadores en la transfusión. Al observar en su clínica de maternidad a jóvenes mujeres que fallecían por hemorragias durante el parto, por lo que llevó a cabo una serie de transfusiones para intentar reemplazar la sangre de estas pacientes, utilizando en todos los casos sangre humana. Debido a sus grandes contribuciones se le reconoce como el padre de la transfusión sanguínea moderna (13,45).

Un importante suceso en la historia de la transfusión fué el descubrimiento de los grupos sanguíneos A, B y O en 1900 por Karl Landsteiner; el grupo AB fué descrito por de Castello y Sturli en 1902. Karl Landsteiner junto con Wiener descubren el sistema Rh, en 1940 (45,67,109).

La primera guerra mundial (1914-1918) y las de Corea (1950-1953) y Vietnam (1964-1970), permitieron no solo multiplicar el número de transfusiones sanguíneas sino también mejorar aspectos técnicos en la extracción como en

conservación de la sangre. La transfusión directa, de brazo a brazo resultó inadecuada en los campos de batalla, además los problemas de coagulación eran numerosos (140).

Desde 1835, se empezó a utilizar sangre desfibrinada para tratar de resolver este problema, en 1890, se utilizaron sustancias químicas tales como bicarbonato de sodio, fosfato de sodio y amonio, y citratos pero desafortunadamente resultaron ser tóxicos (140).

Hustin en Bruselas, Agote en Buenos Aires, Lewisohn en Nueva York (1914-1915), demostraron que el citrato a una concentración de 0.2% era capaz de prevenir la coagulación sin presentar efectos tóxicos (140).

Rous y Tourner, en 1916, adicionaron dextrosa a la sangre, logrando así una mejor preservación. Loutit y Mollison (1943), describieron la solución ACD (ácido cítrico, citrato sódico, dextrosa), como anticoagulante y preservativo (45,140).

El mejor conocimiento del metabolismo de los hematíes a llevado a modificar las soluciones anticoagulantes. Estos descubrimientos fueron contemporáneos con el establecimiento de los primeros bancos de sangre (140).

En 1932 se construyó en Francia el primer Centro de Transfusión Sanguínea en el Hospital Saint Antoine de París (128).

En 1934 se funda el Centro de Transfusión de Sangre del Hospital General de México, por el Dr. Abraham Ayala González, más tarde se funda la Sociedad Mexicana de Transfusión de Sangre (128).

En 1936, Fantus organizó en el Condado de Cook, en Chicago el primer banco de sangre de Estados Unidos de Norteamérica (92).

Desde hace varios años se ha intentado prolongar la conservación de la sangre por congelación. En 1960 se introdujeron contenedores de plástico estériles y los componentes sanguíneos pudieron ser separados por centrifu-

gación y conservados durante periodos variables. La terapia de transfusión sanguínea se ha especializado en la obtención de componentes sanguíneos en forma de concentrados (13).

La práctica de transfusión actual se esfuerza en lograr la mayor racionalidad posible respetando las necesidades del enfermo y la sangre de los donantes (13).

En la actualidad, con la introducción de separadores celulares sanguíneos, se pueden obtener grandes cantidades de un producto sanguíneo determinado a partir de un mismo donante. La técnica de fraccionamiento de Bohr en 1945, permite separar el plasma en sus diferentes fracciones (92).

La historia de la transfusión de sangre se inició en épocas muy tempranas con la historia del hombre. Sin por ello contar importancia al gran mérito de los distintos pioneros, es preciso reconocer que ésta nueva forma de tratamiento nació y se perfeccionó en transcurso del siglo XX (8,45).

1.2. PLASMA: CARACTERÍSTICAS GENERALES

La sangre es un líquido vital que circula en el organismo humano. Se compone de elementos formes suspendidos en una porción líquida, el plasma. Aproximadamente 55% del volumen sanguíneo es plasma, el 45% corresponde a los elementos formes (64, 91).

Está compuesto de aproximadamente 90% de agua, 6.5-8.0 % de proteínas y 2 % de otras sustancias de bajo peso molecular (102).

Los volúmenes de sangre y plasma pueden calcularse aproximadamente a partir del peso corporal; el volumen total de sangre es alrededor de un 7 % del peso corporal y el volumen de plasma de un 4 - 5 % (64).

Tiene una gravedad específica de 1.025 - 1.029, su pH varía de 7.37 a

7.43, una viscosidad de 1.9 - 2.6; el plasma normal tiene una presión osmótica de aproximadamente 7.3 atmósferas (5,600 mmHg) (177).

Muchas sustancias están disueltas en él; éstas incluyen electrolitos, proteínas, lípidos, carbohidratos (particularmente glucosa), aminoácidos, vitaminas, hormonas, productos nitrogenados como la urea y ácido úrico; gases sanguíneos como oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno. La concentración de éstas sustancias puede variar como resultado de una serie de influencias como la dieta y las demandas metabólicas (tabla I.2.1.) (13).

Tabla I.2.1. Algunos constituyentes del plasma humano (17)

Constituyentes Iónicos	Concentración (mEq/L)
Cationes:	
Sodio	135 - 145
Potasio	3.5 - 5.0
Calcio	2.2 - 2.5
Magnesio	1.5 - 2.0
Hidrógeno	7.35 - 7.45
Aniones:	
Cloruro	95 - 107
Bicarbonato	22 - 26
Lactato	1.0 - 1.8
Sulfato	1.0
Fosfato	2.0
Proteínas:	
Albumina	3.4 - 5.0 (g/dl)
Globulina Total	2.2 - 4.0 (g/dl)
Transferrina	250 (mg/dl)
Haptoglobina	30 - 205 (mg/dl)
Ceruloplasmina	25 - 45 (mg/dl)
Hemopexina	50 - 100 (mg/dl)
Ferritina	15 - 300 (μ g/l)
No Proteínas:	
Colesterol	140 - 250 (mg/dl)
Glucosa	70 - 110 (mg/dl)
Nitrógeno uréico	6-23 (mg/dl)
Acido úrico	4.1 - 8.5 (mg/dl)
Creatinina	0.7 - 1.4 (mg/dl)
Hierro	50 - 150 (μ g/dl)

La viscosidad del plasma se debe a su contenido de proteínas. La mayoría de las proteínas pertenecen a dos grupos: albúmina y globulinas, las proteínas plasmáticas han sido caracterizadas por su migración en un campo eléctrico a pH de 8.6 por lo que han sido descritas como alfa-1, alfa-2, beta y gammaglobulinas (15).

La albúmina constituye aproximadamente 60 % de las proteínas totales del plasma, es producida por el hígado. Debido a su alta concentración y al pequeño tamaño de la molécula es responsable de la presión osmótica del plasma, transporta diversas sustancias en el torrente sanguíneo, entre éstas se encuentran bilirrubina, urobilina, ácidos grasos, sales de ácidos biliares y sustancias extrañas como penicilina o sulfonamidas (108).

Las inmunoglobulinas constituyen la mayoría de las globulinas y después de la albúmina son las que se encuentran en mayor concentración en el plasma. Son sustancias protectoras y de defensa del organismo (anticuerpos). Otras proteínas del plasma incluyen factores de la coagulación y componentes del complemento (tabla I.2.2) (108,216).

Tabla I.2.2. Otros constituyentes del plasma humano (22)

Componente	Peso molecular (daltones)	Concentración ($\mu\text{mol/l}$)
Inmunoglobulinas:		
IgG	150,000	53 - 113
IgA	150,000	7 - 27
IgM	900,000	0.06-2
IgD	170,000	0.02-1.2
IgE	190,000	(5-500) 10^{-6}
Factores del complemento:		
C1q	400,000	0.5
C1r	180,000	-
C1s	86,000	1.3
C2	117,000	0.2
C3	180,000	-
C4	206,000	3
C5	180,000	0.4
C6	95,000	0.8
C7	110,000	0.5
C8	163,000	0.5
C9	79,000	3.0
Properdina	184,000	0.14
Proteasas Inhibidores:		
alfa-1 antitripsina	54,000	40
alfa-1 antiquimiotripsina	69,000	7.2
antitrombina III	62,000	3.1
alfa-2 macroglobulina	820,000	3.3
alfa-2 antipiasmina	70,000	1.0

Los factores de la coagulación son proteínas que intervienen en la coagulación de la sangre, circulan en forma inactiva (proenzimas) y pueden ser convertidas a enzimas por reacciones proteolíticas (tabla I.2.3) (216).

En el plasma sanguíneo se encuentran tres principales sistemas amortiguadores que ayudan a regular el equilibrio ácido-base.

Uno de los principales es el par $\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$ (bicarbonato/ácido carbónico); Otro sistema amortiguador es el compuesto por el par $\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$ (ión fosfato monoácido/fosfato diácido). También las proteínas plasmáticas tienen la capacidad de neutralizar tanto a las bases como a los ácidos fuertes dependiendo de que contengan aminoácidos iónicos dipolares (182).

La concentración de sustancias disueltas en el plasma puede ser expresada como la presión osmótica, esta juega un papel importante en la regulación de la distribución del agua entre el plasma y el fluido intersticial (177).

El proceso de coagulación del plasma involucra diversas proteínas que se encuentran en él en forma inactiva y mediante una serie de reacciones proteolíticas se transforman a su forma activa, hasta llegar a la formación de un coágulo de fibrina (177).

La coagulación de la sangre es un sistema de defensa que ayuda a mantener la integridad de los vasos sanguíneos cuando éstos son dañados y puede llevarse a cabo mediante dos vías relacionadas entre sí: vía intrínseca y vía extrínseca (fig. I.2.4) (48,108,143).

Tabla I.2.3. Nomenclatura y algunas propiedades de los factores de coagulación del plasma (53)

Factor	Sinónimo	Vida media	Peso Molecular (daltones)	Concentración en plasma (µg/ml)	Función
I	Fibrinógeno	3 días	340,000	1500-4000	Estructural
II	Protrombina	3 días	72,500	150	Proteasa Zimógeno
III	Factor Tisular	-	37,000	0	Cofactor/iniciador
IV	Calcio	-	-	-	-
V	Proaccelerina	15-24 horas	330,000	10	Cofactor
VII	Proconvertina	1 - 6 horas	48,000	0.5	Proteasa Zimógeno
VIII:C	Factor antihemofílico	5-17 horas	21,000	0.05	Cofactor
VIII:R	Factor von Willebrand	14-40 horas			
IX	Factor Christmas, Tromboplastina plasmática (PTC)	20-24 horas	57,000	5	Proteasa Zimógeno
X	Factor Stuart-Prower	32-48 horas	59,000	8	Proteasa Zimógeno
XI	Antecedente tromboplastínico (PTA)	40-48 horas	160,000	5	Proteasa Zimógeno
XII	Factor Hageman	48-52 horas	76,000	35	Proteasa Zimógeno
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	50-60 horas	32,000	20	-
HMWK	Kininógeno de alto peso molecular, Fitzgerald, Flaujac, Factor Williams	-	150,000	80	-

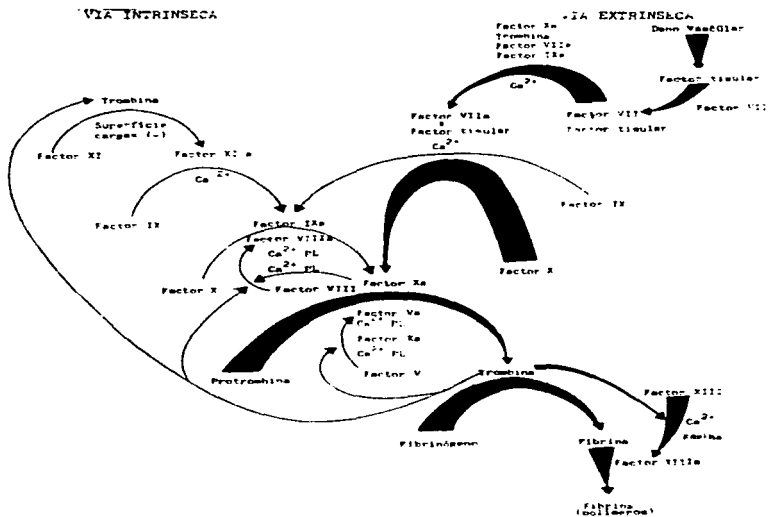


Fig. 1.2.4. La cascada de la coagulación. Vía intrínseca y vía extrínseca (48).
 Las flechas gruesas indicar la vía extrínseca; F= Factor de coagulación.
 PL= Fosfolípidos; HMWK= Kininógeno de alto peso molecular.

C A P I T U L O I I

D O N A C I O N S A N G U I N E A

CAPÍTULO II. DONACIÓN SANGUÍNEA

La transfusión de sangre y sus productos es un elemento esencial de la asistencia sanitaria. La organización de servicios de transfusión de sangre debe ser parte integrante de toda política nacional de salud (72).

En 1975, la Asamblea Mundial de la Salud instó a los estados miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) a que fomentaran el " establecimiento de servicios nacionales de transfusión basados en la donación voluntaria y no remunerada de la sangre " (72).

De recoger la sangre, almacenarla, prepararla y distribuirla pueden encargarse distintas organizaciones como son: la Cruz Roja (que en los países islámicos es la Media Luna Roja), Servicios Oficiales de transfusión y otras organizaciones sin fines de lucro (72).

Los servicios de transfusión de sangre dependen de los donadores voluntarios para proveer la sangre necesaria para satisfacer su demanda (72).

Con el fin de proteger al donador, lo mismo que al receptor, cada donante de sangre debe ser reconocido mediante una historia médica y un examen físico general el día de la donación. Esto sirve para asegurar que no sobrevendrá ningún daño al donante al proporcionar sangre y que la unidad transfundida tampoco dañará al receptor (83).

El registro, la identificación y el examen preliminar del donador inician el proceso de donación (84).

Una vez identificado el donador, se toman brevemente sus antecedentes, realizando un interrogatorio para identificar donantes de alto riesgo de transmisión de enfermedades y se le hace un examen físico convencional(83).

II.1. SELECCIÓN DE DONADORES

Para conocer el estado de salud del donador es necesario determinar diversos factores como son:

a) Apariencia general: no debe presentar signos de intoxicación por alcohol, narcóticos, inhalantes, marihuana ó cualquier estupefaciente; ni debe presentar signos de infección en piel y mucosas, por ejemplo: ictericia, petequias o dermatitis persistente.

b) Peso: donantes que pesen 50 kg o más pueden donar una unidad completa de 450 ml.

c) Edad: de 18 a 65 años. Los menores se considerarán bajo consentimiento paterno por escrito. Después de los 66 años se acepta el donante si es aprobado por el médico del banco de sangre.

d) Temperatura: la temperatura oral no debe exceder de 37.5 °C.

e) Pulso: el pulso debe ser de 50 a 100 pulsaciones por minuto y debe ser rítmico.

f) Presión sanguínea: la presión sistólica no debe ser mayor de 180 mm de Hg y la diastólica no mayor de 100 mm de Hg.

g) Hemoglobina ó hematocrito: estas pruebas se llevan a cabo para prevenir la extracción de sangre de una persona anémica (tabla II.1) (28,30).

Tabla II.1. Niveles de hemoglobina ó hematocrito (50)

Hemoglobina	Hematocrito	Altura sobre el nivel del mar
12.5 g/dl	38 % Hombres	0 - 1,500 m
12.0 g/dl	36 % Mujeres	
14.5 g/dl	43 % Hombres	1,501 m ó más
13.5 g/dl	40 % Mujeres	

Frecuencia de donaciones: el intervalo mínimo entre donaciones será de dos meses. Normalmente dos o tres veces al año (28).

Criterio para el rechazo de donantes

Dependiendo del criterio médico pueden ser circunstancias excluyentes las siguientes:

1) Temporales:

a) Manipulaciones dentales (cirugía): dentro de las 72 horas siguientes.

b) Tatuajes recientes: dentro de los seis meses.

c) transfusiones previas: no se podrá donar hasta pasados seis meses desde la última transfusión con sangre o sus componentes.

c) Embarazo: dentro de los seis meses antes del parto.

e) Medicaciones: en general los medicamentos tomados deben ser bajo control médico.

f) Inmunizaciones o vacunas recientes: la vacuna antirrábica hasta un año después de la inyección y las vacunas contra varicela, rubeola, parotiditis, fiebre amarilla, polio por vía oral, sarampión e influenza hasta después de 28 días de haberlas recibido.

2) Permanentes:

a) Positividad en marcadores serológicos para los virus B ó C de la hepatitis ó ambos.

b) Tuberculosis clínicamente activa.

c) Tripanosomiasis americana: positividad en las pruebas serológicas.

d) Brucelosis

e) Sífilis y gonorrea

f) Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA): la presencia de an-

tuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana (anti-VIH) es causa de exclusión definitiva.

g) Personas que presenten alguna de las siguientes enfermedades: neoplásicas, pulmonares, renales, hepáticas, cardiopatías, diabetes grave y desórdenes hemostáticos (28,50).

II.2. Obtención de la sangre del donador

Una vez que el donador ha sido registrado ha pasado satisfactoriamente tanto el examen físico como el médico, el siguiente paso es la colección de la unidad de donación.

El lugar donde se lleve a cabo la toma de la muestra debe estar bien iluminado. Los operadores deben estar bien presentados y atender correctamente al donador para que éste se sienta tranquilo. El personal que lleve a cabo el procedimiento de venipuntura debe estar bien entrenado y bajo la supervisión de un médico calificado. La colección de sangre debe hacerse con métodos y materiales asépticos usando un sistema cerrado estéril y una sola venipuntura (2,85).

La sangre debe ser obtenida en contenedores que estén libres de pirógenos, estériles y cuya capacidad sea suficiente para la anticoagulación y conservación de 450 ± 45 ml de sangre (77).

Antes de la donación, así como los tubos piloto (que se utilizan para posteriores pruebas de compatibilidad) mediante números, letras u otros símbolos con el nombre del donador y su historia médica (77).

Existen diferentes anticoagulantes para obtener sangre completa en sistemas cerrados, aprobados por la Food and Drug Administration (FDA). Su vigencia dependerá del anticoagulante empleado.

1) ACD (dextrosa, ácido cítrico y citrato trisódico): 21 días.

2) CPD (dextrosa, citrato trisódico, ácido cítrico, fosfato sódico): 21 días.

3) CPD con adenina (dextrosa, citrato trisódico, ácido cítrico, fosfato sódico y adenina): 35 días.

4) CPD con adenina y manitol (dextrosa, citrato trisódico, ácido cítrico, fosfato sódico, adenina y manitol): 45 días.

5) Heparina: 48 horas.

Las soluciones anticoagulantes más usadas actualmente son CPD con adenina y manitol.

Las unidades se conservarán en congelación, con un periodo de vigencia que indican las tablas II.2 y II.3 (50).

Tabla II.2. Concentrado de eritrocitos y sus variantes (50)

Tipo de unidad	Volumen (ml)	Conservación (°C)	Vigencia máxima
Concentrado de eritrocitos	180-350	+ 4°C a + 6°C	Según el anticoagulante
Concentrado de eritrocitos pobre en leucocitos	180 - 350	+ 4°C a + 6°C	Según el anticoagulante
Concentrado de eritrocitos lavados (con sol. salina al .9 %)	180 - 350	+ 4°C a + 25°C	4 horas
Concentrado de eritrocitos congelados (preparados con glicerol)	180 - 350	- 65°C a - 70°C	10 años (congelados) 5 4 horas (lavados)

Tabla II.3. Plasmas y crioprecipitado (50)

Tipo de Unidad	Fuente de obtención	Volumen (ml)	Conservación (°C)	Vigencia a partir de la recolección
Plasma fresco y fresco congelado	Centrifugación entre + 4 y + 6°C de sangre fresca ó por aféresis	150 a 180 (fraccionamiento) ó 450 a 750 (aféresis)	- 20°C a -30°C ó + 4°C a +24°C al se emplea inmediatamente	12 meses congelado ó 6 horas descongelado
Plasma envejecido	Centrifugación de sangre total ó sedimentación de sangre fresca ó total, así como por aféresis	150 a 180 (fraccionamiento) ó 450 a 750 (aféresis)	+ 6°C a -30°C	12 meses (ó menor si se conserva entre + 4°C y + 6°C y muestra cambios físicos)
Crioprecipitado	De plasma fresco ó fresco congelado	10 a 25	- 20°C a - 30°C	12 meses congelados ó 4 horas descongelado

II-2.1. VENIPUNTURA

Este procedimiento involucra varios pasos:

- 1) Confirmar la identidad del donador
- 2) Reunir todo el equipo necesario y revisar que la solución anticoagulante esté clara.
- 3) Colocar la bolsa de colección debajo del nivel del brazo del donador para asegurar que el contrapeso sea nivelado y ajustado por la cantidad de sangre que será obtenido. Si se utiliza un dispositivo que utilice vacío se seguirán las instrucciones del fabricante.
- 4) Realizar la venipuntura:

Se elige el sitio de venipuntura en el brazo del donador, generalmente el área antecubital, que debe estar libre de lesiones en la piel ya que pueden contaminar la unidad de donación.

Se puede usar un torniquete para facilitar la elección de la vena. Colocar una presión máxima de 60 mm de Hg para incrementar la distensión de la vena, dando instrucciones al donador de abrir y cerrar su mano hasta seleccionar la vena más prominente. Las venas más comúnmente usadas son la cefálica y la media cubital.

El sitio de venipuntura deberá ser lavado y desinfectado con solución acuosa de jabón o con solución de complejo iodóforo.

En la vena elegida colocar la aguja formando un ángulo de 45 ° con la piel, reduciendo el ángulo a 10 -20 ° orientando la aguja en dirección paralela a la vena.

La donación se completa en siete minutos aproximadamente. Se detiene el proceso una vez que la cantidad de sangre obtenida es la adecuada (50, 77,85,104).

II.3. PRUEBAS DE LABORATORIO

A todas las unidades de sangre donadas se les deberán practicar las siguientes pruebas de laboratorio.

II.3.1. Determinación de grupos sanguíneos ABO y Rh

Pruebas serológicas para el diagnóstico de:

II.3.2. Hepatitis B

II.3.3. Hepatitis No-A, No-B (HNANB)

II.3.4. Sífilis

II.3.5. Brucelosis

II.3.6. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (12,50).

II.3.1. Determinación de grupos sanguíneos ABO y Rh

Grupos sanguíneos: bajo el nombre de grupos sanguíneos se designa la presencia de determinados antígenos en la superficie de los hematies, así como también se encuentran en otras células como leucocitos y plaquetas.

Sistema ABO: de acuerdo con la posesión o no de los diferentes antígenos del sistema ABO todos los sujetos pueden dividirse en cuatro grupos: grupo A (antígeno ó aglutinógeno A), grupo B (antígeno B), grupo O (ausencia de los antígenos A y B, pero presencia de un precursor, el antígeno H) y grupo AB (presencia de ambos antígenos A y B). El antígeno A se subdivide en A_1 , A_2 , A_1B y A_2B (tabla II.4) (15, 20B).

Tabla II.4. Grupos sanguíneos del sistema ABO (20B)

Grupo sanguíneo (fenotipo)	Antígeno presente en el eritrocito (isoaglutinógeno)	Anticuerpos naturales en plasma (isoaglutinina)
A ₁	A y A ₁	anti-B
A ₂	A	anti-B y anti-A ₁ (10%)
B	B	anti-A
A ₁ B	A, A ₁ y B	-
A ₂ B	A y B	anti-A ₁ (10%)
O	-	anti-A y anti-B

Sistema Rhesus: Los antígenos eritrocitarios del sistema Rhesus se forman a partir de genes muy interrelacionados. Los principales alelos son los Dd, Cc y Ee (10K).

La identificación de grupos sanguíneos se logra gracias a la capacidad que tienen éstos de reaccionar con sus anticuerpos específicos formando complejos que se manifiestan por una hemoaglutinación, donde el antígeno es de tipo particulado (10L).

El grupo sanguíneo ABO puede determinarse por dos procedimientos: prueba directa y prueba inversa en tubo. Los resultados de ambos procedimientos deben coincidir y cualquier discrepancia debe ser investigada (12).

En la prueba directa se enfrentan los hematíes del donador con los diferentes antisueros y en la prueba inversa se enfrentan el suero del donador con hematíes de tipo A y B. Los resultados se clasifican por la presencia o ausencia de aglutinación en los tubos de prueba (tablas II.5 y II.6).

Tabla II.5. Aglutinación del sistema ABO (prueba directa) (219)

Grupo Sanguíneo	Hemáties del donador más:		
	anti-A	anti-B	anti-A , anti-B
A	+	neg	+
B	neg	+	+
AB	+	+	+
O	neg	neg	neg

+ = aglutinación

neg= ausencia de aglutinación

Tabla II.6. Aglutinación del sistema ABO (prueba Inversa) (219)

Grupo Sanguíneo	Sangre del donador más:	
	Hemáties A	Hemáties B
A	neg	+
B	+	neg
AB	neg	neg
O	+	+

+ = aglutinación

neg= ausencia de aglutinación

La denominación Rhesus positivo hace referencia a la presencia del antígeno D. Con el término de donante Rhesus negativo se conocen los casos que no poseen antígenos C, D ni E (104).

Para la determinación del Rh se enfrentan los hematíes problema con suero anti-D. Si se produce aglutinación será sangre tipo Rh positiva, de lo contrario será negativa, en este caso se procede a realizar la prueba D^u (104).

Los hematíes D^u ofrecen reacciones débiles o negativas cuando se determina su Rh. Aunque el anti-D se fija a los hematíes D^u , el anticuerpo es insuficiente para producir aglutinación. El anti-D fijado a los hematíes puede detectarse mediante la prueba indirecta de la antiglobulina (104).

II.3.2. PRUEBA SEROLÓGICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS B

La hepatitis B se produce por un virus DNA que tiene un núcleo o core y una capa superficial. La capa proteica externa contiene el antígeno de superficie (HBsAg). En el núcleo está el antígeno core (HBeAg). Cada uno de estos antígenos da lugar a la formación de anticuerpos específicos. La hepatitis B se transmite por transfusión sanguínea. El HBeAg se investiga en todos los donantes de sangre (9,28,50).

Los métodos aprobados por la FDA para identificar el antígeno de superficie de la hepatitis B son: radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA) y hemaglutinación reversa pasiva (RPHA), siendo EIA el método más comúnmente utilizado (25,98).

Principio de EIA:

Esta prueba utiliza la técnica del "sandwich". Un soporte sólido se cubre con anti-HBs y se deja que reaccione con el suero sujeto a ensayo.

Si está presente el antígeno, se unirá a la matriz sólida. En este procedimiento un segundo anticuerpo está marcado con una enzima en lugar de yodo radioactivo (como en la técnica de RIA). Se forma el "sandwich". Después del lavado se elimina cualquier cantidad de anticuerpo marcado con enzima no ligado; se añade un sustrato adecuado que reacciona con la enzima presente. El color resultante se monitoriza y se mide con un espectrofotómetro. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración del antígeno que está presente (196).

II.3.3. HEPATITIS No-A, No-B (HNANB)

Recientemente se ha descubierto el virus de la hepatitis C (VHC), como el principal agente causante de la HNANB. Esta representa más del 90 % de casos de hepatitis asociados a transfusión en los Estados Unidos. La prueba de alanina aminotransferasa (ALT) identifica donadores de alto riesgo, sin embargo, no es muy específica, por lo que existe la necesidad de desarrollar una prueba de diagnóstico directa para el o los agentes causantes.

Kuo G. y colaboradores clonaron recientemente el genoma del agente de la HNANB, designado como virus de la hepatitis C (VHC) y reportaron el desarrollo y uso de un ensayo basado en DNA recombinante para detectar anticuerpos contra VHC (39,49,71,199,210).

Esta prueba se basa en un inmuncensayo enzimático que no detecta directamente el VHC sino anticuerpos contra un antígeno viral (llamado C-100-3). Este antígeno es un polipéptido sintetizado en clonas de levadura recombinante del VHC y se utiliza para capturar anticuerpos virales circulantes. esta prueba es la que tiende a ser más utilizada debido a que es más específica y más sensible (154,155).

II.3.4. SÍFILIS

La sífilis es una enfermedad venérea contagiosa causada por una espiroqueta (Treponema pallidum). La transmisión de la enfermedad ocurre por contacto sexual, de madre a hijo en útero o por transfusión de sangre que no ha sido refrigerada. El almacenamiento a 4°C inactiva al Treponema (84).

El diagnóstico serológico de sífilis se puede demostrar con la prueba serológica de reaginas contra sífilis, mediante una prueba de aglutinación de partículas. La prueba de reaginas usa un antígeno no específico, de carácter lipídico. Detecta IgG o IgM producidos por el huésped infectado como resultado de la interacción de lípidos, ya sea del huésped o espiroquetas, o ambos con el sistema inmune del hospedador (149,194,216).

Los antígenos que se usan en las pruebas de reaginas son mezclas formadas de cardiolipina, colesterol y lecitina. Es un procedimiento de floculación para detectar anticuerpos, reaginas, dirigidos contra los fosfolípidos o el colesterol. La reacción que ocurre entre este antígeno y los anticuerpos produce una floculación de la suspensión (microaglutinación) que se observa microscópicamente (95).

Existen dos pruebas de reaginas disponibles comercialmente que son: Prueba de venereal Disease Research Laboratory (VDRL) y la prueba rápida de reagina de plasma (PRP). Las pruebas de reagina reactiva (positivas) pueden ser confirmadas con dos pruebas de antígeno treponémico específico: prueba de absorción de anticuerpo treponémico fluorescente (FTA-ABS), que usa como antígeno una suspensión de espiroquetas de Treponema pallidum muertas y la prueba de ensayo de microhemaglutinación para Treponema. Esta prueba se basa en la detección de anticuerpos específicos en el suero del paciente mediante una aglutinación con eritrocitos de carnero sensibilizados contra

el antígeno de Treponema pallidum (69,169,212).

II.3.5. BRUCELLIS

Las brucelas son cocobacilos pequeños, gram negativos, inmóviles, aerobios estrictos. El hombre adquiere la infección por contacto directo con material infectado, así como por la ingestión de leche no pasteurizada o productos lácteos de animales infectados. Los donadores que tengan antecedentes de brucelosis se deberán someter a las pruebas serológicas para su diagnóstico, como las pruebas de aglutinación fértil (69).

Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos en el suero del donador que actúan sobre antígenos constituidos por una suspensión de bacterias mediante una reacción de aglutinación. Un título de 1/60 o más sugiere infección por brucela no necesariamente actual o reciente. Los donadores que presenten positividad en la detección de brucelosis serán excluidos (2).

II.3.6. SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida)

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida es causado por un retrovirus al que se ha denominado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El VIH tiene tres principales genes estructurales: gag, pol y env; cada uno de los cuales codifica una o más proteínas expresadas en células infectadas o en virus maduros. El gen gag codifica las proteínas: p 66 y p 51 ambas con actividad de transcriptasa inversa, y la proteína integrasa nucleasa p 31.

El gen env codifica una glicoproteína de 100 KDa, gp 160, la cual se rompe en una glicoproteína de superficie gp 120 y una proteína transmem-

branal gp 41 (28,85).

Las personas infectadas con VIH se identifican generalmente por la presencia de anticuerpos reactivos con el retrovirus. Con técnicas recientemente desarrolladas, el VIH se puede aislar de casi todos los individuos seropositivos. La prueba de inmunoenzayo enzimático fué la primera que se desarrolló para detectar anticuerpos contra VIH en donantes de sangre potencialmente infectados (90).

La prueba más comunmente utilizada para detectar anticuerpos contra el VIH es el ensayo inmunoadsorbente ligado a enzima (ELISA): estudios clínicos han mostrado que ELISA tiene un 99 % de sensibilidad y especificidad (99,8%) en donadores de sangre (95).

MÉTODO DE ELISA PARA IDENTIFICAR ANTICUERPOS ANTI-VIH:

Pozos de tiras de poliestireno se recubren con virus VIH purificado. La muestra de suero y un anticuerpo anti-VIH marcado con peroxidasa se incuban simultáneamente en dicho pozo. Si la muestra problema no contiene anticuerpos anti-VIH se formará un complejo entre el antígeno en fase sólida con el anticuerpo marcado. La incubación con el sustrato enzimático produce color amarillo-anaranjado en el pozo. Si la muestra contiene anticuerpos anti-VIH, éstos compiten con el anticuerpo marcado por el antígeno disponible, reduciendo el desarrollo de color que será medido espectrofotométricamente.

En cada placa de 96 pozos se deben incluir tres controles positivos y tres negativos, de los cuales se obtiene el promedio de suma y se multiplica por un factor que en este caso es 0.5. El valor obtenido será el límite que indique cuando una muestra es negativa y cuando positiva (valores por arriba son negativos y por abajo son positivos) (83,95).

Después de inmunoenzayo enzimático las muestras reactivas se prueban con métodos confirmativos para asegurar la reacción específica del virus.

La prueba confirmatoria de empleo más común es la inmunoelectrotransferencia, conocida como Western Blot. Con esta técnica se pueden demostrar anticuerpos contra las diferentes fracciones proteicas de la estructura del VIH. (64).

MÉTODO DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA:

Es una técnica que permite la identificación de anticuerpos dirigidos contra polipéptidos estructurales individuales del VIH. Los péptidos son electroforéticamente separados y transferidos a nitrocelulosa donde son estabilizados (49).

La nitrocelulosa se pone en contacto con el suero, si éste tiene anticuerpos se unirán formándose complejos antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos reactivos pueden ser visualizados y localizados por el uso de antiglobulinas marcadas con peroxidasa, el último paso es adicionar el sustrato de la enzima que permitirá el revelado de las bandas de nitrocelulosa (49).

Cuando aparecen las bandas visibles contra los componentes gp 120, gp 160.24 y gp 41 del VIH la prueba es positiva. Cuando hay ausencia de bandas es prueba negativa. Cuando aparece una banda o dos del mismo gen (pol, env o gag) es indeterminada (49,154).

El método de Inmunoelectrotransferencia es el más común para detectar la respuesta de anticuerpo contra proteínas virales VIH específicas. Los donadores que presenten positividad en la prueba serológica para el VIH de cualquiera de sus tipos serán descartados definitivamente (50).

Entre los exámenes de laboratorio que día con día cobran mayor importancia en el estudio de pacientes con SIDA se encuentra el recuento del número absoluto de células T CD4⁺ en sangre, ya que de su resultado depende la toma de decisiones, tanto relacionadas con la clasificación de cada caso como con la aplicación de medidas terapéuticas (64).

CUENTA DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4⁺ Y TCD 8⁺:

La cuenta absoluta de linfocitos T CD4⁺ es uno de los mejores indicadores para estimar el estado de infección de HIV-1. Recientemente los Centros de Estados Unidos de Norteamérica para el control y la prevención de la enfermedad, propusieron que una cuenta de linfocitos T CD4⁺ < 200 X 10⁶ /litro sea usado como un criterio para la definición de casos de SIDA, independientemente de las condiciones clínicas (64).

La cuenta normal de células CD4⁺ es de 31-61 % (≥ 800 células/mm³). La mayoría de pacientes con SIDA tienen valores menores de: 20 %; pacientes con menos de 500 células/mm³ (menos de 25 %) son candidatos para quimioterapia antirretroviral (90).

La cuenta de células TCD4⁺ es uno de los mejores marcadores indirectos de progresión de la enfermedad. La cuenta de células T CD4⁺ disminuye conforme progresa la enfermedad, es útil en decidir si la quimioterapia antirretroviral es indicada y en determinar si una infección aguda es probablemente devida a un patógeno oportunista o a una infección comunitario-adquirida (90).

A causa de que otras enfermedades pueden influenciar la cuenta de células CD4⁺, esta no ha sido utilizada como una prueba de escrutinio primaria para infección por VIH (64).

Cuenta de linfocitos T CD8⁺: El valor pronóstico de los linfocitos TCD8⁺ permanece controversial, en pacientes infectados con VIH, la cuenta de células CD8⁺ ayuda a identificar individuos VIH positivos en riesgo para progresión de la enfermedad, ya que cuentas elevadas de células CD8⁺ han sido relacionadas con el desarrollo de SIDA aunque esto es controversial (34).

Una elevación en el número de células CD8⁺ ocurre durante la seroconversión y permanece durante el transcurso de la enfermedad en subpoblaciones específicas de linfocitos CD8⁺ (70).

Las células $CD8^+$ que expresan el antígeno CD38 están más elevadas en pacientes con SIDA que en personas asintomáticas seropositivos, por otra parte las células $CD8^+$ que expresan el antígeno HLA-DR están más elevadas en personas asintomáticas seropositivas (70).

Los linfocitos T $CD8^+$ se cree que juegan un papel importante en limitar la inmunopatogénesis del VIH, lisando células infectadas con VIH y secretando factores que controlan la replicación viral (70).

La cuenta de células $CD8^+$ se incrementa en las etapas tempranas de la enfermedad y declina en las etapas avanzadas, sugiriendo una relación compleja entre cuenta de células $CD8^+$ y progresión a SIDA (34).

Se ha reportado como una cuenta elevada de células $CD8^+$ un valor mayor de $1,500 \times 10^6/l$ o una cuenta del doble del valor normal (V.N. 18-39 %). Una cuenta elevada en individuos asintomáticos infectados con VIH puede ser de mal pronóstico del progreso de la enfermedad. El mecanismo de incremento de células $CD8^+$ es un fenómeno complejo en la infección con VIH (34).

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA PARA LA CUENTA DE LINFOCITOS T $CD4^+$ Y T $CD8^+$:

La cuenta de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ puede ser determinada por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales.

En citometría de flujo las células son marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a los constituyentes que van a ser medidos. Otros pueden ser marcados con anticuerpos monoclonales conjugados con algunos colorantes fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) ó ficoeritrina. Se lleva a cabo en un citómetro de flujo el cual detecta la fluorescencia y dispersión de la luz (134).

Las células pasan a través de un haz de luz intensa en excitación en la

región medible del citómetro. Cada célula produce un centelleo corto de fluorescencia, la intensidad de la cual es proporcional al contenido celular del constituyente marcado fluorescentemente (134).

Estos centellos son colectados por detectores ópticos apropiados, el detector transforma en impulsos eléctricos los cuales son medidos y registrados por computadoras.

Cada célula causa dispersión de la luz excitada, la intensidad de esta dispersión es una función del tamaño, forma y estructura de la célula, el centelleo resultante de la dispersión de luz es registrado por un detector individual. Así el contenido celular de varios constituyentes marcados y teñidos con fluorescencia a diferentes longitudes de onda son registrados para cada una de las células. Esta técnica hace posible distinguir subpoblaciones de células de linfocitos (134).

Adicionalmente como elementos auxiliares para establecer el diagnóstico de infección por VIH es posible detectar secuencias genómicas del VIH en linfocitos de sangre periférica, luego de que estas hayan sido amplificadas mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Este método es más especializado y sólo ocasionalmente se practica en los laboratorios clínicos de rutina (64).

REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA (PCR):

La reacción de polimerasa en cadena es una nueva técnica para la amplificación " in vitro " de segmentos de DNA específicos. Es una prueba altamente sensible para detectar DNA y RNA de virus de inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I) y otros virus (94).

En esta prueba se necesitan secuencias de ácido nucleico viral o "primers", son derivados de los genes "gag" y/o "pol" del VIH las cuales son las regiones más conservadas del genoma viral (94).

Para que esta prueba se lleve a cabo se requiere la acción de dos "primers", así como la acción de una enzima la polimerasa "taq", la cual es una polimerasa termoestable que se usa para extender los "primers" (43).

La prueba de PCR incluye tres pasos principales: desnaturalización, unión y polimerización del DNA. En la desnaturalización se extrae el DNA a altas temperaturas, seguido de una disminución de ésta para destruir la actividad de otras enzimas. Una temperatura relativamente baja es entonces utilizada para unir los "primers" a la región complementaria de la cadena simple de DNA previamente desnaturalizado (43).

En el paso de polimerización la enzima polimerasa incorpora nucleótidos dentro de la cadena que se va a formar, produciendo una copia complementaria a la secuencia de DNA especificada por el "primer". Esto se lleva a cabo a una temperatura superior a la del paso de unión. Con estos tres pasos se forma un ciclo de PCR, el cual se repite muchas veces para amplificar el DNA a escala logarítmica (43).

El paso de amplificación se realiza para la replicación de una secuencia específica de DNA. El producto genético amplificado es entonces detectado por pruebas específicas para secuencias amplificadas, radio o enzima marcadas o electroforesis en gel de agarosa (43).

La secuencia de este material genético específico indica un resultado positivo y la ausencia de este material indica un resultado negativo.

Aunque la técnica de PCR no ha sido adoptada como prueba de diagnóstico de rutina, ha demostrado utilidad clínica en varias áreas que incluyen: (52).

1. La detección de secuencias de DNA de HIV durante infección temprana o antes de la seroconversión.
2. Resolución del estado de infección de individuos con resultados serológicos determinados.

3. Resolución del estado de infección de recién nacidos cuyas madres son seropositivas.

4. Monitoreo de cantidad viral en pacientes que recibieron agentes terapéuticos.

5. Descripción de variabilidad genética entre VIH aislado (52).

Otros parámetros de laboratorio, además de la cuenta de linfocitos CD 4⁺ y CD8⁺ y reacción de polimerasa en cadena, que han demostrado tener una significancia pronóstica para detectar la progresión de VIH son: el antígeno p 24 libre en plasma, el cual se encuentra presente en las fases iniciales de el proceso pero también puede demostrarse en las fases tardías de la enfermedad y la β 2-microglobulina (β 2M). El aumento de la concentración sérica de la β 2-microglobulina es inversamente proporcional a la disminución del número de células T CD4⁺ (64).

C A P I T U L O I I I

P L A S M A F E R E S I S

CAPÍTULO III. PLASMAFERESIS

Las primeras transfusiones de sangre humana se realizaron con sangre total, fué una práctica común desde la primera guerra mundial (1914-1918). Con el advenimiento de equipos de extracción plásticos, diversos componentes de la sangre pudieron ser aislados y conservados durante periodos variables. En 1918, se publicó en el British Medical Journal, que el plasma podía ser separado de los hematíes y utilizarse para resucitar soldados en estado de choque. Posteriormente con la introducción de diversos separadores celulares sanguíneos, se llegó a obtener selectivamente un producto sanguíneo, mediante procedimientos de hemaféresis (45,67,170).

El procedimiento de hemaféresis permite remover selectivamente uno o más componentes de la sangre " in vivo", regresando el resto al individuo. Mediante citoféresis es posible obtener las diferentes células sanguíneas, así el proceso de separación de plaquetas es llamado plaquetoféresis, mientras que el de leucocitos se denomina leucoféresis. El proceso de separación de eritrocitos se llama eritrocitoféresis (fig. III-1) (112).

La plasmaféresis es un procedimiento por el cual se extrae sangre total de un donante, se impide su coagulación y se separa el plasma del paquete celular por métodos continuos o discontinuos. Las células sanguíneas separadas se devuelven al donador por infusión intravenosa (14).

El término " plasmaféresis " se deriva del griego " apheresis " que significa separar o quitar, fué primero usado por Abel en 1914 para describir la remoción del plasma con retorno de hematíes al donador (77,140,161).

Las primeras técnicas de plasmaféresis fueron métodos manuales difíciles de manejar y no tenían propósitos terapéuticos. Durante la segunda guerra mundial (1939-1945), se llevaron a cabo para obtener plasma útil en el

tratamiento de soldados heridos. Fué hasta 1960 que se dispuso de máquinas de plasmaféresis con las que se podían obtener grandes volúmenes de plasma. Este plasma es utilizado para transfusión o para obtener productos terapéuticos mediante su posterior fraccionamiento (14,77,161).

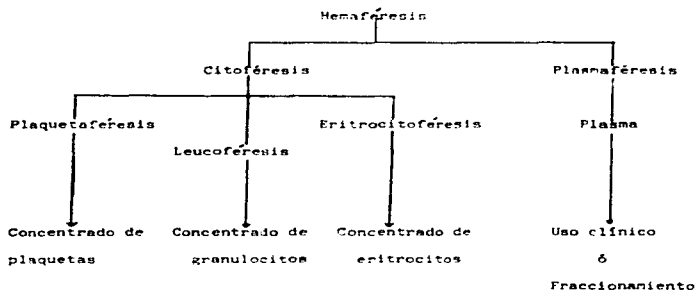


Fig. III.1. Principales componentes obtenidos por hemaféresis (14).

III.1. SELECCIÓN DE DONADORES EN PLASMAFÉRESIS

La plasmaféresis se puede llevar a cabo en tres niveles:

- 1) Los donadores dan plasma con la misma frecuencia que para sangre completa.
- 2) El volúmen de plasma y la frecuencia de donaciones son dos o tres veces más que las permitidas para donaciones de rutina.
- 3) de 1,000 ml a 1,200 ml de plasma pueden colectarse semanalmente cuando el donante ingresa a un programa supervisado, alcanzando un volumen anual de 50 a 60 litros, dependiendo del peso y el nivel de proteínas del donador (14,140).

Los criterios de selección para un donante de plasma son generalmente los mismos que para sangre completa. Cuando el donante ingresa en un programa permanente se deberá someter además a los siguientes exámenes, que se repetirán cada cuatro meses.

a) Determinación de proteínas séricas totales: se deberá tener una concentración mínima de 60 gramos por litro.

b) Electroforesis de las proteínas séricas: determinación de la albúmina y de las globulinas alfa-1, alfa-2, beta y gamma.

c) valoración de las inmunoglobulinas G y M.

Se deberán observar las disposiciones siguientes:

1. El volúmen plasmático máximo extraído por sesión no excederá del 15% del volumen sanguíneo total.

2. Entre cada plasmaféresis óptimamente realizada, deberá haber un lapso mínimo de 48 horas.

Si el donante cumple con los requisitos establecidos, ingresa a la sala de plasmaféresis donde se lleva a cabo el procedimiento (77,104,208).

III.2. PROCEDIMIENTO DE PLASMAFERESIS

Los métodos actualmente disponibles se basan en métodos de separación por centrifugación (flujo continuo o discontinuo) y separación por filtración (fibra porosa y membrana giratoria).

Los procedimientos de plasmaferesis pueden ser de dos tipos: plasmaferesis manual y automatizada. La plasmaferesis manual utiliza el método de separación por centrifugación de flujo discontinuo (CFC) y la plasmaferesis automatizada se realiza por varios métodos: centrifugación de flujo discontinuo (CFD), centrifugación de flujo continuo (CFC) y filtración. Ambos procedimientos requieren de un acceso vascular así como del uso de sustancias anticoagulantes (151,161).

III.2.1. PLASMAFERESIS MANUAL

La técnica manual es simplemente una colección de sangre completa, en doble secuencia, la cual se separa en eritrocitos y plasma, con retorno de los hematíes al donador; el proceso se repite con la colección de una segunda unidad de sangre completa que también se separa en plasma y eritrocitos, de este modo se obtienen de 500 a 600 ml de plasma en un tiempo aproximado de 80 a 100 minutos (69).

En esta técnica se utiliza un sistema cerrado de bolsas de plástico múltiples. Cada una de las bolsas primarias está conectada a una o dos bolsas satélites para transferencia de plasma (151).

PROCEDIMIENTO:

1. Se prepara el sistema de colección y al donador se le ayuda a tener una posición confortable.

2. Se lleva a cabo el proceso de venipuntura (como en obtención de sangre completa).

3. Se observa la presencia de flujo sanguíneo continuo. Se mueve ligeramente la bolsa de colección a intervalos de aproximadamente 50 ml de colección para asegurar una mezcla adecuada con anticoagulante. El citrato es el más frecuentemente utilizado en procedimientos de aféresis (ACD y CPD).

4. Después que han sido colectados 450 ml se presiona la tubería arriba de la conexión en " Y " para después cortar a aproximadamente una pulgada arriba del nudo hecho anteriormente a la tubería.

5. Obtener muestras para laboratorio y espezar la infusión salina.

6. Centrifugar la bolsa de sangre en una centrifuga refrigerada (4°C) para obtener plasma. Mientras tanto se hace pasar por la tubería solución salina normal. Se coloca la bolsa en un extractor de plasma y se libera este dentro de la bolsa de transferencia. Se resuelve la bolsa primaria, se corta y se sella. Esta bolsa contendrá los eritrocitos que serán retornados al donador.

7. Se coloca la bolsa de hematíes para administrarse y reinfusionarse al donador. Se cierra la solución salina normal y se abre la línea de eritrocitos. Se regula el flujo y se infunden las células rojas rápidamente. en caso de hormigueo alrededor de la boca o en la punta de los dedos la infusión se hará más lentamente (fig. III.2.) (69,77,151,212).

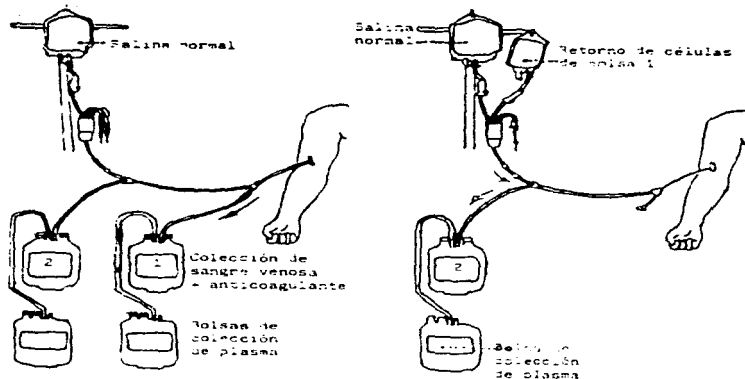


Fig. III.2. Plasmaféresis manual 82

En esta técnica se utiliza un sistema cerrado de bolsas de plástico múltiples. Cada una de las bolsas primarias está conectada a una bolsa satélite para transferencia de plasma. Se colecta la primera unidad de sangre completa, se sella y se corta la tubería. Se hace pasar por ésta solución salina normal. La unidad es centrifugada y el plasma pasa a la bolsa de colección. Se coloca la bolsa de remanentes para reinfundirse al donador. El proceso se repite con la segunda unidad.

III.2.2. PLASMAFÉRESIS AUTOMATIZADA

Los procedimientos de aféresis automatizada requieren de un buen acceso venoso. Existen varias máquinas diseñadas exclusivamente para remoción de plasma y se basan en el principio de separación de componentes sanguíneos por fuerza centrífuga o por filtración. Las máquinas requieren tubería catérril especial y contenedores. El anticoagulante se adiciona por vía controlada. Estas máquinas tienen algunos dispositivos especiales modernos como son sensores de presión, microfiltros, detectores de aire, bombas de vacío, velocidad de centrifugación, dependiendo del sistema. Es esencial que se cuente con operadores y supervisores que faciliten la atención médica en caso de presentarse efectos adversos inesperados (69,105,140).

CENTRIFUGACIÓN DE FLUJO DISCONTÍNUO (CFD)

El procedimiento de CFD se lleva a cabo en ciclos. La sangre del donador se obtiene con ayuda de una bomba y fluye a una velocidad aproximada de 100 ml/min hacia una procesadora, la que consiste de una centrifuga transparente en forma de campana, la cual rota a una velocidad fija (aproximadamente 1600 rpm) (77,161).

El anticoagulante ACD se adiciona al sistema de flujo. Estos equipos poseen sensores que detectan flujos sanguíneos bajos, retardando el flujo de anticoagulante para mantener una apropiada dilución de la sangre (161).

La sangre sin coagular pasa hacia la unidad procesadora, en donde los componentes se separan de acuerdo a sus gravedades específicas. Los componentes celulares más densos quedan distribuidos en las partes laterales de la campana, el plasma fluye de la centrifuga a través de un orificio de salida y se colecta en bolsas externas (fig. III.3) (77).

En este sistema el procesamiento sanguíneo se detiene cuando la centrifuga se llena de heparina. Una centrifuga estándar tiene una capacidad de 350 ml, el paquete celular se renueva al donador por infusión intravenosa con lo que se completa un ciclo. Cada ciclo renueva aproximadamente de 400 a 700 ml de plasma. Este proceso se repite hasta que se obtiene la cantidad deseada de plasma (9,77,101).

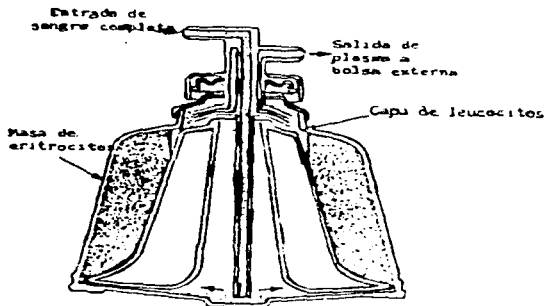


Fig. III.3. Procedimiento de centrifugación de flujo discontinuo (CFD). Unidad procesadora (83).
 La sangre pasa hacia la unidad procesadora, en donde los componentes se separan de acuerdo a sus gravedades específicas. Los componentes celulares más densos quedan distribuidos en las partes laterales de la cámara, el plasma fluye de la centrifuga a través de un orificio de salida y se colecta en bolsas externas.

CENTRIFUGACIÓN DE FLUJO CONTÍNUO (CFC).

En el procedimiento de CFC, la obtención, procesamiento y retorno de la sangre al individuo ocurre simultáneamente. El anticoagulante que se utiliza es heparina (80 UI/min). Se necesitan dos sitios de venipuntura para la obtención y el retorno continuo de la sangre durante el procesamiento. La sangre se obtiene del sitio de venipuntura con ayuda de una tórta; se mezcla con anticoagulante y se colecta en la unidad de procesamiento (Arnico IBM 2997, Fenwal CS-3000) (09.77.05).

La separación de los componentes se lleva a cabo por centrifugación y el plasma se obtiene en una bolsa de colección. Los eritrocitos (junto con los leucocitos) son devueltos continuamente al donador vía el segundo sitio de venipuntura. El tiempo requerido para coleccionar 500 ml de plasma varía de 28 a 40 minutos (Fig.III.4) (16).

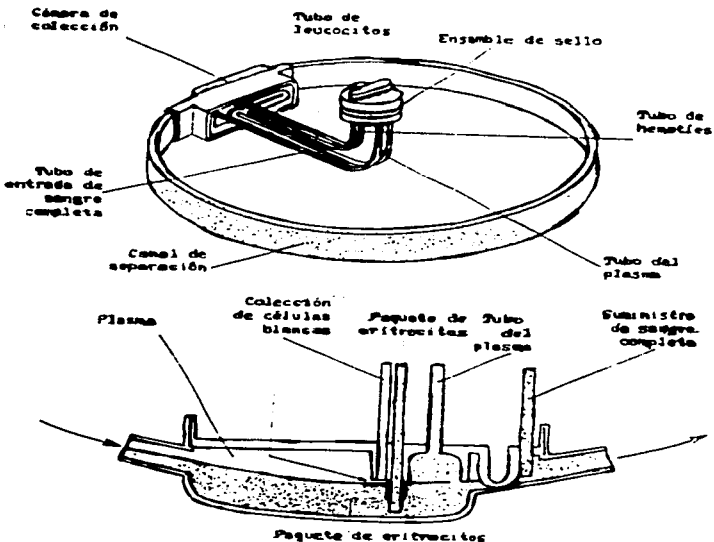


Fig. III.4. Procedimiento de CFC en 12V 299 Model. El diagrama de botón es una sección transversal de la cámara de colección (77).

La sangre entra a través de una cámara de colección y al ser centrifugada se separa en sus diferentes componentes, cada uno de los cuales se colecta en un tubo de colección. El plasma se transfiere a una bolsa de colección.

MÉTODOS DE FILTRACIÓN

En estos métodos se utilizan técnicas automatizadas, que generalmente son de dos tipos: a) filtración por fibra porosa como en el sistema Organon Teknika Plasmapur, CPS-10 Capillary Plasma Separator; b) filtración por membrana giratoria (por ejemplo el sistema Hema Science Autopheresis-C).

Los métodos de filtración utilizan una membrana para separar el plasma de los componentes celulares de la sangre, mediante procesos continuos ó discontinuos. La porosidad de la membrana es tal que todos los elementos celulares son excluidos y los componentes plasmáticos son filtrados.

Las soluciones anticoagulantes que se pueden utilizar son heparina y ACD al 1.35 %. Antes de la separación del plasma un bolus de 3000 a 5000 UI de heparina es inyectado en el sistema extracorporeal, seguido por una infusión continua de 500 a 2000 UI/ h (26,69,149,151).

a) Filtración por fibra porosa:

En esta técnica se utiliza una membrana cuyo tamaño de poro es pequeño (0.2 - 0.7 μ m) y resisten una determinada presión por ejemplo 100 mm de Hg. Las membranas pueden ser fabricadas por diversos materiales como nylon diacetato de celulosa, polisulfonato, policarbonato. Pueden presentar problemas potenciales como su labilidad a romperse o daño celular (160,161).

Los laboratorios Fenwal han desarrollado una membrana de polisulfonato que tiene forma de lámina doblada sobre sí misma, cuya superficie es de 400 cm^2 y un diámetro de poro de 0.6 μ m. Esta membrana está alojada en una celda de filtración, la cual consiste de dos cubiertas externas (C) y dos placas internas flexibles (B) que soportan la membrana (A). La sangre completa entra en uno de los extremos de la celda de filtración (F) y pasa a través de la membrana. El plasma pasa a través de los poros y es canalizada

en la placa interna hacia el extremo de la salida de la celda, donde es depositado (5) en una bolsa de colección. Los elementos celulares son retenidos por la membrana y salen posteriormente hacia un orificio de salida de la celda (7) (fig. III.5) (3,140).

La velocidad de flujo sanguíneo óptimo para filtrar es de 100 ± 20 ml/min. Estos sistemas utilizan bombas para controlar la obtención de sangre, la adición de anticoagulante y la recirculación de la sangre a través de la celda. Algunos cuentan con monitores de presión que detectan algún exceso de presión en la membrana. Otros poseen monitores que determinan la presencia de aire en el circuito, ruptura de la membrana o hemoglobina libre (hemólisis). El volumen de sangre procesado y el volumen de sangre colectada también son continuamente monitoreados (69,73).

La sangre se extrae y se bombea al sistema previamente heparinizado. La sangre se filtra a través de la membrana y el plasma se separa de los elementos celulares, los cuales se regresan al donador a intervalos regulares. El tiempo de colección de 500 ml de plasma es de 35 a 45 minutos (5).

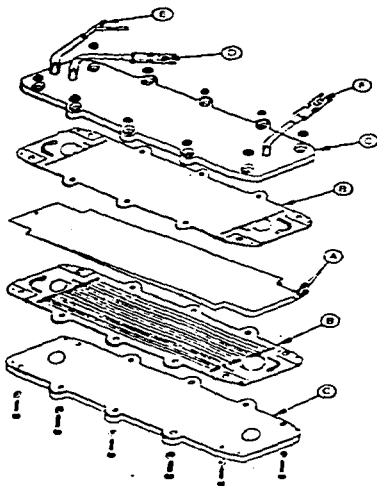


Fig. III.5. Partes que componen la celda de filtración usada durante plasmaféresis (79). La celda de filtración contiene una membrana y consiste de dos cubiertas externas (C) y dos placas internas flexibles (B) que soportan la membrana (A). La sangre completa entra en uno de los extremos de la celda de filtración (F) y pasa a través de la membrana. El plasma pasa a través de los poros y es canalizado en la placa interna hacia el extremo de la salida de la celda, donde es depositado (E) en una bolsa de colección. Los elementos celulares son retenidos por la membrana y salen posteriormente hacia un orificio de salida de la celda (D).

b) Filtración por membrana giratoria

Este procedimiento se basa en las técnicas de centrifugación y filtración. El equipo de procedimiento consta de una cámara de separación que es similar a una jeringa de 100 ml, la cual rota a un sistema magnético integrado y en ella se encuentra adherida una membrana formando un sistema cerrado. También cuenta con reguladores de presión y detectores de aire para prevenir accidentes (69,166).

La sangre que se obtiene del donador es bombeada hacia la cámara de separación donde se centrifuga; el plasma obtenido pasa a través de la membrana para ser transportado a una bolsa de colección. Los elementos celulares son entonces devueltos al donador cuando se ha colectado aproximadamente una unidad de sangre. Este proceso utiliza una aguja simple, funciona como un sistema de flujo discontinuo. Aproximadamente se requieren de 30 a 40 minutos para colectar de 500 ml a 600 ml de plasma (69,79).

III.3. COMPARACIÓN ENTRE PLASMAFÉRESIS MANUAL Y AUTOMATIZADA

Plasmaféresis manual: es un procedimiento que requiere de un solo sitio de venipuntura, es de bajo costo y el equipo utilizado no es muy sofisticado. Representa una alternativa disponible cuando las venas del donador son resistentes a las demandas del equipo automatizado (69,77).

Sin embargo, el tiempo del procedimiento es prolongado; el plasma obtenido se encuentra frecuentemente contaminado con leucocitos, plaquetas y algunos eritrocitos, lo que implica que no se obtiene puro, aunque no se ha demostrado todavía que sea perjudicial para derivados del plasma colectado por este procedimiento. Por otra parte, la cantidad de plasma es mucho "e-

nor que en técnicas automatizadas, es un proceso poco aceptado tanto por el donador voluntario como por el personal que lo lleva a cabo. (89,146).

Plasmaféresis automatizada: En este procedimiento se obtiene una mayor cantidad de plasma en un tiempo menor que en la técnica manual. No representa riesgos para el donador por lo que es mejor aceptado que el método manual. En este método los donadores nunca se desconectan de sus propios hemafíes, así eliminan riesgos de transfusión de eritrocitos de otro donador. También han observado que el volumen extracorporeal es menor en algún momento del procedimiento, particularmente por filtración, que en la plasmaféresis manual. La máquina se maneja más fácilmente por ser automatizada y requiere poca asistencia del operador (26,64).

Una desventaja de este método es el alto costo del equipo; en algunos procedimientos (por ejemplo en CFC), se requieren dos sitios de venipuntura en el modelo 50 Haemonetics parece ser que el plasma contiene algunas plaquetas, las cuales no son removidas y reducen la calidad del plasma destinado para fraccionamiento (77,146).

Tabla III.1. Plasmaféresis manual contra automatizada

	Manual	Automatizada
tiempo, minutos	80-100	30-45
volumen, mililitros	500-600	500-600
seguridad del donador	regular	excelente
aceptación del donador	pobre	buena
aceptación del personal	regular	buena
costo del software	bajo	muy alto

III.4. REACCIONES ADVERSAS A LA PLASMAFERESIS

Al igual que otro procedimiento médico que implique el tratamiento de individuos, la plasmaferesis se puede acompañar de reacciones adversas. Casi todas son leves y pasajeras, pero ocasionalmente se puede dar alguna reacción grave. Aunque la posibilidad de reacciones adversas sea remota, se debe prever y se han de tomar las providencias apropiadas para atender al donante. Es indispensable que el personal de los servicios de plasmaferesis esté capacitado para prestar atención de urgencia. En caso de cualquier reacción adversa se deberá recurrir a un médico que se haga cargo del donante (14).

Síncope vasovagal. Puede ocurrir principalmente entre los nuevos donantes. Los signos y síntomas son hipotensión, bradicardia, síncope, sudor y raras veces convulsiones; al iniciarse las manifestaciones clínicas se intentará convencer al donante de que su reacción es relativamente leve. Se aumentará el volumen de plasma por medio de solución salina o de una infusión de los propios eritrocitos puestos en una infusión y se le colocará con la cabeza baja. En caso de desfallecimiento se emplearán inhalaciones de amoníaco, pero raras veces son necesarios agentes vasopresores (14).

Reacciones hemolíticas por transfusión. Estas reacciones no deben ocurrir, puesto que obedecen a la infusión accidental de eritrocitos incompatibles. El personal que interviene en los procedimientos de reinfusión debe estar adecuadamente capacitado para evitar este tipo de accidentes. Los signos y síntomas son hipotensión, respiración superficial, dolor de estómago o en los costados, aprensión, cianosis y hemoglobinuria (14).

Si esto ocurre se deberán interrumpir las infusiones de eritrocitos a

todos los donantes en el centro de plasmáferesis hasta que se haya terminado de llevar a cabo los procedimientos de reidentificación correspondientes. Se recomienda la administración de oxígeno, manitol, furosemida, heparina, dopamina y corticosteroides por vía intravenosa. El tratamiento se deberá orientar a que se aumenten la irrigación renal y la producción de orina. Los donantes afectados se trasladarán con prontitud a un hospital donde puedan recibir atención especializada (50).

Infección, inflamación y hematoma en el sitio de la venipuntura. La manera más conveniente de evitar este tipo de reacciones consiste en preparar adecuadamente el sitio donde se hará la punción venosa y capacitar a los encargados de realizar la venipuntura en los métodos apropiados para iniciar la extracción de sangre. Las manifestaciones son dolor circunscrito, e hinchazón en el sitio de la venipuntura (14).

Se aplicarán compresas de hielo en el sitio afectado tan pronto como sea posible antes de que transcurran 24 horas, después de lo cual se podrá indicar la aplicación de calor. En los casos de infección se emplearán antibióticos (140).

Reacciones anafilactoides. Estas reacciones pueden ocurrir durante la administración de solución salina al donante en tanto se termina de preparar la suspensión de eritrocitos o al hacer la reinfusión de éstos. Los signos y síntomas son urticaria, ardor de garganta, sensación de estrechez torácica, estertores sibilantes, dolor abdominal e hipotensión (14).

Se debe administrar de preferencia epinefrina por vía subcutánea; también pueden ser útiles los antihistamínicos y corticosteroides (14).

C A P I T U L O I V

F R A C C I O N A M I E N T O D E L P L A S M A

CAPÍTULO IV. FRACCIONAMIENTO DEL PLASMA

En el procedimiento llamado fraccionamiento, un producto es separado de un gran volumen de plasmas (pool de plasmas) para obtener un derivado del plasma, como concentrado de factor VIII, concentrado de complejo protrombínico, albúmina e inmunoglobulinas (104,179).

La tecnología del fraccionamiento del plasma ha sido un área de continua investigación. Desde 1920, ya se había visto la importancia que tenía el plasma en estados de enfermedad, en los cuales se presentaban cambios en sus diversos componentes (35).

La mayoría de los componentes del plasma son proteínas y han sido estudiados por diferentes investigadores debido a su disponibilidad y fácil aislamiento. Con el descubrimiento de la electroforesis en 1937, un proceso para la separación de proteínas plasmáticas en componentes puros, se dió con la "clave" para el fraccionamiento del plasma (35).

Este fué estimulado por la necesidad de encontrar un expansor de volumen sanguíneo de origen natural que proporcionara la acción oncótica necesaria y estuviera exento del peligro de transmitir enfermedades (35).

Esta necesidad aumentó durante la segunda guerra mundial, debido a la gran demanda de plasma y sus fracciones. Edwin Joseph Cohn, profesor de la escuela de medicina de Harvard, en Boston, USA, desarrolló en 1946 un sistema de fraccionamiento basado en precipitación con disolventes orgánicos para obtener albúmina. A partir de este hecho aparecieron más sistemas de fraccionamiento, como el método 9 de Oncley en 1949, y en Europa, el método de Kistler y Nitachman en 1962 (35).

El desarrollo de diferentes métodos de fraccionamiento usando etanol, disminuyó considerablemente el tiempo de proceso, sin embargo, no siempre

se pudo controlar la desnaturalización proteínica, por lo que se desarrollaron nuevos métodos para tratar de reducir este riesgo (32).

Algunas sustancias que han sido utilizadas en lugar de etanol para la obtención de albúmina y gammaglobulina son: etil éter, rivanol seguido de sulfato de amonio, cloroformo, ácido tricloroacético y polielectrolitos en fase sólida. Solo algunas de ellas han sido utilizadas en lugar de etanol para fraccionamiento a gran escala principalmente en Europa (35).

Un procedimiento utilizando polietilenglicol (PEG) ha sido usado para el fraccionamiento de proteínas. Tres procedimientos cromatográficos han sido empleados en la preparación de componentes del plasma: filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, algunos componentes obtenidos por estos procedimientos son: albúmina, gammaglobulinas y factor VIII (32).

En los últimos años se ha incrementado el uso de las fracciones del plasma, principalmente del factor VIII y de albúmina a nivel mundial. Uno de los mayores riesgos que presenta el utilizar " pool " de plasma como materia prima para el fraccionamiento es la transmisión de enfermedades virales, principalmente hepatitis y SIDA, por lo que se han desarrollado métodos para inactivar a estos virus durante la obtención de éstos derivados plasmáticos (97).

Los principales métodos de fraccionamiento se clasifican en forma general de la siguiente manera: (20,35,179).

IV.1. Precipitación

IV.2. Filtración en gel

IV.3. Cromatografía de intercambio iónico

IV.4. Afinidad cromatográfica

IV.1. FRACCIONAMIENTO POR PRECIPITACIÓN

Dentro de este tipo de fraccionamiento se encuentran los siguientes métodos (47).

IV.1.1. Con sulfato de amonio

IV.2.1 Con etanol

IV.1.3. Con rivanol

IV.1.4. Con polietilenglicol (PEG)

IV.1.1. Precipitación con sulfato de amonio.

Es la sustancia más ampliamente utilizada para fraccionamiento de proteínas a gran escala. Su uso se debe al estudio realizado por Paul Hufmeister, en 1890 en la universidad de Praga, quien determinó la relación existente entre la solubilidad de las proteínas y la concentración de las sales neutras (47).

El sulfato de amonio puro es una sal de una base débil y un ácido fuerte. La superficie de las proteínas posee una carga eléctrica, la solubilización salina estabiliza los grupos cargados de las proteínas, la precipitación salina representa una competencia entre la proteína y la sal respecto al agua. Al aumentar la concentración de la sal, ésta desplaza al agua, que se transforma en agua de hidratación alrededor de los iones cargados de la sal. Esto significa la formación de agregados proteínicos que precipitan (47).

El sulfato de amonio es frecuentemente utilizado como un paso de separación inicial para obtener una fracción enriquecida de una proteína particular y también ayuda a concentrar la proteína deseada antes de ser purificada por otros métodos como cromatografía de intercambio iónico (40).

La sal ha sido usada para fraccionamiento del plasma a nivel industrial. Este procedimiento ha sido combinado con precipitación con rivanol.

IV.1.2. Precipitación con etanol

E. J. Cohn en 1946, reemplazó el método de precipitación con sulfato de amonio, comúnmente utilizado por el método de precipitación con etanol, que desarrolló a pequeña escala para obtener proteínas (47).

Trabajando con concentraciones de 0% a 40% de etanol observó que en general, la solubilidad de la mayoría de las proteínas disminuye rápidamente con el aumento en la concentración de etanol (40).

Al trabajar a bajas temperaturas se minimiza el efecto de desnaturalización de proteínas, lo cual es un riesgo que presentan los solventes orgánicos y disminuye la cantidad requerida de solvente para precipitación (40).

En este método se toman en consideración algunas de las propiedades fisicoquímicas del etanol como son: su solubilidad con el agua, que no genera mezclas explosivas bajo condiciones normales ambientales y de trabajo, es altamente volátil, químicamente inerte y de baja toxicidad (47).

El etanol es un agente precipitante a bajas temperaturas. Variando la concentración de etanol y la temperatura, las diferentes proteínas plasmáticas pueden precipitar en diferentes fracciones. Diversos factores influyen en ésta acción como son: pH, fuerza iónica, temperatura, concentración de proteínas y concentración de etanol; por ello a este procedimiento se le conoce como "sistema de cinco parámetros". El etanol causa precipitación de proteínas principalmente debido a que disminuye la constante dieléctrica del medio. En un medio de baja constante dieléctrica se incrementan las interacciones entre las moléculas de proteínas por su diferencia de cargas y así la solubilidad disminuye (47).

Después de los primeros trabajos de Cohn, la mayoría de procesadores de plasma, aún siguen fraccionando con los métodos básicos de etanol. El método 6 de Cohn, el 9 de Oncley y el método 10 de Cohn, así como el de Deutch, han pasado por muchas modificaciones de investigadores de todo el mundo. Esto fué para intentar economizar la producción y obtener buenos rendimientos de las pocas proteínas que tienen uso terapéutico (47).

El plan original de Cohn fué separar una serie de fracciones proteínicas bajando sucesivamente los puntos isoeléctricos mediante el ajuste de pH ácido a neutro. El fraccionamiento se analizaba con electroforesis de las fracciones proteínicas, la cual describe el sistema de proteínas en términos de carga neta en los diferentes componentes y consecuentemente tiende a identificar componentes en términos de su punto isoeléctrico. Uno de los más exitosos esquemas de fraccionamiento para plasma es el método 6 de Cohn (fig. IV.1.) (40,47).

Algunos años después de que el trabajo de Cohn fué publicado. Nitachman y Kistler en 1945 y 1962 introdujeron un procedimiento modificado que es grandemente simplificado y permite la preparación de los principales componentes, el "precipitado IV", semejante a la fracción IV de Cohn, puede ser omitido si no requiere la pureza máxima de albúmina (47).

La distribución aproximada de proteínas y sus fracciones se muestran en las tablas IV.1 y IV.2.

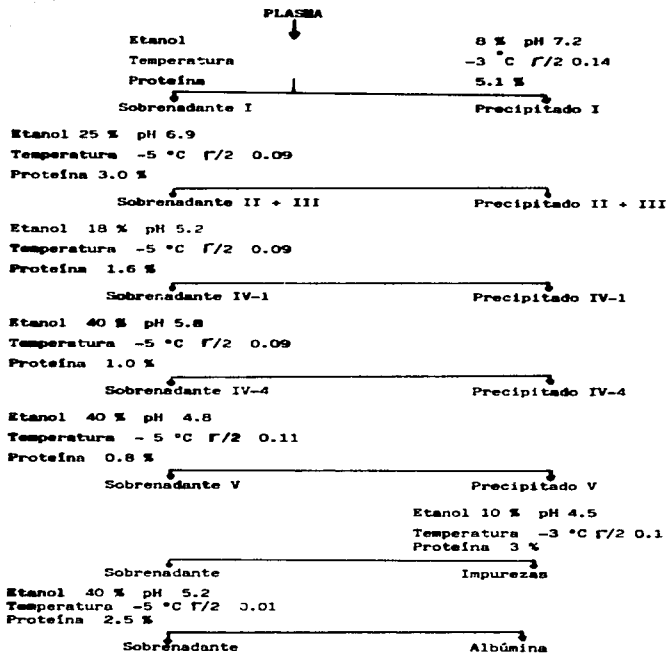


Fig. IV.1. Método 6 de Cohn (45).

Tabla IV.1. Distribución de las proteínas del plasma en las fracciones individuales obtenidas por el método 6 de Cohn (6)

Fracción	Recuperación aproximada de proteínas (% de inicio)	Componentes
I	5 - 10	Fibrinógeno Factor VIII de coagulación Clq, C1r, C1s Globulina insoluble fría
II + III	25	μ -globulinas: IgG, IgA, IgM Factores de coagulación II, VII, IX y X
IV-1	5 - 10	α - y β -globulinas α_1 -antitripsina IgM Antitrombina III Componentes del complemento
IV-4	5 - 10	α y β -globulinas Ceruloplasmina Haptoglobina Transferrina
V	50 - 60	Albumina α y β -globulinas

Tabla IV.2. Distribución de proteínas del plasma en sus fracciones individuales por el método de Kistler y Nietschmann (1962) (61)

Fracción	Recuperación aproximada de proteínas (% de inicio)	Componentes
I	5 - 10	Fibrinógeno Factor VIII de coagulación Clq, C1r, C1s Globulina insoluble fría
Precipitado B	20	α y β -globulinas Plasminógeno Ceruloplasmina Factores de coagulación II, VII, IX y X Ig ^M
Precipitado "IV"	10 - 15	α y β -globulinas Transferrina Transcobalamina Ceruloplasmina Albúmina
Precipitado C	50	Albúmina α y β -globulinas Gonadotropina pituitaria
Precipitado GG	10	δ -globulinas IgG (IgA) α y β -globulinas Albúmina

IV.1.3. Precipitación con rivanol

La precipitación con rivanol se desarrolló originalmente como un método de laboratorio simple y rápido para el aislamiento de gammaglobulinas de plasma o suero. El rivanol es 2-etil-6,9-diaminocridina lactato. Es una sustancia amarilla, brillante, rápidamente soluble en agua. Ha sido utilizada en el humano en pequeñas dosis como un desinfectante intestinal (47).

En la precipitación de las proteínas plasmáticas con rivanol son de importancia dos factores: el pH y la cantidad del reactivo, además del tiempo de contacto del reactivo con las proteínas en solución. A pH entre 5 y 7 es posible llevar a cabo la precipitación más restrictiva y más específica. Variaciones en las condiciones de pH permiten obtener una fracción más enriquecida de la proteína deseada. El rivanol es una sustancia orgánica básica, se cree que fuerzas electrostáticas están involucradas en la formación del complejo entre el rivanol y las proteínas plasmáticas, pero este mecanismo podría no ser exclusivo. No se ha desarrollado una teoría molecular más comprensible. El precipitado formado es un complejo proteína-rivanol que puede ser separado, disolviendo el precipitado en una solución amortiguadora a un pH ácido, seguido por precipitación con etanol. El residuo del reactivo puede ser removido por adsorción sobre carbón, alaidón insoluble, fosfato de calcio y otros adsorbentes (47,78).

La precipitación con rivanol puede ser combinada con otros procedimientos de fraccionamiento, por ejemplo con sulfato de amonio para obtener IgG y albúmina (78).

IV.1.4. Precipitación con polietilenglicol (PEG)

El PEG es un polímero sintético, no tóxico, soluble en agua y fue utilizado como precipitante por Stocking y Albertson, sin embargo, tomó mayor importancia con el trabajo de Polson quienes lo utilizaron para purificar inmunoglobulinas y fibrinógeno de plasma humano (47).

Se ha reportado que el PEG no incrementa la temperatura de la solución por lo que se puede trabajar a temperaturas mayores de 0 °C sin afectar la naturaleza de la proteína; también el tiempo requerido del proceso es más corto, por esto, se puede emplear como método alternativo al etanol y otros solventes orgánicos (47).

El mecanismo de precipitación con PEG no se encuentra completamente establecido. Se atribuye a un proceso de exclusión por el cual las proteínas son excluidas estéricamente de las regiones del solvente ocupadas por la cadena de polímeros sintéticos. El PEG incrementa el potencial químico de las proteínas excediendo el de la fase sólida en la cual la precipitación ocurre. En las últimas décadas, el PEG ha sido empleado para purificar factor VIII, albúmina, complejo protrombínico y antitrombina III (6,32).

IV.2. FRACCIONAMIENTO POR FILTRACIÓN EN GEL

La cromatografía en gel, es un tipo especial de cromatografía de reparto, en la que la separación se basa en el tamaño molecular (61).

Es un método para la separación de sustancias de diferentes tamaños moleculares. utiliza materiales porosos (geles). Un gel es un retículo tridimensional cuya estructura se dispone, por lo general al azar. Los geles que se utilizan como tamices moleculares, constan de polímeros entrecruzados, por lo general inertes, que no se unen ni reaccionan con el material analizado y que no presentan carga eléctrica. El espacio del interior del gel está ocupada por un líquido que rellena la mayor parte del gel. Los geles

más comunmente utilizados son: dextranos (Sephadex), agarosa (Sephacrose, Biogel A), poliacrilamida (Bio-Gel P) y poliestirenos (Bio-Beads S). Estos geles pueden estar suspendidos en solución amortiguadora, agua u otras sustancias y empacados en una columna. Si se hace pasar una disolución con moléculas de distintas dimensiones a través de la columna, las moléculas mayores que los poros se mueven más rápidamente que las pequeñas, debido a que estas últimas se mueven por el interior y el exterior de los poros, con una probabilidad que aumenta a medida que disminuye el tamaño molecular. Debido a ello, su movimiento de descenso a través de la columna se hace más lento. La probabilidad de penetración es el factor principal que determina la velocidad de movimiento a través de la columna, puesto que el gel no adsorbe las moléculas. Por lo tanto, las moléculas son eluidas de la columna por orden de tamaños decrecientes o por orden de pesos moleculares decrecientes (123,213).

IV.3. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Una de las modificaciones más significativas del método de Cohn ha sido la introducción de materiales de intercambio iónico para purificar o mejorar la pureza de los productos finales. Este método es ampliamente utilizado en la preparación de concentrado de complejo protrombínico, IgG y en algunos casos en la preparación de albúmina a partir de plasma humano (47).

La principal característica de esta forma de cromatografía es la atracción entre partículas de cargas opuestas (entre la proteína y la resina). Las separaciones por intercambio iónico se llevan a cabo en columnas llenas de una resina que actúa como intercambiador iónico. Existen dos tipos de resinas: las intercambiadoras de aniones, que poseen grupos cargados po-

sitivamente (grupo sulfónico - $\text{SO}_3^- \text{H}^+$) y atraen a las moléculas cargadas negativamente; y las intercambiadoras de cationes, que contienen grupos cargados negativamente (hidróxido de amonio cuaternario: $-\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-$) y atraen a las moléculas cargadas positivamente. Las resinas de intercambio iónico están constituidas por una matriz insoluble que puede estar hecha de diferentes materiales: dextrano, celulosa, copolímeros del estireno y divinilbenzeno. Contienen grupos iónicos que pueden reversiblemente intercambiar cationes o aniones con una solución. Las separaciones de sustancias por resinas de intercambio iónico se consiguen por un mecanismo de adsorción reversible. Consiste en la fijación de sustancias (que poseen carga opuesta a la de iones fijos en la resina) a una resina, siendo una unión de tipo electrostática y reversible, con su posterior remoción. Si las sustancias fijadas tienen diferentes propiedades eléctricas, mediante la variación de pH o de fuerza iónica del eluyente se conseguirá que cada una de ellas eluya por separado (1, 47).

IV.4. FRACCIONAMIENTO POR AFINIDAD CROMATOGRÁFICA

La cromatografía de afinidad es un tipo de cromatografía que utiliza la afinidad específica entre la sustancia que debe aislarse y una molécula a la que ésta puede unirse de forma específica (un ligando) (1).

En una cromatografía de adsorción en la que se utiliza la afinidad de las proteínas a ligandos específicos, los cuales se fijan covalentemente a una matriz insoluble adecuada, que puede ser un derivado de celulosa, dextrano, poliacrilanida, agarosa, ó cuentas de vidrio (1, 216).

Cuando una mezcla de proteínas se pasa a través de una columna, el componente con suficiente afinidad para unirse al ligando es retenido en

este momento la columna es capaz de adsorber de manera específica, a partir de la disolución, la proteína que va a ser aislada. La elución se realiza cambiando las condiciones de forma que la unión ya no tenga lugar (216).

C A P I T U L O V

OPCIÓN DE DERIVADOS DEL PLASMA DE USO TERAPÉUTICO

CAPÍTULO V. OBTENCIÓN DE DERIVADOS DEL PLASMA DE USO TERAPÉUTICO

El plasma sanguíneo puede ser empleado para su uso clínico en forma de numerosos productos como son: plasma fresco congelado, plasma congelado, plasma de recuperación, plasma envejecido y crioprecipitado (104).

Plasma fresco congelado. Es el plasma separado de la sangre total y congelado a -18°C o menos dentro de las ocho horas después de la colección, la pronta congelación de este plasma permite la máxima conservación de los factores lábiles (V y VIII), por lo que puede ser destinado para la preparación de crioprecipitados para incrementar el contenido de factor VIII (111).

Plasma congelado. Es el plasma separado de la sangre total dentro de las 12 horas después de la extracción. Contiene como mínimo el 50 % de los factores V y VIII de la coagulación, se conserva a -30°C hasta por 12 meses. El plasma congelado puede utilizarse para tratar deficiencias de factores de coagulación de leves a moderadas (104).

Plasma de recuperación. Es el plasma separado de la sangre total después que éste ha sido conservado a 4°C durante 24 horas. También puede proceder del sobrenadante de crioprecipitado. Contiene niveles bajos de los factores lábiles de la coagulación (si procede del sobrenadante de crioprecipitado). Está indicado en los pacientes que necesitan aumentar la volemia o un aporte de proteínas plasmáticas y no necesitan el aporte de factores de coagulación lábiles (104).

Plasma de un solo donante. Consiste en plasma que ha sido separado de la sangre total en cualquier momento durante los cinco días siguientes a la caudicidad de la unidad. Contiene niveles bajos de factor V y VIII. El plasma de un solo donante es una fuente de los factores estables de la coagulación (II, VII, IX y X) (50).

Plasma envejecido. Es el plasma que en cualquier momento después de la recolección ha permanecido durante seis horas o más a temperaturas por arriba de 20°C. Se obtiene por centrifugación de sangre total (53).

Crioprecipitado (factor antihemofílico crioprecipitado). Es la porción insoluble en frío del plasma fresco congelado que queda después de haberlo descongelado entre 1°C a 6°C. El crioprecipitado contiene factor VIII:C (actividad procoagulante), factor VIII:fvW (factor de von Willebrand), fibrinógeno, factor XIII y fibronectina (110,117).

El plasma sanguíneo también puede ser fraccionado para obtener derivados que tienen uso terapéutico, entre los de mayor demanda se encuentran los factores de coagulación VIII y IX, concentrados de albúmina, inmunoglobulinas y antitrombina III (111).

V.I. CRIOPRECIPITADO (FACTOR ANTIHEMOFÍLICO CRIOPRECIPITADO)

El crioprecipitado es la porción insoluble en frío, que permanece después que el plasma fresco congelado ha sido descongelado entre 1°C a 6°C. Es una preparación concentrada que contiene los siguientes factores de coagulación: factor VIII (aproximadamente 50%), fibrinógeno (20%-40%), factor XIII (20%-30%) y algo de fibronectina (212).

El factor VIII es una proteína plasmática con actividad coagulante que circula en el torrente sanguíneo unida a otra proteína de mayor tamaño, el factor von Willebrand (fvW), necesario para su estabilidad y transporte. El crioprecipitado contiene tanto factor VIII:C (factor antihemofílico) como factor VIII:fvW (factor von Willebrand) (36,209).

Desde que en 1967 Judith Pool introdujo la técnica de precipitación en frío, diferentes investigadores han desarrollado cada paso del procedimiento

de colección y técnica de procesamiento haciendo modificaciones para incrementar la recuperación de factor VIII y obtener la máxima cantidad de ésta proteína (4,101).

El crioprecipitado (factor antihemofílico), se define como una unidad simple del plasma colectada y procesada en un sistema cerrado. Puede ser preparado a partir de: a) plasma fresco congelado; b) plasma congelado (77, 104,192).

Una máxima producción de factor VIII se obtiene si el plasma se separa inmediatamente después de la colección de sangre, se congela rápidamente a -18°C ó menos y posteriormente es procesado, ya que retiene aproximadamente el 90% de la actividad inicial de factor VIII (4).

Los anticoagulantes de elección para la colección de crioprecipitado son: CPDA-1, CPD y ACD. La crioprecipitación es usualmente el paso inicial para el fraccionamiento del plasma y la preparación de concentrados de factor VIII de pureza intermedia y de alta pureza (33,60,214).

OBTENCIÓN DE CRIOPRECIPITADO

La preparación de crioprecipitado de factor VIII involucra los siguientes pasos:

1. Proceso de descongelamiento. El crioprecipitado se obtiene congelando el plasma a temperaturas de -65°C por los siguientes medios:

- a) Baño de etanol a -70°C por treinta minutos.
- b) Baño de etanol / hielo seco en treinta minutos.
- c) Congelamiento a proporción controlada (1 cm/min) a -80°C en un congelador programable de nitrógeno líquido.

Los paquetes de plasma deberán ser protegidos con una sobrecubierta

plástica (de polietileno). El plasma deberá estar sólidamente congelado en el lapso de una hora desde que el proceso fué iniciado (124,127,192).

2. Proceso de descongelamiento. El plasma podrá descongelarse mediante: a) proceso lento ó b) descongelamiento rápido.

a) descongelamiento lento. Se efectúa a 4°C, aproximadamente 18 horas o en refrigeración entre 1°C a 6°C durante 14 a 16 horas.

b) descongelamiento rápido. Se puede llevar a cabo en un baño de agua con agitación a una temperatura de 4°C, aproximadamente 90 minutos; en una cabina de aire caliente a 24°C, aproximadamente dos horas; en un baño maría a 25°C durante 15 minutos, después en refrigeración a 4°C durante 4 horas (124,127,214).

3. Colección de crioprecipitado. La colección de crioprecipitado se podrá llevar a cabo por: a) centrifugación ó b) por el método sifón.

a) centrifugación. Se centrifugan las bolsas de 1-6°C a 4500 g por diez minutos ó a 5000 g por siete minutos, el plasma sobrenadante fluye dentro de la bolsa de transferencia. Se dejan de 10-15 ml de plasma sobrenadante para reusar el crioprecipitado (124,129,159).

b) por el método sifón. En este método se combina un rápido descongelado (baño de agua con agitación de 3°C a 5°C) con una continua remoción del plasma sobrenadante por sifonamiento (159,192).

La bolsa de colección del plasma sobrenadante se coloca por abajo del nivel del baño y cuando inicia el descongelado el líquido fluye a través del tubo de colección, el descongelado total se alcanza en un periodo de 55 a 65 minutos (129,159,214).

Con este último método se ha logrado incrementar la producción de factor VIII del 70% al 100% del original, el cual es mayor comparado con la recuperación que se tiene por el método de centrifugación que es de aproxima-

damente 50% (159,192,214).

4. Conservación del crioprecipitado. Si el crioprecipitado va a usarse en unas cuantas horas se refrigera a 4°C, si no es así, se deberá almacenar a una temperatura de -20°C o menos por un período de hasta 12 meses a partir de que la sangre fué colectada (124,147,174,197).

5. Contenido. Una bolsa de crioprecipitado contiene un volumen de 10 ml a 25 ml y contiene factor VIII:C (80-120 unidades), fibrinógeno (150-250 mg) factor von Willebrand (40-70% del PFC), factor XIII (20-30% del PFC) y una cantidad desconocida de fibronectina (36,77,117).

6. Requerimientos. Cada bolsa de crioprecipitado deberá contener un mínimo de 80 unidades internacionales (UI) de factor VIII (117,212).

7. Factores que afectan la producción de factor VIII durante el proceso de crioprecipitación: entre éstos factores se encuentran ; el tiempo de almacenamiento de sangre completa, un almacenamiento mayor de cuatro a seis horas causa decremento de factor VIII:C (100,173,214).

El plasma separado de la sangre completa por centrifugación deberá ser congelado en un lapso de seis horas y si no es procesado inmediatamente, deberá ser almacenado a -18°C por pocos días (100,147).

Proceso de congelado-descongelado. Se deberá realizar un rápido congelado en un período de 30 minutos a -70°C, el descongelado se deberá realizar en baño de agua con agitación en un tiempo no mayor de 90 minutos, durante éste procedimiento puede ocurrir gran pérdida de factor VIII debido a la naturaleza lábil y a la solubilidad de este factor, por lo que un proceso rápido es deseable para minimizar la inactivación (60,124).

V.2. CONCENTRADO DE FACTOR VIII

Durante la pasada década, los rápidos avances en el conocimiento de los estados de deficiencia de proteínas del plasma han conducido al desarrollo de productos terapéuticos sofisticados para reemplazar tales deficiencias (38).

La hemofilia A fué el primer desorden descrito como una deficiencia del factor VIII de la coagulación, entonces llamado globulina antihemofílica (38).

El concentrado de factor VIII es el producto terapéutico de elección para pacientes con hemofilia A y ha reemplazado al plasma fresco congelado y al crioprecipitado en su manejo (38,142).

Los métodos modernos del fraccionamiento del plasma se basan en los primeros trabajos de Cohn durante la segunda guerra mundial. Desde entonces la demanda de productos del plasma se ha incrementado de tal manera que ha superado la de los componentes celulares de la sangre (38).

Algunos estudios realizados en Reino Unido indican que la demanda del factor VIII es la principal fuerza detrás de la industria del fraccionamiento del plasma a nivel mundial. El patrón de tratamiento de pacientes con hemofilia ha cambiado durante los últimos 20 años. Un alto número de pacientes están siendo tratados en su casa con factor VIII exitosamente y año con año el requerimiento del factor VIII está aumentando (38).

La mayoría de los productos del plasma son manufacturados de " pools " plasma (de hasta 1000 litros) de muchos miles de donadores (60).

OBTENCIÓN DE CONCENTRADO DE FACTOR VIII

Los concentrados de factor VIII son materiales que contienen factor VIII parcialmente purificado y son manufacturados comercialmente a gran escala o por laboratorios de procesamiento del plasma. Existen métodos de procesamiento para la preparación de concentrados de factor VIII para uso clínico tanto de pureza intermedia como de alta pureza, sin embargo, todos ellos utilizan la crioprecipitación como fase inicial del fraccionamiento (60,141).

Los primeros reportes sobre el aislamiento del factor VIII de plasma humano normal para uso terapéutico en hemofílicos muestran que el concentrado de pureza intermedia es efectivo clínicamente (14 a 30 veces purificado) y puede ser producido simultáneamente por crioprecipitación y precipitación con etanol, derritiendo PFC, seguido por extracción del precipitado con tris buffer y adsorción de los factores II, VII, IX y X en hidróxido de aluminio. Este material es remarcablemente soluble y estable y se puede realizar a gran escala (144).

El factor antihemofílico de pureza intermedia preparado por el método desarrollado por la Cruz Roja Americana, contiene aproximadamente 10 unidades de factor VIII / ml con una purificación de 20 a 25 veces sobre el plasma. Este método se basó en la extracción de la fracción conteniendo factor antihemofílico del crioprecipitado (CRIO) seguido por parcial purificación con hidróxido de aluminio (127).

Los concentrados de factor VIII de pureza intermedia (aproximadamente 20 veces purificado) preparados por precipitación con glicina estuvieron comercialmente disponibles hasta ser reemplazados por concentrados de alta pureza. Sin embargo, surgió la necesidad de incrementar el proceso de purifi-

cación para la preparación de un producto más concentrado y fácilmente soluble de factor antihemofílico, es decir, un concentrado de alta pureza (127).

Los concentrados de factor antihemofílico de alta pureza han sido preparados por métodos de precipitación con PEG-4000, el cual da como resultado un concentrado purificado de 125-130 veces y es eficaz clínicamente (fig.V.2.1.) (127).

Sin embargo, se ha reportado una baja recuperación del factor VIII durante la producción de concentrados debida a una remoción física (durante la crioprecipitación, por su comportamiento soluble) ó a la inactivación del factor VIII (por su naturaleza lábil) durante el proceso de producción (60,158).

Además a escala analítica se ha visto una buena recuperación del factor VIII, pero la pérdida es ya significativa durante la preparación de rutina de crioprecipitado y aumenta a escala industrial (125).

Posteriormente se desarrolló un método a gran escala para la purificación del factor VIII mediante cromatografía que utiliza vidrio de poro controlado (VPC). Este material está compuesto de gránulos de SiO_2 casi puro y más del 90 % de su volumen está ocupado por canales (poros) moleculares de un diámetro de aproximadamente 500 Å (125).

El concentrado puro es tratado con VPC el cual remueve muchas proteínas del plasma por adsorción en la superficie interna, dejando fluir libremente al factor VIII (125).

Los gránulos son partículas rígidas y permiten un rápido flujo a través de la columna. También son químicamente inertes y resistentes a los tratamientos drásticos de aclaramiento y esterilización (125).

Con este método de adsorción se obtiene un producto final altamente aceptable conteniendo aproximadamente 1 unidad de factor VIII por mg de pro-

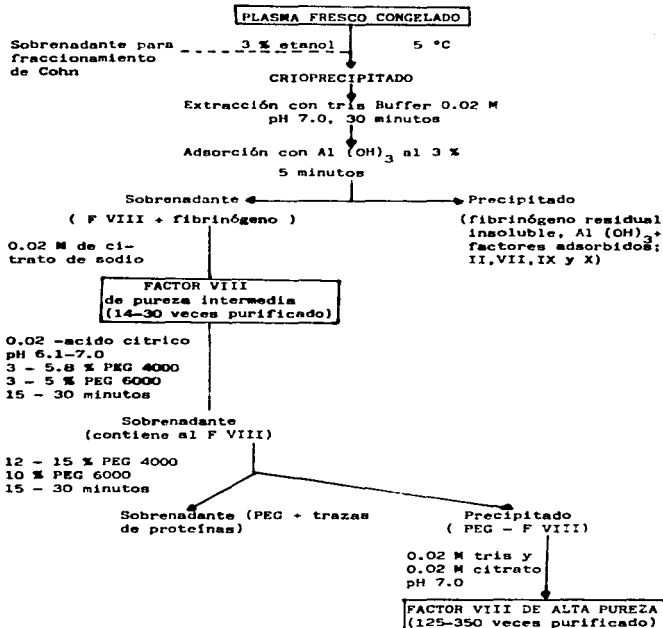


Fig.-V.2.1. Fraccionamiento del Plasma Fresco Congelado para obtener Factor VIII de pureza intermedia y alta pureza (144).

teína total, en una alta producción, de la cual el fibrinógeno comprende menos del 10 %. Esta técnica no es costosa y no requiere de un equipo de fraccionamiento altamente especializado; puede ser llevado a cabo por un laboratorio de procesamiento sanguíneo moderadamente equipado (14,125).

Aunque la disponibilidad de factor VIII preparado comercialmente, ha incrementado y mejorado el cuidado de pacientes con hemofilia A desde los primeros años de la década de los setenta, la transmisión de virus como el de la hepatitis B, HANB a VIH a receptores (generalmente multitransfundidos) con este producto ha sido uno de los mayores problemas (55,116,122).

Los concentrados de factores de coagulación derivados del plasma es probable que estén contaminados con virus por varias razones:

a) Los productos son elaborados de grandes "pools" de plasma. En la gran cantidad de muestras, se detecta raramente portadores probables de enfermedades infecciosas.

b) Algunas de las pruebas para detectar agentes infecciosos en plasma donado no son 100 % sensibles. En combinación con el gran número de donaciones es probable que los "pools" de plasma para fraccionamiento sean contaminados con un pequeño número de donaciones que escapa a la detección de patógenos. Es posible que una unidad simple de plasma infectado con VIH, virus de HB, ó HANB contenga un título suficiente de virus para convertir todo el contenido de material infeccioso.

c) Los procesos usados para preparar factores de coagulación son de naturaleza suave, debido a su labilidad, por lo que son incapaces de inactivar los virus. Por lo que se han desarrollado varios métodos para lograr inactivar virus como el de la hepatitis y VIH en estos concentrados (122).

La introducción de procedimientos de inactivación viral dentro de la

industria ha mejorado remarcablemente la seguridad de concentrados de factores de coagulación preparados comercialmente desde 1985 (55).

Existen tres métodos principales de inactivación viral usados durante el procesamiento de concentrados de factores:

1) Tratamiento con calor. Recientemente se ha utilizado un método de calentamiento "super seco" en el cual se aplica una temperatura de 80 °C durante 72 horas y su uso aún permanece. En general la inactivación de virus es más rápida en el estado liofilizado. Con la adición de sucrosa y glicina como estabilizadores proteínicos ha sido posible "pasteurizar" al factor VIII en estado líquido a 60 °C durante 10 horas (55).

2) Métodos químicos. Estos métodos utilizan una combinación de solvente-detergente, la cual rompe la cubierta lipídica de los virus. Estudios en chimpancés llevados a cabo con este producto confirmaron un alto nivel de inactivación de VIH, virus de HB y HNANB (55).

Un ejemplo de este método, desarrollado por investigadores del "Blood Center of New York", usaron el solvente tri (n-butil) fosfato al 0.3 % a combinación con los detergentes cloruro de sodio al 0.2 %, tween 80 y tritón X-100 (55).

3) Cromatografía de afinidad. El factor VIII ha sido también purificado por el paso a través de una columna de inmunofinidad conteniendo anticuerpo monoclonal murino para adherir el complejo de la molécula de factor VIII (FVIII:VWF) ó el factor VIII:C a la fase sólida de agarosa (55).

La purificación de afinidad monoclonal en combinación con otros procedimientos de inactivación también ha demostrado un alto grado de aclaramiento viral. Los varios tipos de métodos de inactivación viral los producen las compañías farmacéuticas y los nombres de las marcas se muestran en la tabla V.2.1 (55).

Tabla V.2.1. Concentrados de factor VIII comerciales y métodos de inactivación viral

Método de inactivación viral	Nombre del concentrado	Fabricante
Calor		
Calentamiento en estado liofilizado-calor seco		
60 °C (32 h)	FACTOR VIII-HT	ARMOUR *
60 °C (72 h)	HEMOPHIL-T	HYLAND *
68 °C (72 h)	KOATE HT	CUTTER
Super calor seco		
80 °C (72 h)		UK NATIONAL HEALTH SERVICE ⁺
Calentamiento con vapor		
Calentamiento en suspensión con heptano 60 °C (20 h)	AHF-VAPOR HEATED	IMMUNO ⁺
Calentamiento en solución acuosa (pasteurización)		
60 °C (10 h)	PROFILATE - HT (método húmedo)	ALPHA
	KDATE - HT	CUTTER
	HUMATE - P	BEHRINGWERKE
Solvente/Detergente		
TNBP/Cloruro	FACTOR VIII-SD	NY BLOOD CENTER
Purificación por cromatografía de afinidad		
60 °C (30 h) en estado liofilizado		
	MONOCLATE	ARMOUR
TNCP/Tritón X-100 en estado húmedo		
	HEMOPHIL M	HYLAND
60 °C (10 h) en solución acuosa (pasteurización)		
	MONOCLATE M	ARMOUR *

* Producto no disponible en grandes cantidades

+ Disponible solo en Europa

◆ Ahora en viales terapéuticos

Varios métodos de factor VIII están disponibles y difieren en los métodos de inactivación viral utilizados y en nivel de pureza logrado. Los concentrados comúnmente en uso se clasificaron como de pureza intermedia, con una actividad específica de 1-50 UI/mg de proteína; productos de alta pureza, por ejemplo los purificados con cromatografía de intercambio iónico cuya actividad específica va de 100 a 200 UI/mg y son comparables en términos de eficiencia; así la elección racional se ha basado en datos de seguridad y costo (183,187).

V.3. CONCENTRADO DE COMPLEJO DE FACTOR IX (COMPLEJO PROTROMBÍNICO)

El primer concentrado de complejo de factor IX fué preparado por Didisheim en 1959 y comercialmente disponible en los Estados Unidos hasta 1969 este concentrado es una mezcla impura que comprende los factores de coagulación II, VII, IX y X; que son factores dependientes de la vitamina K.

También se les conoce como " PPSB " (protrombina, proconvertina, factor Stuart, factor antihemofílico B) (35,78,139,215).

Estos factores son proteínas que estructural y químicamente son similares, poseen mas o menos las mismas características fisicoquímicas como son: peso molecular, punto isoeléctrico, movilidad electroforética y la presencia de un aminoácido en común, ácido β -carboxiglútamico. A causa de estas características similares es difícil preparar concentrados puros (139).

Todos los métodos de purificación para la preparación de concentrados de complejo protrombínico se basan en la adsorbabilidad específica de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K, estos tienen una fuerte carga negativa y pueden ser adsorbidos directamente con sulfato tricálcico, hidróxido de aluminio, sulfato de bario, el cual debido a sus efec-

tos colaterales es abandonado y sustituido por resinas de intercambio iónico como dietil aminoetil (DEAE) Sephadex y DEAE-celulosa. Si se requiere un producto muy puro la adsorción con DEAE ó polielectrolito (PE-E 100), puede ser continuado por cromatografía con dextrán sulfatado y/o heparina-sefaro-sa. Los factores adsorbidos son subsecuentemente eluidos y liofilizados, la concentración de los elutos puede ser llevada a cabo por liofilización, ultrafiltración o polietilenglicol (PEG-4000) (35,47).

La mayoría de esquemas para la producción de concentrados de complejo protrombínico utilizan generalmente el mismo procedimiento. Adsorción de proteínas del plasma en un medio de intercambio iónico, recuperación del adsorbente cargado y remoción de las proteínas débilmente unidas mediante un lavado seguido por la elución de las proteínas usando cambios de fuerza iónica o de pH (80).

Los intercambiadores iónicos más usados son DEAE-Sephadex, DEAE-Sepharosa y DEAE-celulosa. De éstos, DEAE-sephadex es el intercambiador iónico más fuerte y DEAE-celulosa el más débil. Los intercambiadores más fuertes unen más proteínas a altas fuerzas iónicas, pero requieren eluentes fuertes para la recuperación posterior de las proteínas, así la composición del concentrado puede variar de acuerdo al método que se utilice (80).

Los intercambiadores iónicos fuertes producen concentrados de " cuatro factores ", incluyendo el factor VII; los que usan intercambiadores iónicos débiles producen un concentrado de " tres factores " (II, IX, X) (35,78).

OBTENCIÓN DE COMPLEJO DE FACTOR IX

Los concentrados de factor IX son preparados comercialmente mediante el fraccionamiento de grandes "pools" de plasma. Pueden ser preparados a partir

de: I.- Plasma fresco congelado; II.- plasma pobre en crioprecipitado (es el plasma sobrenadante que queda después de la remoción del factor antihemofílico); III.- efluente I de Cohn (35,47,204,215).

I. Plasma fresco congelado. El plasma es primero crioprecipitado para producción del factor VIII. El plasma pobre en crioprecipitado es entonces fraccionado por intercambio iónico para producir complejo de factor IX, una mezcla conteniendo los factores de coagulación dependientes de la vitamina K. Los cuales pueden ser fraccionados por intercambio iónico o afinidad cromatográfica dentro de los factores II, IX y X. Los concentrados de complejo protrombínico también contienen otras proteínas dependientes de la vitamina K como la proteína C y la proteína S (fig.V.3.1) (204).

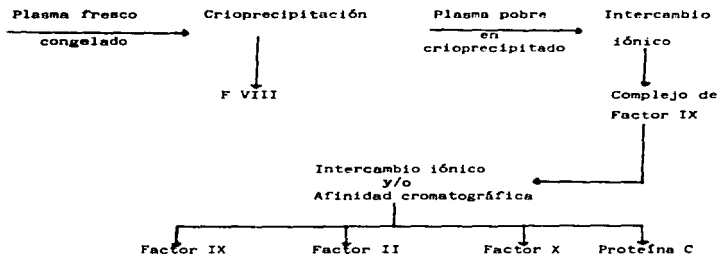


Fig. V.3.1. Fraccionamiento del plasma humano (204)

II. Plasma pobre en crioprecipitado. Es el plasma obtenido después del proceso de crioprecipitación. La siguiente figura muestra la preparación de complejo protrombínico utilizado por la Cruz Roja de Holanda (fig.V.3.2)

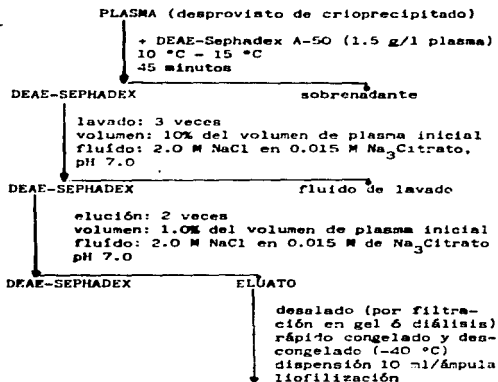


Fig.V.3.2. Esquema de preparación para complejo protrombínico (47).

III. Efluente I de Cohn. El plasma es obtenido por plasmaféresis y anticoagulado con citrato de sodio. Se pone en contacto con la resina de intercambio iónico DEAE/Sephadex, después se lava con bicarbonato de amonio, la sustancia deseada es eluida en el siguiente paso y esta fracción es liofilizada, dando un polvo protéico libre de sal (fig.V.3.3) (35).

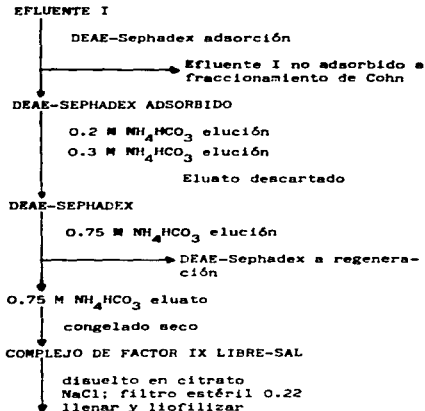


Fig. V.3.3. Manufactura de Complejo de factor IX de Konyne (35)

Todas las preparaciones DEAE tienen bajos niveles de factor VII y aproximadamente iguales niveles de factores IX (23-29 U), factor II (20-25 U), factor VII (10-15 U) y factor X (23-29 U). Una unidad de factor (U) se define como la actividad presente en un mililitro de plasma fresco normal (35,77).

Producto final. El contenedor final deberá expresar: a) el contenido de factor IX en UI; b) contenido de las demás proteínas; c) volumen del diluyente para la reconstitución; d) condiciones de almacenamiento (2 °C-8 °C); e) fecha de caducidad (no más de dos años); f) advertancia referente a la posible transmisión de enfermedades virales y g) el concentrado deberá tener un volumen final de 20-30 ml (47,212).

Los concentrados de factor IX altamente purificados contienen muy poco o nada de los factores II y X, han sido desarrollados en un intento por evitar las complicaciones que ocurren con los concentrados de complejo protrombínico. Son preparados a partir de concentrados de complejo protrombínico mediante técnicas de inmunofinidad usando anticuerpo monoclonal y otras nuevas técnicas (88).

Estos concentrados han sido infundidos en pacientes con hemofilia B y han mostrado una recuperación "in vivo" y una vida media similar al concentrado de complejo protrombínico. Entre las ventajas de éstos concentrados se encuentran: menor riesgo de transmisión viral y menor riesgo de complicaciones trombóticas (88).

V.4. CONCENTRADO DE ANTITROMBINA III

La antitrombina III humana es el nombre genérico usado en los Estados Unidos que se refiere a un producto derivado del plasma para uso terapéutico que contiene antitrombina III (AT III) humana en forma de concentrado (135).

La antitrombina III (6 cofactor heparina) es una glicoproteína que pertenece a una clase de inhibidores de serina proteasas llamada la familia de las serpinas. Tiene un peso molecular de 58,200 daltones (137).

La presencia de un inhibidor de trombina natural fué primero observada por Schmidt en 1892 y fué demostrado por Brinkhous en 1939 que la antitrombina III se requiere para la acción anticoagulante de la heparina (188).

Históricamente, fueron designadas seis "antitrombinas", unas de las tres principales fueron: la antitrombina I, cuya actividad se refiere a la adsorción de trombina a fibrina durante la coagulación; la antitrombina II, con actividad de cofactor heparina y la antitrombina III con actividad de inhibición de trombina. Más tarde, se determinó que la misma proteína era la responsable de las actividades de antitrombina II y antitrombina III, por lo que se designó únicamente como antitrombina III. En plasma humano la AT III se encuentra a una concentración de 3 a 5 mol/l (157).

La antitrombina III es el principal inhibidor de trombina y factor Xa y en menor grado de otras serina proteasas generadas durante el proceso de coagulación (factores IXa, XIa y XIIa). La AT III también inhibe tripsina, plasminógeno y calicreína. Algunos investigadores observaron que el efecto inhibidor de AT III está dramáticamente acelerado por heparina (136,146).

La AT III se une a trombina en un complejo covalente estequiométrica-mente 1:1 y la heparina ejerce un efecto catalítico en esta reacción y han propuesto que la heparina unida a AT III induce cambios conformacionales que

hacen que el sitio de unión de la AT III a la trombina sea más accesible a la enzima. La disminución de la concentración de AT III asociada con enfermedad hepática sugiere que el hepatocito es el sitio primario de biosíntesis (136,137,145).

La vida media de AT III después de su administración en sujetos normales o en pacientes con deficiencia hereditaria de AT III varía de 60 a 70 horas (137).

Bajos niveles de AT III han sido asociados a estados de deficiencias congénitas y adquiridas. En la forma congénita, el nivel de AT III en plasma es de 60 % o menos que el normal y se ha relacionado con predisposición a trombosis. Los estados comunes de deficiencia adquirida incluyen: cirugía, embarazo, trauma y uso de anticonceptivos orales. La administración de heparina produce una disminución en el nivel de AT III circulante y una reducción significativa de su vida media, mientras que los anticoagulantes pueden aumentar su nivel en circulación. El efecto de estrógenos en el nivel de AT III circulante permanece controversial, pero anticonceptivos orales conteniendo estrógenos aumentan el riesgo de trombosis en mujeres con deficiencia de AT III hereditaria (93,130).

Para incrementar temporalmente los niveles de AT III en circulación se han realizado infusiones de concentrados de AT III. Estos concentrados han sido usados en Europa desde los años setenta en pacientes con deficiencias hereditarias y/o adquiridas de AT III (137,145).

OBTENCIÓN DE CONCENTRADO DE ANTITROMBINA III

Debido a que la AT III se encuentra funcionalmente activa en plasma fresco congelado y en plasma pobre en crioprecipitado, se han utilizado como

punto de partida para el fraccionamiento del plasma en la obtención de concentrados de AT III y otros derivados del plasma (fig.V.4.1) (145).

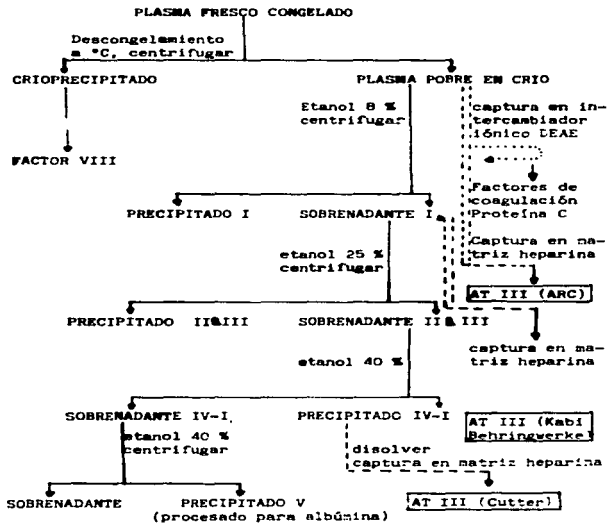


Fig.V.4.1. Esquemas de fraccionamiento del plasma. Proceso de fraccionamiento por etanol (—). Proceso de exclusión (---). Proceso opcional (...) (145).

En el esquema, el plasma pobre en crioprecipitado (plasma pobre en CRIO) puede ser colocado en contacto con resinas de intercambio iónico para extraer otros factores de coagulación y proteína C, y entonces purifican la AT III con resina de afinidad a heparina; una de las propiedades de la molécula de heparina es su alta afinidad de unión a AT III, esto ha conducido a utilizar cromatografía de afinidad a agarosa-heparina para el aislamiento de la AT III del plasma (145).

El plasma pobre en factores de coagulación puede entonces ser procesado idénticamente al plasma pobre en CRIO original. Alternativamente, como se muestra en la figura, la AT III y otros productos del plasma son purificados por procesamiento de fracciones intermedias de proteína, tales como sobrenadante I y precipitado IV-1, las cuales son obtenidas como parte del proceso de fraccionamiento con etanol, originalmente designado para producir albúmina. Específicamente para producir concentrado de AT III, los productores de Baxter/ARC usan sobrenadante de fracción I; mientras que los de Cutter utilizan el precipitado de la fracción IV-1 (145).

Todas las preparaciones de concentrados de AT III son manufacturados utilizando pasos de purificación, los cuales varían de acuerdo al fabricante (tabla V.4.1.) (137,145).

Tabla V.4.1. Comparación de procesos de purificación de AT III (143)

	BAXTER/ARC	BEHRINGWERKE	CUTTER	KABI VITRUM AP
Fuente	Plasma pobre en CHID	Sobrenadante fracción I	Pasta fracción I	Sobrenadante fracción I
Primer paso de purificación y procesamiento	Captura en heparina-sefaraosa Lavar 0.15 mol/L NaCl, eluir con 2 mol/L Concentración Diafiltración	Captura en heparina-fractogel Lavar Elución Concentración Diafiltración	Captura en heparina-ultrogel Lavar 0.3mol/L NaCl Elución 2 mol/L NaCl Concentración Diafiltración Inactivación viral 10h 60°C en citrato 0.5 mol/L	Captura en heparina-sefaraosa Lavar 0.4 mol/L NaCl Eluir 2mol/L NaCl Concentración Diafiltración
Segundo paso de purificación y procesamiento	Impurezas de proteínas precipitadas con PEG al 20%	Impurezas proteicas precipitadas con sulfato de amonio 31.3% AT III precipitada con 45.9% sulfato de amonio Redisolver AT III Inactivación viral 10h 60°C en 1,000g/L sacarosa, 150g/L glicina, 2.5 mmol/L EDTA, 20mmol/L CaCl ₂	Recaptura en heparina-ultrogel Lavar 0.4mol/L NaCl eluir 2mol/L NaCl Concentración Diafiltración	Impurezas proteicas unidas a intercambiador catiónico AT III unida a intercambiador de aniones Elución Concentración Diafiltración Inactivación viral 10 h a 60°C en sucrosa y 0.5 mol/L de citrato de Na
Tercer paso de purificación y procesamiento	Recaptura en Heparina-sefaraosa Lavar 0.5 mol/L NaCl Lavar 0.5 mol/L NaCl Elución 2 mol/L NaCl Concentración Diafiltración Inactivación viral 10h a 60°C en 0.5 mol/L citrato de Na	Precipitación AT III con 45.9% de sulfato de amonio Redisolver precipitado de AT III		Precipitación AT III Redisolver precipitado AT III Diafiltración

Tabla V.4.1. Continuación

	BAXTER/ARC	BEHRINGWERKE	CUTTER	KABI VITRUM AB
Producto final	Formulación llenado estéril liofilizado	Formulación llenado estéril liofilizado	Formulación llenado estéril liofilizado	Formulación (a- dicionando albú- mina) llenado estéril liofilizado

Durante la preparación de concentrados de AT III los productores utilizan un tratamiento con calor en solución para eliminar o minimizar el riesgo de contaminación viral (128).

La mayoría de los fabricantes de concentrados de AT III utilizan el método de calentamiento del producto en solución a 60 °C durante 10 horas en presencia de estabilizadores (por ejemplo sucrosa y glicina) dando como resultado una preparación que conserva la actividad biológica de AT III (135).

Este proceso de tratamiento con calor ha mostrado ser efectivo en la inactivación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tipo I en experimentos "in vitro". La seguridad de las preparaciones pasteurizadas de AT III ha sido confirmada por estudios en pacientes que no mostraron transmisión del SIDA, hepatitis B ó No-A, No-B (137,145).

El producto final se etiqueta como estado seco-congelado para asegurar una vida media larga del producto, el cual debe estar reconstituido con agua para inyección antes de su uso. La fecha de caducidad de la caja tiene un rango de dos a tres años cuando se almacena de 2 °C a 8 °C. La potencia de AT III se mide como actividad de cofactor-heparina, y va de 50 a 100 UI/ml del material reconstituido. La concentración de proteína en la solución es proporcional a la potencia de una actividad específica de 5 a 8 UI/mg de proteína. Los viales disponibles contienen 500, 1000 y 1500 UI de AT III por contenedor (145).

V.5. ALBÚMINA

Durante el período de 1975-1985, la albúmina fué el producto del plasma más ampliamente utilizado, particularmente en Alemania, Japón y los Estados Unidos (124).

Algunos países en los que el uso de albúmina ha disminuído, ha sido asociado a un consumo proporcionalmente alto de plasma (70).

Con el desarrollo de soluciones cristaloides y gelatinosas, las cuales son productos sintéticos macromoleculares que se utilizan como expansores de volumen sanguíneo, el uso de la albúmina disminuyó un poco; sin embargo, no son tan efectivas como la albúmina, ya que ninguna de ellas combina las funciones de transporte con el efecto oncótico, permanecen en la circulación menos tiempo que la albúmina, es decir, sus efectos son limitados y de corta duración (70).

Numerosos métodos para la purificación de albúmina de plasma humano han sido desarrollados basados en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la proteína. La albúmina es una proteína de cadena simple de aproximadamente 585 residuos de aminoácidos; posee moléculas relativamente estables, con 17 puentes disulfuro formando una proteína globular.

En preparaciones de albúmina pura, es evidente cierto grado de heterogeneidad; en parte, esto es debido a la retención de un grupo sulfhidrilo simple que es capaz de unirse covalentemente a cisteína u otras moléculas de albúmina. La unión de largas cadenas de ácidos grasos también contribuye a su heterogeneidad (78,152).

Quizá la propiedad más significativa de la albúmina, desde el punto de vista de purificación es su gran carga negativa a pH fisiológico, su afinidad por el agua la hace extremadamente soluble en soluciones arriba de 35 %

p/v para ser obtenido (73).

La albúmina de plasma humano, frecuentemente referida como albúmina de suero humano (HSA) ó albúmina de suero humano (NSA), ha sido ampliamente disponible en diversas formas de productos. Los principales productos son preparaciones líquidas llamadas solución de albúmina humana (HAS) y fracción proteínica del plasma (PPF) (78).

Las preparaciones terapéuticas de albúmina disponibles son las siguientes: Albuminar-5, Albuminar-25 (Armour), Albutein 5 % y 25 % (Alpha Therapeutic), Buminate 5 %, 25 % (Hyland), Plasbumin-5, Plasbumin-25 (Cutter). Su presentación es en solución al 5 % en contenedores de 50 ml (Albuminar-5, Plasbumin-5), en contenedores de 250 y 500 ml para administración intravenosa (Albuminar-5, Albutein 5 %), y en contenedores de 1000 ml (Albuminar-5) y se disponen de soluciones acuosas al 25 % en contenedores de 20, 50 y 100 ml (Albuminar-25, Albutein 25 %, Buminate 25 % y Plasbumin-25) (47).

OBTENCIÓN DE ALBÚMINA

La obtención de albúmina a partir de plasma humano ha tenido como base el método desarrollado por Cohn en 1946. Actualmente, la industria del fraccionamiento del plasma ha realizado numerosas variaciones de éste método para la obtención de albúmina. Se basa en la solubilidad diferencial de la albúmina y otras proteínas del plasma ésta se logra por medio del manejo de varios factores como son: pH, temperatura, concentración de etanol y concentración de proteína (78).

En el método 6 de Cohn, la albúmina tiene la solubilidad más alta y el punto isoeléctrico más bajo que el total de las principales proteínas del plasma, por lo que precipita bajo condiciones donde el etanol alcanza

una concentración de 0 % a 40 %, dando un pH total de 4.8 a una temperatura de - 5 °C. Otras proteínas como el fibrinógeno (fracción I) e inmunoglobulinas (fracción II + III), precipitan en las primeras fases (fibrinógeno precipita con etanol al 8 %, pH 7.2 °C a - 3 °C, obteniendo 5.1 % de proteína y las inmunoglobulinas precipitan con etanol al 25 %, pH 6.9 a - 5 °C, obteniendo 3 % de proteína, mientras que la albúmina permanece en la fracción sobrenadante durante la separación sólido/líquido de cada una de las suspensiones de proteínas generadas bajo dichas condiciones. Se han realizado varias modificaciones del método 6 de Cohn para intentar reducir el costo del proceso mediante la disminución del consumo de etanol y otros reactivos (47,78).

El método de Hink en 1957 permitió obtener un gran rendimiento a través de la recuperación de algunas de las proteínas del plasma normalmente descartadas en las fracciones IV-I y IV-4 (78).

Kistler y Mitelman en 1962, intentaron obtener una preparación de albúmina altamente pura en vez de la fracción proteica del plasma (PPF), aunque comparado con el método de Hink, el contenido de albúmina fué más alto, sin embargo, fué más baja la recuperación de proteína total (fig.V.5.1)

MÉTODO 6 DE COHN
(1946)

KISTLER Y NITSCHMANN
(1962)

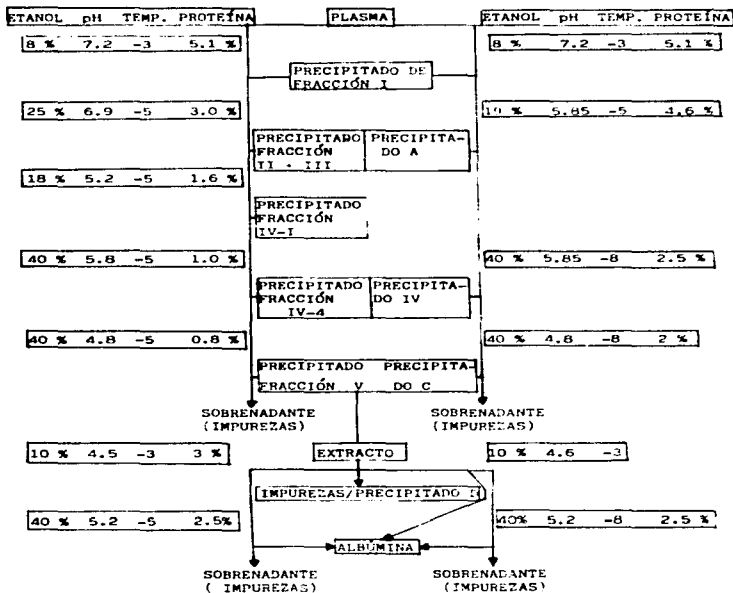


Fig. V.5.1. Comparación del fraccionamiento con etanol frío por el método 6 de Cohn (1946) y el de Kistler y Nitschmann (1962) (78).

Cuando la preparación de albúmina de alta pureza es de gran importancia y la recuperación de otras proteínas no es esencial, un método referido como desnaturalización térmica diferencial puede ser la opción al fraccionamiento. En este método, todas las proteínas diferentes a la albúmina precipitan por desnaturalización con calor, dejando solo a la albúmina en alta producción y pureza (78).

La base de este método es el uso de estabilizadores específicos para la albúmina, llamados octanato de sodio (caprilato) y *N*-acetil triptofanato, los cuales permiten que las soluciones de albúmina resistan elevadas temperaturas durante largos periodos. La obtención de albúmina por este método fué revisado por Hoch y Chanutin, que incluía un tratamiento preliminar del plasma con calor (70 °C) durante 90 minutos en presencia de octanato de sodio seguido por filtración y precipitación con etanol frío para recuperar el equivalente a la fracción V (78).

Quizá el precipitante que ha ganado la más amplia aplicación aparte de aquellos basados en solventes orgánicos, es el polietilenglicol, un polímero no tóxico, soluble en agua. El PEG utilizado tiene un peso molecular de 4,000 y 6,000, puede selectivamente precipitar proteínas en solución en base a sus pesos moleculares y sus cargas netas. Este método tiene la ventaja de no requerir un estricto control de temperatura, por lo que es pequeño el riesgo de desnaturalización por calor. Se tienen pocos ejemplos de obtención de albúmina únicamente por PEG; en cambio, procesos integrados, combinando PEG con precipitación con etanol; métodos de separación cromatográficos y desnaturalización térmica diferencial, son los más comunes, aunque el PEG se considera no tóxico, su completa remoción de los concentrados elimina cualquier riesgo (Fig.V.5.2) (47,67).

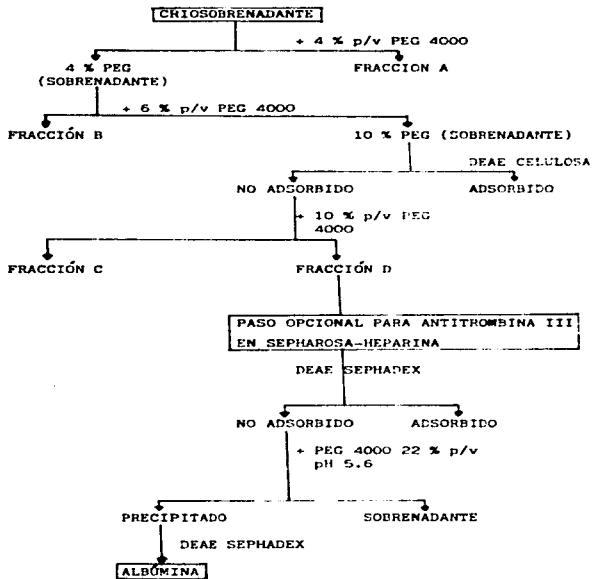


Fig. V.5.2. Aislamiento de albúmina de fracciones pEG de plasma humano (adaptado de Hao y colaboradores, 1980) (83)

El fraccionamiento con etanol frío es el método más reconocido, ya que ofrece un excelente registro de seguridad y capacidad para manejar grandes volúmenes. Sin embargo, requiere procesos que utilizan temperaturas de -8°C, que probablemente limitan la viabilidad económica (78).

El material fuente para la purificación de la albúmina ha tendido a ser el plasma total, sobrenadante de crioprecipitado, plasma pobre en factor IX o el precipitado obtenido con PEG (78).

Un método desarrollado con adsorbentes Pharmacia ha sido adoptado por Tayot en 1987 en el Instituto Merieux, basado en micropartículas porosas de sílica unidas al polímero PEG, llamadas Spherosil y Spherodex, medios distribuidos por IBF, Francia. Las principales características de los procesos de purificación de albúmina de Pharmacia e IBF se dan en la figura V.5.3 (78).

El pretratamiento de plasma completo, involucra clarificación por filtración o centrifugación, desalinización por filtración en gel (usando Sephadex G-25), y ajustando el pH 5.2 siendo necesario permanecer a 4 °C antes de remover el precipitado mediante centrifugación o filtración (15,47).

El plasma pretratado o las fuentes alternativas de albúmina se hacen pasar por un intercambiador aniónico bajo condiciones donde la albúmina se une a dicho intercambiador (pH 5.2, acetato 0.025 M) y las inmunoglobulinas pasan directamente a través de la columna en la fracción no adsorbida. La desorción de la albúmina a pH 4.5 permite a esta fracción ser directamente aplicada a un intercambiador catiónico; la elución de la albúmina del intercambiador catiónico se logra usando solución amortiguadora a pH de 5.2 o 5.5. Los contaminantes proteínicos unidos son eluidos con solución amortiguadora pH 7.0 / 8.0 de acetato conteniendo alta concentración del mismo o con hidróxido de sodio al 0.1 % (78).

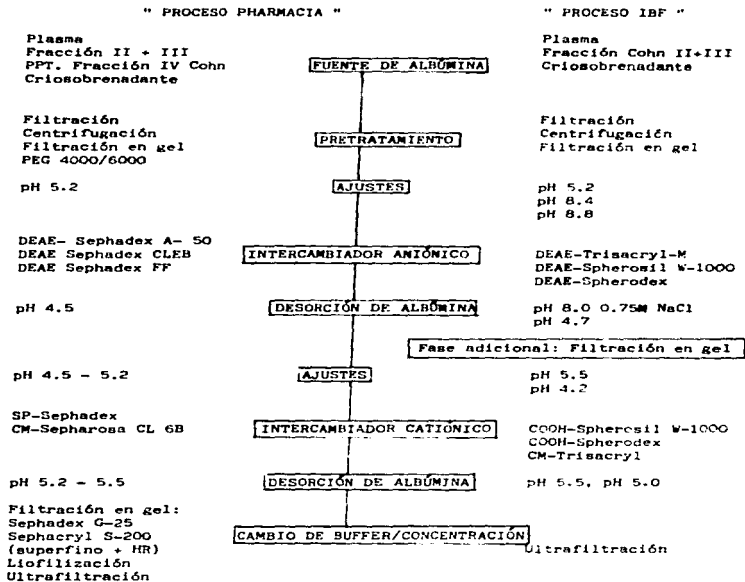


Fig. V.5.3. Purificación cromatográfica de albúmina (78)

El método Pharmacia incluye un procesamiento final de concentración por ultrafiltración de 6 % - 7 % p/v, una fase de filtración en gel usando ya sea Sephadex G-25 o Sephacryl S-200; posteriormente una concentración por ultrafiltración o liofilización seguida por formulación, filtración estéril y llenado. El proceso IBF, con un número similar de pasos cromatográficos al inicio, requiere solo una concentración por ultrafiltración antes de finalizar el producto (15).

En la preparación de productos clínicos es esencial que un adsorbente pueda resistir un riguroso procedimiento de esterilización. Esto se puede lograr por medio de tratamientos químicos tales como soluciones ácidas o alcalinas; si es posible hipoclorito de sodio, formaldehído, glutaraldehído y cuando es posible mediante un equipo de autoclave (78).

En general se evita el uso de materiales tóxicos debido al riesgo de contaminación del producto final, aunque el hidróxido de sodio es altamente favorable a causa de su efecto de solubilidad sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (47,78).

Los reactivos utilizados en el fraccionamiento del plasma necesitan ser removidos del producto final; esto implica la remoción de etanol después del fraccionamiento con etanol frío. En la obtención de albúmina se ha considerado al etanol y al agua como los principales contaminantes de estas soluciones. La liofilización (secado-congelado) fué una de los primeros métodos para conservar el plasma humano, pero este método a nivel industrial es muy costoso (47,78)

Posteriormente se introdujeron otros métodos para la remoción de etanol y otros solventes como alternativas al método de liofilización. Uno de los métodos desarrollados en las últimas décadas es la ultrafiltración y ha sido definida como una " técnica de separación de solutos disueltos y suspendidos

en base a su tamaño pasando una solución bajo presión a través de un filtro extremadamente fino ". Puede ser considerado como una forma de tamiz molecular donde los solutos más grandes que el tamaño de poro de la membrana son retenidos, y los solutos más pequeños pasan a través de la membrana. En este método se ha observado una muy baja desnaturalización de proteínas y el costo del equipo ha conducido a su amplio uso en la industria del fraccionamiento del plasma (78).

La formulación de la solución de albúmina concentrada involucra el ajuste final de pH, adición de cloruro de sodio y estabilizadores en los niveles especificados (47,78).

La solución de albúmina humana (HAS) está disponible en concentraciones de 4 %, 4.5 %, 5 %, 20 %, y 25 %, mientras que la fracción proteínica del plasma (PPF) solo como solución al 5 %. Los volúmenes de producto están disponibles en 50 ml y 100 ml en los productos de alta concentración y en 250, 500 y 1,000 ml los de concentración más baja (4 % a 5 %). La albúmina en HAS debe constituir al menos 95 % del total de la proteína, mientras que PPF contendrá al menos 83 % de albúmina. Las especificaciones para productos HAS y PPF establecidas en las Farmacopeas y en la US Code of Federal Regulations (1981), requieren que las preparaciones sean neutras; definen límites de pH de 7.0 ± 0.3 para esos productos (216).

Ambas soluciones deben contener una concentración fisiológica de sodio y potasio. El límite superior para el sodio en todos esos productos es normalmente de 160 mmol/l, mientras que el límite máximo de potasio es de 50 μ mol/g de proteína. Otros iones tales como cloruros, están presentes en concentraciones no especificadas. Contienen también estabilizadores para prevenir agregación y proteger el estado natural de la albúmina durante la pasteurización, usada para inactivación de virus. Los estabilizadores usual-

les son octanato de sodio (caprilato) y/o N-acetil triptofanato de sodio, adicionado en una proporción de 0.16 mmol/g de albúmina cuando se usa en combinación. El llenado del producto final es principalmente materia de adecuada precisión y esterilidad para evitar recontaminación de la solución estéril (216).

V.6. INMUNOGLOBULINAS

El inicio de la terapia con inmunoglobulinas puede ser atribuido a Behring y Kitasato, en Alemania en 1890, ellos describen el uso de antitoxina equina producida contra toxina diftérica teniendo éxito en el tratamiento de una joven enferma con difteria; con este trabajo Behring obtuvo el premio Nobel de Medicina en 1902 (145).

Babes y Lepp, en 1889, en Francia, realizaron trabajos de investigación en inmunización pasiva contra rabia usando antisuero canino. En los años sesenta se desarrollaron antisueros para prevenir sarampión y más tarde para paperas y poliomielitis (145).

La base de la terapéutica del uso de concentrados de inmunoglobulinas fué establecida en 1952, cuando Bruton publicó su clásica descripción de agammaglobulinemia congénita (145).

Se han tenido muchos reportes acerca de los efectos benéficos de la administración de concentrados de inmunoglobulina humana para control de hipogammaglobulinemias. Ordman y col. (1944), realizaron estudios de investigación sobre el uso de concentrados de inmunoglobulinas en prevención o atenuación de infecciones como sarampión y hepatitis B (145).

Las globulinas hiperinmunes contienen al menos cinco veces el título de anticuerpo específico que contendría un pool normal de gammaglobulinas. Se ha confirmado que las globulinas hiperinmunes humanas dirigidas contra hepatitis B, contra toxina del tétano y contra la rabia, son de valor terapéutico, pero otras como las dirigidas contra poliomielitis y paperas han llegado a ser extintas (145, 200).

La globulina hiperinmune de especial interés la cual es diferente de aquellas con altos títulos de anticuerpos contra toxinas bacterianas o virus

es la globulina hiperinmune dirigida contra el grupo sanguíneo Rh⁺ (D). La inmunoglobulina Rh⁺ (D) está aprobada para la prevención de isoimmunización en el individuo Rh⁺ (D) negativo expuesto a sangre Rh⁺ (D) positivo, ya sea como resultado de una hemorragia materno fetal que ocurre durante el nacimiento de un infante Rh⁺ (D) positivo; de un aborto (espontáneo o inducido) o de un trauma abdominal. Similarmenete la inmunización que resulta de la producción de anti-Rh⁺ (D) después de transfusión de células Rh⁺ (D) positivas a un receptor Rh⁻ (D) negativo podría prevenirse administrando inmunoglobulinas Rh⁺ (D) (165).

Con el uso de concentrados de inmunoglobulinas por vía intramuscular, la dosis está limitada por el músculo y puede producir complicaciones locales tales como abscesos y tendencias hemorrágicas, además toma de dos a siete días para alcanzar los niveles máximos sanguíneos y se ha reportado destrucción local de la inmunoglobulina en el tejido muscular antes de entrar a circulación (165).

La terapia por vía intravenosa asegura el 100 % de biodisponibilidad, la preparación es inmediatamente activa, hay un mínimo de daño en la pared de la vena, el único riesgo de tóxis es la sobrecarga cardiovascular (200).

OBTENCIÓN DE INMUNOGLOBULINA G

La elección de un concentrado de inmunoglobulina G (IgG) para propósitos terapéuticos se basa en algunos factores como:

- a) La IgG es la inmunoglobulina que se encuentra en la más alta concentración.
- b) El estado de deficiencia inmune más frecuentemente reportado y diagnosticado ha sido la agamaglobulinemia.

c) La IgG se distribuye en los espacios tanto intersticial como intravascular, debido a lo cual puede ser administrada ya sea intravenosa o intramuscularmente, mientras que la IgM solo en el espacio intravascular, por lo que se debe administrar intravenosamente.

d) La IgG es la única que atraviesa la barrera placentaria. El dímero activo de la inmunoglobulina A (IgA secretora) ejerce su actividad biológica solo en secreciones de membrana mucosa, la IgE se llega a fijar a células mastocitos y basófilos para ejercer su actividad.

e) Las isoaglutininas de grupo sanguíneo (anti-A y anti-B) son de la clase IgM, por lo tanto, las reacciones hemolíticas con concentrados de IgG son poco probables (165).

La naturaleza globular y propiedades anfotéricas de las inmunoglobulinas hace relativamente fácil la precipitación de esas moléculas en soluciones acuosas (51).

La técnica comúnmente utilizada para aislar gammaglobulinas de plasma humano para uso terapéutico es precipitación con mezclas de etanol frío/agua de acuerdo a E. J. Cohn (47,165).

El método 6 de Cohn llegó a ser el punto de partida para la obtención de IgG segura y eficaz. Existen dos métodos que son utilizados a nivel comercial para la obtención de IgG de uso terapéutico: el método 9 de Oncley y el de Kistler y Nitschman. La figura V.6.1. muestra los parámetros importantes de estos métodos (165).

La principal diferencia entre los dos métodos es que el método 9 de Oncley resuspende y reprécipita la fracción gammaglobulina del método 6 de Cohn antes de remover la IgM por precipitación, mientras que el método de Kistler y Nitschman no lo hace (165).

AISLAMIENTO DE IgG DE PLASMA HUMANO
(Método 6 de Cohn)

PLASMA

Remoción de proteínas insolubles a 0 °C por centrifugación

Remoción de fibrinógeno por precipitación del 5 % de proteína a pH 7.2 con adición de etanol al 8 % a -25 °C

Precipitación de gammaglobulina a pH de 6.9 con adición de etanol al 25 % a 0 °C (Más tarde se usaron modificaciones con etanol al 3 %. Kistler y Nitschman realizaron precipitación a pH de 5.9)

MÉTODO 6 DE ONCLEY

Precipitado de gammaglobulina suspendido en agua a 2 °C

Reprecipitación de gammaglobulinas a pH 7.6 por adición de etanol al 20 % a -5 °C (últimas modificaciones utilizan pH cerca de 6.7)

Gammaglobulinas suspendidas en agua a 2 °C

Precipitación de IgM por adición de etanol al 17 % a -6 °C y pH 5.2

Separación y clarificación de la solución que contiene el precipitado por centrifugación y filtración. Esta solución clarificada es la IgG purificada

MÉTODO DE KISTLER Y NITSCHMAN

Precipitado de gammaglobulina suspendido en agua a 0 °C y pH 4.8

Precipitación de IgM ajustando la concentración de etanol al 12 % a -5 °C y pH 5.1

Separación y clarificación de la solución que contiene el precipitado mediante centrifugación y filtración. Esta solución contiene proteínas diferentes a IgG

La IgG precipita ajustando la concentración de proteínas a 0.5% con etanol al 25%, temperatura de -7 °C y pH 7.0

Fig. V.6.1. Comparación de los métodos de fraccionamiento del plasma de Oncley y el de Kistler/Nitschman (165)

El método de remoción de IgM puede significativamente afectar la calidad del producto final de IgG. Para el fraccionamiento a escala comercial, el grueso del precipitado de IgM es removido mediante centrifugación de flujo continuo seguido por filtración en membrana (133,165).

Otros métodos para obtener IgG han sido utilizados, tales como aquellos que involucran el aislamiento de IgG directo del plasma por medio de cromatografía de intercambio iónico o por medio de precipitación con polietilenglicol pero se ha eliminado la posibilidad de su uso a nivel comercial debido a una probable transmisión de hepatitis (156,165).

Existen métodos para obtener IgG que utilizan anticuerpos monoclonales producidos en cultivo de tejidos de células de hibridoma que son disponibles para uso terapéutico. Sin embargo el costo del material de partida de anticuerpos monoclonales puede ser de cinco a cincuenta veces más por mg de anticuerpo específico que con plasma humano (47).

En la tabla V.6.1. se mencionan diferencias entre los productos disponibles comercialmente (165).

Tabla V.6.1. Algunos productos comerciales de inmunoglobulina intravenosa (165)

FABRICANTE	PRODUCTO	CONTROL DE ACTIVIDAD ANTI-COMPLEMENTO	FORMULACION
Cutter	Saminone-S	Ultrafiltración Diafiltración	5% IgG en agua con 10% sulfosa, pH 4,25
Sandoz	Sandoglobulin	Digestión con pepsina, pH 4	5% IgG liofilizada con 5% sacarosa, pH 6,8. Diluyente: 0,9% NaCl (trazas)
Hyland-Travenol	Genagard	Tratamiento con 1% _{v/v} y albúmina	5% IgG liofilizada con 0,9% NaCl, 0,3M glicina, 2% glucosa, 0,1% albúmina, 0,2% PEG a pH 7, diluyente: agua
Biotech	Intraglobin F	Propilolactona a 17°C	5% IgG en agua con 0,4% NaCl, 2,5% glucosa a pH 6,6
Imunon	Endotulin	Digestión con peptilasa a pH 4 y tratamiento con 1%G	5% IgG liofilizada con 0,9% NaCl 5% glucosa, 0,5% PEG a pH 7, diluyente: agua
Green Cross	Venoglobulin-F	Tratamiento con 1%G	5% IgG liofilizada con 1% albúmina, 0,5% PEG, 2% manitol, 0,9% NaCl a pH 6,8, diluyente: agua
Kabi-Vitrus	Genonativ	Formulación con albúmina	5% IgG en agua con 0,5% glicina, 0,6% caprilato, 5% albúmina, 2,5% glucosa, 0,1% acetiltripotofano a pH 6,8
Teljin Institute	Venilon	Sulfonación	5% IgG liofilizada con 2,25% glicina, 0,75% albúmina, 1% manitol 0,9% NaCl a pH 6,8. Diluyente: agua
Behringwerke	Venizunon	Sulfonación	5% IgG liofilizada con 0,3M glicina, 0,9% NaCl. Diluyente: agua

En 1962 Barandum reportó que la IgG purificada se autoasocia en solución y llega a ser térmicamente inestable y en reposo forma agregados que activan sistemas de complemento "in vivo". Se han realizado intentos para prevenir o remover la actividad anticomplemento de la IgG purificada con etanol frío en los productos comerciales (11,133,167,168).

La remoción de agregados en el método de Oncley o el de Kistler y Mitchman puede ser realizada usando PEG (las cantidades residuales de pEG en el producto final parecen prevenir posterior agregación y actividad anticomplemento, de acuerdo a Polson y Ruiz Bravo (1972) (113,114,156).

Se han utilizado también modificaciones en la estructura molecular de IgG para eliminar actividad anticomplemento, por medio del rompimiento de uniones disulfuro en las moléculas usando reacciones de reducción, alquilación o sulfonación o bien reacciones con beta-propiolactona y digestión con enzimas proteolíticas, aunque según Barandum 1962 y Stephan 1975, parece que estos métodos degradan a la IgG (subclase 3) (11,73).

Una alternativa para estabilizar la IgG purificada a pH bajo es la adición de albúmina humana a la solución de IgG; la albúmina interfiere con la formación de agregados de IgG a pH fisiológico y durante el proceso de secado-congelado reduce el desarrollo de actividad anticomplemento (165).

Otro problema de estabilidad es cuando la actividad de enzima proteolítica está presente en el producto final de IgG. Las enzimas proteolíticas causan agregación de IgG y se pierde su título de anticuerpo. La detección de dicha actividad varía de lote a lote y fabricante a fabricante de IgG; Fainter y Mintz en 1969 mostraron que una fuente de esta variabilidad es el pH al cual la IgM precipita de la fracción gammaglobulina de Cohn. La precipitación de IgM a pH menores de 5.4 da como resultado niveles significativos de actividad de enzima proteolítica siendo encontrada en productos de IgG

mientras que una precipitación a pH mayor de 5.4 deja trazas de actividad detectables. La eliminación de enzimas proteolíticas se logra mediante cromatografía de intercambio iónico, precipitación con PEG y formulación a pH menor de 6.4 (9,45).

En las preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas se ha observado la posibilidad de transmisión de hepatitis No-A, No-B (HNAHB) (110,146).

A pesar del uso de albúmina y PEG para controlar actividad anticplemento se han encontrado otros factores que también afectan a la formulación de los productos de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) (165).

Oncley, Enders y Janeway en 1948, reconocieron que la formulación con solución salina no era recomendable debido a que causa turbidez, agregación, inestabilidad térmica y pérdida de títulos de anticuerpos; ellos recomendaron una formulación de IgG purificada en glicina 0.3 M, los efectos desestabilizantes de solución salina pueden ser compensados con el uso de carbohidratos, sin embargo, en formulaciones con pH menor de 6, los carbohidratos no mejoran la estabilidad de IgG natural en solución (9).

La esterilidad también ha influenciado la formulación de productos de IgG. Oncley en los años cuarenta, recomendó dejar la IgG en estado seco-congelado para minimizar el riesgo de crecimiento bacteriano. Aunque las soluciones filtradas estériles de IgG han permanecido en el mercado por muchos años, sin episodios clínicos de contaminación bacteriana (165).

Por esta razón, todas las botellas de IGIV con formulación en estado líquido se les realiza una inspección visual para evidenciar crecimiento bacteriano. En esta inspección se observa la claridad de la solución por medio de medición de turbidez. Por lo tanto, en la formulación líquida se facilita más la detección de contaminación que en estado seco-congelado (165).

C A P I T U L O VI

USOS TERAPÉUTICOS Y REACCIONES ADVERSAS DEL PLASMA Y SUS DERIVADOS

CAPÍTULO VI: USOS TERAPÉUTICOS Y REACCIONES ADVERSAS DEL PLASMA Y SUS DERIVADOS

El uso del plasma y sus derivados ha evolucionado en un periodo de cuatro décadas. esto puede ser atribuido a múltiples factores que incluyen una disminución de la disponibilidad de sangre completa debido a la amplia aceptación de la terapia con componentes sanguíneos (42).

Cuando se pierde sangre, es necesaria reemplazarla con un volumen equivalente de la misma. Sin embargo, el uso de ésta para superar una diferencia en uno de sus componentes sería un derroche de todos los otros. En la mayoría de los casos, la administración de un único componente en forma de concentrado provoca una respuesta mucho más efectiva que la administración de sangre completa (6,163).

Cuando ocurre una hemorragia aguda, se realizan intentos para mantener: 1) un volumen sanguíneo al 100 % del normal; 2) un nivel de hemoglobina al menos de 8 g/dl y hematocrito al 24 % para permitir un adecuado transporte de oxígeno a los tejidos; 3) un nivel de proteína sérica al menos del 60 % del nivel normal; 4) factores de coagulación del plasma arriba del 35 % del normal, excepto factor VIII al 50 % del normal; plaquetas arriba del 25 % (50,000/mm³) del normal. Para lograr esos niveles se ha sugerido lo siguiente. Cuando la pérdida de sangre es de 20 % o menos del volumen total, es generalmente adecuada una solución cristalóide (por ejemplo, solución balanceada de electrolitos). Con una pérdida sanguínea mayor podrían preferirse expansores de volumen de plasma no proteínicos, adicionando concentrados de eritrocitos; cuando la pérdida de sangre exceda del 50 % se da sangre completa si es disponible; albúmina o fracción proteínica del plasma pueden ser necesarios si la sangre total no está disponible (163).

Cuando el volumen sanguíneo es reemplazado en menos de 24 horas, la hemodilución podría dar como resultado una trombocitopenia y una reducción de factores de coagulación del plasma. Los concentrados de plaquetas y plasma fresco congelado podrían entonces ser necesarios pero para evitar el riesgo de hepatitis, generalmente son administrados solo cuando las plaquetas y factores de coagulación deben ser reemplazados (6).

La terapia con componentes en transfusión sanguínea puede ser utilizada ya sea para restaurar deficiencias en coagulación o para reducir tendencias trombóticas excesivas. Algunos desórdenes de coagulación son reconocidos como congénitos e involucran deficiencias hereditarias ya sea de factores procoagulantes o inhibidores del mecanismo de coagulación. Los desórdenes adquiridos son generalmente más complejos e involucran deficiencias de múltiples factores debido a síntesis reducida, pérdida incrementada o consumo acelerado. El consumo acelerado de factores de coagulación generalmente resulta de la liberación de activadores de coagulación o de la estimulación del sistema fibrinolítico. Estos desórdenes resultan en coagulación patológica o hemorragia (141).

VI.I. PLASMA

VI.I.1. USOS TERAPÉUTICOS

El plasma se usa más comúnmente para fines terapéuticos como plasma fresco congelado (PFC) (141).

La administración de PFC se ha incrementado dramáticamente en los años recientes a pesar de la escasez de indicaciones definitivas para su uso (24).

Algunos reportes han sugerido que aproximadamente un 73 % de unidades de plasma fresco congelado son transfundidas sin justificación, particularmente para remplazamiento de volumen (53,191,193,195).

Estudios en el uso de PFC en Gran Bretaña, en 1993, donde su administración se incrementó mas de 10 veces en los pasados 15 años, han mostrado un mal uso del mismo. Probablemente las principales razones se limitan al conocimiento de que es eficaz en situaciones específicas, ignorando sus riesgos e incrementando su disponibilidad (17,38).

Algunos factores que han contribuido a un mayor uso de PFC se encuentran en la tabla VI.1.1 (207).

Tabla VI.1.1. Factores que estimulan el uso de PFC (207).

-
- Contiene todas las proteínas del plasma: Inmunoglobulinas, coloides y coagulantes.
 - Elimina la necesidad de análisis de coagulación detallado
 - Contiene una solución balanceada de sal y una concentración normal de otros cristaloides.
 - Contiene todas las sustancias necesarias para el control de CID o lisis primarias: Inhibidores de serina proteasas, antitripsina III, alfa-macroglobulina, inhibidores de activadores de plasminógeno.
- Proteína C y proteína S
-

CID= Coagulación intravascular diseminada

Aunque el PFC está ampliamente avocado a pacientes con defectos de coagulación múltiples asociados con enfermedad hepática severa, CID y transfusiones masivas de sangre, su efecto está feblemente definido (37).

El PFC no tiene papel como expansor de volumen; coloides sintéticos son más efectivos, seguros y baratos. Tampoco se utiliza para proporcionar nutrición en pacientes con estado de pérdida de proteínas, ya que existen preparados de aminoácidos más adecuados. Su uso como fuente de inmunoglobulinas en el tratamiento de estados de inmunodeficiencia congénita ha sido superado por el uso de preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas (37).

La principal justificación para la obtención de PFC de sangre completa es incrementar la disponibilidad de factor VIII. Para este propósito, mucho del PFC es destinado a ser crioprecipitado o concentrado de factor VIII. Sin embargo, cuando es usado directamente como producto de transfusión, las únicas indicaciones definitivas para su uso incluyen las siguientes:

1) Es útil en el tratamiento de deficiencias congénitas de factores de coagulación (por ejemplo factor V), cuando no es disponible un concentrado de factor específico (37,38).

2) Ha sido utilizado como tratamiento de pacientes con deficiencias congénitas de los anticoagulantes naturales: antitrombina III, proteína C y proteína S. Los concentrados de AT III están actualmente disponibles y los concentrados de proteína C están bajo pruebas clínicas (37).

3) El PFC se ha usado también para obtener un efecto reversible de la anticoagulación oral (por ejemplo de warfarina) asociada con serias hemorragias cuando los concentrados de factor IX o factor VIII no son disponibles. Pacientes a quienes se les ha administrado el anticoagulante warfarina de sodio, están deficientes funcionalmente en factores de coagulación dependientes de la vitamina K, así como en proteínas C y S. Estas deficiencias fun-

cionales pueden ser revertidas por la administración de vitamina K, sin embargo, cuando los pacientes presentan hemorragia activa o requieren cirugía de emergencia el PCF puede utilizarse para lograr la hemostasis inmediata, aproximadamente se requiere un litro por adulto (42).

4) Un régimen similar se usa para tratar enfermedades hemorrágicas del recién nacido y hemorragias asociadas con mala absorción de vitamina K (38).

5) El PFC es usado en grandes volúmenes (mínimo 3 l/día) en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Se utiliza comúnmente como fluido de reemplazamiento durante procedimientos de intercambio de plasma llevados a cabo para pacientes con PTT (23,38).

Otras indicaciones son en pacientes con defectos de coagulación múltiples (como en enfermedades hepáticas, CID) y en pacientes quienes reciben transfusiones masivas (140).

En pacientes con severa enfermedad hepática, hay una deficiencia de todos los factores de coagulación. Si hay hemorragia severa, o el tiempo de protrombina se incrementa al menos 50 % o la concentración de factores de coagulación es menor del 50 %, el tratamiento es indicado con PFC (140).

El plasma fresco congelado es una fuente de reemplazamiento de factores de coagulación para pacientes con CID. Sin embargo, el tratamiento de CID permanece controversial (140).

Hemorragias generalizadas pueden ocurrir en pacientes que reciben transfusiones masivas de sangre como resultado de trombocitopenia, disfunción plaquetaria adquirida, fibrinólisis anormal, CID o disminución de los factores de coagulación (140).

El uso empírico de PFC para revertir desórdenes hemostáticos se limita a aquellos pacientes en quienes las deficiencias son el único o principal desarreglo (42).

DOSIS TERAPÉUTICA

El volumen inicial de PFC transfundido será adecuado para reemplazar los factores de coagulación deficientes. El promedio adulto generalmente requiere 2 a 9 unidades de aproximadamente 200 ml cada una, dadas en un periodo de unas pocas horas. El máximo beneficio se da adicionando pequeñas dosis que son requeridas a intervalos periódicos (34).

El PT y/o PTT serán determinados inmediatamente después de la transfusión de PFC. La decisión para dar dosis adicionales se basa en factores terapéuticos, así como en una evaluación de laboratorio. Dependiendo de la situación clínica una dosis empírica de 5 a 10 ml de PFC/kg de peso corporal puede ser utilizada (42).

Frecuentemente el PFC se da empíricamente para detener la hemorragia o como profilaxis en pacientes con hemorragias y se basan en fórmulas antiguas tales como una unidad de PFC por cada cuatro unidades de hematíes "para complementar los factores de coagulación" sin que cualquier prueba de coagulación sea ordenada (42).

VI.I.2. REACCIONES ADVERSAS

Una de las reacciones adversas al plasma (o cualquier componente conteniendo plasma) es urticaria. La causa es una reacción entre alguna proteína presente en el plasma del donador y un anticuerpo de tipo IgE del plasma del receptor. La urticaria es generalmente leve, pero si es severa puede ser tratada por transfusión lenta, dando un antihistamínico. A pacientes quienes han desarrollado urticaria después de previas transfusiones se les administra antihistamina oral antes de otra (44).

Raramente suceden reacciones anafilácticas severas, se caracterizan por hipotensión, disnea y síntomas gastrointestinales incluyendo calambre abdominal. Estas reacciones son generalmente el resultado de una reacción entre IgA normal en el plasma del donador y los así llamados anti-IgA en el plasma del receptor; este anticuerpo se encuentra solo en sujetos " aIgA ", quienes están casi completamente deficientes de IgA (menos de 1 mg/l en plasma); la incidencia de sujetos aIgA en la población normal es aproximadamente 1/1000 (44).

Reacciones anafilácticas severas se tratan deteniendo la transfusión y dando adrenalina 0.5-1.0 mg subcutanea o intramuscularmente e hidrocortisona 100 mg a 200 mg intravenosamente (44).

VI.2. CRIOPRECIPITADO (FACTOR ANTINEMOFÍLICO CRIOPRECIPITADO)

La hemofilia A, o hemofilia clásica es una deficiencia de la porción procoagulante del complejo de factor VIII. La hemofilia A es la forma más común de hemofilia, de éstas aproximadamente 80 % tienen hemofilia A (77).

Generalmente no es aparente a menos que el nivel de factor VIII sea menor que el 10 % del normal. Individuos con menos del 1 % presentan hemorragias severas y espontáneas en músculos y articulaciones; en estos pacientes el nivel de factor von Willebrand es usualmente normal (117).

El síndrome von Willebrand se caracteriza por una deficiencia de factor von Willebrand así como niveles bajos de F VIII. Existe una deficiencia de la porción procoagulante, éstos pacientes tienen la capacidad para formar la porción procoagulante pero no la liberan dentro de la circulación en cantidades normales (77,117).

El crioprecipitado es el producto confiable que provee altas concentraciones de factor von Willebrand. Estos pacientes fueron tratados inicialmente con plasma o sangre completa, requiriendo volúmenes excesivos para efectuar y mantener la hemostasis. Una ventaja del crioprecipitado por sobre el plasma fresco es su pequeño volumen en relación a la cantidad de los factores que se encuentran concentrados en él: factor VIII:C (80-120 U), factor von Willebrand (80 U), fibrinógeno (200-300 mg), factor XIII (40-60 U) (77).

VI.2.1. USOS TERAPÉUTICOS

El crioprecipitado está indicado en los siguientes casos:

1) Hipofibrinogenemia. El crioprecipitado es el componente sanguíneo que contiene fibrinógeno en forma concentrada, se puede encontrar en una concentración de 10 a 20 veces mayor. Por lo tanto en el tratamiento de pacientes con una marcada deficiencia de fibrinógeno, el crioprecipitado es el componente sanguíneo de elección. Esta deficiencia no es común y no está frecuentemente asociada con sangrado en adultos (36,77,111,216).

2) Enfermedad de von Willebrand. El crioprecipitado puede ser usado cuando la administración de factor von Willebrand sea necesaria. Recientemente un concentrado de factor VIII disponible en los Estados Unidos ha demostrado que contiene cantidades adecuadas de factor von Willebrand, ya que otros no contienen niveles adecuados de este factor, el contenido de éste varía en las unidades de crioprecipitado de 40 % a 60 % del original (104,216).

3) Hemofilia A. El crioprecipitado puede ser usado como una fuente de factor VIII:C en el tratamiento de pacientes con hemofilia A, cuando no se dispone de concentrados de factor VIII purificados (36,77,212).

DOSIS TERAPÉUTICA

La dosis necesaria de crioprecipitado se puede calcular de la siguiente manera:

1) Hipofibrinogenemia. El número de unidades necesarias para corregir deficiencias de fibrinógeno se puede calcular de la siguiente fórmula:

Incremento deseado (g/l) = (0.2 X Número de bolsas) / volumen de plasma (L). Una regla empírica es dar una bolsa de crioprecipitado por cada 5 Kg de peso corporal. El fibrinógeno tiene una vida media de tres a cinco días y su recuperación después de transfundido es del 50 % (111).

2) Enfermedad de von Willebrand. Ya que el contenido de factor von Willebrand en bolsas de crioprecipitado individuales no es disponible, la dosis estándar es generalmente una bolsa de crioprecipitado por cada 10 Kg de peso corporal. Se recomienda una terapia de administración diaria (111).

3) Hemofilia A. La cantidad de crioprecipitado requerida para tratar deficiencias de factor VIII:C se puede determinar de la siguiente fórmula:

Número de bolsas de crioprecipitado = [(volumen de plasma (ml) X % de incremento de factor VIII necesario) / 100] / 80

La vida media de factor VIII varía de 8 a 12 horas. Por lo tanto la dosis se repite cada 12 horas para hemorragias serias y procedimientos quirúrgicos (111,212).

VI.2.2. REACCIONES ADVERSAS

Entre estas se encuentran la posible transmisión de enfermedades de origen viral como la hepatitis (39,88,132).

Sensibilización y reacción por proteínas del plasma, anticuerpos contenidos en el crioprecipitado pueden causar reacción hemolítica en el receptor por lo que se recomienda que el receptor del crioprecipitado sea de grupo sanguíneo ABO compatible con el donador de la unidad sanguínea (27,104,186).

VI.3. CONCENTRADO DE FACTOR VIII

Con el advenimiento de la terapia con componentes sanguíneos, los hemofílicos pudieron ser tratados primeramente con crioprecipitado, el cual ha sido grandemente reemplazado por concentrados de factor VIII en la mayoría de los países donde es disponible (25,141).

Debido a que muchos varones con deficiencia leve de factor VIII raramente requieren tratamiento, la incidencia de hemofilia no se conoce con certeza, se estima de 1 en 10,000 a 12,000 a nivel mundial. De ellos del 10% al 20 % estarían severamente afectados con niveles de factor VIII de cero por ciento a dos por ciento, mientras que del 15 % al 20 % estarían moderadamente afectados con niveles del 2 % al 10 %. El resto levemente afectados, pocas veces requiere de factor VIII, excepto en procedimientos quirúrgicos o dentales (13).

La hemofilia es el desorden hemorrágico más común y severo de niños y adultos. El uso del término hemofilia ha sido atribuido a Schonlein en 1820.

La era moderna del tratamiento de hemofilia empieza en 1964 con el descubrimiento del crioprecipitado y poco después con la introducción de concentrados de factores de coagulación en 1965 y 1966 (142).

La hemofilia A (deficiencia de factor VIII) es un desorden hereditario causado ya sea por ausencia de factor VIII o alternativamente por sustitución de una molécula procoagulante no funcional del factor VIII (141).

El factor VIII es una molécula compleja que consiste de una proteína procoagulante (factor VIII:C antihemofílico) y múltiples proteínicos relacionados, VIII:R (factor von Willebrand, VIII:vWF). Los pacientes con hemofilia A (hemofilia clásica) tienen deficiencia en el factor VIII:C, se transmite por cromosoma X, pero presenta un factor VIII:R normal. La severi-

dad de la hemorragia que resulta de la deficiencia congénita de factor VIII:C varía marcadamente, puede ser mínima o ausente y puede ser una historia no familiar de desorden ligado al sexo (6,171).

VI.3.1. USOS TERAPÉUTICOS

En el tratamiento de episodios hemorrágicos se deben tomar en cuenta los siguientes aspectos:

a) Severidad de la deficiencia de factor VIII. El nivel mínimo de factor VIII necesario para tener una hemostasia efectiva es de 30 - 40 %. El volumen sanguíneo es aproximadamente 70 ml/kg. En ausencia de anemia, el volumen de plasma es aproximadamente 40 -50 ml/Kg, por lo que cada mililitro de plasma contiene una unidad de cada factor de coagulación, un paciente completamente deficiente de factor requeriría de 40 - 50 U/kg para alcanzar el nivel del 100 % de actividad. Este 100 % se define como el factor VIII contenido en plasma fresco normal y que es equivalente a 100 U/dl (141,216).

Pacientes con deficiencia leve de factor VIII (entre 5 - 30 %) generalmente llevan una vida normal con hemorragias que ocurren solo después de trauma mayor o cirugía. Pacientes con deficiencia moderada de factor VIII (entre 1 - 5 %) sufren de hemorragias espontáneas, incluyendo hemartrosis. Pacientes con hemofilia severa (menos de 1 % de factor VIII) presentan hemorragias espontáneas dando como resultado hemartrosis, hematomas intramusculares (140,216).

b) La severidad del episodio hemorrágico. Los episodios hemorrágicos pueden ser clasificados dentro de leves, mayores y muy severos (41).

Episodios de hemorragia leve son por ejemplo, hemorragias en articulaciones en fases primarias, hematuria, extracciones dentales simples. Proble-

mas hemorrágicos severos son: hemartrosis, hematomas, fracturas de hueso, hemorragias gastrointestinales, dolor abdominal, dolor de cabeza sin evidencia de daño neurológico, extracciones dentales mas complicadas. Daños muy severos, por ejemplo en cirugía mayor (41).

DOSIS TERAPÉUTICA

En el tratamiento de hemofilia con factor VIII se da al paciente la inmediata y adecuada corrección de su defecto hemostático al primer síntoma sugestivo de hemorragia (140).

La dosis de factor VIII que se usa en diferentes centros de hemofilia para tratar hemorragias varía ampliamente, de paciente a paciente y de acuerdo a las condiciones del individuo en las cuales se presenta y a su severidad (140).

Como regla general, una unidad de actividad de factor VIII/Kg de peso corporal incrementará el nivel de factor VIII circulante al 2 %. La cantidad de factor VIII en cada botella de concentrado está expuesta en la etiqueta. La vida media biológica del factor VIII reemplazado se usa para determinar el intervalo de tiempo para una dosis adicional si esta es necesaria. Es de ocho a doce horas, se puede administrar dos veces diariamente (216).

Algunas veces se usa terapia profiláctica para prevenir hemorragias. Este tratamiento está diseñado para pacientes con severa hemofilia, aquellos con niveles de factor VIII por abajo del 1 % (quienes tienen un riesgo de episodios hemorrágicos casi semanalmente) (140).

Aproximadamente 85 % de factor VIII en concentrados es recuperable en circulación después de la infusión. El 50 % de la dosis infundida estará presente a las doce horas y 25 % a las 24 horas. Cuando es importante mante-

ner un nivel alto de factor VIII, por ejemplo, después de cirugía, lo mejor es dar dosis cada 12 horas (140).

Aproximadamente del 10 - 15 % de pacientes con hemofilia A desarrollan un inhibidor de factor VIII después del tratamiento con concentrados de factor VIII. Estos pacientes son relativamente refractarios al tratamiento y se les debe dar dosis muy altas de factor VIII para asegurar la respuesta (216).

Las unidades de potencia de inhibición en uso incluyen unidades Oxford y unidades Bethesda, cuya correlación es la siguiente: una unidad Oxford equivale a aproximadamente 2 - 6 unidades Bethesda (U.B.). Los concentrados de factor VIII son efectivos si los títulos de inhibidor son menos de 20 U.B./ml; con títulos más altos, los concentrados de factor VIII son inefectivos (141).

En pacientes con un título que excede de 20 U.B./ml son efectivos los concentrados de complejo protrombínico activado pero son muy costosos, y solo se reservan para episodios hemorrágicos que amenazan la vida (140,216).

En pacientes quienes requieren grandes cantidades de factor VIII son muy útiles los concentrados de factor VIII:C porcino (216).

VI.3.2. REACCIONES ADVERSAS

Los concentrados de factor VIII están preparados de "pools" conteniendo más de 20,000 unidades de plasma humano; el riesgo de enfermedades transmitidas por transfusión debe ser considerado a pesar de los procedimientos de inactivación viral (3,7,59).

La administración de concentrados de factor VIII está ocasionalmente asociada con reacciones alérgicas, leve escalofrío y náuseas. La urticaria ha sido reportada (82).

Los concentrados de factor VIII contienen isoaglutininas de grupo sanguíneo. Cuando se dan grandes cantidades o frecuentes dosis a pacientes de grupo sanguíneo A, B ó AB, podría ocurrir destrucción de eritrocitos. Esta complicación es tratada administrando células rojas tipo O compatibles serológicamente si es necesario o usando concentrados bajos en isoaglutininas (aquellos que son preparados monoclonalmente) ó lotes de productos que los fabricantes han determinado que tienen bajos títulos de isoaglutininas (216).

Téoricamente, los concentrados de factor VIII purificados por técnicas de anticuerpo monoclonal murino podrían estar asociados con reacciones de hipersensibilidad a proteínas de ratón pero esto no se ha reportado (183).

VI.4. COMPLEJO DE FACTOR IX

La coagulación de la sangre es una reacción en cascada la cual involucra diferentes factores de coagulación. Cuando existen deficiencias congénitas o adquiridas de algunos de éstos factores se causan desordenes (4).

Dos de los más conocidos son las deficiencias de factor VIII (Hemofilia A) y de factor IX (Hemofilia B). En el tratamiento de estos desordenes una terapia con concentrados del factor requerido es preferible a sangre completa o plasma fresco (47).

Los concentrados de factor IX también contienen factor II (protrombina), factor VII (proconvertina) y factor X (Prower-Stuart). Se les conoce como concentrado de complejo protrombínico; concentrado de complejo de factor IX ó PPSB (protrombina, proconvertina, factor Stuart y factor antihemofílico B). Estos concentrados se encuentran disponibles comercialmente en Estados Unidos desde 1969 para el tratamiento de hemofilia B, así como en deficiencias congénitas de los otros factores del complejo protrombínico. Este producto representa un importante avance en el tratamiento de pacientes hemofílicos y ha mejorado su calidad de vida (35,78).

La hemofilia B es un desorden hemorrágico hereditario, ligado al cromosoma X; con una incidencia de aproximadamente 1 en 30,000. Es un desorden secundario a mutaciones o deleciones en el gen del factor IX. Los síntomas de la enfermedad van de leves a severos (tabla VI.4.1) (10).

La principal meta de la terapia con concentrados es la de alcanzar un nivel hemostático en circulación, usando la dosis efectiva más baja del concentrado (3).

Aunque el uso de estos concentrados ha mejorado la calidad de vida de los pacientes, también han producido diversas reacciones adversas, como la transmisión de agentes infecciosos ó complicaciones tromboembólicas. Pero el mejoramiento en los procesos tanto de obtención como de inactivación de virus en estos concentrados ha disminuido las posibles complicaciones post-transfusionales (3,55,115).

VI.4.1. USOS TERAPÉUTICOS

La indicación primaria de concentrado de complejo protrombínico es para el tratamiento de pacientes con hemofilia B (deficiencia de factor IX en episodios de sangrado y profilaxis). También es útil en el tratamiento de pacientes con deficiencias de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K (77,212).

Este producto también ha demostrado ser hemostáticamente efectivo en pacientes con deficiencias de factor VIII:C (hemofilia A), los cuales han desarrollado anticuerpo contra VIII:C; debido a que tienen actividad "bypass" sobre el factor VIII. El mecanismo exacto de esta actividad se desconoce. Una terapia profiláctica con bases generales no ha sido desarrollada, regímenes más específicos han sido desarrollados de observaciones empíricas de pacientes en años de tratamiento y pueden variar de un centro de transfusión a otro. La duración de la terapia varía dependiendo de la gravedad de la hemorragia. Guías generales para el manejo de la hemofilia B se encuentran en la tabla VI.4.2. (35,121,164).

Tabla VI.4.1. Clasificación clínica de Hemofilia B (164)

Clasificación	Nivel de factor IX	Condición clínica
Severa	1% del normal (0.01 unidades/mL)	hemorragias espontáneas frecuentes y hemartrosis; sangrados que amenazan la vida
Moderada	1% a 5% del normal (0.01 a 0.05 u/mL)	hemartrosis espontáneas ocasional hemorragia con trauma o cirugía
Leve	6% a 60% del normal (0.06 a 0.60 u/mL)	hemartrosis espontánea rara; hemorragia con trauma o cirugía

Tabla VI.4.2. Terapia de reemplazo en pacientes con Hemofilia B (164)

Tipo de hemorragia	Factor IX * Nivel requerido (%)	Frecuencia de dosis (horas.)	Duración de terapia (días)
Menor			
Hemartrosis, no complicada	20-30	12-24	1-2
Superficial muscular	20-30	12-24	1-2
Superficial tejido blando	20-30	12-24	1-2
Moderada			
Intramuscular con disección	25-50	12-24	Tratada hasta que el sangrado cesa y comienza a cicatrizar; aproximadamente 2 a 7 días
Tejido blando con disección	25-50	12-24	
Membranas mucosas	25-50	12-24	
Extracciones dentales	25-50	12-24	
Hematuria	25-50	12-24	
Mayor			
Faringe	50-100	12-24	7-10
Retrofaringe	50-100	12-24	7-10
Retroperitoneo	50-100	12-24	7-10
Cirugía	50-100	12-24	7-10

* Las dosis recomendadas son aproximadas y pueden variar de un centro a otro + Niveles mayores que 50% son probablemente seguros cuando se usan concentrados altamente purificados. Productos menos puros se asocian con complicaciones tromboembólicas y no son recomendados.

DOSIS TERAPÉUTICA

La dosis terapéutica de factor IX se puede calcular de la siguiente manera:

- I. $\text{Peso (Kg)} \times 70 \text{ ml/Kg} = \text{volumen de sangre (ml)}$
- II. $\text{Volumen de sangre (ml)} \times (1.0 - \text{hematocrito}) = \text{volumen de plasma (ml)}$
- III. $\text{Volumen de plasma (ml)} \times (\text{nivel de factor IX deseado U/ml} - \text{nivel de factor IX inicial U/ml}) = \text{Unidades de factor IX requeridas}$

La recuperación " in vivo " de factor IX es aproximadamente 50%. La vida media de éste factor es de 24 horas; así la dosis inicial se incrementa el nivel a 50%, las dosis subsecuentes serán la mitad de la dosis inicial y pueden darse cada 12 a 24 horas (77,212).

VI.4.2. REACCIONES ADVERSAS

El uso de concentrados de complejo protrombínico ha sido asociado con diferentes reacciones adversas. Entre las que se han reportado se encuentran la transmisión de enfermedades de origen viral, complicaciones tromboembólicas y el desarrollo de inhibidores en contra del factor IX. Siguiendo a la administración de estos concentrados, algunos pacientes desarrollan fiebre transitoria, escalofríos, dolores de cabeza, rubor (35,55,68,186).

HEPATITIS VIRAL

Estudios recientes han mostrado que los concentrados de factor IX pueden transmitir no solo hepatitis B (HB), sino también hepatitis no A no B (HNANB). Collins mostró en 1983 una incidencia de 2.4% de hepatitis post-

transfusional; Craske realizó un estudio en hemofílicos en Gran Bretaña en el que encontró que la HNANB se desarrolló en una alta proporción de pacientes (55).

Pacientes hemofílicos con hepatitis aguda crónica mostraron un riesgo significativo de cirrosis. Pacientes no tratados anteriormente con concentrados de complejo protrombínico presentan un 5% de riesgo de desarrollar HNANB. Como resultado del desarrollo de pruebas de laboratorio más específicas y la disponibilidad de productos más altamente purificados, la transmisión de hepatitis vía concentrados de factor IX ha reducido y se espera eliminarlo. Muchos pacientes hemofílicos infectados con este virus sufren significativa morbilidad y mortalidad por enfermedad crónica del hígado (39,88).

SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA)

Un alto riesgo de infección con virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), ha sido asociado con el uso de concentrados de factores de coagulación manufacturados a finales de la década de los setenta y principios de los ochenta. Los primeros casos de SIDA transmitidos por transfusión fueron detectados en 1982. La infección ha ocurrido en pacientes con hemofilia severa A y en menor cantidad en hemofilia B. Pocos pacientes con enfermedad de von Willebrand han sido afectados (62).

Para estimar el riesgo de transmisión de HIV por concentrados de factores de coagulación se llevó a cabo un estudio en Estados Unidos en personas receptoras de concentrados derivados del plasma. Dicho estudio se inició en 1987 y concluyó en Diciembre de 1990. Este proyecto sugiere que el riesgo de seroconversión HIV es extremadamente bajo. Solo 37 seroconversiones fueron

identificados de un total de 9496 y solo nueve se aceptaron estar asociadas con concentrados de factores de coagulación, según el criterio de la " Food and Drug Administration " (FDA) (62).

Los esfuerzos para reducir el riesgo de transmisión de éstos virus incluyen la inactivación o eliminación durante el proceso de fraccionamiento y la realización de pruebas de detección en donadores de plasma. El riesgo de transmisión de los nuevos productos que han estado sujetos a métodos de inactivación o de remoción de virus es difícil de estimar (88).

Desde 1985, diversos métodos han sido desarrollados para inactivar concentrados de factor VIII y IX. Calentamiento a 60 °C o 69 °C por 20 a 144 horas, dando como resultado la inactivación del virus VIH, pero no inactiva el virus de la hepatitis B o C. Otros métodos se basan en el calentamiento terminal del producto liofilizado a 80 °C por 72 horas, o calentamiento en solución a 60 °C en una suspensión contenido n-heptano o adicionando al plasma una mezcla solvente-detergente para inactivar virus con envoltura lipídica (hepatitis B y VIH) (tabla VI.4.3.) (55,120).

Tabla VI.4.3. Productos disponibles comercialmente para terapia de reemplazo de factor IX: Métodos de preparación y riesgos de transmisión viral (164).

Producto (Manufacturador)	Preparación	Riesgo de transmisión viral	
		Hepatitis	VIH
Concentrados de complejo protrombínico			
Rebulin VH (Immuno)	Calentado con vapor a 60 °C por 10 horas a 190 mbar, después a 80 °C por 1 hora a 37 ⁵ mbar	NO	NO
Proplex T (Baxter-Hyland)	Calor seco a 60 °C por 144 horas	SI	NO
Profiline HT (Alpha)	Calor húmedo a 60 °C por 20 horas en N-heptano	SI	NO
Konyne 80 (Cutter)	Calor seco a 80 °C por 72 horas " super calentamiento "	NO	NO
Concentrados de Factor IX altamente purificados			
Alphanine (Alpha)	Adsorción en citrato de bario seco	no reportado	NO
Alphanine PD (Alpha)	Como el anterior, con extracción solvente - detergente	NO	NO
Mononine (Rorer)	Cromatografía de inmunofinidad con anticuerpo monoclonal, extracción con tiocianato de sodio Ultrafiltración	NO	NO
Concentrado de Complejo Protrombínico activado *			
Autoplex (Baxter-Hyland)	Exposición inicial a etanol, calor seco a 60 °C por 144 horas	RARO	NO
FEIRA (Immuno)	Vapor calentado a 60 °C por 10 horas a 190 mbar, después calentado a 80 °C por 1 hora a 370 mbar	NO	NO

* Estos productos son usados para tratar pacientes con hemofilia A y B que poseen inhibidores (anticuerpos) a los factores VIII o IX respectivamente.

COMPLICACIONES TROMBOEMBÓLICAS

Son otras de las reacciones adversas relacionadas con la administración de complejo protrombínico después de su uso clínico en procesos quirúrgicos en pacientes hemofílicos. Incluyen coagulación intravascular diseminada (DIC), trombosis venosa grave y embolia pulmonar (88).

Entre éstas complicaciones también se encuentra el infarto al miocardio. Entre 1987 y 1990, se reportaron 72 casos de enfermedades tromboembólicas asociadas con el uso de concentrados de complejo protrombínico, entre éstos cinco fueron de infarto al miocardio. Se ha reportado infarto agudo al miocardio en pacientes jóvenes que recibieron concentrados de F IX para control de sangrados, algunos recibieron grandes y repetidas dosis (115).

La naturaleza de las especies presentes en éstos concentrados y que son responsables de inducir éstas complicaciones no han sido bien establecidas. Se ha propuesto que algunos de los factores de coagulación activados son la causa de la trombogenicidad (VIIa, IXa, Xa, XIa), pero esto no está comprobado (35,104,121).

Este problema ocurre principalmente en asociación con el estado postoperatorio. Se han reportado CID y complicaciones tromboembólicas en condiciones patológicas con deficiencias adquiridas de los factores dependientes de la vitamina K, particularmente en enfermedad del hígado. Por lo que el uso de éstos concentrados está contraindicado en pacientes con enfermedades hepáticas ya que presentan con frecuencia bajos niveles de antitrombina III y es más probable que desarrollen CID (212).

Con el desarrollo de concentrados de F IX altamente purificados desde 1992, que se encuentran libres de otros factores de coagulación y contaminantes virales se ha disminuido el riesgo de complicaciones trombóticas y

éstos concentrados son el tratamiento de elección en todos los pacientes con hemofilia B, ya que los niveles de F IX pueden ser incrementados seguramente al 100 % del normal (88,164).

DESARROLLO DE INHIBIDORES AL FACTOR IX

Anticuerpos al F IX se han desarrollado en 2.5 % a 16 % de pacientes con severa hemofilia B. Estos inhibidores son aloanticuerpos, usualmente IgG 4 . La terapia en pacientes con inhibidores depende del título de éste. ; parece que las complicaciones tromboembólicas asociadas con complejo de factor IX son menos probables en pacientes con inhibidores (164).

Pacientes que presentan altos títulos pueden ser tratados exitosamente con concentrados de factor IX activados. Estos productos son sujetos a " activación controlada " durante el proceso de elaboración y contiene los factores dependientes de la vitamina K activados (115,164).

VI.5. CONCENTRADO DE ANTITROMBINA III (AT III)

La AT III es una proteína del plasma relativamente descubierta en la actualidad ha sido aislada desde los últimos 20 años. El desarrollo de técnicas para el aislamiento de AT III de grandes " pools " de plasma ha dado como resultado la disponibilidad de concentrados para terapia de reemplazamiento (185).

Los concentrados de AT III se han utilizado en Europa de la mitad de los años setenta en pacientes con deficiencias hereditarias y/o adquiridas de AT III. En los Estados Unidos, la primera preparación de AT III humana fué autorizada en 1990. Las indicaciones para el uso del producto están restringidas al tratamiento de pacientes con deficiencia hereditaria de AT III para prevenir trombosís después de cirugía, procedimientos obstétricos ó cuando esos pacientes sufren de tromboembolismo (137).

La frecuencia de la deficiencia hereditaria de AT III está estimada en uno por 2,000 a 5,000 en la población general (203,217).

El patrón de herencia es dominante autosomal, las personas con deficiencia hereditaria de AT III tienen niveles de 40 % a 60 % del normal de AT III en plasma y tienen un riesgo mayor de tromboembolismo asociado con embarazo o parto, procedimientos quirúrgicos, trauma, infección o el uso de anticonceptivos orales. Entre el 42 % y 68 % de mujeres embarazadas no tratadas deficientes en AT III desarrollan trombosís ya sea durante el embarazo o después del parto (57,81,172).

VI.5.1. USOS TERAPÉUTICOS

La deficiencia adquirida de AT III se puede dar en diversas condiciones que incluyen: enfermedad hepática, síndrome nefrótico, CID, sepsis y después de cirugía (185).

En la deficiencia adquirida, los niveles de AT III pueden ser reducidos por una disminución en la síntesis (pacientes con cirrosis hepática y en infantes prematuros), por un incremento en la excreción o un aumento en su consumo (137).

La deficiencia hereditaria de AT III se caracteriza por la aparición de trombos venosos múltiples y embolia pulmonar. Los pacientes con este padecimiento tienen un nivel circulante que va de 40% a 60% del normal y se evalúa por medio de su actividad biológica (138).

El manejo de pacientes con deficiencia hereditaria de AT III depende del estado del paciente:

a) Pacientes asintomáticos: la edad de ataque del primer episodio trombótico exhibido por un paciente con deficiencia hereditaria varía considerablemente y algunos pacientes permanecen asintomáticos durante décadas. Se ha reportado que la trombosis está en función de la edad; el riesgo de trombosis se incrementa entre los 15 y 30 años y empieza a disminuir después de los 30 años (87).

b) Pacientes con una historia de trombosis: una vez que los pacientes han demostrado trombosis manifiesta se le da un tratamiento con anticoagulantes derivados de cumarina. Este tratamiento puede ser efectivo para prevenir trombosis y en algunos casos puede también conducir al aumento del nivel de AT III endógeno. Sin embargo, pacientes sometidos a terapia con anticoagulantes orales pueden también desarrollar trombosis (137).

c) Pacientes con factores de alto riesgo: aunque existen pruebas clínicas no controladas, la terapia profiláctica para prevenir trombosis en situaciones reconocidas como de alto riesgo (embarazo, parto y período postparto) parece ser una vía razonable.

d) Procedimientos quirúrgicos: se conoce que la cirugía aumenta el riesgo de trombosis en pacientes con deficiencia hereditaria de AT III. Se ha reportado éxito en el uso de concentrado de AT III con y sin heparina para prevenir trombosis (137,138,105).

e) Pacientes con episodios trombóticos agudos: estos pacientes se tratan generalmente y algunas veces se controlan con heparina intravenosa. En algunas ocasiones el aumento de dosis de heparina se requiere para producir una prolongación satisfactoria del tiempo de tromboplastina parcial activada, mientras que en otras instancias, los pacientes son refractarios a la heparina. En el último caso, la administración de preparaciones de AT III se ha reportado que controla la extensión y recurrencia de trombosis (138,105).

Los pacientes con deficiencia adquirida de AT III han sido tratados con concentrados de AT III. La CID puede estar asociada fundamentalmente a condiciones tales como sepsis, quemaduras, cáncer, trauma y complicaciones obstructivas. Se ha intentado reducir la coagulación activa tratando a los pacientes con heparina, pero no siempre ha dado buen resultado. Debido a que los niveles de AT III disminuyen en pacientes con CID, muchos investigadores en Europa y Japón han tratado a estos pacientes con concentrado de AT III solo en combinación con heparina para mejorar los resultados. Sin embargo, la mayoría de estudios a este respecto no han sido controlados y han incluido pacientes con varias enfermedades, lo cual hace difícil evaluar el actual beneficio derivado del tratamiento con AT III (21,119,211).

DOSIS TERAPÉUTICA

La terapia de reemplazamiento es ayudar a restaurar el nivel normal de actividad biológica. La dosis varía con el paciente y depende del nivel circulante basal de AT III, del peso del paciente y de su respuesta a dicha dosis. La recuperación " in vivo " de AT III después de la administración de concentrados de AT III es estable en pacientes con deficiencia hereditaria de AT III y va del 80 % al 100 % (134,185).

La recuperación es de un 2.0 U a un 2.5 U por UI administrada por Kg de peso corporal. La vida media está entre 60 y 70 horas, y no se altera por la administración de derivados cumarínicos, sin embargo, la administración de heparina podría reducir el nivel circulante de AT III y acortaría significativamente la vida media de AT III (202).

Asumiendo una recuperación " in vivo " de 90 % (0.9), un nivel de AT III basal de 45 % y un volumen de plasma de 40 ml/Kg de peso corporal, la siguiente fórmula podría ser usada para calcular la dosis a ser administrada para lograr un nivel circulante de 120 % del normal:

$$\frac{40 \text{ ml/Kg} \times \text{peso (Kg)} \times (1.2 \text{ U/ml} - 0.45 \text{ U/ml})}{0.9 \text{ (recuperación)}}$$

En algunas instancias, sin embargo, la recuperación podría ser más baja, podría variar con la condición del paciente y podría cambiar mientras el paciente está siendo tratado. Es además importante medir el nivel circulante después de la administración de una primera dosis dada. Se recomienda el monitoreo del nivel una vez por día durante el período de tratamiento (202).

VI.5.2. REACCIONES ADVERSAS

La administración de concentrados de AT III con y sin heparina ha tenido éxito en la prevención de trombosis y no se han reportado casos de complicaciones trombóticas en pacientes tratados con terapia de reemplazo (81).

VI.6. ALBÚMINA HUMANA

Las funciones fisiológicas de la albúmina han recibido una considerable atención, aunque algunos estudios se han enfocado más a su capacidad de transporte de pequeñas moléculas, otros a su capacidad de mantener el volumen de plasma y su presión osmótica, la cual está considerada como la principal función de la albúmina (67,78).

La albúmina a pesar de tener una carga negativa fuerte se une tanto a cationes como aniones (orgánicos e inorgánicos), así como a material no cargado. Algunas sustancias endógenas se unen a la albúmina, por ejemplo, ácidos grasos de cadena larga, bilirrubina, fosfolípidos y otros lípidos incluyendo esteroides y cationes metálicos parecidos al calcio y cobre, también la albúmina se une a muchas drogas (130).

Durante todos los estados hipovolémicos la aplicación de sustitutos de volumen de plasma constituye la base de profilaxis y terapia de choque hipovolémico (118).

Las concentraciones fisiológicas de albúmina (40 g/l - 50 g/l en plasma) contribuye en un 60 % - 80 % de la presión osmótica coloidal del plasma normal (26 - 28 mm de Hg). Las soluciones de albúmina humana al 5 % tienen una presión osmótica coloidal similar al plasma y soluciones al 20 % son hiperoncóticas.

Las soluciones de albúmina se vienen usando desde hace aproximadamente 50 años, las soluciones conteniendo coloides tales como albúmina y fracción proteínica del plasma (FPP) son utilizadas en la reanimación de pacientes hipovolémicos e hipotensivos y para la repleción de proteínas del plasma involucradas en el mantenimiento de la presión osmótica coloidal (148,216).

VI.6.1. USOS TERAPÉUTICOS

Las indicaciones para el uso de soluciones de albúmina son las siguientes:

1) Pérdida temporal excesiva de albúmina y/o disminución de su síntesis por ejemplo en casos de quemaduras y grandes operaciones quirúrgicas. Las quemaduras causan un incremento prolongado en la permeabilidad microvascular resultando una gran pérdida de fluido y proteína. Con la solución al 25 %, una infusión de volumen pequeño puede ser usada en estas situaciones con bajo riesgo de sobrecarga circulatoria. En deficiencia congénita de albúmina (condición rara), los sujetos afectados cuya concentración de albúmina está por abajo de 0.1 g/l puede experimentar sólo ligero edema y tienen problemas atribuibles a desórdenes en las funciones de transporte (38,148).

2) Enfermedades agudas que se acompañan de hipoalbuminemia con menos de 20 - 25 g/l; por ejemplo, en nefrosis aguda o insuficiencia hepática aguda. La hipoalbuminemia causada por una pérdida incrementada de albúmina del plasma a través de los riñones, intestino o por enfermedad hepática crónica conduce a edema y contracción del volumen intravascular que dispara una retención compensatoria de sal y agua. En aquellos pacientes quienes no responden al tratamiento con diuréticos, la infusión de albúmina al 20 % después de una inyección intravenosa de diurético (como furosemida) junto con un antagonista de aldosterona puede producir una diuresis. Una vez que el edema ha aclarado, dosis mucho más pequeñas de diurético son requeridas para mantener el inicio de diuresis (38,148).

3) Exanguinotransfusión: por ejemplo, en la incompatibilidad Rh y la plasmaféresis terapéutica.

4) Intervenciones especializadas, por ejemplo hemodiálisis y circula-

ción extracorporea como en cirugía cardiopulmonar con derivación de la corriente sanguínea (38,148).

5) Hipovolemia. El choque traumático ha sido tradicionalmente una importante indicación del uso de albúmina. Albúmina al 25 % es útil como expansor de volumen de plasma en el tratamiento de pacientes con choque, se necesita una adecuada hidratación cuando se emplea albúmina al 25 % para tratar estos pacientes. En la deshidratación existe poco fluido extravascular por lo que la albúmina concentrada debe ser administrada en cantidades adecuadas de su suplemento fluido. En esos casos, al menos 500 ml de fluido como solución salina o solución de Ringer con lactosa se requieren por cada 100 ml de albúmina al 25 %. Varios estudios sugieren que mucha de la albúmina se usa inapropiadamente. En la siguiente tabla se muestran las indicaciones de productos de albúmina de uso ocasional y de uso justificado (78).

Tabla VI.6.1. Usos terapéuticos de productos de albúmina (78)

USO APROPIADO

choque
quemaduras
síndrome respiratorio doloroso en adulto
enfermedad hemolítica del recién nacido
reemplazo del plasma en plasmaféresis terapéutica

USO OCASIONAL

falla hepática aguda
medio de resuspensión de eritrocitos
ascitis
hipoproteïnemia después de cirugía
nefrosis aguda
diálisis renal

USO INJUSTIFICADO

desnutrición
nefrosis crónica
cirrosis crónica

VI.6.2. REACCIONES ADVERSAS

Las soluciones de albúmina poseen un excelente y reconocido grado de inocuidad a causa de que la inspección de su calidad ha sido adecuada, no solo en cuanto al plasma inicial, sino también durante la elaboración de los productos finales; sin embargo, ocasionalmente los preparados de albúmina pueden producir incidentes desagradables generalmente pasajeros como son: prurito, urticaria, erupción cutánea; la transmisión de hepatitis B es muy rara ya que se hace una selección del donador como prueba de rutina antes de la obtención del plasma para fraccionamiento. La contaminación bacteriana debida a endotoxinas también es muy rara (41).

La hipotensión algunas veces severa, ha sido relacionada con la presencia de activador de procalcireina (fragmentos de factor Hageman), pero la contaminación con esta sustancia es ahora removida durante la manufactura y las reacciones hipotensivas han sido casi eliminadas (5,96,140).

VI.7. INMUNOGLOBULINAS

La iniciación de terapia con inmunoglobulinas fué atribuida a Behring y Kitasato en Alemania a finales del siglo pasado (1890) (78).

Las inmunoglobulinas, formalmente conocidas como gammaglobulinas ó inmunoglobulinas séricas, tienen uso terapéutico en el tratamiento de una amplia variedad de condiciones (78).

Las preparaciones de inmunoglobulinas estan hechas ya sea para uso intravenoso o intramuscular. Las inmunoglobulinas especificas, tales como inmunoglobulinas contra hepatitis B y contra Rh, están comúnmente disponibles en los Estados Unidos sólo para administración intramuscular (78).

Las inmunoglobulinas para uso intramuscular contienen conservadores como glicina para asegurar que presenten los niveles requeridos por la FDA de anticuerpos contra difteria, sarampión y poliomielitis (78).

En las preparaciones para uso intramuscular la concentración de proteínas de las inmunoglobulinas humanas normales oscila entre 150 g/Kg y 180g/Kg (15%-18%) y en las inmunoglobulinas humanas especificas varia entre 100 g/Kg y 180 g/Kg (10%-18%). Las inmunoglobulinas humanas para uso intravenoso se administran como soluciones de proteínas en concentración aproximada de 50 g/L (14B).

VI.7.1. USOS TERAPEÚTICOS

Las preparaciones de inmunoglobulinas para uso intravenoso fueron aceptadas en los Estados Unidos en 1981. Las indicaciones para el uso de inmunoglobulinas son las siguientes:(16,20f).

Inmunoglobulinas humanas normales:

- 1) En síndromes de deficiencias inmunes (Tabla VI.7.1, VI.7.2, VI.7.3)

Tabla VI.7.1. Usos de inmunoglobulinas humanas normales en deficiencias humorales (78)

Condiciones	Comentario
Deficiencias primarias de anticuerpos Agammaglobulinemia ligada a X	Dosis usual 400 mg/Kg/mes (8 ml/Kg 5% IGIV ^a ó 2.3 ml/Kg 16.5% Im IGS ^b); así se logra una mejor dosis mensual con IGIV
Deficiencias en subclases de IgG Varias Disgammaglobulinemias	Estudios bajo investigación Se ha puesto énfasis en la ausencia selectiva de IgA a causa de la posible sensibilización contra IgA y desarrollo de anticuerpos reagénicos (IgE)
Deficiencias secundarias de anticuerpos Hipogammaglobulinemia fisiológica en infantes	La administración de IGIV puede ser benéfica hasta la maduración del sistema inmune del infante (Estudios bajo investigación)
Infantes prematuros con bajo peso y SIDA	Para prevenir infecciones nosocomiales se están haciendo estudios de investigación
Enteropatías con pérdida de proteínas	No hay resultados clínicos disponibles
Síndrome nefrótico	
Deficiencias secundarias de anticuerpos contra tumores malignos, por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (LLC)	Se usa en LLC dosis de 400 mg/Kg cada 3 semanas por 1 año
Quemaduras	Los resultados han sido desalentadores

- a: Inmunoglobulina intravenosa humana (IGIV) está generalmente disponible en preparaciones al 5%
b: Inmunoglobulina sérica-humana (IGS) se da intramuscularmente y está disponible en solución al 16.5%

Tabla VI.7.2. Usos de inmunoglobulinas humanas en inmunodeficiencias combinadas (78)

Condición	Comentario
Inmunodeficiencias combinadas severas, como síndrome de agammaglobulinemia tipo suizo	La terapia definitiva requiere un trasplante compatible de médula ósea. La terapia con inmunoglobulinas puede ser útil y exitosa en injerto de médula ósea

Tabla VI.7.3. Usos de inmunoglobulinas en inmunodeficiencias atípicas (26)

Condición	Comentario
Ataxia y telangiectasia	Existe una deficiencia humoral con severa disminución de IgA secretora en suero. Se debe tener precaución con el uso de IgG, no hay estudios disponibles
Síndrome de Wiskott-Aldrich	Se han reportado resultados beneficiosos con el uso de IGIV con efectos positivos tanto en infecciones como en trombocitopenia

2) Para prevenir hepatitis A, sarampión, varicela y en ciertas ocasiones rubeola (tabla VI.7.4.) (78).

Tabla VI.7.4. Uso de inmunoglobulinas séricas al 16.5% en enfermedades infecciosas^a (78).

Enfermedad	Objetivo	Dosis ^b (ml/Kg)	Comentarios
Hepatitis A	Profilaxis en exposición simple	0.01	
	Profilaxis en exposición múltiple	0.05 cada 4-6 meses	
Hepatitis B	Profilaxis en post-exposición	0.06-0.12	Solo si IGHB no está disponible
HNANB	Profilaxis	0.12	Se ha utilizado en - transfusión, aunque no se ha confirmado
Sarampión	Profilaxis	0.25	A pacientes inmunocomprometidos se les da 0.5 ml/Kg
Rubeola	Profilaxis	0.55	Puede prevenir daño fetal en embarazo, - pero su uso terapéutico se avoca al aborto provocado
Varicela	Profilaxis		En pacientes de alto riesgo si no se dispone de IGIVZ

IGHB: Inmunoglobulina contra hepatitis B

IGVZ: Inmunoglobulina contra varicela-Zóster

a: Los concentrados de inmunoglobulina intravenosa (IGIV) contienen el mismo título de anticuerpo/unidad de peso de IgG que las preparaciones de inmunoglobulina sérica intramuscular. Así teóricamente es posible administrar una dosis equivalente de IGIV al 5% multiplicando la dosis de arriba por 3.3

b: la dosis se basa en la inmunoglobulina sérica al 16.5% dada por inyección intramuscular

3) En el tratamiento de hipogammaglobulinemia. Los pacientes con este padecimiento congénito o adquirido que tienen niveles de IgG menores de 2 g/l pueden ser considerados como candidatos para tratamiento. Han sido satisfactorias las preparaciones de inmunoglobulinas tanto intravenosas como subcutáneas. La dosis recomendada es de 0.2 g/Kg de peso corporal una vez al mes. Si la respuesta no es satisfactoria, la dosis puede aumentar o dar la misma con más frecuencia (140).

4) Sepsis neonatal. Ha sido reportado un tratamiento de sepsis neonatal particularmente en infantes prematuros que pesaban menos de 1,500 g de 0.5 g con 0.5 g diarios durante seis días dando buenos resultados (140).

5) Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) ó púrpura trombocitopénica autoinmune. En niños que tienen sangrado activado, junto con corticosteroides, que no tengan remisión después de cuatro semanas de tratamiento con corticosteroides, o cuando estos estén contraindicados y en adultos que presenten sangrado activo que no responden a corticosteroides durante 10 - 14 días y también cuando éstos estén contraindicados. La dosis que está indicada es de 0.4 g/Kg de inmunoglobulina intravenosa por día, junto con un monitoreo de cuenta diaria de plaquetas. Se descontinúa la inmunoglobulina intravenosa si la cuenta de plaquetas es adecuada en tres días (103).

6) Púrpura post-transfusional. Es efectivo el mismo esquema de dosis que para PTI.

7) Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Algunos reportes han descrito éxito en el tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas en pacientes con PTT. El mecanismo de acción es desconocido; no se dispone de datos suficientes para evaluar totalmente su efectividad terapéutica (103).

8) Desórdenes hematológicos misceláneos. La terapia con inmunoglobulinas intravenosas para anemia hemolítica autoinmune, neutropenia autoinmune y

tronicitopenia asociada a VIH es efectiva solo en casos seleccionados. Respuestas variables han ocurrido en el tratamiento de pacientes con inhibidores de factor VIII (18,30,31,58).

GLOBULINAS HIPERINMUNES (Inmunoglobulinas humanas específicas). Estos productos concentrados se preparan de pacientes con altos títulos de anticuerpos particulares (ó del suero de animales inmunizados) y su uso terapéutico se da en algunas enfermedades específicas (tabla VI.7.5) (78).

Tabla VI.7.5. Usos de Inmunoglobulinas hiperinmunes (78)

Enfermedad	Objetivo	Preparación	Concentración (%)	Dosis ^a	Comentario
Hepatitis B	Profilaxis post-exposición	IGHB	16.5	0.06 ml/Kg In.	
	Profilaxis en infantes de alto riesgo	IGHB	16.5	0.5 ml al nacer	Se usa como vacuna se puede repetir contra hepatitis B a los 3 meses
Tétanos	Profilaxis post-exposición Terapia	IG S tétanos	16.5	250 unidades	Se usa como toxoide contra tétanos
		IG S tétanos	16.5	Arriba de 6000 unidades	
Rabia	Profilaxis post-exposición	IG S rabia	16.5	20 UI/Kg	También como vacuna
Varicela-Zóster	Profilaxis post-exposición	IG VZ	16.5	12.5 UI/Kg	Individuos de alto riesgo
Sensibilización Rh	Profilaxis contra sensibilización Rh en embarazo	IG S Rh	16.5	300 µg ó más	Postparto inmediato
	Profilaxis antenatal	IG S Rh	16.5	300 µg	por 28 semanas
	Aborto, amniocentesis, embarazo ectópico y otras de sus complicaciones	IG S Rh	16.5	300 µg	Al tiempo del parto o del acontecimiento
Infección por CMV ^b	Profilaxis en alto riesgo	IG IV CMV	5	Aprox. 400 mg/Kg por semana	Bajo investigación
Pseudomonas ^b	Profilaxis en alto riesgo	IG IV-Ps	5	-	Bajo investigación

a= Esta tabla intenta ser como una guía. Es esencial seguir cuidadosamente las instrucciones de dosis detallada por el fabricante cuando se administran esas preparaciones.

b= Se están obteniendo resultados favorables en profilaxis y tratamiento de infecciones específicas en individuos susceptibles. Esos productos solo se permiten comúnmente en Alemania.

La globulina hiperinmune contra hepatitis B se prepara de donadores con alto título de anti-HBs. La profilaxis de esta enfermedad inmediatamente después de la exposición en una persona anti-HBs negativa. La inmunoglobulina contra hepatitis B está indicada en profilaxis post-exposición contra hepatitis B. La exposición puede ser parenteral, por ejemplo, cuando hay daño por picadura con aguja o puede ser a través del contacto con membrana mucosa o ingestión oral. También está indicada en profilaxis de infección en infantes con quemaduras y que tienen madres HBs-positivas (74).

La globulina hiperinmune contra rabia está aprobada en prevención de rabia junto con inmunización activa contra rabia en individuos sospechosos de exposición a la enfermedad, excepto en aquellos que han sido previamente inmunizados con la vacuna contra la rabia y han confirmado adecuados títulos de anticuerpos contra la rabia (75).

Globulina hiperinmune contra tétanos. Está indicada en pacientes que requieren inmunidad inmediata contra toxina del tétanos, especialmente aquellos que tienen poca o no preexistente inmunidad activa conferida por inmunización activa pasada (76).

La globulina hiperinmune contra varicela-Zoster se aplica como medida profiláctica a pacientes con inmunosupresión que han estado expuestos a la varicela (78).

La inmunoglobulina contra Rh ⁺(D) se utiliza para prevenir isoimmunización en un individuo Rh⁺(D)-negativo expuesto a sangre Rh⁺(D)-positiva ya sea como resultado de una hemorragia materno-fetal que ocurre durante el nacimiento de un infante Rh⁺(D)-positivo, aborto (espontáneo ó inducido) o después de "amniocentesis" ó trauma abdominal. Similarmente la inmunización que resulta en la producción de anti-Rh⁺(D) después de transfusión de eritrocitos Rh positivos contra un receptor de Rh⁺(D) negativo podría prevenir

se administrando inmunoglobulinas Rh^o (D). Esta inmunoglobulina intravenosa no está comúnmente disponible en los Estados Unidos (165).

Otras indicaciones para inmunoglobulinas intravenosas, que aunque todavía no están disponibles en Estados Unidos, incluyen su uso en el control de infecciones por citomegalovirus en trasplantes de médula ósea (78).

VI.7.2. REACCIONES ADVERSAS

Se considera que cuando las inmunoglobulinas se administran por vía intramuscular no causan efectos secundarios inmediatos en la mayor parte de los pacientes, pero pueden ocurrir algunas reacciones adversas como lo es el dolor local en el sitio de la infección, con menor frecuencia sobrevienen enrojecimiento del rostro, cefalea, escalofríos y náuseas. Las reacciones graves implican una respuesta anafiláctica (148).

Las reacciones adversas asociadas con las preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas incluyen:

- Agregado de inmunoglobulinas
- Reacciones de vasoactividad
- Reacciones alérgicas, especialmente en pacientes con hipogammaglobulinemia con deficiencia de IgA
- Autoanticuerpos contra eritrocitos
- Hipervolemia
- Hiper-viscosidad
- Daño renal (29,96,162,175).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abott and Andrews, R.S. Introducción a la cromatografía. Ed. Alhambra. España (1983); 46-52.
- 2.- Albarrán, S.C. y Albarrán, B.L. Manual técnico del banco de sangre. La Prensa Médica Mexicana, S.A. México, D.F. (1985); 4-9, 13-25, 42-47.
- 3.- Aledort, L.M. Blood products and immune charges: Impacts without HIV infection. *Semin Hematol.* 25 (suppl 1). (1988); 14
- 4.- Allain, J.P. and Rock, G.A. What are the critical factors in the production and quality of frozen plasma for fractionation. *Vox Sang.* 44(24); 256-259. (1983).
- 5.- Alving, B.M., Hojima, Y., Pisanol, J.J. Hypotension associated with prekallikrein activator (Hageman factor fragments) in plasma protein fraction. *N Engl J Med.* 229; 66. (1978).
- 6.- American Medical Association. Drug evaluation. W. B. Saunders Company. (1986); 1-16, 46-48.
- 7.- Aronson, D.L. Cause of Death in hemophilia A. Patients in the United States from 1986 to 1979. *Am J Hematol.* 27 (1988); 7-9.
- 8.- Art, G.P. and Finlayson, J.G. Stability of immune serum globulin during storage: Effects of prior heating. *Vox Sang.* 17 (1969); 419-433.
- 9.- Back, J.F. and Smith, M.B. Increased Thermal Stability of proteins in the presence of sugar and polyols. *Biochemistry.* 18 (1979); 5191-5196.
- 10.- Balagtas, R.C., Nelson K.E., Levin S. Treatment of pertussis with pertussis immune globulin. *J. Pediatr.* 79. (1971); 203-208.
- 11.- Barandun S., Kistler P. Intravenous administration of human gammaglobulin. *Vox Sang.* 7 (1962); 157-174.
- 12.- Bayer J.D. Análisis clínicos. Métodos e Interpretación. Ed. Reverté. España (1986); 413-423.
- 13.- Beal, R.W. and Isbister J.P. Blood component therapy in clinical practice. Ed. Blackwell Scientific Publications. Singapore (1985); 1-5.
- 14.- Benny A.G., Scott R.H. and Woodfield D.G. A heat-treated factor VIII concentrate prepared by controlled-pore glass adsorption chromatography. *Transfusion.* 27 (1987); 174-177.
- 15.- Berglöf J.H., Erikssons S. and Curling J.M. Chromatographic preparation and in vitro properties of albumin from human plasma. *J Appl Biochem.* 5 (4-5). (1983); 282-292.

- 16.- Berkman S.A., Lee M.L. Gale R.P. Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Semin hematol.* 25 (1988): 140-141.
- 17.- Berne, R.M. and Matlew, N.C. *Physiology*. 2a edición. USA (1986); 359-360.
- 18.- Bess E.C. Rapid transflet reversal of anemia and long term effects of maintenance intravenous immunoglobulin for autoimmune hemolytic in patients with lympho proliferativa disorders. *Am J Med.* 84 (1988); 691-692.
- 19.- Björling H.A. A new protein fractionation method using ion exchange chromatography and PEG precipitation. *Vox Sang.* 49 (1985); 240-243.
- 20.- Björling H. Plasma Fractionation Methods used in Sweden. *Vox Sang.* 23 (1972); 18-25.
- 21.- Blaahut, B. Kraker V., Vinazzer H. Substitution of antithrombin III in shock and DIC: a randomized study. *Throm Res.* 39 (1985); 81-89.
- 22.- Bloembäck B. Hannen L. *Plasma Proteins*. Ed. John Wiley Sons. Gran Bretaña (1979); 10, 20-21.
- 23.- Blumberg N., Laczin, J. A critical survey of fresh-frozen plasma use. *Transfusion.* 26 (1986); 511-513.
- 24.- Bove J.R. Fresh frozen plasma: Too few-indications-too much use. *Anesth analg.* 64 (1985); 849-850.
- 25.- Brettlér D.B. and Levine P.H. Factor concentrates for treatment of hemophilia. Which one to choose?. *Blood.* 73 (8): (1989); 2267-2273.
- 26.- Buchholz D.A. Lin A. Plasma separation using a hollow fiber membrane device. *Transfusion.* 26(2): (1986); 144-150.
- 27.- Buñuel C. Astarain F. Marro L. Reacciones inducidas por la transfusión de plasma y sus derivados. *Sangre.* 25(5-B): (1980); 807-827.
- 28.- Buñuel S. Buñuel C. Los requisitos previos a la donación de sangre. *Sangre.* 36(6): (1991); 511-514.
- 29.- Burks A.W., Sampson H.A. Buckley, R.H. Anaphylactic reactions after gammaglobulin administration in patients with: detection of IgE antibodies to IgA. *N Engl J Med.* 514: (1986); 560-565.
- 30.- Bussel J.B. Cunningham-Rundles C. Intravenous treatment of autoimmune hemolytic anemia with very high dose gammaglobulin. *Vox Sang.* 51: (1986); 261-263.
- 31.- Bussel J. Lalezari F. Reversal of neutropenia with intravenous gammaglobulin in autoimmune neutropenia with intravenous gammaglobulin in autoimmune neutropenia of infancy. *Blood.* 62: (1983); 398-399.

- 32.- Cabasso V.J. Plasma Fractionation. A profile. *Pathology*. 17: (1985); 45-51.
- 33.- Carlebjör K.G. Blömbäck M. Improvement of plasma quality as raw material for factor VIII:C concentrates. *Vox Sang*. 45: (1983); 233-242.
- 34.- Cheuret S., Roquin H., Ganne P. Prognostic value of an elevated CD 8 Lymphocyte in HIV infection AIDS. 6(11): (1992); 1349-1352.
- 35.- Coan M.H., Founel A. Properties of commercial factor IX concentrates. *Ann NY Acad Sci*. 370: (1981); 731-756.
- 36.- Coffin C.M. Current issues in transfusion therapy. *Postgrad Med*. 81: (1987); 343-350.
- 37.- Cohen H. Avoiding the mine of fresh froze plasma. *British Medical Journal*. 307: (1993); 395-396.
- 38.- Cohen H. Kernoff P.B. Plasma products, and indications for their use. *British Medical Journal*. 300 (6727): (1990); 803-806.
- 39.- Colombo M. Carnelli V. Transmission of non-A, non-B. Hepatitis by heat treated factor VIII concentrate. *Lancet*. 2: (1985); 1-4.
- 40.- Colowick S.P. and Kaplan N.O. *Methods in enzymology*. Academic Press. USA (1995); 76-84.
- 41.- Conn H.F. *Terapeutica*. Editores Salvat. España (1979); 355-359.
- 42.- Consensus Conference. Fresh-Froze Plasma Indications and Risks. *JAMA* 253(4): (1985); 551-553.
- 43.- Constantine N.T. Callahan J.D. Watts D.M. Retroviral testing essentials for quality control and laboratory diagnosis. Ed. CFC Press. Inc USA (1992); 51-53, 73-74.
- 44.- Contreras M. and Mellison P.L. Immunological complications of transfusion. *British Medical Journal*. 300: (1990); 173-176.
- 45.- Cumming R.A. and Cash J.D. *Clinica hematologica*. Transfusiones. Salvat editores. Barcelona (España): (1977); 1-11.
- 46.- Curling J.W. Berglöf. A chromatographic procedure for the purifications of human plasma albumin. *Vox Sang*. 33: (1977); 97-107.
- 47.- Curling J. *Methods of Plasma Protein Fractionation*. Academic Press. Londres (1980); 3-15, 636-641.
- 48.- Davie E.W. Fujikawa K. The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance and Regulation. *Biochemistry*. 30: (1991); 43-44.

- 49.- Dawson G.J., Lesniewsky R.R. Detection of antibodies to hepatitis C in US Blood Donors. *J Clin Microbiol.* 30 (9): (1991); 551-556.
- 50.- Diario oficial de la Federación. Jueves 24 de junio de 1993. 14-29.
- 51.- Dixon M., Webb E.C. Enzyme fractionation by salting out. A theoretical note. *Adv Protein Chem.* 16: (1961); 197-219.
- 52.- Erles R.A., Stamps A.C. *Polymerase Chain Reaction (PCR): The technique and its applications.* Landers Company, USA. (1993): 4-10.
- 53.- Einsenstaedt R.S. Concurrent audit of fresh frozen plasma use. *Transfusion.* 23: (1985); 466-467.
- 54.- Ekert E., Shanbrom E. Evaluation of a new concentrate for the treatment of factor IX deficiency. *New England J Med.* 290: (1969); 291-292.
- 55.- Epstein J.S. and Fricke W.A. Current Safety of Clotting Factor concentrates. *Arch Pathol Lab Med.* 14: (1990); 335-340.
- 56.- Erlev, A.J., Gabuzda T.G. *Pathophysiology of blood.* 3a edición W.B. Saunders Company. USA (1985); 213-215.
- 57.- Fagenhol M.K. and Abidgaard V. Immunological studies in human anti-thrombin III. *Scand J Haemat.* 7: (1970); 10-17.
- 58.- Finn N.G., Wang J.C., Hong K.J., High-dose intravenous gamma immunoglobulin infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenia purpura. *Arch Intern Med.* 147: (1987); 2167-2168.
- 59.- Flechter W.L., Trowell J.M. Non-A, non-B hepatitis often transfusion of factor VIII in infrequently treated patients. *British Medical Journal.* 287: (1983); 17454-17455.
- 60.- Foster P.R., Dickson A.J., Mc Quillan T.A. Control of large scale thawing factor recovery of cryoprecipitate Factor VIII. *Vox Sang.* 42: (189); 180-189.
- 61.- Freifelder D. *Técnicas de bioquímica y biología molecular.* Ed. Reverté, España (1979); 49-55.
- 62.- Frickew A., Augustyniak L. Human immunodeficiency virus infection due to clotting factor concentrates. *Transfusion.* 32(8): (1992); 707-709.
- 63.- Furie B., Furie B.C. The molecular basis of blood coagulation cell. 53: (1988); 505-518.
- 64.- Gaceta médica de México. El laboratorio clínico en el diagnóstico, clasificación y seguimiento de los pacientes con infección por HIV/SIDA. 130(1) (1984); 26-27.

- 65.- Galliani D., Broze G.J. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*. 253: (1991); 909-911.
- 66.- Galliani D., Broze G.J. Independent activation of factor XI in plasma. *Blood*. 82(3): (1993); 813-819.
- 67.- Gambal. Simple rapid procedure for isolating serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 251: (1971); 54-56.
- 68.- Genet B., Mannoni P. *La transfusión*. Ed. Toray S.A. Barcelona (España). (1980); 249-252.
- 69.- Gilcher R.O. Plasmapheresis Technology. *Vox Sang.* 51 (Suppl 1):(1986); 35-39.
- 70.- Giorgi J.V., Ho H.N., Mirji K. CD8 lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type I seroconversion: Development of HLA-DRT CD38 CD8 cells is associated with subsequent stable CD4 cell. *J Infect Dis.* 70: (1994); 775-781.
- 71.- Goldie D.J. Serum alanine transaminase (ALT) reference ranges estimated from blood donors. *J Clin Pathol.* 43: (1990); 929-931.
- 72.- Greendyke R.W. *Blood Bank Policies and Procedures*. Publishing Company. USA (1979); 10-22.
- 73.- Gronsky P. Hofstaerle T. al S-sulfonation: A reversible chemical modification of human immunoglobulins permitting intravenous application I. *Vox Sang.* 45: (1983); 144-154.
- 74.- Gunay V., Cho H.S., Maurer H.S. Commercial preparations of prothrombin complex. *Am J Dis Child.* 26: (1973); 775-777.
- 75.- Gunso H.H. National self-sufficiency in blood and blood products. *British Medical Journal.* 299: (1989); 1514-1516.
- 76.- Hao Y.L. Pilot Plant Scale Preparation of Human Serum Albumin. *Vox Sang* 49: (1985); 1-8.
- 77.- Harmenting D., Culhool R. *Modern banking and transfusion practices*. 2a. edición. Ed. Davis Company F.A. Philadelphia. (1983); 175, 276, 280-281.
- 78.- Harris J.R. *Blood separation and plasma fractionation*. Ed. Wiley-Liss. USA (1991); 17, 261-306, 307-340, 344-356.
- 79.- Heal, J.M., Barley G. Non-centrifugal plasma collection using cross-flow membrane plasmapheresis. *Vox Sang.* 44: (1983); 156-166.
- 80.- Heiner D.C. Significance of immunoglobulin G subclasses. *Am J Med.* 76: (1984); 1-6.
- 81.- Helligren M., Tengborn L. Pregnancy in women with congenital antithrom-

- bin III deficiency: Experience of treatment with heparin and antithrombin. *Gynecol Obstet Invest.* 14:127. (1982).
- 82.- Helmer, R.E. Alperin, J.B. Anaphylactic reactions following infusion of factor VIII in patient with classic hemophilia. *Am J Med.* 69:953.(1980).
- 83.- Henry, J B. Tood-Sanford. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Séptima edición. Ed. Salvat. España. (1984). 1247-1249, 1866.
- 84.- Hernández, J M. Transmisión de enfermedades por la sangre y derivados. *Sangre.* 25(5-8): 844-855.(1980).
- 85.- Hewir, P E. and Wagstaff W. The blood donor and test on donor blood. *British Medical Journal* 299.(1959).
- 86.- High, K A. Antithrombin III. Protein C and Protein S. *Arch Pathol Lab Med.* 112:28-29. (1988).
- 87.- Hirah, J., Piovella, F., Pini, M. Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features. *Am J Med.* 87 (suppl 58): 345-385. (1989).
- 88.- Hoffbrand, A.V. Brenner, M.K. Recent Advances in haematology. Ed. Churchill Livingstone. Singapore. (1993).74-78, 82-84.
- 89.- Hollán, S.R. Wastaff. Gestión de Servicios de transfusión de sangre. Organización Mundial de la Salud. Suiza. (1991).1-13.
- 90.- Holmes, K. Corey. AIDS Dx/Rx. Ed. Mc Graw Hill. USA (1990). 61-69, 172-174.
- 91.- Houssay, F.A. Fisiología humana. 5a. edición. Ed. El Ateneo. Buenos Aires.(1980). 10.
- 92.- Huestis, D.W. Hove, J.R. Blood components fractions and derivatives. In *Practical Blood Transfusion.* 2a. edición. Boston. (1976). 285-311.
- 93.- Inkster, M. Sherman, L.A. Preservation of antithrombin III activity in stored whole blood. *Transfusion.* 24:57-59. (1984).
- 94.- Innis, M.A., Gelfand, D.H. PCR Protocols, A guide to Methods and Applications. Academic Press, INC. USA (1990). 3-12.
- 95.- Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). Catálogo de Técnicas de Laboratorio. Publicación técnica del INDRE # 1. México, D.F.(1991). 92, 100-104.
- 96.- Inbister, J.P. Adverse Reactions to Plasma and Plasma Components. *Anaesth Intens Care.* 21:31-38. (1993).
- 97.- Johnsons, A.J. Mathews, R.W. Approaches to Plasma Fractionation for Improved Recovery and the Development of Potentially Useful Clinical factors. *Clin Haematol.* 13(1): 3-17.(1984).

- 98.- Jullis C. and Westphal R.G. The safety of blood component and derivatives. *Haematology/oncology clinics of North America*. 6(5): (1992); 1057-1059.
- 99.- Junqueira, L.C. Carneiro J. *Basic Histology*. 6a edición. Ed. Appleton Lange USA (1989); 229-230.
- 100.- Kakaiga R.M., Morse E.G., Panek S. Labile coagulation factors in thawed fresh frozen plasma prepared by two methods. *Vox Sang.* 46: (1984); 44-46.
- 101.- Kang E.P. An improved. Thaw-siphon method for the cryoprecipitate preparation. *Vox Sang.* 38: (1980); 172-177.
- 102.- Kaplan A.P., Silverberg M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood*. 70 (1): (1987); 1-15.
- 103.- Keller T., Mc Grath K. Newland A. Consensus Statement indications for use of intravenous Immunoglobulin. *The Medical Journal of Australia*. 159: (1993). 204-206.
- 105.- Kennedy M.J. Domen R.E. Therapeutic Apheresis . *Vox Sang.* 45: (1983); 261-277.
- 104.- Kelton J.G. *Transfusión Sanguínea. Bases teóricas y aplicación clínica* Ed. Doyma. España (1986); 3-4, 49-51, 76-78.
- 106.- Kilduffe R.A., Beake D.M. *The Blood Bank and the technique and therapeutics of transfusions*. The CV. Mosby Company. USA (1943); 17-39.
- 107.- Kurachi K., Furukawa M. *Biology of factor IX*. *Hematol Oncol Clin North Am.* 6(5): (1992); 991-997.
- 108.- Lamb J.F. *Essentials of physiology*. 2a edición. Blackwell Scientific Publications, USA. (1989); 80-83.
- 109.- Leavell B.S., Throrup D.A. *Hematología clínica*. 4a edición. Nueva Intermérica. México, D.F. (1987); 656-671.
- 110.- Lever A.M. Non-A, Non-B hepatitis occurring in agammaglobulinaemic patients after intravenous immunoglobulin. *Lancet*. 2: (1984); 1062-1064.
- 111.- Lundberg G.D. Practice parameter for the use of Fresh-Frozen Plasma, Cryoprecipitate and platelets. *JAMA*. 271(10): (1994); 777-781.
- 112.- Lundberg G.D. Serological diagnosis of human immunodeficiency virus infections by Western Blot Testing. *JAMA*. 260 (5): (1988); 624-679.
- 113.- Lundblad J.L. The effect of processing methods on intravenous immunoglobulin preparations. *J Hosp Infect.* 12: (1988); 3-15.
- 114.- Lundblad J.L. Comparative studies of impurities in intravenous immunoglobulin preparations. *Rev Infect Diseases*. 8(54): (1986); 382-389.

- 115.- Lusher J.M. Prediction and management of adverse events associated with the use of factor IX complex concentrates. *Seminars in hematology*. 30 (2): supply 1.(1993).
- 116.- Lusher J.M., Salzman P.M. and the monoclonate study group. Viral safety and inhibitor development associated with factor VIII:C ultra-purified from plasma in hemophiliacs previously unexposed to factor VIII:C concentrates. *Semin Hematol*. 27(2): (1990); 1-2.
- 117.- Lusher J.M., Warrior I. Hemophilia A. *Hematol Oncol Clin North America*. 6(5): (1992); 1021-1033.
- 118.- Lute H., Georgielf M. Effect and side effects of colloid plasma substitutes as compared to albumin. *Curr Stud Hematol Blood Transf*. 53: (1986); 145-154.
- 119.- Maki M., Therao T., Ikenoue T. Clinical evaluation of antithrombin III concentrate (BI 6.013) for disseminated intravascular coagulation in obstetrics. Well-controlled multicenter trial. *Gynecol Obstet Invest*. 23: (1987); 230-240.
- 120.- Manucci M.P. Clinical evaluation of viral safety of coagulation factor VIII and factor IX concentrates. *Vox Sang*. 64: (1993); 197-203.
- 121.- Manucci M.P., Bayer K.A. No activation of the common pathway of the coagulation cascade after a highly purified factor IX concentrate. *British Journal Haematology*. 79: (1991); 606-611.
- 122.-Manucci M.P., Brettler D.E. Low risk for hepatitis C in hemophiliacs given a high-purity, pasteurized factor VIII concentrates. *Annals of Internal medicine*. 113: (1990); 27-32.
- 123.- Margni R.A. *Inmunología e inmunológica*. 4a edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina. (1983); 453-468.
- 124.- Margolis J., Eisen M. Preparation of stable lyophilized cryoprecipitate in the original frozen plasma bags. *Vox Sang*. 50:(1986); 38-41.
- 125.- Margolis J., Gallovich C.M. and Rhoades P.H. Process for preparation of high-purity factor VIII by controlled pore glass treatment. *Vox Sang*. 46: (1984); 341-348.
- 126.- Margolis J., and Rhoades P.H. Preparation of high-purity factor VIII by controlled pore glass chromatography. *Lancet*. 2: (1981); 446-448.
- 127.- Margolis J., Rhoades P.H. Preparation of stable intermediate purity factor VIII concentrate with a note on high-purity factor VIII. *Vox Sang*. 36: (1979); 369-374.
- 128.- Marín F. *Transfusiones de sangre y plasma*. 2a edición. La Prensa Médica Mexicana. México D.F. (1960); 10-13.

- 129.- Mason E.C. Thaw-nippon technique for production of crioprecipitate concentrate of factor VIII. *Lancet*. (1978); 15-17.
- 130.- Mc Clelland D.L. Human albumin solution. *British Medical Journal*. 300: (6717); (1990); 35-37.
- 131.- Mc Clintic J.D. *Physiology of the human body*. Ed. Limusa. 333: (1988). 431-432.
- 132.- Mc Lood B.C., Sassett R.J. A high-potency, single donor cryoprecipitate of know factor VIII content dispensed in vials. *Annals of Internal Medicine*. 106: (1978); 35-40.
- 133.- Mc Lue J.P., Johnson A.J. Non comparability among IgG products. *Transfusion*. 26: (1986); 489-450.
- 134.- Melamed M.R., Lindoo J., Mendelsohn M.L. *Flow cytometry and sorting*. 2a. edición. Ed. Wiley-Liss. USA (1991); 11-25.
- 135.- Menache D. Antithrombin III concentrates. *Hematology/oncology clinics of North America*. 6(5): (1992); 1115-1119.
- 136.- Menache D. Antithrombin III: Introduction. *Semin Hematol*. 28(1): (1991); 1-2.
- 137.- Menache D., Grossman B.J. and Jackson C.M. Antithrobin III. *Physiology, deficiency and replacement therapy*. *Transfusion*. 32(6): (1992); 580-588.
- 138.- Menache D.O., O Malley J.P., Schurr J.B. Evaluation of the safety, recovery; half-life, and clinical efficacy of antithrombin III (human) in patients with hereditary antithrombin III deficiency. *Blood*. 756: (1990); 33-39.
- 139.- Middleton S.H., Bennet I.H., Smith J.K. A therapeutic concentrate of coagulation factors II, IX, X, from citrates factor VIII-depleted plasma. *Vox Sang*. 24: (1973); 414-456.
- 140.- Mollison P.L. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 9a edición. Blackwell Scientific Publication. USA (1993); 21, 45-47.
- 141.- Napier J.A. *Blood Transfusion Therapy*. John Wiley Jons. Gran Bretaña. (1987); 110-117, 125-132.
- 142.- Nathan D.G. and Oski F.A. *Hematology of infancy and child hood*. 4a. edición. W.B. Saunders Company. México D.F. (1993); 1796, 1819-1822.
- 143.- Nemerson Y. Tissue factor and Hemostasis. *Blood*. 71(1): (1988); 1-8.
- 144.- Newman J., Johnson A.J. Methods for the production of clinical effective intermediate and high-purity Factor VIII concentrate. *Br J Haematol*. 21 (1971); 1-2.

- 145.- Nuñez H., and Drohab W.N. Purification of antithrombin III (human). *Semin Hematol.* 28(1): (1991); 24-30.
- 146.- Ocha H.D., Fischer S.H. Non-A, non-B hepatitis and intravenous immunoglobulin. *Lancet.* 1: (1985); 404-405.
- 147.- Ofose F.A., Smith C.M., Blajchan M.A. Use of plasma segments for estimating factor VIII activity in pools of fresh frozen plasma. *Vox Sang.* 52: (1987); 254-256.
- 148.- Organización Mundial de la Salud (OMS). Suiza. (1982); 10-18, 26-31.
- 149.- Organización Panamericana de la Salud and Organización Mundial de la Salud. manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. USA (1983); 288-289.
- 150.- Painter R.H., Mintz J.D. Stability of immune serum globulin during storage. Effects of modifications of the fractionation scheme. *Vox Sang.* 17: (1969); 434-444.
- 151.- Pesce A.J., and Kaplan L.A. Química clínica. Métodos. Ed. Médica Panamericana. Argentina (1990); 1071-1073.
- 152.- Peter T.J. Serum Albumina: Recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin Chem.* 23(1): (1977); 8-12.
- 153.- Pittiglio D.H. Clinical Hematology and fundamentals of hemostasis. F.A. Davis Company. USA (1987); 337-339.
- 154.- Poel V.D. and Reesink C.L. Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in the Netherlands. *Lancet.* 2: (1989); 297.
- 155.- Poel V.D. and Reesink C.L. Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet.* 335: (1990); 558-560.
- 156.- Polson A., Ruiz-Bravo C. Fractionation of plasma with polyethylene glycol. *Vox Sang.* 23: (1972); 107-118.
- 157.- Pratt Ch.W. and Church F.C. Antithrombin: structure and function. *Semin Hematol.* 28(1): (1991); 5-9.
- 158.- Prowse C.V., Griffin B., Pepper D.S. Changes in factor VIII Complex activities during the production of clinical intermediate purity factor VIII concentrate. *Thromb Haemostas* (Stuttgart). 46(3): (1981); 597-601.
- 159.- Prowse C.V., Mc Gill A.M. Evaluation of the "Mason" (continuous thaw-siphon) Method for cryoprecipitate production. *Vox Sang.* 37: (1979); 235-243
- 160.- Rapaport S.I. The initiation of the tissue factor dependent pathway of blood coagulation. *Advances in Exp. Medicine and Biology.* 281: (1990); 97-103.

- 161.- Reiman P.M. and Mason P.D. Plasmapheresis; Technique and complications *Intensive Care Med.* 16: (1990); 3-10.
- 162.- Reinhart W.H., Berchtold P.E. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin therapy on blood rheology. *Lancet.* 339: (1992); 662-664.
- 163.- Remington. *Farmacía.* 17a edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1985); 111a-1152.
- 164.- Roberts H.R., Eberts H.G. "Current management of hemophilia B". *Hematol Oncol Clin North Am.* 7(6): (1993); 1269-1278.
- 165.- Robins J. *Blood Separation and Plasma Fractionation.* Wiley-Liss. INC USA. (1991); 75-79.
- 166.- Rock G., Tittley P. Plasma collection using an automated membrane device. *Transfusion.* 26: (1986); 269-271.
- 167.- Romer J., Morgan T.J. Characterization of various immunoglobulin preparations for intravenous application. I. Protein composition and antibody content. *Vox Sang.* 42: (1982); 62-73.
- 168.- Romer J., Spath P.J. Characterization of various immunoglobulin preparations for intravenous application II. Complement activation and binding to *Ataphylococcus* protein A. *Vox Sang.* 42: (1982); 74-80.
- 169.- Ross W.H., Ronrell L.J. *Histología.* 2a edición. Ed Médica Panamericana México, D.F. (1992); 183-185.
- 170.- Rosman C. and Ferreras P. *Medicina Interna.* Undécima edición. Ediciones Doyma. España. (1988); 1471, 1473-1474.
- 171.- Ruggeri Z.M. Structure and function of von Willebrand Factor: Relationship to von Willebrand's Disease. *Mayo Clin Proc.* 66: (1991); 847-861.
- 172.- Sanson P., Stirling Y. Management of planned pregnancy in a patient with congenital antithrombin deficiency. *Br J Haematol.* 56: (1984); 243-249.
- 173.- Saxenas S., Odonov V., Francis R. Storage of thawed cryoprecipitate AHF is better a room temperature than a 1°C-6°C for Factor VIII content. *Arch Pathol Lab Med.* 115: (1991); 343-345.
- 174.- Saxenas S., Vickle O., Francis R.B. Can Storage of thawed cryoprecipitate be extended to more than six hours? *Am J Clin Pathol.* 94(1-2): (1990); 203-206.
- 175.- Schifferli J., Leski M. High-dose intravenous IgG treatment and renal function. *Lancet.* 337: (1991); 457-458.
- 176.- Schmidt A.J. Transfusion in American in the eighteenth and nineteenth centuries. *N. Eng J Med.* 279: (1968); 1319.

- 177.- Schmidt, R.F. Thews, G. Human Physiology. Springer-Verlag. Alemania. (1989). 403-406.
- 178.- Schneider, W. Lefeure, H. Friedler, H. An alternative method of large-scale plasma fractionation for the isolation of serum albumin. Blut. 30:121-134. (1975).
- 179.- Schneider, W. Wolter, D. and Mc Carty, L.J. Alternatives for plasma fractionation. Vox Sang. 31:141-151.(1976).
- 180.- Schneider, W. Wolter, D. Mc Carty L.S. Heat ethanol: isolated serum albumin. Folia Haematol (Leipzig). 104:116-122. (1977).
- 181.- Schneider, W. Wolter, D. Mc Carty, L.J. Technical improvement in heat ethanol isolation of serum albumin. Blut. 33:275-278. (1976).
- 182.- Schotellius, B.A. Physiology. 8a. edición. The C.V. Mosby Company. USA. (1978). 431-435.
- 183.- Schreiner, A.H. The preclinical characterization of MONOCLATE factor VIII:C, antihemophilic factor (human). Semin Hematol. 25(suppl 1):27.(1988).
- 184.- Schrguer, A. and Meheus, A. Syphilis and transfusion: a global perspective. Transfusion. 30(9):844-847. (1990).
- 185.- Schwartz, A.S. Bayer, K.A. Rosenberg, R.D. Clinical experience with antithrombin III concentrate in treatment of congenital and acquired deficiency of antithrombin. Am J Micol. 87(suppl 3B): 535-605. (1989).
- 186.- Secretaría de Salud. Manual de las indicaciones y manejo de la transfusión sanguínea. México, D.F. (1989). 1-10
- 187.- Seremetis, S.U. Aledort, L.M. Bergman, G.E. Three year randomized. Study of high-purity or intermediate purity. Factor VIII concentrates in symptom-free, HIV-seropositive haemophiliacs: effects on immune status. Lancet. 342:700-703. (1993).
- 188.- Seyfer, A.E. Sember, A.V. Coagulation changes in elective surgery and trauma. Ann Surg. 193(2):210-213.(1981).
- 189.- Siegfried, S. Syphilis screening in the 1990s. Transfusion. 30(9):773-774. (1990).
- 190.- Shanberge, J.N. Reduction of fresh-frozen plasma use trough a daily survey and education program. Transfusion. 27:226-227. (1987).
- 191.- Silbert, J.A. Bore, J.R. Dubin, S. Patterns of frozen plasma use. Conn Med. 45:507-514. (1981).
- 192.- Slichter, G.J. Counts, R.B. Henderson, R. Preparation of cryoprecipitated factor VIII concentrates. Transfusion. 16(6):616-626.(1976).
- 193.- Snyder, A.J. Gotta, C.J. Why is fresh frozen plasma transfused ?. Trans-

Fusion.26:107-112.(1986).

194.- Synder,E.L. Clinical use of albumin, plasma protein fraction, and immunoglobulin products. In Kolinn J, Britten AHF, silverleid AS. "plasma products: use and management". American Association of Blood Banks. USA. (1982).

195.- Solomon,R.R. Clifford,J.S. The use of laboratory intervention to stem the flow of fresh-frozen plasma. *Am J Clin Pathol*. 83:518-521.(1989).

196.-Sonnenwith, A.C. and Jarett,L. Métodos y diagnósticos del laboratorio - clínico. Octava edición. Ed. Médica-Panamericana. Argentina(1986).2074-2075.

197.- Spirey,M.A. Jeter,E.K. Kiza, J. Post filtration factor VIII and fibrinogen levels in cryoprecipitate stored at room temperature and at 1°C a 6°C. *Transfusion*.32(40):340-343.(1992).

198.- Stephan,W. Undergraded human immunoglobulin for intravenous use. *Vox Sang*. 28:422-437.(1975).

199.- Stevens, C.E. Taylor,P.F. Epidemiology of hepatitis C virus. *JAMA*. 263(1-4):49-53.(1990).

200.- Stiehm,E.R. Human gammaglobulin as therapeutic agents. *Adv Pediatr*. 35:1-2.(1988).

201.- Stiehm,E.R. Ashida,E. Kim,K.S. Intravenous immunoglobulins as therapeutic agents. *Ann Intern Med*. 107:367 (1987).

202.- Tengborn,L. Frohm,B. Nilsson,L.E. Properties and catabolism of heart treated antithrombin III concentrate. *Thromb Res*. 45:701.(1987).

203.- Thaler,F. Lechner,K. Antithrombin deficiency and tromboembolism. *Clin haematol*.10:369-390.(1981).

204.- Tharakan, J.P. Gee,D.M. Clark,D.B. A semi-continuous method for purification of factor IX complex from human plasma.*Vox Sang*.57:(4-9):233-239. (1989).

205.- Travis,J.Bowen,J. Tewksburg,D. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin depleted plasma. *Biochem J*. 157:301-306(1976).

206.- Travis,J. Pannell,R. Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography. *Clin Chim Acta*. 49:49-52. (1973).

207.- Tullis,J.L. Benefits and risk of fresh-frozen plasma as compared to albumin. *Curr Stud Hematol Blood Transf*. 53:133-142.(1986).

208.- Turgeon,M.L. Fundamentals of immunohematology. Theory and technique. Ed. Lea Febiger. Philadelphia.(1989). 19-36,377,391.

209.- Tussell,J.M. Factor VIII recombinante. *Sangre*.38(2):129-142.(1993).

- 210.- Under, W.J. Hepatitis C virus and transfusion transmitted liver disease: Review. *J Clin Pathol*. 43:445-447. (1990).
- 211.- Von, R. Stannigel, H. Gobel, V. Anticoagulant therapy by continuous heparin antithrombin III infusion in newborns with disseminated intravascular coagulation. *Eur J Pediatr*. 144:191-194. (1985).
- 212.- Walker, R. Richard. M.D. Technical Manual. American Association of Blood Banks. USA. (1990). 642-644, 471.
- 213.- Weir, D.M. Handbook of Experimental Immunology. Immunochimistry. 3a. edición. Blackwell Scientific Publications. Gran Bretaña. (1978). 34-38.
- 214.- Wensley, R.T. Snopes, T.J. Preparation of Improved Cryoprecipitated Factor VIII Concentrate. *Vox sang*. 38:222-228. (1980).
- 215.- Wickerhauser, M. Scouris, J.T. Development of Large-Scale fractionation Methods. *Vox Sang*. 27:137-160. (1972).
- 216.- Williams, W.J. Beutler, E. Hematology. 4a. edición. Mc Graw-Hill. USA. (1991). 1267-1277, 1660-1669.
- 217.- Winter, J.H. Fenech, A. Ridley, W. Familial antithrombin III deficiency. *J Med*. 209:373-395. (1987).
- 218.- World Health Organization Global Programme on AIDS. Report of a WHO workshop on flow cytometry and alternative methodologies for CD4 lymphocyte determination: applications for developing countries. Washington, D.C., 16 April 1992. *AIDS* 8:1-4. (1994).
- 219.- Zmijewsky, C.M. Immunohematology. 3a. edición. Appleton-Century-Crofto. USA. (1978). 1-2.

INDICE DE ABBREVIATURAS

ACD: ácido cítrico, citrato trisódico, dextrosa
ALT: prueba de alanina-aminotransferasa
AT III: antitrombina III humana
 ₂ M: beta-2-microglobulina
BV: Unidades Bethesda
CFC: centrifugación de flujo continuo
CFD: centrifugación de flujo discontinuo
CID: coagulación intravascular diseminada
CMV: citomegalovirus
CPD: ácido cítrico, citrato trisódico, fosfato sódico, dextrosa
CRIO: crioprecipitado
DEAE: dietil aminoetil
EIA: inmunoensayo enzimático
ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FDA: Food and Drug Administration
FTA-ABS: Prueba de absorción de anticuerpo treponémico fluorescente
F VIII: factor VIII de la coagulación
F VIII:C: factor antihemofílico
F W:R: factor von Willebrand
F IX: factor IX de la coagulación
HAS: Solución de albúmina humana
HB: hepatitis B
HBc Ag: antígeno core del virus de la hepatitis B
HBs Ag: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

HMWK: cinnógeno de alto peso molecular

HNANB: hepatitis no-A, no-B

HSA: albúmina de suero humano

IG HB: inmunoglobulina contra hepatitis B

IG IV: inmunoglobulina intravenosa

IG VZ: inmunoglobulina contra varicela zóster

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción de polimerasa en cadena

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PEG: polietilenglicol

PFC: plasma fresco congelado

PL: fosfolípidos

PPF: fracción proteínica del plasma

PTI: púrpura trombocitopénica idiopática

PTT: púrpura trombocitopénica trombótica

RIA: radioinmunoensayo

RPHA: hemaglutinación reversa pasiva

RPR: prueba rápida de reagina

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

VDRL: Venereal Disease Research Laboratory

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

VPC: vidrio de poro controlado