

Prof. Dr. JORGE DECARO
Dr. FELIPE LEMOS / Dr. MARTÍN MAGRI

HISTORIA de la MEDICINA TRANSFUSIONAL

medilibros.com





Historia de la Medicina Transfusional

PROF. DR. JORGE DECARO

DR. FELIPE LEMOS

DR. MARTÍN MAGRI

2010



Autores:

Prof. Dr. JORGE DECARO

- * Director de la Cátedra de Medicina Transfusional
Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela"
Facultad de Medicina - Universidad de la República

Dr. FELIPE LEMOS

- * Asistente (Grado 2) de la Cátedra de Medicina Transfusional
Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela"
Facultad de Medicina - UDELAR

Dr. MARTÍN MAGRI

- * Postgrado de la Cátedra de Medicina Transfusional
Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela"
Facultad de Medicina - UDELAR

Agradecimientos:

- A todos los técnicos transfusionistas y médicos hemoterapeutas pues con su esfuerzo y trabajo esta historia pudo ser contada.
- En especial, a Heber Silva y Lilián García, con quienes hemos compartido muchas vivencias y nos han aportado importante bibliografía.
- A Marta Padin, en Buenos Aires, Argentina, por la selección de numerosa bibliografía internacional, por su tarea y su amabilidad.

Índice

PRÓLOGO	9
CAPÍTULO 1 - HISTORIA DE LA SANGRÍA O FLEBOTOMÍA.....	15
CAPÍTULO 2 - HISTORIA DE LA TRANSFUSIÓN DE SANGRE.....	25
CAPÍTULO 3 - HISTORIA DE LOS BANCOS DE SANGRE Y PLASMA	43
CAPÍTULO 4 - HISTORIA DE LOS HEMOCOMPONENTES Y HEMODERIVADOS	67
CAPÍTULO 5 - HISTORIA DE LA HEMAFÉRESIS.....	87
CAPÍTULO 6 - HISTORIA DE LA FILTRACIÓN DE LA SANGRE Y DE LA LEUCOREDUCCIÓN	113
CAPÍTULO 7 - HISTORIA DE LA INMUNOHEMATOLOGÍA.....	119
CAPÍTULO 8 - HISTORIA DEL SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y DE LOS TRANSPLANTES DE MÉDULA ÓSEA	147
CAPÍTULO 9 - HISTORIA DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS TRANSMISIBLES POR LA SANGRE.....	163
CAPÍTULO 10 - HISTORIA DE LA COAGULACIÓN DE LA SANGRE	183
RESUMEN	207

Prólogo

HISTORIA DE LA MEDICINA TRANSFUSIONAL

Premio *El País* de la Academia Nacional de Medicina 2010

El libro de los Dres. Jorge Decaro, Felipe Lemos y Martín Magri, recoge de forma sintética y amena, un capítulo de la mayor jerarquía en la Historia de la Medicina Universal, y también en el desarrollo de la Medicina Nacional.

Brinda con facilidad al lector médico y no médico, amplia ilustración sobre la evolución que ha tenido para la Medicina el conocimiento de la sangre, sus elementos constitutivos, la fisiología de sus componentes. También aporta la secuencia de los descubrimientos que a través de los siglos produjeron cientos de investigadores en el largo camino de conocer los detalles que determinaban afecciones hereditarias o adquiridas y cómo se fueron encadenando hechos para resolver estas vitales cuestiones.

Progresivamente fue surgiendo en el pensamiento de diversos autores la necesidad de utilizar la transfusión de sangre para salvar vidas, tanto en la paz como en la guerra; destacando el papel cumplido por los obstetras en el desarrollo de estos avances, tanto a nivel universal, como en nuestro país.

La meticulosidad de la exposición dividida en diez capítulos que abordan desde las sangrías mágicas a la Medicina Transfusional, pasando por el descubrimiento de los componentes de la sangre y los factores que inciden en su normalidad y fisiopatología. Desde los factores de la coagulación a la solución de algunas enfermedades como la hemofilia, que fue reconocida primero en algunas familias reales, pero que en realidad se conocía desde la Antigüedad, con testimonios en el Talmud y los escritos médicos clásicos, permite adquirir un conocimiento sistemático y apasionante sobre el desarrollo de esta disciplina.

El surgimiento de los primeros Bancos de Sangre durante la Guerra Civil Española, en 1936 en Barcelona, seguida pocos meses después por el primero fundado en Chicago, Estados Unidos de América, abre capítulos sobre la conservación, transporte y utilización de este vital elemento y su progresiva utilización en forma completa y fraccionada. Los avances registrados en la utilización del plasma, elemento fundamental para el tratamiento de los grandes quemados, o para aportar elementos faltantes en determinadas entidades nosológicas, abren nuevas perspectivas para el progreso de la Atención Médica.

Los autores utilizan un adecuado rigor expositivo, eslabonando en sus capítulos los progresos registrados a lo largo de la historia en cada uno de los aspectos que comprende este amplio campo. Con permanentes referencias a los avances mundiales, y su incorporación a la práctica médica nacional.

Jerarquizan la donación voluntaria de sangre, de la que Uruguay ha sido pionero y brindan testimonio de cómo controlar afecciones de antiguo conocimiento, que se han podido resolver gracias a los aportes de esta disciplina, como las sensibilizaciones producidas entre diferentes antígenos durante el embarazo y su incidencia sobre la mortalidad fetal e infantil, hoy felizmente controladas.

Las enfermedades por hipercoagulabilidad también son consideradas y expuestos los elementos que hacen a su diagnóstico y tratamiento, con sus inmensas repercusiones médicas, psicológicas y sociales, además de las económicas.

A lo largo de toda la exposición, este libro aporta en cada capítulo, numerosa y actualizada bibliografía, que recoge desde los aportes históricos más antiguos, a los más recientes, tanto nacionales, como producidos en la literatura universal.

Por lo tanto, este trabajo, que aporta tantos conocimientos sobre el desarrollo de esta especialidad, que ha ido creciendo a lo largo del siglo XX y XXI, por la calidad de su contenido y claridad de exposición, ha merecido el Premio *El País*, correspondiente al año 2010, otorgado por la Academia Nacional de Medicina.

Su lectura enriquecerá el patrimonio cultural de cualquier médico, y muy especialmente el de quienes se relacionan con esta amplia especialidad.

Felicitemos a sus autores por tan loable esfuerzo de exposición y síntesis, y recomendamos su lectura. Libros como éste reafirman, si fuera preciso, la constante línea del avance científico y humano en el ejercicio cotidiano de la profesión médica. Marcando cómo sus investigaciones y trabajos silenciosos, en el laboratorio o junto al paciente, tienen tan grande repercusión económica y social. Lo que a menudo pasa desapercibido y es, sin embargo, un mandamiento de inexcusable reflexión para todos quienes tienen, en el campo de la salud, alguna responsabilidad.

Ac. Eva Fogel de Korc

Ac. Antonio L. Turnes

Montevideo, febrero de 2011

LISTADO DE SIGLAS SEGÚN ORDEN DE APARICIÓN EN EL TEXTO

SHOT	Serious Hazards of Transfusion (Reacciones transfusionales severas)
OMS	Organización Mundial de la Salud
IDH	Índice de Desarrollo Humano
BTS	Blood Transfusion Safety (seguridad transfusional)
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
EHC	Enfermedad Hemolítica Congénita
EST	Exsanguinotransfusión
EHP	Enfermedad Hemolítica Perinatal
FDA	Food and Drug Administration (Oficina reguladora de medicamentos y alimentos de USA)
CLAP	Centro Latinoamericano de Perinatología
MSP	Ministerio de Salud Pública
AABB	American Association of Blood Bank (Asociación Americana de Bancos de Sangre)
DGP	Diagnóstico Genético Preimplantacional
USA	United States of America (Estados Unidos de Norteamérica)
AAP	Academia Americana de Pediatría
AC	Antes de Cristo
DC	Después de Cristo
MBE	Medicina Basada en Evidencia
rEPO	Eritropoyetina recombinante
ISBT	International Society of Blood Transfusion (Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea)
BBC	British Broadcasting Corporation (Radiodifusora inglesa)
ACD	Acido Cítrico Dextrosa
EUTM	Escuela Universitaria de Tecnología Médica
CPD	Citrato Fosfato Dextrosa
SAGMAN	Salino Adenina Glucosa y Manitol
IQT	Instituto Quirúrgico Traumatológico
HCFFAA	Hospital Central de las Fuerzas Armadas
AUTHEM	Asociación Uruguaya de Técnicos en Hemoterapia
SNS	Servicio Nacional de Sangre
OPS	Oficina Panamericana de la Salud
HTLV	Virus Linfo-Trópico Humano
IAMC	Instituciones de Asistencia Médica Colectiva
ASH	American Society of Hematology (Sociedad Americana de Hematología)
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
EMEA	European Medical Agency (Agencia Europea de Medicina)
PTA	Púrpura Trombocitopénico Autoinmune
IgRhD	Inmunoglobulina anti RhD
SD	Solvente Detergente
F	Nanofiltración
PAIHE	Programa Atención Integral de la Hemofilia
UNC	Universidad Nacional de Córdoba

GMP	Good Manufacturing Practices (Buenas Prácticas de Producción)
FHM	Federación Mundial de Hemofilia
ARN	Acido Ribo-Nucleico
ADN	Acido Desoxiribo-Nucleico
NAT	Test de Ácidos Nucleicos
CME	Células Madres Embrionarias
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
PPP	Plasma Pobre en Plaquetas
HAES	Hydroxiethylstarch (Hidroxietilalmidón)
TCA	Tiempo de Coagulación Activado
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
NCI	National Cancer Institute (Instituto Nacional del Cáncer de USA)
LRS	Leuco Reduction System (Sistema de leucoreducción)
CFC	Centrifugación de Flujo Continuo
CD	Centrifugación Diferencial
FNR	Fondo Nacional de Recursos
ASFA	American Society For Apheresis (Sociedad Americana de Aféresis)
FL	Filtración
GVHD	Enfermedad de Injerto versus Huésped
GVL	Injerto versus Leucemia
DLI	Infusión de Linfocitos del Donante
ISH	International Society of Hematology (Sociedad Internacional de Hematología)
CSIC	Comisión Sectorial de Investigación Científica
SCP	Células Madres (Stem Cell) Periféricas
MO	Médula Ósea
VES	Velocidad de Eritro-Sedimentación
RPT	Recambio Plasmático Terapéutico
APTT	Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado
GLAHT	Grupo Latino Americano de Hemostasis y Trombosis
LA	Líquido Amniótico
WAA	World Apheresis Association (Asociación Mundial de Aféresis)
GLHEMA	Grupo Latinoamericano de Hemaféresis
RFNH	Reacciones Febriles No Hemolíticas
HPA	Antígenos Plaquetarios Humanos
TRIM	Inmunomodulación asociada a Transfusión
CMN	Células Mono-Nucleadas
PCD	Prueba de Coombs Directa
PCI	Prueba de Coombs Indirecta
BGRL	Blood Group Reference Laboratory (Laboratorio de Referencia para Grupos Sanguíneos)
ARDP	American Rare Donor Program (Programa Americano de Grupos Sanguíneos Raros)
MRC	Medical Research Council (Consejo de Investigación Médica)
HLDA	Human Leukocyte Differentiation Antigens (Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos)
CE	Comunidad Europea
LFB	Laboratorio Francés de Biotecnología
APC	Células Presentadoras de Antígeno
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Treg	Células T reguladoras
RhAG	Proteína asociada a Rh
HUGO	Organización Genoma Humano

PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
TNAI	Trombocitopenia Neonatal Alo-Inmune
MAT	Microquimerismo Asociado a Transfusión
PNC	Platelet Nomenclature Committee (Comité de Nomenclatura Plaquetaria)
ISTH	International Society of Thrombosis and Hemostasis (Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis)
TRALI	Transfusion Related Acute Lung Injury (Insuficiencia Respiratoria Aguda Asociada a Transfusión)
LISS	Solución de baja fuerza iónica
IgG	Inmunoglobulina clase G
HLA	Human Leukocyte Antigens (Antígenos leucocitarios humanos)
CU	Cordón Umbilical
IMAE	Institutos de Medicina Altamente Especializada
TMO	Transplante de Médula Ósea
BNOT	Banco Nacional de Órganos y Tejidos
INDT	Instituto Nacional de Donación y Transplante
DMSO	Dimetilsulfóxido
DAH	Hemorragia Alveolar Difusa
EPC	Células Progenitoras Endoteliales
FEVI	Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo
SMU	Sindicato Médico del Uruguay
MSC	Células Madres Mesenquimales
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
WMDA	World Marrow Donor Association (Asociación Mundial de donantes de médula ósea)
GPA	Gel Plaquetario Autólogo
SETS	Sociedad Española de Transfusión Sanguínea
SIDA	Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida
HPR	Hospital Pereira Rossell
HPT	Hepatitis Post-Transfusional
NIH	National Institutes of Health (Institutos Nacionales de Salud de USA)
APG	Aglutinación de Partículas de Gelatina
HAMSTeRS	Hemophilia A Mutations, Structure, Test, Resource Site (Sitio de Registro e investigación de las mutaciones en hemofilia A)
CHS	Canadian Hemophilia Society (Sociedad Canadiense de Hemofilia)
ICHT	International Committee of Hemostasis and Thrombosis (Comité Internacional de Hemostasis y Trombosis)
FT	Factor Tisular
NO	Óxido Nítrico
AT-III	Antitrombina III
HBPM	Heparina de Bajo Peso Molecular
HNF	Heparina No Fraccionada
WARF	Wiscosin Alumni Research Fundation (Fundación de Investigación de Wiscosin)
INR	International Normalized Ratio (Índice Internacional Normal)

Historia de la Sangría o Flebotomía

Se puede definir la sangría como la pérdida deliberada de sangre a través de la piel o los tegumentos mediante el corte o punción de los vasos sanguíneos. El término flebotomía proviene del griego “phlebos” que significa vena y “temnein” cortar.

Nadie conoce sus orígenes pero tal vez los antiguos viendo que la hemorragia menstrual parecía aliviar el malestar de las mujeres, asociaron la pérdida de sangre con una mejoría de los síntomas.

La historia de la sangría sigue siendo una de las mayores dentro de las técnicas médicas no precisamente por la sucesión de nuevos descubrimientos sino por su persistencia en el tiempo. El escaso saber, la carencia de un pensamiento y de un lenguaje apto limitaron el intelecto del hombre primitivo obligándolo a resolver sus interrogantes existenciales mediante la creación de mitos supersticiosos. Los conocimientos médicos sufrían similares limitaciones y por lo tanto, los actos curativos, eran en gran parte rituales ceremoniosos.

Desde siempre, la sangre fue considerada como portadora de vida, como elemento vital, y por tanto, es razonable aceptar que su entrega constituyera una preciada ofrenda. Aún hoy, muchas campañas de donantes voluntarios utilizan las consignas “done vida, done sangre” o “su sangre es importante para salvar la vida de quien la necesita”.

Por contraposición, puede haber surgido el concepto de que su alteración o la presencia en ella de seres maléficos pudiera ser causa de enfermedades justificando así su extracción con fines curativos. Cualquiera sea su origen, lo cierto es que las sangrías aparecen en casi todas las civilizaciones primitivas como sacrificios voluntarios o como actos médicos. Así, la sangría se incluía en los antiguos “ritos de purificación”. En el momento actual, el bautismo o las aspersiones con agua bendita

entre los cristianos, las abluciones de los musulmanes o la circuncisión judía deben ser considerados como vestigios de aquellos ritos ancestrales.

Ya desde 2.500 años AC, los egipcios practicaban la sangría como forma de sacrificio según se describe en dos pasajes del “Ebers Papyrus” aunque nadie sabe por qué lo hacían ni que intentaban conseguir con ella. En la India antigua aparece en los libros de los Vedas entre los años 2000 y 1000 AC. En la China primitiva a partir del siglo III AC y en Japón, a partir del siglo VII DC, la sangría se apoya en la filosofía de Ying y Yang (Taoismo), pretendiendo recuperar el equilibrio espiritual (1). En la cultura hebraica la sangría es mencionada en el Talmud pero no en la Torá.

Entre los Aztecas en el día señalado por el calendario religioso los sacerdotes se auto sangraban utilizando espinas o cuchillos. En el campo terapéutico y con similar perfil religioso, las sangrías se utilizaban junto a las purgas.

Los Incas utilizaban las sangrías para el tratamiento de las cefaleas realizando heridas en el entrecejo con un cuchillo. Para la cura de otros males abrían la vena más próxima al lugar afectado.

La sangría fue introducida entre los griegos por la escuela de Crotona donde uno de sus médicos, Diógenes de Abdera, fue maestro de Hipócrates. En uno de los textos del “Hábeas Hipocraticus” se expone la teoría de los cuatro humores: sangre, bilis amarilla, bilis negra y “flegma” originados en el corazón, hígado, cerebro y bazo respectivamente. De sus alteraciones cuali o cuantitativas que alteraban el equilibrio humoral resultaban las enfermedades.

A partir de este momento, la sangría cambia su esencia de rito para convertirse en un acto terapéutico racional que, aplicado sin violar los límites de la naturaleza, busca recuperar el equilibrio humoral perdido (1).

La flebotomía se constituye en una técnica destinada a extraer la flema pútrida, impura y perniciosa realizándose del mismo lado del cuerpo y cerca del foco de putrefacción. Las mejorías alcanzadas significaban para los hipocráticos la evidencia más importante de la acción perniciosa de la flema.

Uno de los más importantes médicos del Imperio Romano, Aurelio Cornelio Celso en su obra *Medicina* describió la técnica, indicaciones, oportunidad y lugar de la sangría. Afirmaba que su aplicación no tenía límites de edad o sexo debiéndose considerar solamente la resistencia y la fuerza vital del individuo a tratar. En la medicina de Galeno, la sangría se indicaba de manera especial para el tratamiento de las neumopatías utilizando para ello el miembro superior homolateral. Galeno añadió a la teoría de los humores su propia teoría del “vitalismo” donde afirmaba que la sangre era algo más que un líquido nutritivo y que engendraba la esencia espiritual del hombre: fluyendo desde el hígado al corazón y al cerebro adquiría una trinidad de características espirituales gracias a la combinación de órganos por los que pasaba (2).

Cuando cayó la ciudad de Roma, los árabes que habían asimilado la ciencia griega heredaron también la medicina romana. A diferencia de los griegos que sangraban del mismo lado del cuerpo donde radicaba la enfermedad los árabes sangraban del lado opuesto como efecto revulsivo. La sangre se dejaba correr gota a gota y en general en proporciones escasas.

El médico Avicena de Persia en su obra titulada “Poema de la Medicina” incluye la sangría en el capítulo donde se trata la cirugía de los vasos.

Durante la Edad Media la sangría fue ejercida casi exclusivamente por clérigos. En algunas órdenes, los monjes eran sometidos a sangrías cinco veces por año salvo que estuvieran enfermos. A partir del siglo XII la Iglesia prohibió a los clérigos el ejercicio de toda práctica que causara pérdida de sangre.

En la primera escuela médica del mundo occidental, fundada en Salerno en el siglo XII, la sangría era muy utilizada para tratar una amplia gama de enfermedades según figura en el “Regimen Sanitatis” escrito en verso. Sin embargo, la escuela salernitana aconsejaba la cautela, indicando que la sangre extraída no podía ser escasa ni excesiva y siempre

de acuerdo con la edad y vigor del paciente así como a la época del año y la temperatura corporal.

En la ciudad de Brujas, en Bélgica, la sangría era tan popular que se disponía de un lugar especial para realizarla denominado “vertedero de sangre” en donde los sangradores debían arrojar la sangre recolectada. En general, no se extraían más de tres o cuatro onzas (100 a 120 ml) aunque en algunos casos especiales el volumen alcanzaba las dos libras (alrededor de un litro).

En los primeros siglos de la era moderna (XV y XVI) la sangría se convirtió en un procedimiento médico de uso casi irrestricto con objetivos terapéuticos y profilácticos.

Así, los médicos sangraban a sus pacientes por cualquier afección imaginable por lo cual corrieron “ríos de sangre”.

El segundo texto médico salido de la imprenta de Gutenberg en Estrasburgo en 1462 era un Calendario de Sangrías y el primero fue el Calendario de Purgas impreso en 1457.

En 1492, año del descubrimiento de América, el Papa Inocencio VIII padecía una insuficiencia renal crónica que lo mantenía críticamente enfermo manteniendo períodos de estupor y otros de lucidez (3). Los médicos del Papa habían agotado todas las terapéuticas disponibles basadas sobre todo en sangrías encontrándose el paciente a las puertas de la muerte. En ese momento, apareció en Roma un médico que ofreció cambiar la sangre del viejo Papa por sangre de jóvenes plenos de vigor y salud. Ante la urgencia de la situación se consiguieron tres donantes niños varones de 10 años, autorizados por sus respectivas familias, mediante el pago de un ducado de oro a cada uno. Los niños fueron sangrados falleciendo los tres y como la sangre se coagulaba constantemente, la transfusión de sangre no fue realizada (4). Cuando se intentó detener al médico para someterlo a juicio éste había desaparecido para siempre.

En el siglo XVII el médico francés Guy Patin, Decano de la Facultad de Medicina de París, escribió a un colega en 1645 que no existía remedio en el mundo que opere tantos milagros como la sangría. Así, convencido de los beneficios de la flebotomía, Patin sangró a su esposa doce veces por una congestión, a su hijo veinte por una fiebre y él mismo se realizó siete sangrías por un catarro nasal (3). La

supervivencia de algunos de los pacientes de Patin tenía que ver más con la suerte y con la resistencia corporal, llámese reserva funcional, que con algún beneficio de las sangrías. No guardaba historias clínicas de manera sistemática y basaba únicamente sus éxitos en apreciaciones subjetivas. Por el contrario, se calificaba el fracaso de la terapéutica como trágicamente inevitable.

Durante la época de Patin, algunos estudiosos se empezaron a preguntar si no sería la química en lugar de los humores lo que influía en el cuerpo y eso los llevó a dudar de la eficacia de las sangrías. Uno de estos personajes fue el farmacéutico belga Jean Baptiste van Helmont. El novelista Alain Lesage parodió al médico en el personaje del doctor “Sangrado”. Otro Jean Baptiste, pero este francés de apellido Poquelin, más conocido como Molière, dramaturgo y actor, considerado el padre de la Comedia Francesa, en su última obra “El enfermo imaginario” satiriza las acciones médicas y en especial las sangrías. En el cuadro final un coro compuesto por 8 lavateros, 6 boticarios, 22 doctores, 8 cirujanos que bailan y 2 que cantan entonan: “Clysterium donare, postea seignere, ensuite purgare” (darle un enema, luego sangrar y enseguida purgar). Molière sufrió varias enfermedades por lo cual tuvo tratos con la profesión médica frecuentemente. Un día Luis XIV le preguntó que tal le iba con su último médico y Molière le respondió “Señor, hablamos; me prescribe medicamentos; no los tomo y me recupero”. Molière sufre un ataque en la cuarta representación del “enfermo imaginario” en 1673 y fallece estando vestido de amarillo. Por ello, los actores de teatro dicen que vestirse de este color trae mala suerte.

Carlos II de Inglaterra sufrió un ataque en 1685 por lo cual fue sangrado 24 onzas logrando una mejoría transitoria pero luego falleció (5). Queen Anne (1665-1714) sobrina de Carlos II sufrió un accidente y fue tratada con sangrías falleciendo dos días después (6).

A finales del siglo XVII, el pintor Egbert van Heemskerck reflejó en su obra un cuarto con operadores que realizaban una sangría en una mujer con jarras de farmacia a su alrededor (7).

Lord Byron que falleció, en el siglo XIX de una encefalitis, fue sometido previamente a varias sangrías (6). A Napoleón también se le

realizaron flebotomías y sobrevivió llegando a decir que la “Medicina era la ciencia de los vampiros” (7).

Mozart, el niño prodigio de la música, cuya muerte se produjo en Viena en 1791, en su etapa terminal desarrolló un shock por las reiteradas sangrías y purgaciones realizadas (8).

En el último año de vida realizó varias composiciones, la “Flauta Mágica” y el inacabado “Réquiem”, el que estaba escribiendo cuando falleció. Mozart se sintió enfermo durante su estancia en Praga donde había concurrido en setiembre de 1791 para el estreno de la ópera “La Clemenza de Tito”. El cinco de diciembre a la hora cero llegó el Dr Closset del teatro a la casa de Mozart y ordenó a su hermana Sofía y a su esposa Constanza que le pusieran compresas frías para bajar la fiebre. Cincuenta y cinco minutos después Mozart fallecía a los 35 años, 10 meses y ocho días. El entierro se realizó en el cementerio St Marx de Viena al anochecer como era costumbre en esa época. La causa de su muerte precoz más probable fue fiebre reumática ya que había recibido tres o cuatro ataques desde su infancia debilitando sus válvulas cardíacas.

En las colonias españolas quedó reglamentada la obtención del título de Maestro en Flebotomías, encargado de formar y proponer a los sangradores. En el Virreinato del Río de La Plata Pedro Faya fue el primer maestro sangrador por su gran habilidad y conocimiento del arte de la sangría. A partir de 1820, se creó en Buenos Aires el Tribunal de Medicina y más tarde, con la creación de la Facultad de Medicina, la práctica de la sangría fue agregada a esa carrera como una rama especial que persistió como tal hasta la década de 1870 (1).

En USA, Benjamín Rush doctorado en Edimburgo, desde su cátedra de Química en la Escuela de Medicina de Filadelfia estimuló a cientos de estudiantes a realizar la práctica de las sangrías. Era conocido por sus contemporáneos como el “Príncipe de las Sangrías”. Pensaba que todas las enfermedades eran consecuencia de la sobrestimulación de los vasos sanguíneos y por tanto debían ser tratadas con flebotomías. Estudioso, humanista y reformador social se pronunció en contra de la esclavitud, la pena de muerte y el maltrato infantil. Fue uno de los firmantes de la Declaración de Independencia y su nombre aparece justo arriba del de su amigo Benjamín Franklin con

quien fundó la Sociedad de Protección a los Negros Libres (9).

A principios de la década de 1790, Filadelfia sufrió una de las mayores epidemias de fiebre amarilla. Al principio Rush puso en práctica sus recursos habituales como vómitos, purgantes y sangrías moderadas pero sus pacientes igualmente fallecían. Una noche, leyendo un relato sobre una peste anterior, encontró que la solución había sido la purga más agresiva aunque llevara a los pacientes al borde de la muerte. Así, comenzó a realizar purgas con dosis masivas de mercurio y jalapa para provocar diarrea y a continuación sangrías. Al principio extrajo 280 a 340 ml pero luego aumentó gradualmente la cantidad hasta 1500 y 2200 ml y en la mayoría de los casos con un resultado feliz. Trabajando día y noche durante los siete días de la semana consiguió sangrar cada 24 horas a más de 100 pacientes.

Con el paso del tiempo la epidemia comenzó a menguar, sobre todo por la llegada del otoño, en donde los mosquitos no sobrevivían. Pero Rush se echó un enemigo, un periodista joven llamado William Cobbett, nacido en Inglaterra, que editaba la *Porcupine Gazette* uno de los periódicos más leídos en el país. Montó una campaña contra el médico a quien apodó sarcásticamente como el “Hipócrates de Pensilvania” (2). El acoso del periodista prosiguió durante meses hasta que Rush decidió demandarlo por difamación. El proceso legal que tropezó con múltiples aplazamientos no concluyó hasta diciembre de 1799 cuando el jurado encontró culpable de calumnia a Cobbett y le ordenó pagar a Rush 5.000 dólares.

Pero, ese 14 de diciembre y a la misma hora que se dictaba la sentencia en el tribunal, fallecía el general George Washington sometido también al tratamiento con sangrías.

Rush había sido llamado en consulta para la atención del general Washington pero no había podido concurrir por encontrarse en medio del juicio. George Washington parecía tener una laringotraqueítis infecciosa contraída durante una cabalgata en el frío y la nieve por su granja en Virginia. Sus médicos James Craik y Gustavus Brown, ambos doctorados en Edimburgo-Escocia, realizaron en menos de 12 horas cuatro sangrías extrayendo un volumen total de 2365 ml pero el presidente murió al cabo de dos días de tratamiento a las 10 pm (10). George Washington fue el primer

Presidente de USA durante dos períodos desde 1789 a 1797 asumiendo dos años después de la primera constitución federal de 1787.

Un médico joven de Filadelfia, Elisha Dick, había sugerido que se le realizara un nuevo procedimiento, la traqueotomía, la cual fue rechazada por los médicos tratantes (11).

Al día siguiente del deceso, un familiar de Washington llegó junto con el amigo de la familia William Thornton cuyas actividades médicas en Washington fueron mínimas y quizás las menos reconocidas a lo largo de su vida. Su nombre resulta familiar dado que fue el primer arquitecto del edificio del Capitolio.

Al observar el cuerpo congelado de su amigo, el presidente George Washington, estableció que había fallecido por la pérdida de sangre y la falta de aire. Inmediatamente propone la resurrección descongelando su cuerpo colocándolo en agua caliente, luego abrigarlo con una frazada y mediante fricción darle calor. Realizar respiración artificial insuflando los pulmones mediante pasaje de aire directamente a través de la tráquea (traqueotomía) y transfundirlo con sangre de cordero (12). El plan no fue bien recibido por los miembros de la familia presentes y el procedimiento no se llevó a cabo.

Luego, Thornton el arquitecto propone realizar un mausoleo en el cual el presidente Washington podía ser sepultado bajo el domo de su edificio del Capitolio. La Casa Blanca y el Senado así como Martha Washington estuvieron de acuerdo y el mausoleo fue construido. Sin embargo, los restos de George Washington y su esposa se encuentran sepultados actualmente en la plantación de Mount Vernon en Virginia (13). Existe un famoso mito sobre su juventud en Virginia. Una vez taló un cerezo de su padre. Cuando este preguntó quien lo había hecho, Washington le dio la famosa respuesta “No puedo decir una mentira, fui yo papá”. Dentro de la cultura estadounidense la frase “I cannot tell a lie” (no puedo mentir) sigue siendo un símbolo de Washington y su honradez.

A pesar de la poca suerte de Rush y la muerte de Washington la sangría mantuvo igualmente su popularidad por lo menos durante más de medio siglo debido, principalmente, a que sin comprender verdaderamente las enfermedades, los médicos tenían muy pocos recursos terapéuticos a los cuales recurrir.

En las aulas de medicina se escuchaban las palabras “Sangren ad libitum”, sangren hasta que aparezca el desmayo (2).

A principios del siglo XIX en Francia se desempeñaba el doctor Broussais, veterano de las campañas napoleónicas. Con él las sangrías alcanzaron la cima. Según su teoría todas las fiebres tenían el mismo origen: eran manifestaciones de la inflamación de los órganos. De esta manera se colocaban sanguijuelas en la parte del cuerpo con el órgano inflamado. Por ejemplo, si el paciente tenía neumonía se colocaban las sanguijuelas en el tórax con el fin de realizar sangrías localmente. Se dice que, durante la visita a sala de los pacientes internados, ordenaba la realización de flebotomías colectivas a todos los pacientes de un costado de la sala y enemas a los del costado opuesto. En la década de 1830, Francia importó 42 millones de sanguijuelas con fines médicos (14).

Sin embargo, los fracasos alcanzados durante la epidemia de cólera que afectó París en 1832 y las de fiebre tifoidea en las ciudades británicas, hizo disminuir el crédito hacia las sangrías. A su vez, surgió un nuevo campo dentro de la medicina: la estadística. En la década de 1830 un médico de París, Pierre Louis comenzó a reunir la información clínica de manera sistemática (15). Mostró como una enfermedad evolucionaba y como respondía a ciertos tratamientos. Durante siete años se dedicó a recoger miles de casos clínicos y protocolos de autopsias en el Hospital de la Charité en el servicio de Chomel que fue el sucesor de René Laënnec en dicho centro como profesor de medicina clínica. En 1812 el físico y matemático Pierre Simon de Laplace publicó la *Théorie analytique des probabilités*, que lo sitúa entre los fundadores de la teoría de la probabilidad. En 1823, Louis comenzó a publicar trabajos donde aplicaba este método a una gran variedad de temas desde la perforación del intestino delgado a la muerte súbita. Uno de los más importantes fue el que le dedicó a la tuberculosis, enfermedad de gran importancia en la época. En 1825 publica un trabajo sobre 123 casos que había seguido, describiendo los síntomas y las lesiones con gran detalle (16). En este texto, se hace referencia a lo se conoce actualmente como la “ley de Louis”: la tuberculosis pulmonar comienza generalmente por el vértice,

en el pulmón izquierdo y siempre que hay una tuberculosis en otras partes del cuerpo, se acompaña también de lesiones pulmonares. Su único hijo Armand contrajo la tuberculosis y él abandonó el hospital para cuidarlo. Murió en julio de 1854 a la edad de 18 años. Louis se retiró de la medicina y falleció el 22 de agosto de 1872 a la edad de 85 años.

Quizá, el trabajo que le hizo más popular fue el que realizó para estudiar la eficacia de la sangría en la neumonía. Publicó su primer artículo sobre este tema en 1828. Este trabajo fue revisado, ampliado y publicado en un libro en 1835 y luego, en inglés en USA al año siguiente (17). Para este estudio, se seleccionó un grupo homogéneo de 77 pacientes con la misma forma de neumonía. Louis analizó la duración de la enfermedad y la frecuencia de muerte de acuerdo al tiempo en que se realizó la primera sangría. Agrupó los pacientes en aquellos a los que se le habían realizado la primera sangría entre el primer y cuarto día de la enfermedad (sangría precoz) y a los que se les había realizado el procedimiento entre el quinto y noveno día de la enfermedad (sangría tardía). De esta división resultaron dos grupos de 41 y 36 pacientes comparables en edad (41 y 38 años respectivamente). Encontró que la duración de la neumonía era tres días menor en los que la sangría se realizaba precozmente pero, el 44% de estos pacientes fallecía comparado con el 25% a los cuales se les realizaban sangrías tardías lo cual, era un aparente absurdo (18). Louis establece la posibilidad de que los pacientes que son sangrados tardíamente hayan pasado la peor fase de la enfermedad y por lo tanto tengan mejor pronóstico. De esta manera Louis planteó que la sangría no era una terapéutica tan eficaz como hasta ese momento se creía y como había sido establecido por la teoría de Broussais. Demostró además que era más eficaz realizar una sangría abundante con lancetas que sangrías locales con sanguijuelas (18). Puede considerarse a Pierre Louis como el padre de la Medicina Basada en Evidencia (MBE) cuyo concepto fue consolidado en 1992 por el grupo dirigido por Gordon Guyatt en la Universidad de McMaster en Canadá (19). Luego, Louis Pasteur en Francia, Joseph Lister en Escocia y Robert Koch en Alemania, demostraron que los microbios y no los humores eran los responsables de la mayoría de las enfermeda-

des. En el transcurso del siglo XX la sangría fue progresivamente abandonada para quedar actualmente reservada su utilización en el tratamiento de algunas enfermedades hematólogicas como la hemocromatosis, la poliglobulia y la porfiria cutánea tardía así como en el edema agudo de pulmón. Sin embargo, la flebotomía fue una práctica que se mantuvo durante 25 siglos y es casi seguro que a lo largo de esta historia haya provocado o acelerado la muerte de innumerables pacientes. Pero, si repasamos las indicaciones actuales se apoyan en fundamentos similares a los que utilizaban los antiguos médicos hipocráticos: eliminar humores perjudiciales.

Varios instrumentos han sido utilizados desde la antigüedad para realizar sangrías. La mayoría de los elementos afilados consistían en piedras puntiagudas, plumas, espinas o dientes de animales. Para el autosacrificio, los mayas empleaban lancetas de silex u obsidiana. En varias ofrendas dedicatorias de Toniná había navajas muy angostas y de punta aguzada o bien navajas de doble punta con una de ellas mellada. Se trata sin lugar a dudas de lancetas que servían para obtener sangre. Lo mismo puede pensarse de las pequeñas dobles puntas de silex descubiertas en otra ofrenda dedicatoria del mismo sitio en la que los cuchillos excéntricos ceden su lugar a las lancetas de piedra.

En el siglo XV se introduce la Thumb Lancet (lanceta pulgar) que consistía en un instrumento de doble filo adornado con caparazón de tortuga y del tamaño de un encendedor de bolsillo.

En 1719, Lorenz Heister, cirujano, anatomista y botánico alemán, nacido en Frankfurt desarrolla la lanceta (Schnapper en alemán) que mediante la presión sobre una palanca permite que la lanceta se libere hacia delante produciendo el corte de la vena. Esta lanceta de 5 a 8 cm elimina la presión manual para realizar el corte de la vena. Por seguridad, la schnapper no podía cortar más de una cierta profundidad. Heister utilizó por primera vez la palabra traqueotomía y realizó la primera apendicectomía post mortem.

Los sangradores utilizaban principalmente estos instrumentos para abrir principalmente las venas del brazo, pierna o cuello. En el procedimiento se aplicaba una ligadura con la suficiente presión para bloquear el retorno

venoso pero no la circulación arterial, a excepción claro, de la sección de las venas del cuello. Se practicaba un corte en la vena en diagonal o longitudinal pues el perpendicular o transversal podía seccionar el vaso sanguíneo. Los sangradores recogían la sangre en recipientes calibrados de excelente cristal veneciano que muchas familias se los transmitían en herencia.

Los médicos británicos sentían tal respeto por la sangría que llamaron The Lancet a su principal publicación científica, nombre que aún conserva desde su primera publicación en 1823 (7).

Los que realizaban las sangrías se denominaban cirujanos barberos o barberos cirujanos. Los cirujanos barberos (20) eran considerados como trabajadores manuales que además de cortar el pelo y afeitar realizaban el tratamiento de heridas, extraían dientes, aplicaban ventosas, hacían enemas y también sangrías. En el siglo XVIII, los barberos seguían practicando la cirugía menor y la odontología y muchos cirujanos famosos adquirían sus habilidades en las tiendas de los barberos como Ambroise Paré, cirujano francés considerado el padre de la cirugía.

Paré, empezaría su carrera como aprendiz de cirujano barbero o cirujanos de túnica corta. Estos estaban por debajo de los cirujanos de túnica larga que estudiaban en la Escuela de San Cosme (fundada en el siglo XIII) y conocían las lenguas clásicas (griego y latín) y los escritos de Galeno. Entre los aportes de Ambroise Paré se encuentran la ligadura de los vasos en las amputaciones, técnica para extracción de proyectiles, utilización de tubos para drenar abscesos, bragueros para hernias y prótesis de miembros amputados. Tuvo también un papel destacado en el desarrollo de la Obstetricia mostrando que era posible dar la vuelta al feto antes del parto cuando se presentaban complicaciones debido a su posición en podálica. En 1584 la Escuela de Medicina de la Universidad de París le otorgaría finalmente el título de doctor en medicina debido a sus logros, falleciendo en París seis años después.

El padre de Cervantes llamado Rodrigo era cirujano barbero al igual que su bisabuelo materno. Esto explicaría porqué Cervantes poseía amplios conocimientos médicos para la época que se reflejan en su obra "Don Quijote de la Mancha".

En las Ordenanzas del reino de Aragón se

establecía que en cada galera debía ir un cirujano barbero con las herramientas del oficio. La información sobre los cirujanos barberos que viajaron con Colón es escasa. En el primer viaje a América vinieron el Maese Juan Sánchez en la Santa María, el Maese Alonso de Mojica en la Niña y el Maese Diego Méndez en la Pinta. Sánchez, nacido en Córdoba, era amigo personal de Colón y permaneció en el fuerte Navidad de la isla de Santo Domingo para atender a los nuevos colonos cuando Colón regresó a España. Fue masacrado con todos sus compañeros por los aborígenes. Alonso de Mojica, nacido en Palos de Moguer, era amigo del capitán Vicente Yañez Pinzón, comandante de la Niña. También permaneció en el fuerte Navidad y falleció con sus compañeros. Diego Méndez regresó a España con Colón y además de sus conocimientos quirúrgicos era boticario y herborista.

El rojo y el blanco que todavía se utiliza para identificar una barbería fue pensado originalmente para reflejar la sangre y el blanco por las servilletas usadas para limpiar el derramamiento de la misma. En Inglaterra, los barberos y los cirujanos tenían gremios por separado pero, éstos se fusionaron por Henry VIII en 1540 en la United Company of Barbers and Surgeons. Sin embargo, las dos profesiones habían comenzado a separarse. Cada vez más, a los barberos se les prohibió llevar a cabo cualquier procedimiento quirúrgico excepto la extracción de dientes y las sangrías. Definitivamente en 1745, las profesiones fueron separadas por el rey George II quien estableció el London College of Surgeons. En Francia, los médicos clínicos tenían un status superior al de los cirujanos pero, poco a poco la categoría social de los cirujanos ascendió. En el siglo XVIII se producen oficialmente los cambios decisivos con la fundación de la Académie Royale de Chirurgie en 1731 y la ordenanza de Luis XV prohibiendo a los barberos el ejercicio de la cirugía. Después de la Revolución Francesa, se abolieron las diferencias entre médicos y cirujanos con la creación de las Escuelas de Salud y el título de Doctor.

Como ya vimos, las lancetas fueron utilizadas a diestra y siniestra. Sin embargo, en otros muchos casos se utilizaba una bomba extractora biológica: la sanguijuela. Ya en el siglo II AC, el galeno y botánico griego Nicandro de Colofón recogía en su poema Theriaca la

primera referencia al uso terapéutico de la sanguijuela. Theriaca es un poema de unos tres mil versos sobre los tóxicos de origen animal y su tratamiento. Por ello, durante mucho tiempo theriaca fue sinónimo de antídoto. Las sanguijuelas, son anélidos y se utilizaron durante gran cantidad de años para tratar numerosos trastornos desde dolores de cabeza (se aplicaban en la sien), la obesidad e incluso algunos tumores. De hecho, durante los siglos XVIII y XIX el *Hirudo medicinalis*, la especie utilizada por los médicos, llegó a estar en peligro de extinción. Uno de los facultativos que las usaron en ese período fue el obstetra inglés James Blundell quien se considera realizó la primera transfusión con sangre humana (21). Pero, estos bichitos han sido famosos porque contienen en su saliva un compuesto anticoagulante. Esta sustancia detiene la formación del coágulo con el fin de que el animal se alimente durante más tiempo sin que se coagule la sangre de su víctima. Así, durante la Edad Media, los peregrinos que recorrían el camino de Santiago solían hacer altos en su caminata para tomar baños de agua con sanguijuelas. De esta manera, aliviaban los edemas pero ellos pensaban que era por el reposo. No sabían que estaban haciendo profilaxis de la enfermedad tromboembólica. En 1957, Markwardt (22) denomina a la sustancia anticoagulante de la sanguijuela hirudina. Luego, el estudio bioquímico del compuesto establece que es un polipéptido que contiene 65 aminoácidos. A mediados de la década de 1980 se desarrollaron sustancias anticoagulantes similares a la hirudina (hirudinas recombinantes) como alternativa a la heparina. Son una antitrombina tan potente que tienen mayor riesgo de sangrado que la heparina. Se utilizan cuando los pacientes no pueden recibir el tratamiento anticoagulante clásico por reacciones adversas. No requiere de la presencia de AT III para su acción y ésta no es inhibida por el factor plaquetario 4 (23).

Para trasladar las sanguijuelas, desde la botica hasta donde se encontraba el paciente, se utilizaban recipientes de estaño. Una versión de este contenedor se encuentra en exhibición en el Museo Wellcome de Londres y tiene la palabra inscrita “leeches”. Los agujeros de la tapa son para permitir la transferencia de gas o aire dado que es muy probable que los recipientes se llenaran de musgo húmedo en el fondo para permitir la sobrevida de las sangui-

juelas durante el transporte. Estos recipientes parecían “buzones” por su forma y porque la puerta de entrada voltea hacia delante y hacia abajo. Tal vez, los contenedores de sanguijuelas más hermosos son los grandes recipientes de cerámica, decorados con motivos florales u otros, multicolores, que lucían en las vidrieras de los boticarios (24).

En el siglo XXI las sanguijuelas han vuelto a sus andanzas. En el 2003, el número de marzo de la revista *International Journal of Clinical Practice* (25) se publica un trabajo titulado “El retorno de la sanguijuela” y en el *Annals of Internal Medicine* de noviembre del mismo año un grupo de médicos alemanes establecen que el tratamiento con *Hirudis medicinalis* tiene un efecto antiinflamatorio superior que el uso de diclofenac tópico (26).

En los hospitales de USA las sanguijuelas se comenzaron a usar a partir de 1976 pero la FDA aprueba su uso en el año 2004 como animales acuáticos para ser utilizados como productos sanitarios. En lo que ha tenido más éxito el uso de las sanguijuelas es en cirugía donde se utilizan habitualmente para tratar complicaciones vasculares de ciertos reimplantes (dedos u orejas) y en pacientes que al realizarles un colgajo sufren congestión venosa. Para esta complicación que se produce en el 20% de las cirugías de reconstrucción facial no hay ningún fármaco que la solucione. La sanguijuela sí puede. Primero absorbe la sangre acumulada en el colgajo aliviando la compresión, la hirudina que queda en la mordedura impide que se coagule y el injerto sigue descongestionándose (27).

La práctica no convencional de la sangría se sigue utilizando actualmente en algunos países como Marruecos, Argelia y Oman. En abril de 2008, tres hospitales de Kashmir reportan el uso de sanguijuelas para realizar sangrías en pacientes con patologías cardíacas, artritis, gota, cefaleas crónicas y sinusitis. Las sanguijuelas son utilizadas una sola vez para evitar la transmisión de enfermedades (28).

La sangría fue utilizada con fidelidad y entusiasmo durante más de 2500 años.

Por el contrario, la práctica de la transfusión de sangre documentada, en seres humanos, no tiene más de 200 años. Luego que William Harvey describe la circulación de la sangre en 1628 se comienzan a realizar transfusiones de animales a humanos en Londres

y París en 1667. Pero, recién en 1818 James Blundell en Londres, transfunde por primera vez a un ser humano con sangre humana (29).

La transición de la sangría a la transfusión como acto terapéutico fue el resultado de cambios religiosos, científicos, filosóficos y políticos que aún influyen en la práctica de la medicina moderna. Charles Darwin establece el concepto de la evolución de las especies en 1859. Por extensión, puede aplicarse al desarrollo de la Medicina Transfusional (30). En el siglo XX el Darwinismo Transfusional comienza a principios de siglo con el descubrimiento de los grupos sanguíneos dando origen al período científico y a una nueva disciplina la inmunohematología que con el correr de los años describe serológicamente más de 250 antígenos eritrocitarios agrupados en 30 sistemas junto con los antígenos plaquetarios y granulocitarios específicos. A mediados de siglo, el descubrimiento del sistema HLA origina la avalancha de trasplantes de órganos y tejidos desembocando hoy en el desarrollo de la terapia celular y medicina regenerativa.

A pesar de que la Medicina actual es científica y se fundamenta en la aplicación de tratamientos basados en evidencia, lo cual impediría un lugar racional para los mitos, es común entre los médicos de hoy asignar a ciertos procedimientos o drogas novedosas resultados sorprendentes, casi mágicos, que luego la ciencia, en un cierto período de tiempo, se encarga de relegarlos al olvido ya sea porque producen reacciones adversas o porque existen fármacos más efectivos. Aún actualmente, de forma similar a lo que ocurría con la sangría hace muchos años, cuando a un paciente terminal no hay nada que ofrecerle, se le indica generalmente una transfusión de sangre. La familia se aferra a esta terapéutica como si salvara vidas exigiendo, por lo general, que se le realice lo antes posible. Muchas veces la transfusión de sangre no llega a tiempo o el paciente fallece en la infusión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Manrique J. La sangría: del mito al logos y del rito a la técnica. *Médicos y Medicina en la Historia. Invierno* 2002;1:5-10.
2. Starr D. Historia de la Sangre: Leyenda, Ciencia o Negocio. Barcelona-España Ed. BSA, 2000: 58-59.
3. Rizzi M. Historia de la transfusión de sangre. Sus comienzos en Uruguay. *Rev Med Urug* 1999;15:165-182.
4. Lindegroom GA. The history of blood transfusion to a pope. *J Hist Med* 1954;9:455-462.
5. Schneeberg NG. A twenty first century perspective on the ancient art of bloodletting. *Trans Stud Coll Physicians Phila* 2002;24:157-185.
6. Gordon R. Aliments through the ages. Michael O'Mara Books Limited, London 1998:52-59.
7. Parapia LA. History of bloodletting by phlebotomy. *Br J Haematol* 2008;143:490-495.
8. Karhausen LR. Weeding Mozart's medical history. *JR Soc Med* 1998;91:546-550.
9. Schmidt PJ. Transfusion in the eighteenth and nineteenth. *N Engl J Med* 1968;279:1319.
10. Morens DM. Death of a president. *N Engl J Med* 1999;341:1845-1849.
11. Schmidt PJ. Transfuse George Washington. *Transfusion* 2002;42:275-277.
12. Harris CM, Preston D. Papers of William Thornton. Vol I, Charlottesville, VA: University of Virginia Press, 1995;528-529.
13. Scott P. Temple of liberty: building the capitol for a new nation. New York, Oxford University Press 1995.
14. Ackerknecht EH. Medicine at the Paris Hospital 1794-1848. Baltimore: John Hopkins Press, 1967
15. Steiner WR. Dr Pierre Charles Louis. A distinguished parisien teacher of american medical students. *Ann Med Hist* 1940;2:500-501.
16. Burdois, Royer-Collard et Chomel. Recherches anatomopathologiques sur la phitisie. Précédées du rapport fait à l'Académie Royale de Médecine. Paris: Gabon and Cie, 1825.
17. Louis PCA. Researches on the effects of bloodletting in some inflammatory diseases. Boston: Hilliard-Gray, 1836.
18. Morabia A. Pierre-Charles-Alexandre Louis and the evaluation of bloodletting. *J R Soc Med* 2006;99:158-160.
19. Sackett D, Rosenberg W, Gray J, Haynes R, Richardson W. Evidence based medicine : what it is and what it isn't. *Br Med J* 1996;312:71-72.
20. Schmidt PJ. The hemotherapy of the barber surgeon. *Transfusion* 2006;46:165.
21. Schmidt PJ, Ness PM. Hemotherapy: from bloodletting magic to transfusion medicine. *Transfusion* 2006;46:166-168.
22. Markwardt F. Die isolierung und chemische charakterisierung des hirudis. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1957;308:147-156.
23. Bittl JA, Strony J, Brinker JA, Ahmed WH, Meckel CR, Chaitman BR, Maraganone J, Deutsch E, Adelman B. Treatment with bivalirudin (hirulog) as compared with heparin during coronary angioplasty for unstable or postinfarction angina. *N Engl J Med* 1995;333:764-769.
24. Schmidt PJ. The leech. *Transfusion Today- www.isbt-web.org*. 23/03/2010.
25. Abdelgabar AM, Bhowmick BK. The return of the leech. *Int J Clin Pract* 2003;57:103-105.
26. Michalsen A, Klotz S, Ludtke S, Moebus S, Spahn G, Dobos GJ. Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 2003;139:724-730.
27. Hochberg MC. Multidisciplinary integrative approach to treating knee pain in patients with osteoarthritis. *Ann Intern Med* 2003; 139:781-783.
28. Hussain A. Kashmir Hospitals using leeches. www.news.bbc.co.uk. 10/09/2009.
29. Giangrande PLF. Historical Review. *Br J Haematol* 2000;110:758-767.
30. Snyder EL. Component therapy to cellular therapy and beyond a Darwinian approach to transfusion medicine. *Transfusion* 2008;48:2000-2007.

Historia de la Transfusión de Sangre

Desde la antigüedad, la sangre ha sido asociada a un gran número de creencias muchas de las cuales permanecen como dichos o hechos populares en las sociedades modernas.

Se usa la sangre como símbolo de la relación familiar para referirse a los antepasados o a los descendientes como “hermanos de sangre” o “lazos de sangre”.

En el cristianismo se le da a la sangre un énfasis especial “porque todo ser vive por la sangre que está en él, y yo se la he dado a ustedes en el altar para que por medio de ella puedan ustedes pagar el rescate por su vida, pues es la sangre la que paga el rescate por la vida” (Levítico 17: 11). Se utiliza la sangre como sinónimo de vida.

En las iglesias católicas cuando se realiza la eucaristía se toma el vino como simbolismo de la sangre de Jesús. En la última cena, citada en los cuatro Evangelios, Jesús expresa a sus discípulos que el pan debe ser considerado su cuerpo y el vino su sangre lo cual fue representado por Leonardo Da Vinci en su famosa obra que se encuentra en la iglesia Santa María de las Gracias en Milán.

Basados en las citas bíblicas, los Testigos de Jehová, no comen sangre ni aceptan transfusiones de sangre o hemocomponentes: eritrocitos, glóbulos blancos, plaquetas, plasma o crioprecipitado.

Las citas a que se hace referencia son en el Antiguo Testamento el libro de Levítico y Génesis. El libro de Levítico puede considerarse como una especie de manual destinado a los levitas o miembros de la tribu de Levi que eran los encargados de celebrar los oficios sagrados en el templo de Jerusalén. La llamada “Ley de la Santidad” constituye, por así decirlo, el corazón del levítico, estableciendo normas por una forma de vida cimentada en la

santidad, la justicia y el amor fraterno. En ella (levítico 17: 11-14), se dice “Todo ser vive por la sangre que está en él” y “porque la sangre es la vida de todo ser viviente. Por eso les he dicho que no coman sangre”.

En Génesis 9:4 se expresa también “Pero hay una cosa que no deben comer: carne con sangre, porque en la sangre está la vida”.

En el Nuevo Testamento en el libro de Hechos de los Apóstoles 15:28 y 29 considera que “Pues ha parecido bien al espíritu santo y a nosotros no imponer sobre ustedes ninguna carga aparte de estas cosas necesarias: que no coman carne de animales ofrecidos en sacrificio a los ídolos, que no coman sangre ni carne de animales estrangulados y que eviten matrimonios prohibidos. Si se guardan estas cosas actuarán correctamente. Saludos”.

El concepto que se extrae de la Biblia es la prohibición de “comer sangre de animales” pero los Testigos de Jehová lo interpretan con un sentido más general extendiendo la prohibición a las transfusiones de sangre humana.

A pesar de que la decisión de no aceptar transfusiones de sangre o hemocomponentes es estrictamente religiosa, la mayoría de los individuos Testigos de Jehová utilizan información científica acerca de los efectos adversos de la transfusión de productos biológicos así como de las terapéuticas alternativas (www.noblood.com).

Solicitan incluso discontinuar la quimioterapia cuando son necesarias transfusiones de plaquetas (www.watchtower.org). Cuando se plantea la necesidad de elección entre la realización de un acto quirúrgico con sangre o la muerte, generalmente responden: “si violamos la ley de Dios por una simple transfusión ganaremos días o años de vida pero, hemos muerto espiritualmente y mi relación con

Dios puede dañarse sin lugar a la reparación” (www.religioustolerance.org).

Los Testigos de Jehová han realizado numerosos encuentros con la comunidad médica con el fin de establecer medidas para minimizar o eliminar las pérdidas sanguíneas en cirugías.

Inclusive, se proponen medidas con bases científicas en repartidos (1) para evitar la coagulopatía medicamentosa y optimizar la producción preoperatoria de eritrocitos con hierro o eritropoyetina recombinante (rEPO). Otras acciones propuestas son disminuir la hemorragia perioperatoria limitando las flebotomías diagnósticas, mantener la normotermia operatoria, desarrollar técnicas quirúrgicas que eviten la hemorragia, procedimientos mínimamente invasivos, instrumentos quirúrgicos hemostáticos y el uso de drogas antifibrinolíticas.

Muchos de los cirujanos pioneros que aplicaron estas medidas de “ahorro de sangre” publicaron sus experiencias en cirugías de Testigos de Jehová. El cirujano cardíaco Denton Cooley de Texas-USA, publica un artículo en 1964, en el *American Journal of Cardiology* sobre “Open Heart Surgery in Jehovah’s Witnesses”. En 1977, este mismo autor reporta su experiencia en más de 500 pacientes (2).

Actualmente muchos centros de Europa y del resto del mundo aplican estas medidas de ahorro de sangre.

Los Testigos de Jehová si bien no aceptan la transfusión de hemocomponentes ni el procedimiento de transfusión autóloga de predepósito, si pueden realizarse la hemodilución normovolémica y la recuperación de sangre autóloga del campo operatorio. Es decir, que de las tres modalidades de transfusión autóloga aceptados. Inclusive, autorizan a realizar la recuperación de sangre en cirugía oncológica si se utiliza la leucoreducción (3) y la irradiación gamma (4). Si existe riesgo de contaminación bacteriana por lesión intestinal por ejemplo, se considera la terapéutica o profilaxis con antibióticos (5).

También pueden ser transfundidos con hemoderivados comerciales originados a partir del fraccionamiento del plasma humano como albúmina, inmunoglobulinas, factores de la coagulación (FVIII, FIX, FvW o complejo protrombínico) y los de uso tópico (gel de fibrina, gel plaquetario o crioprecipitado). Aceptan drogas que favorecen la hemostasis como la

vitamina K, desmopresina y antifibrinolíticos. No tienen limitaciones para la utilización de los hemoderivados recombinantes como el rFVIIa, FVIII, FIX, rEPO y G-CSF.

En la década de 1980 debido, por un lado a la epidemia de SIDA y por otro, a los Testigos de Jehová se revisaron pautas establecidas como el nivel de 10 gramos de hemoglobina como límite para realizar intervenciones quirúrgicas. En la actualidad, de acuerdo al terreno del paciente y sus antecedentes se realizan cirugías con valores de hemoglobina entre 7 a 10 gramos (6). A su vez, en 1998 se crea en Graz-Austria, la Network for Advancement of Transfusión Alternatives (NATA), un grupo internacional de médicos, investigadores y líderes de opinión de una gran variedad de disciplinas médicas y científicas que desarrollan y fomentan las terapéuticas alternativas a la transfusión de hemocomponentes (www.nataonline.com). Publican sus experiencias en el *Journal of Transfusion Alternatives in Transfusión Medicine*.

Últimamente, en muchos hospitales, se crean comités para tratar los casos de los pacientes que rechazan ciertos tipos de tratamientos. En el Hospital de Clínicas “Dr Manuel Quintela” de Montevideo se ha creado un comité multidisciplinario para este tipo de pacientes, en los cuales se engloba a los Testigos de Jehová, con el fin de estudiar cada caso en particular y realizar propuestas terapéuticas al paciente y sus familiares. Respetando desde el punto de vista ético la decisión final del paciente se ha elaborado un protocolo escrito médico, legal y ético (“Relevancia del consentimiento del paciente y situaciones en que éste no acepta el procedimiento terapéutico propuesto en centros asistenciales públicos, www.hemoterapia.edu.uy).

Desde la antigüedad se ha considerado a la sangre como un ejemplo de vida. Se pensaba que las propiedades físicas e intelectuales de una persona podían ser transmitidas a otro individuo por la sangre, inclusive de animales. Así, se seleccionaban animales fuertes y bravíos para la transfusión de pacientes deprimidos o de animales mansos para individuos excitados o nerviosos.

Marsilio Ficino de Florencia recomienda extraer sangre de personas jóvenes para mejorar el estado físico de los ancianos (7). Así, en 1492 en ocasión de la última enfermedad

del papa Inocencio VIII los médicos de la época habían agotado todas las terapéuticas disponibles incluyendo sangrías. Apareció en Roma un médico judío que ofreció cambiar la sangre del viejo papa por sangre de jóvenes plenos de vigor y salud.

Se obtuvieron tres varones de 10 años como donantes previo el pago de un ducado de oro a cada una de las familias. Los niños fueron sangrados falleciendo los tres pero como la sangre se coagulaba constantemente, la transfusión no se realizó (8). Cuando se intentó detener al médico judío éste ya había huido, desapareciendo para siempre. El papa murió el 25 de abril de 1492.

En 1628, William Harvey, Profesor en el Royal College de Londres y médico personal del rey James I, describe la circulación de la sangre en su libro, editado en Frankfurt, “*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*” (9) con lo cual los médicos no sólo pensaron como hasta ahora en extraerla sino en transfundirla pero, para ello era necesario idear un procedimiento técnico. Al examinar las venas de varias especies encontró que contaban con numerosas válvulas. Trató de introducir agua por los vasos en sentido inverso pero no pudo conseguir que el líquido fuera y viniera porque las válvulas sólo permitían la corriente en una sola dirección. Aunque Harvey había introducido agua dentro del aparato circulatorio, no hay evidencia que considerara la transfusión de sangre en relación con su práctica médica.

En el mismo año, 1628, Johannes Colle, un profesor de la Universidad de Padua, que pudo haber conocido el trabajo de Harvey, al escribir sobre los métodos de prolongación de la vida mencionó la transfusión de sangre pero no hay seguridad de que alguna vez intentara realizarla (10).

Quizá el reverendo Francis Potter de Inglaterra haya sido el originario de la idea de transfundir sangre dado que en 1639 utilizó tubos y plumas como agujas. En 1649 le escribe a su amigo John Aurbey, un anticuario y escritor, que ha realizado el procedimiento de transfusión entre dos pollos pero sin mucho éxito: “no he conseguido que penetren dentro de la cánula o vejiga más de dos o tres gotas de sangre” (7).

Francesco Folli, nacido en Poppi en Toscana el 3 de mayo de 1624, fue luego doctor

de la corte de los Medici en Florencia. En 1654 realizó una demostración de transfusión frente al Duque de Toscana, Fernando II. El Duque no quedó muy impresionado con el procedimiento por lo cual Folli se retira a vivir en un pequeño pueblo fuera de los dominios del Duque. En 1680 escribe un volumen *Stadera Medica* o *The Medical Steelyard* (Florence, GF Cecchi, 1680) en el cual en la segunda sección “*Della transfusione de sangue*” reclama su descubrimiento de la transfusión de sangre (11). Folli declara que leyó el tratado de Harvey sobre el movimiento de la sangre y como consecuencia se le ocurrió que la transfusión de sangre permitiría curar enfermedades y rejuvenecer a los ancianos. Más tarde, describe en su libro, el aparato requerido para realizar una transfusión y el modo de usarlo pero finalmente dice que “he dicho demasiado sobre la manera de efectuar la operación, no habiendo realizado el experimento...” (10)

Harvey trabajó en Oxford entre un grupo de científicos que se autodenominaban Club de la Filosofía Experimental. Sus compañeros se sintieron tan impresionados con sus descubrimientos que empezaron a experimentar con la circulación sanguínea.

Uno de ellos, Christopher Wren en 1656 realizó las primeras infusiones intravenosas en animales inyectando cerveza y vino. Fue un distinguido científico y arquitecto del siglo XVII, famoso por sus trabajos de reconstrucción de las iglesias de Londres después del gran incendio de 1666. Wren diseñó la Catedral de San Pablo la única de estilo renacentista en todo el país. En ella se encuentra su tumba. Fue fundador de la Royal Society junto con Thomas Willis, Richard Lower, Robert Hooke, Robert Boyle, William Petty, Thomas Sydenham y Samuel Pepys siendo su presidente entre los años 1680 y 1682 (www.wikipedia.org/wiki/Christopher_Wren).

Los trabajos de Wren fueron continuados por Robert Boyle, el fundador de la química moderna, que utilizando una pluma hueca y una vejiga inyectó opio y antimonio a perros lo cual fue publicado en su “*Usefulness of Experimental Philosophy*” en 1663.

Basado en los trabajos de Wren y Boyle, Richard Lower (1631-1691) pensó que si la cerveza y el vino podían ser infundidos intravenosos al igual que otras sustancias, la sangre

también. En febrero de 1665 realizó los primeros experimentos exitosos de transfusión de sangre directa entre animales. Al inicio trató de transferir sangre de la vena yugular de un animal a la vena yugular de otro por medio de tubos entre ambos perros pero, viendo coagularse la sangre en el tubo, por el lento movimiento de la sangre venosa, intentó otro camino. Tuvo éxito cuando unió la arteria del animal donante con la vena del animal receptor dado que la diferencia de presión forzaba el pasaje de la sangre de un animal al otro. El famoso libro de Lower, *Tractatus de Corde* fue publicado en 1669. Sin embargo, en 1668 se publicó en Bolonia-Italia el primer libro de 80 páginas referente a las experiencias sobre la transfusión de sangre. Era una recopilación de folletos y revistas publicadas en París y Londres en el año anterior con algunas observaciones realizadas por Magnani de Roma sobre los experimentos publicados (10).

En junio de 1667, Jean Baptiste Denis (1643-1704), médico de Luis XIV, tropezó con un paciente de quince años que tenía una fiebre prolongada y por la cual los médicos le habían realizado veinte sangrías con el fin de disminuir el excesivo calor pero, lo único que habían hecho era debilitarlo. Denis decidió que podría ser beneficiosa la sangre de un manso cordero por lo cual le extrajo al paciente 3 onzas de su sangre a través de una vena y la conectó a la arteria carótida del cordero recibiendo 9 onzas de sangre del animal. Después de la transfusión el paciente realiza lo que se le ordena, no tiene dolor, embotamiento ni pesadez en su cuerpo. Semanas más tarde, el paciente engordó visiblemente y es motivo de asombro para todos los que lo conocen. La transfusión a este muchacho se hizo con fines terapéuticos.

Denis hizo su segunda transfusión de sangre de animales a humanos en un hombre robusto de 45 años que no tenía una indisposición considerable por lo cual el procedimiento fue puramente experimental. Se supone que el sujeto recibió 20 onzas de sangre de cordero pero, de nuevo sin efectos perjudiciales. Luego de la transfusión el hombre se negó a descansar y para demostrar su fuerza y habilidad degolló al cordero y lo esquiló gustosamente pues ésta había sido su profesión durante toda su vida.

Denis publicó su informe en el número de

Philosophical Transactions del 22 de julio de 1667 ante lo cual Lower replicó en términos violentos diciendo que “la transfusión fue descubierta por mí” y acusó a Denis de haberle robado la idea.

El 23 de noviembre de 1667 los doctores Lower y King pagaron 20 chelines a un tal Arthur Coga, un indigente bachiller en Teología de Cambridge de unos treinta y dos años de edad y hermano del director del Pembroke College, para que se dejara inyectar sangre de cordero. Este experimento no causó ningún contratiempo para el individuo pero se realizó seis meses después que se efectuara en París la primera transfusión de un animal a un ser humano. Debe considerarse entonces que aunque Lower tuvo la prioridad en la transfusión de sangre de animal a animal, Denis la tuvo en la de animal a hombre.

En el invierno de 1667, un noble halló a Antoine Mauroy vagando desnudo por las calles de París y se lo presentó Jean Baptiste Denis, médico de Luis XIV. El 19 de diciembre, se abrió una vena del brazo de Mauroy, se insertó un tubo de plata y se extrajo un cuarto litro de sangre. Seguidamente, se introdujo el otro extremo del tubo en una arteria de la pata de un ternero penetrando al paciente sangre del animal. El médico confiaba que la sangre del ternero, por su mansedumbre y frescura pudiera aliviar el calor y la ebullición de la sangre del paciente. Denis retiró el dispositivo cuando Mauroy se quejó de un gran calor que subía desde la muñeca. Dos horas después su dolor había desaparecido, cenó copiosamente y se entretuvo con silbidos entonando canciones.

Luego de dos días, Denis lo sometió a otra transfusión pero no bien la sangre del animal comenzó a penetrar en la vena de Mauroy este se quejó de la misma sensación de calor que ascendía por su brazo. Pronto se asoció intensa sudoración, vómitos, dolor en los riñones, taquicardia y sensación de asfixia ante lo cual se retiró rápidamente el tubo. Luego, el paciente orinó varias copas de una orina tan negra como si la hubieran mezclado con hollín de las chimeneas (hemoglobinuria). Denis no podía saberlo pero su paciente experimentó una incompatibilidad transfusional que le produjo una hemólisis intravascular. Le acostaron y cuando despertó a la mañana siguiente mostró una sorprendente calma y una languidez en todos sus miembros. Permaneció con Denis

dos días hasta que se aclaró la orina y Mauroy sobrevivió únicamente gracias a Dios (12).

Al tiempo, Perrine la esposa de Mauroy, le suplica a Denis que le realice la tercera transfusión dado que su esposo se encuentra sumamente violento y ha empezado a golpearla. Denis se niega a realizar la transfusión. Luego en una carta dirigida a Denis, Perrine le solicita si puede acudir a su casa. Ante los llantos y ruegos de Perrine, Denis accede a realizar el procedimiento. Cuando estaba por insertar el tubo, el paciente fue presa de un acceso tan violento que cayó la cánula y concluyeron el experimento sin poder realizar la transfusión. Antoine Mauroy falleció la noche siguiente. Perrine se negó a que Denis examinara el cadáver y éste desconfiando le manifestó que volvería con testigos y le haría una autopsia por la fuerza. La mujer enterró a su marido antes que se presentaran. Poco después Perrine visitó a Denis y le confesó que tres médicos de la Academia Francesa rival le habían ofrecido 50 luises de oro si lo acusaba de asesinato en el tercer intento de transfusión. Denis presentó una demanda en el Tribunal Penal de París donde salió a luz una extraña historia. Una noche después que su marido la golpeó en sus oídos, Perrine empezó a echar ciertos polvos en la sopa por lo cual en los días precedentes a la tercera transfusión Mauroy estaba muriendo intoxicado por arsénico.

Sin embargo, en el fallo del 17 de abril de 1668, el magistrado advirtió que las transfusiones preocupaban a los médicos de París y decretó que cualquier médico que quisiera realizar una transfusión debía solicitar previamente permiso a la Facultad de Medicina. Dos años más tarde, el Parlamento francés prohibió oficialmente todas las transfusiones a seres humanos. Los ingleses hicieron lo mismo y el Papa proscribió la práctica en la mayor parte de Europa (12).

Transcurrirá un siglo y medio antes de que los médicos intenten nuevas transfusiones humanas empleando sangre de otras personas.

La fecha histórica que se le debe asignar a la primera transfusión directa de sangre humana es el 22 de diciembre de 1818 en la cual el obstetra inglés James Blundell (13) leyó a la Sociedad Médico Quirúrgica de Londres, un informe sobre la transfusión de sangre que realizó con la ayuda del célebre cirujano Henry Cline. El enfermo se moría de

inanición por un carcinoma gástrico. Blundell pensó que se podía beneficiar con una transfusión de sangre y que en todo caso, el experimento no podría producir ningún daño. El paciente recibió entre 350 y 450 ml de sangre proveniente de varios donantes por medio de una jeringa en treinta a cuarenta minutos. Mejoró temporalmente aunque pronto recayó, falleciendo 56 horas después de la transfusión. Su enfermedad era incurable y realmente poco podía esperarse de la transfusión pero, evidentemente Blundell estaba decidido a comenzar con precaución.

Blundell obtuvo su título de médico en la Universidad de Edimburgo en Escocia en 1813 donde por ese entonces realizaba sus experimentos John Henry Leacock (14). Si bien los manuscritos de Leacock fueron escritos mientras estaba en Barbados, los experimentos sobre transfusión de sangre fueron realizados en Edimburgo siendo uno de sus contemporáneos James Blundell. Leacock exsanguinaba a perros y luego los resucitaba mediante transfusiones de sangre pero no realizó transfusiones en humanos. En 1817 Leacock advierte sobre el riesgo de mezclar sangre de diferentes especies y resalta las ventajas de la transfusión para el tratamiento de las hemorragias que alteran las funciones vitales peligrosamente como las que ocurren en los soldados en la guerra o en las parturientas (15). Blundell comenzó a interesarse en la transfusión de sangre como método para tratar la hemorragia durante el parto muy poco tiempo después del uso de la jeringa que facilitó la técnica de transfundir vena a vena. Los experimentos de Blundell contrastaban con los de Leacock en que transfundió sangre venosa y no arterial, usó la infusión de sangre humana previamente en perros y realizó procedimientos de transfusión indirectos mediante jeringas mientras que Leacock usaba el método directo donante receptor (15).

Existe un registro que una transfusión de sangre humana a un paciente fue realizada en 1795 por el cirujano americano Philip Syng Physic graduado también en Edimburgo (14).

Entre 1818 y 1829 Blundell y sus colegas realizaron un total de 10 transfusiones usando sangre humana de las cuales no más de cuatro fueron exitosas. La primera transfusión con buenos resultados se realizó en una mujer que se recuperó de una hemorragia postparto

luego de recibir ocho onzas de sangre de un ayudante de Blundell. Este caso fue publicado en *The Lancet* en 1829 pero reporta que la paciente desarrolló fiebre, dolor lumbar, cefaleas y orinas oscuras (hemólisis intravascular por incompatibilidad ABO?).

Sin embargo, a partir de 1830 el interés de Blundell por las transfusiones decayó y luego se retiró de la práctica médica en 1847 a la edad de 57 años. Blundell fue sin duda quien transfundió por primera vez sangre humana a humanos y se le debe todo el honor.

Es interesante saber también cómo Blundell realizó las transfusiones. Al principio usó un simple modelo de jeringa y cánula de latón con la que extraía sangre de la vena del donante y la inyectaba luego en la vena del paciente (10). Pero esto no le satisfizo e inventó un extraño instrumento con un embudo y una bomba que denominó “impellor” y lo publicó en su libro en 1824. Después inventó otro instrumento el “gravitator” en el cual la gravedad proporcionaba la fuerza motora para impulsar la sangre a la vena del paciente.

Blundell se tomó el trabajo de demostrar que la sangre no se dañaba al pasar a través de un instrumento y que la entrada de unas pocas burbujas de aire en la circulación eran completamente inofensivas.

Si bien la Escuela Médica de la Universidad de Edimburgo en Escocia contribuyó al desarrollo de las transfusiones de sangre otros dos importantes descubrimientos fueron la antisepsia y la anestesia por Joseph Lister y James Young Simpson respectivamente (16).

A partir del trabajo de Lister en 1867 se introdujo la esterilización de los instrumentos y la aplicación de los antisépticos lo cual en un futuro tendría una importante aplicación en el desarrollo de la transfusión de sangre en el siglo XX. Por su parte, Simpson comunica su “Account of a new anaesthetic agent” en la Sociedad Médico-Quirúrgica de Edimburgo en 1847. Cinco días después aplica cloroformo a un muchacho para que el Dr. James Miller extraiga parte de su húmero por osteomielitis. Recordemos que la reina Victoria en su octavo parto en 1853 recibe anestesia y nace su hijo Leopoldo que es hemofílico (ver historia de la coagulación).

En 1840, el cirujano inglés Samuel Armstrong Lane realiza la primera transfusión exitosa de sangre total “fresca” para tratar un

paciente con hemofilia lo cual es publicado en la revista *The Lancet* (17).

Durante la última parte del siglo XIX había estallado en Europa la guerra franco-prusiana y se colocó en primer plano la posibilidad de realizar transfusiones en los heridos de guerra. Por aquel entonces, la principal autoridad era el doctor Roussel de Ginebra quien había realizado con éxito una transfusión directa brazo a brazo, en una enferma con hemorragia puerperal, en 1865. El aparato utilizado consistía en una vasija de vidrio colocada sobre la fosa antecubital del donante en cuya parte superior había una lanceta para abrir la vena. El equipo se llenaba antes con agua y luego se puncionaba la vena. El operador por medio de una llave de doble paso expulsaba entonces el agua a través de una cánula e inyectaba la sangre al receptor a través de una segunda cánula inserta en la vena del receptor. La fuerza motora la proporcionaba una pera de caucho compresible situada entre los dos brazos. Fue publicado en la *Gazette des Hôpitaux* en 1867. Sin embargo, fue insuficientemente divulgado y no se usó en la guerra franco-prusiana.

Roussel resaltaba la importancia de usar sangre humana y afirmaba que el método estaba exento de peligro tanto para el donante como para el receptor.

En 1876 se le atribuye a Roussel la realización de 16 transfusiones afortunadas aparte de las 35 realizadas por diversas afecciones. En 1877 se tradujo al inglés su libro “Transfusión of Human Blood”. Su aparato fue oficialmente adoptado por el ejército francés y aparentemente fue utilizado en tiempos de guerra (10).

Durante el siglo XIX uno de los principales usos de la transfusión de sangre fue en la práctica obstétrica y en 1873 se realizó una encuesta sobre sus méritos por la Obstetrical Society de Londres. Los resultados al parecer no fueron muy alentadores y la transfusión de sangre continuó siendo considerada como un procedimiento a usar como último recurso terapéutico.

En el último cuarto del siglo, la frustración y el desencanto con las transfusiones de sangre, hizo que durante un corto período de tiempo se buscaran sustitutos de la sangre para ser infundidos. Así, entre 1873 y 1880 en USA comenzaron a utilizarse las transfusiones de leche de vaca por Gaillard Thomas. Había descartado el uso de sangre por su tendencia a la

coagulación y utiliza leche de vaca para el tratamiento de la hemorragia postparto (18). Sin embargo el aumento de las reacciones adversas provocadas por las transfusiones de leche hizo que estas fueran abandonadas en 1880. Pero, el empujón final para que las transfusiones de sangre animal y de leche dejaran de realizarse fue la introducción entre 1875 y 1880 de la solución salina fisiológica para uso intravenoso y sin riesgos para el receptor.

La primera fotografía sobre una transfusión de sangre fue tomada en el año 1876 en el Hospital Bellevue de la ciudad de New York (19). En ella se observa una transfusión directa donante –receptor utilizando el equipo del obstetra inglés James Hobson Aveling descrito en 1873. El equipo de Aveling consistía en un simple tubo unido a dos cánulas con una pera de goma interpuesta en el medio cuya compresión hacía impulsar la sangre. Lo utilizó por primera vez en 1872 para realizar una transfusión directa en una mujer de 21 años con una hemorragia postparto grave.

Hasta esta fotografía, entre los siglos XVII y XIX se realizaron numerosas ilustraciones que documentaban las sangrías y las transfusiones realizadas de animales a seres humanos y luego entre seres humanos de forma directa. En un trabajo reciente, se realiza una recopilación de estos grabados donde se muestra el gravitator de Blundell, el equipo de Roussel así como la transfusión realizada por Aveling entre otros (20). En las ilustraciones más antiguas el receptor por lo general era un hombre pero en las del siglo XIX generalmente es una mujer dado que la mayoría de los médicos transfusionistas eran obstetras y trataban las hemorragias del parto con sangre. Esta predominancia de la mujer como receptor de las transfusiones tenía dos excepciones: las caricaturas políticas y la demostración de las transfusiones en la guerra. La imagen del donante, no menos importante, comenzó con animales. En el siglo XIX es la imagen del hombre principalmente maridos o familiares de los receptores o doctores del equipo tratante. Así el donante y el doctor se fusionan en una sola persona, “el médico heroico”, representado en las figuras 11 y 19 de la publicación mencionada (20). El “donante heroico” no relacionado recién aparece en el siglo XX en el contexto de la primera guerra mundial. En octubre de 1914 en Montpellier-Francia se

realizó una de las primeras transfusiones de la primera Guerra Mundial. El donante fue Emile Barthelemy un soldado del batallón 81. Su sangre salvó la vida de un soldado llamado Crochet, del batallón 68, quien debió ser amputado luego de una severa hemorragia. La transfusión se realizó en forma directa brazo a brazo probablemente con el equipo de Roussel y finalizó cuando el donante se puso pálido. Luego se publica en *L'Illustration* una foto de ambos veinticinco días después de la transfusión, titulada “Hermanos de Sangre” (20).

En Uruguay, la primera publicación sobre una transfusión de sangre data del mes de marzo de 1877 en el periódico mensual de Medicina y Farmacia, el *Boletín Médico Farmacéutico*.

Fue realizada en el Hospital de Caridad de Montevideo por un joven facultativo, Florentino Ortega, quien se graduó en la Facultad de Medicina de París en 1875 y registró su título en Uruguay el primero de abril de 1876. La transfusión de sangre directa fue realizada a un militar que presentaba un aneurisma en la pierna mientras se le amputaba el miembro (36).

La segunda experiencia exitosa de una transfusión de sangre fue realizada por el cirujano francés Joseph Fort en diciembre de 1884, en una mujer con anemia secundaria a menorragias de causa desconocida. Utilizando el transfusor de Roussel extrajo sangre a Dufour, médico de la cañonera francesa “Tactique”, mediante descubierta de la vena basilica. Luego de la transfusión la paciente tuvo un ahogo y un chuco de frío pero las menorragias cesaron y no reaparecieron (36).

A principios del siglo XX, en 1907 el cirujano de Cleveland-USA, George Washington Crile describió uno de los últimos métodos de transfusión directa donante-receptor (21).

Consiguió buenos resultados mediante el empleo de un tubo de goma delgado con una cánula de plata en cada extremo (arteria del donante y vena del receptor). El interior del aparato se cubría antes de su uso con una delgada capa de aceite de parafina para impedir la coagulación de la sangre dentro del tubo. La transmisión de la sangre donante-receptor se podía comprobar por la pulsación visible del tubo de goma conector que era sincrónica con la pulsación arterial. Su desaparición implicaba la evidencia de que se había producido la coagulación en algún componente del equipo.

Crile publicó sus experiencias en una monografía de 560 páginas titulada "Hemorrhage and Transfusion", donde desarrolla el método, sus teorías y casos clínicos. Sin embargo, no reporta inconvenientes técnicos o clínicos. Usando el método de transfusión directa, Crile realiza 61 transfusiones en 55 pacientes. Esta técnica fue utilizada antes que la sangre citratada estuviera disponible.

Pero, la transfusión directa donante-receptor tenía como inconvenientes: 1- la imposibilidad de medir la cantidad de sangre que pasaba al enfermo, 2 -el traumatismo de la arteria radial del donante que debía ser expuesta a través de una incisión de considerable longitud, había que ligarla al terminar la operación dejando para siempre una cicatriz y no podía utilizarse más de dos veces, 3- la transfusión había que realizarla con el donante y el paciente uno al lado del otro y 4 - era necesario untar el interior del tubo con parafina lo cual acarreaba alguna dificultad y en las situaciones clínicas que no se podía perder tiempo, no se podía contar con la eficacia de este método.

Las dificultades de las trasfusiones directas condujeron al desarrollo de métodos indirectos para la transfusión de sangre completa primero y de hemocomponentes después, como veremos en los capítulos siguientes.

En 1875, Hammarsten describe que el cloruro de calcio acelera la coagulación así como la cantidad de fibrina formada (22). En 1890, Arthus y Pagés (23) concluyen que el calcio es absolutamente necesario para la formación del coágulo y demuestran que si la sangre se mezcla con oxalato inmediatamente, permanece fluida por varias semanas en la heladera.

Si bien la adición de oxalato a la sangre puede ser útil para la transfusión también puede ser peligroso. En 1891, Wrigth (24) usa el oxalato con buenos resultados para las transfusiones en perros. En este año, Griesbach (25) establece que el citrato de amonio interfiere con la coagulación de la sangre pero no determina cual es el mecanismo de esta acción. Recién en 1892, Pekelharing (26) demuestra que 90 cc de sangre mezclados con 10cc de una solución al 5% de citrato mantiene la sangre fluida y este efecto se debe a la afinidad del calcio con el ácido cítrico.

En 1902, de nuevo Arthus (27) nacido en Francia en 1862 y profesor de Fisiología en

Lausana, establece que los anticoagulantes como el oxalato y tartratos precipitan el calcio de la sangre mientras que el citrato produce anticoagulación sin precipitación.

En 1909, se realizan los primeros ensayos de la administración de sangre citratada alogénica en animales (conejos) en el Hospital Guy's de Londres por Boycot y Douglas (28).

La primera transfusión de sangre citratada realizada entre seres humanos fue reportada por Hustin en Bruselas, en marzo de 1914 (29). Si bien este trabajo fue listado en el Index Medicus del 14 de octubre de 1914 no fue mencionado en la prensa norteamericana (30).

En noviembre de 1914, Luis Agote en Buenos Aires -Argentina, realizó la primera demostración pública de una transfusión de sangre citratada alogénica segura y eficaz.

Agote no publicó este hecho relevante en revistas médicas pero apareció en La Prensa, un diario bonaerense y a su vez el New York Herald publicó un extracto el 15 de noviembre de 1914 (31).

Dos meses después, a finales de enero de 1915, Richard Lewisohn cirujano del Hospital Mount Sinai de New York en un pequeño reporte establece que la sangre mezclada con citrato al 0,2% no resultó tóxica en transfusiones en perros por lo cual la aplicó en dos pacientes con éxito (32). En su trabajo, menciona a Hustin pero éste aconsejaba una dilución (10 g de citrato por cada 100 cc en partes iguales con una solución salina de glucosa) que diluía tanto la sangre que hacía que la transfusión fuera muy poco eficaz. Sin embargo, no cita a Agote. Lewisohn considera que el método propuesto por él, 30cc de citrato al 2% para 300 cc de sangre, es el mejor para realizar trasfusiones sanguíneas.

En Uruguay, en 1914 Pedro Ernesto Duprat, que era secretario de la Sociedad de Medicina de Montevideo, publica dos artículos sobre el procedimiento y las indicaciones de la transfusión de sangre (33) (34). "Desde el punto de vista terapéutico exclusivo, la transfusión tiene que ser necesariamente muy superior a la intravenosa de suero fisiológico, porque la sangre inyectada representa no sólo un agente mecánico que permite recuperar al organismo una masa líquida completamente semejante a la que necesita el corazón para latir sino también un agente biológico perfecto, porque pone a disposición del organismo

esa hemoglobina que le es tan indispensable; porque llevando su fibrinógeno restablece la coagulabilidad normal y la excesiva fluidez de la sangre (de los discrásicos, de los inyectados de suero, por ejemplo) y por último, porque esa sangre sana es el mejor excitante de la regeneración globular. La transfusión representa en resumen un agente terapéutico, cuyas propiedades mecánicas (por su masa líquida) y biológicas (antiasfíxicas: hemoglobina, anticoagulantes: fibrinógeno y hematopoyéticas) hacen comprender sus indicaciones capitales y hacen presentir otras muchas que el porvenir precisará. Además, la transfusión es una técnica relativamente fácil y bien practicada es completamente inocente”.

En el siguiente relato se ocupa de la técnica y de las condiciones que debe llenar el “greffon”. En él describe el método de Crile y el de Kimptom- Brown de 1913 utilizado en el John Hopkins Hospital de USA, el cual si se comprobara que no altera la sangre y que no provoca o facilita su coagulación, cosas éstas muy probables, podría llegar a ser un método del porvenir por su sencillez.

Augusto Turenne, Profesor de Obstetricia de la Facultad de Medicina, primer Presidente del Sindicato Médico del Uruguay (1920), historiador y Decano (1907-1909), realizó en octubre de 1916 la primera transfusión de sangre citratada por el método de Agote (35). Al igual que James Blundell en Londres, que realiza la primera transfusión de sangre directa entre humanos un siglo antes (1818), Augusto Turenne era obstetra y conocía la técnica de la sangre citratada dado que su asistente María Armand Ugon había estado presente en Buenos Aires en ocasión de la segunda transfusión realizada por Agote en el Instituto Médico Modelo del Hospital Rawson de Buenos Aires-Argentina..

El 1 de agosto de 1916 ingresa al Servicio de Protección Maternal (Casa de la Maternidad) la señora JP de G, uruguaya, casada de treinta años de edad sin antecedentes personales de importancia. Había tenido cuatro gestas y tres partos de término normales. El 18 de julio tuvo un aborto espontáneo de su última gesta con fecha de última menstruación 12 de abril de 1916. Hubo retención de restos ovulares que una partera quiso extraer infructuosamente con la mano sin guantes. Dos días después un médico le hizo un legrado. El 23

de julio empezó a sentir dolores en el bajo vientre y fiebre. Desde el 25 o 26 de julio tiene tenesmo rectal con secreción mucosa y algunos chuchos; hay retención de orina.

Al examen genital el anexo derecho está aumentado de volumen, pero poco doloroso. El útero mal limitado, es encuadrado por una masa renitente que a la izquierda rebasa el pubis, de 7 a 8 centímetros, hace prominencia en el fondo de saco lateral izquierdo y en el posterior, que es francamente fluctuante. Se diagnostica piosalpinx y pelviperitonitis. La punción da salida a unos 500 cc de pus muy fétido y a alta presión. Se deja grueso drenaje e instilación cada dos horas de líquido Carrel. La temperatura se mantiene varios días por debajo de 38 grados y el pulso entre 80 y 92 cpm. La supuración disminuye rápidamente y entra en apirexia a partir del 13 de agosto. Es dada de alta con control en policlínica.

El 1 de setiembre reingresa con fiebre de 39 grados y retención de pus, reponiéndose el drenaje. El tres de octubre, Turenne decide intervenirla quirúrgicamente. Todas las partes denudadas sangran en superficie lo cual obliga a colocar un Mickuliez. Durante los primeros 10 días el estado de la paciente fue sumamente grave, llegándose a formar una escara sacra de 6 a 7 cms, diarrea casi continua, lipotimias y pulso de 120 a 170 cpm. Mejoró gradualmente y el 16 de octubre se retiró el tubo de drenaje abdominal dejando en su lugar una mecha. Al día siguiente, tiene dos serias hemorragias por el trayecto del drenaje que la reagran. El 22 de octubre repite las hemorragias cuatro veces en 24 horas, llegando el pulso a 168 cpm. Se renueva el taponamiento que se mantiene hasta el día 25. El estado de la enferma era gravísimo por su anemia y la ínfima tensión del pulso a pesar del suero y de los tonicardíacos aplicados. Todo hace pensar que la menor pérdida sanguínea será fatal. Convencidos de que sólo una transfusión sanguínea podía modificar este estado de las cosas, la practicaron el 26 de octubre.

El procedimiento, realizado por los doctores Colistro, Curbelo y García San Martín consistió en descubrir la vena media cefálica de la donante (nurse Ramírez) y la vena media cefálica de la enferma. Se sangró la donante en un frasco que contenía citrato neutro de soda al 25% y se bombearon con pera de

Richardson 220 cc de sangre a la vena receptora en 20 minutos. No se hizo ninguna prueba de compatibilidad sanguínea ni se mencionan los grupos sanguíneos (35). El pulso que estaba en 144 bajó a 132 cpm, la tensión sanguínea subió de 13 a 14 bajando la mínima de 7 a 6 mm de Hg. La mejoría subjetiva fue rápida y real; media hora después de la transfusión la enferma estaba visiblemente más animada y un leve sudor cubría su cara y extremidades. Esa noche, por primera vez desde su operación, durmió varias horas.

En la publicación realizada por Turenne existe una fotografía del equipo utilizado para realizar esta primera transfusión de sangre citratada (figura 2.1). El aparato se constituyó con un frasco de cristal graduado de 500 cc, de boca ancha, cerrada por un tapón de goma con dos aberturas para dar paso a dos tubos de vidrio acodados; uno de ellos corto en comunicación con una pera insufladora de Richardson; el otro largo, cuya extremidad inferior alcanzaba el fondo del frasco, continuándose por la otra parte con un delgado tubo de goma adaptado a una aguja común de inyección intravenosa.



Figura 2.1 - Equipo de transfusión de Turenne tomado de la Revista Médica del Uruguay 1917;20;297-213. Biblioteca de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

En el tubo de insuflación se interpuso un copo de algodón esterilizado para filtrar el aire y todo el aparato fue esterilizado convenientemente. La solución anticoagulante fue de citrato neutro de soda al 25%. La emplearon en cantidad mayor que la indicada por Agote (1 cc cada 100 cc de sangre) para tener la certeza de humedecer convenientemente las paredes del frasco, del tubo y aguja por donde tenía que pasar la sangre, utilizando unos 100 cc. Se recogió directamente la sangre en el frasco cuya mezcla con la solución sódica se facilitó con la agitación de una varilla esterilizada. Notaron que esta agitación produce una espuma persistente cuya penetración en las venas del receptor es fácil evitar porque ocupa la superficie del líquido y porque su paso al tubo (de goma) se señala primero en el tubo de vidrio evacuador. La extracción no tuvo acción alguna sobre la donante que diez minutos después prestaba sus cuidados a la receptora.

Así, Turenne concluye que “en el campo ginecotológico, en el que con tanta frecuencia se presentan casos de hemorragias inquietantes, hay ventajas en difundir la práctica de la transfusión de sangre”. Utiliza en su relato la palabra “hemoterapia” y establece como propósito iniciar en su Servicio una experimentación sobre las transfusiones de sangre.

Entre 1916 y 1918 en el servicio de Protección Maternal se realizaron 22 transfusiones, 18 en pacientes ginecobstétricas graves (aborto, placenta previa, hemorragias del alumbramiento) y 4 a niños con púrpura y una intensa azoemia. Finalmente no sobrevivieron a la “isohematoterapia” registrándose en sus historias clínicas las reacciones transfusionales que desarrollaron (36).

En 1919 un procedimiento transfusional en el que tampoco se realizaron pruebas de compatibilidad, tuvo lugar en el interior del país en la ciudad de Melo donde se transfundió una niña de 9 años con una anemia severa. El donante fue el médico tratante Mauricio Langón quien le solicitó a otro médico de apellido Gayol que realizara la extracción de la sangre de la vena del codo en una jeringa Luer de 100 ml con una solución de citrato de soda al 5%. Se extrajeron 50 cc que fueron inyectados luego en la vena de la niña. Al día siguiente, queriendo asegurar el éxito de la primera transfusión se realizó una segunda de 70 ml de

sangre del cura párroco de la ciudad logrando la mejoría de la paciente (36).

En una comunicación realizada a la Sociedad de Medicina de Montevideo el 15 de mayo de 1918, Horacio Félix Platero, médico del Servicio de Protección Maternal y del Hospital Maciel describe la transfusión directa practicada en Montevideo, cinco años antes por los cirujanos Albo e Iraola. “Después de una larga preparación de ambos enfermos que eran hermanos, pudo llevarse a cabo la anastomosis arterio-venosa a costa de un sin número de maniobras molestas pero al fin eficaces y cuando el éxito parecía sonreír a los ejecutores de la intervención y habiendo pasado según se supone alrededor de 100 cc de sangre, un coágulo se posesionó de la luz de la cánula e impidió en absoluto el pasaje de nuevas cantidades de sangre” (37).

En su publicación, Platero establece que se deben dar dos condiciones indispensables para llevar a cabo una transfusión exitosa; por un lado que la sangre del donante no se coagule y por otro la asepsia absoluta del procedimiento. Refiriéndose luego a la anticoagulación dice “Quizá no esté la solución del problema de la coagulación de la sangre en las sustancias químicas ni en la parafina, pero es el caso que aún no tenemos un medio más eficaz que nos prevenga de esa eventualidad sin hacer correr riesgos al enfermo; quizás no esté lejano el día en que podamos emplear alguna sustancia biológica o encontremos alguna diastasa que actúe en la misma forma que lo hace la superficie peritoneal o pleural o pericárdica, deteniendo durante horas o días el proceso de la coagulación de la sangre, tal vez favorecido por la ausencia del aire”. A continuación, describe una intervención quirúrgica realizada por cirujano Koecher por una ruptura de hígado con un hemoperitoneo de más de un litro. Valiéndose de un método, por cierto bastante primitivo, la sangre del derrame era quitada con un pequeño recipiente de metal y tratada inmediatamente con citrato de soda. Una vez obtenida cierta cantidad se vertía en un embudo de vidrio que adaptaba a un tubo de goma y en la extremidad, una aguja se conectaba al interior de la vena de la enferma. Como vemos se trató de una transfusión autóloga donde la paciente recibió más de un litro de su sangre derramada en el peritoneo, curó perfectamente de su lesión traumática y

nunca tuvo consecuencias de la transfusión realizada. Este constituye el primer relato en nuestro país de una transfusión autóloga por recuperación de sangre del campo quirúrgico como se conoce actualmente y que se realiza por máquinas especiales que lavan y filtran la sangre antes de su infusión.

Platero también relata que en el mes de agosto de 1917, presenciando una transfusión que realizaba su estimado colega y amigo Colistro, en una enferma atacada de nefritis uremígena con más de tres gramos de urea en el suero sanguíneo, se le ocurrió que era completamente inútil, para llevar a la práctica la citada transfusión por el método de Agote, hacer la descubierta previa de la vena en el donante y menos aún en el paciente, puesto que no se hacía jamás esa operación para realizar estudios de laboratorio. Horacio Platero entonces sustituye los aparatos transfusores conocidos por jeringas de vidrio de tipo Luer pero de 100 cc de capacidad, de uso corriente en Veterinaria. El procedimiento ideado por él, permite además, servirse de venas de cualquier calibre, usar varias venas en la misma persona, todo a costa de una simple punción y a menudo casi indolora. Por otra parte, el volumen de sangre obtenido no tiene tiempo para perder la temperatura del cuerpo de donde ha salido y puede ser inyectado inmediatamente sin calentarlo previamente. Para hacer la transfusión se requiere lo siguiente: varias agujas de platino, dos jeringas de vidrio de 100cc y una solución de citrato de soda al 10% esterilizada. Se pincha la vena mediana cefálica o mediana basílica del donante, se adapta la jeringa número 1 en la que se han depositado 5cc de solución citratada y en menos de un minuto, en sujetos robustos y de venas gruesas, se llena completamente la jeringa. Damos algunos movimientos al émbolo para obtener la completa homogeneización del contenido de la jeringa y la sangre se ha transformado en una solución incoagulable y pronta para ser inyectada por un pinchazo en la vena del enfermo. Con la jeringa 2 podemos hacer exactamente lo mismo mientras un ayudante inyecta el contenido de la jeringa 1. Alternando de esta manera el uso de ambas jeringas conseguimos extraer e inyectar cantidades elevadas, que nos permitirán hacer el tratamiento del volumen de sangre que queramos en el mínimo tiempo de 10 o 15 minutos.

Esta técnica sencilla soluciona dos problemas de las anteriores transfusiones directas. Por un lado, se puede establecer exactamente el volumen de sangre extraído e infundido y por otro lado, no menos importante, no es necesario realizar la descubierta venosa del donante y del receptor. Sin embargo, dice Platero, si la parte mecánica del asunto parece finalmente resuelta, los estudios realizados sobre la acción de dos sangres de la misma especie puestas en presencia y los fenómenos biológicos a que puede dar lugar este contacto, nos obliga a usar ciertas precauciones antes de realizar cualquier transfusión de sangre y a continuación describe las pruebas de compatibilidad entre la sangre del donante y el receptor como las conocemos hoy en día. Detalla la técnica de la prueba cruzada mayor (suero del receptor y eritrocitos del donante) y la menor (suero del donante y eritrocitos del receptor) realizada en lámina. Ambas preparaciones (mayor y menor) se colocan en una estufa a 37 grados durante una hora y se observan cada 20 o 30 minutos. En general, la aglutinación y la hemólisis se producen en la primera media hora, pero como se han observado algunas reacciones tardías, conviene esperar una hora o más para tener la certeza de la compatibilidad intersanguínea (Técnica usada en el Servicio de Turenne desde mediados de 1917) (37). Además, prácticos como en todas las manifestaciones de la actividad humana, se ha resuelto el problema de los donantes, comenta Platero, a los que podríamos llamar “mercenarios” es decir, el que brinda un servicio por estipendio o remuneración. En la parte de terapéutica o indicaciones de la transfusión de sangre dice: “la isohematoterapia tiene su indicación principal en los enfermos atacados de anemia aguda o crónica. En las grandes hemorragias agudas debe preocupar principalmente al médico que está frente a un enfermo en esas condiciones, levantar el estado general inmediatamente y llevar la presión sanguínea tan cerca de lo normal como le sea posible o suponga necesario para la sobrevivencia del paciente. Para ello, dispone de tónicos numerosos y del suero fisiológico que puede inyectar en variable abundancia. Pero bien conocida es la poca eficacia del suero fisiológico en las intensas anemias agudas por hemorragias enormes, y los enfermos se mueren entonces a pesar de todos los esfuerzos, porque

no llegan a readquirir su perdida tensión sanguínea o por anoxemia o por ambas causas a la vez”. Finalmente, concluye en mayo de 1918, que “la transfusión de sangre como procedimiento práctico, no ha alcanzado todavía el máximo de perfeccionamiento que permita hacer de ella una intervención rápida, exenta de peligros para el paciente y sobre todo, que sea capaz de ser llevada a cabo por cualquier médico práctico que quiera obtener con el procedimiento los beneficios inmediatos y lejanos que derivan de la llegada al torrente sanguíneo de esos billones de glóbulos rojos que necesitan los enfermos para reanimarse y activar la producción de nuevos elementos, excitando los órganos hematopoyéticos”.

En la primera transfusión de sangre citrada realizada en 1916 en el servicio de Augusto Turenne hubieron dos testigos, José Parietti y Julio César Estol, quienes serían luego protagonistas en la historia de las transfusiones sanguíneas.

En 1919, Parietti inventó un nuevo método de transfusión de la sangre (38). Este equipo (figura 2.2) consistía en un tubo grueso de caucho donde en cada extremo se conectaban dos jeringas de vidrio a las que se les había retirado el émbolo previamente. Todo este conductor se llena de una solución de suero fisiológico citratado al 4 por mil y se pone a hervir en una pescadera que tiene la misma solución. Una vez hervido se saca el conductor formado por el tubo de goma, las dos jeringas y las agujas correspondientes con las precauciones indispensables para que quede lleno de suero fisiológico citratado para que no entre en el sistema ninguna burbuja de aire. Luego se hace pasar este conductor entre los dos cilindros del “aparato” laminador también diseñado por él. Este aparato tiene dos cilindros o rodillos que pueden acercarse o alejarse y que por medio de una manivela se ponen en funcionamiento. Se necesita además una botella como las empleadas para inyectar suero fisiológico, pero de una capacidad de 200 a 300 cc. Este frasco de vidrio tendrá en su interior un suero fisiológico citratado al 2% y se conectará mediante un tubo de caucho con una aguja larga de punción lumbar pero de pequeño calibre. Se pincha con ella el tubo grueso de caucho conector en un punto próximo a la jeringa que lleva la aguja con la que se va a puncionar al donante intro-

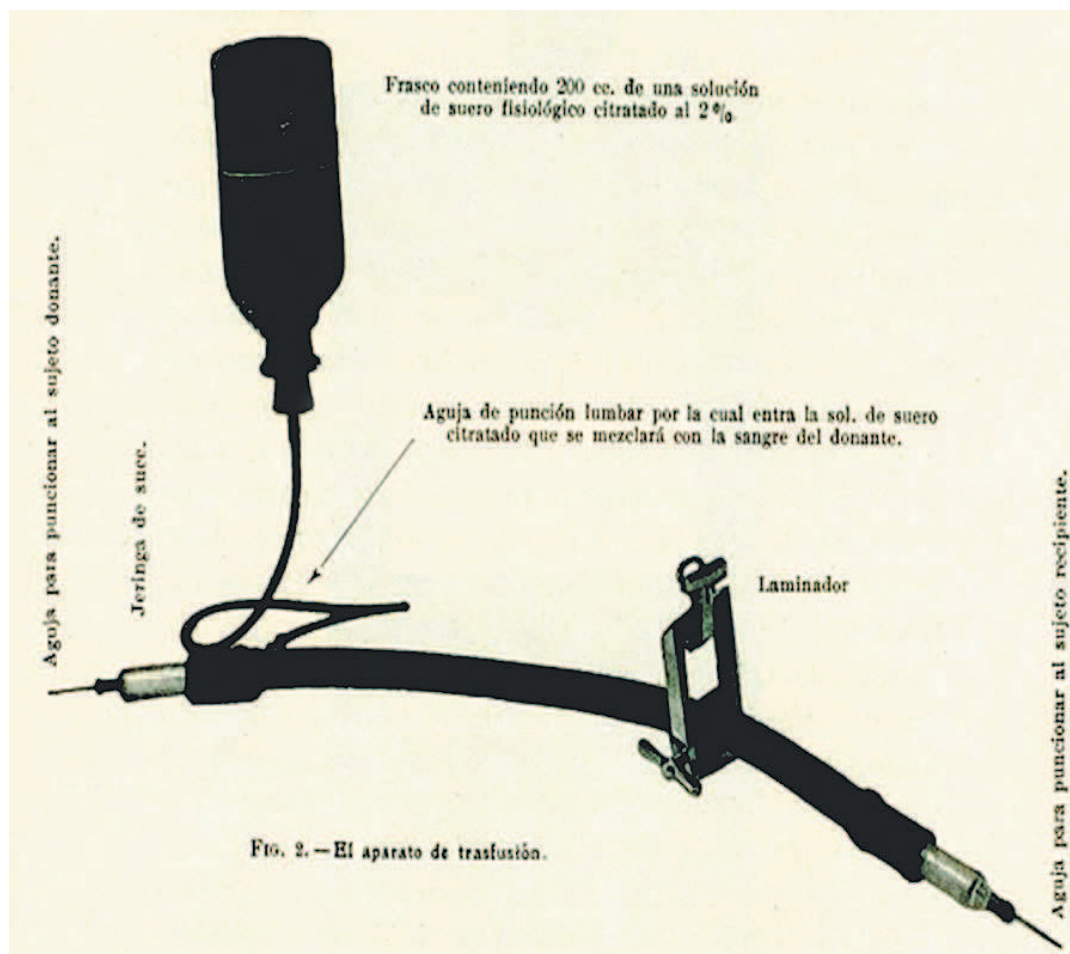


FIG. 2. — El aparato de transfusión.

Figura 2.2 - Aparato de transfusión de Parietti para método directo vena a vena con laminador. Fotografía tomada de Anales de la Facultad de Medicina 1919;4:413. Biblioteca de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

duciendo la aguja hacia el pico de la jeringa con el objeto que se mezcle chorro a chorro la sangre del donante con la solución citratada al 2%. Estando en comunicación por intermedio de un conductor cerrado las venas de los dos sujetos (donante-receptor) se establece una activa y casi ininterrumpida corriente de sangre de una vena a la otra, gracias al aparatito laminador. Se ajustan los cilindros del aparatito sobre el tubo de caucho grueso en el extremo más próximo a la jeringa del donante. Entonces, por intermedio de la manivela se ponen en marcha los cilindros desplazándose a lo largo del tubo en dirección al paciente produciendo por un lado, una enérgica succión e impeliendo también enérgicamente hacia el sujeto recipiente la sangre que está por delante del aparatito. Una vez llegado al extremo del tubo de caucho donde conecta la jeringa y aguja del paciente se pinza dicho tubo, se

desajustan los cilindros (se separan) y se llevan al punto inicial de la excursión del lado del donante. Se repite así el procedimiento tantas veces como se desee hasta haber hecho la transfusión de una cantidad dada de sangre.

Dicha cantidad puede medirse fácilmente, conociendo la capacidad del equipo conductor y multiplicando esta capacidad por el número de excursiones hechas con el laminador. Las ventajas de esta técnica eran que se podía realizar por un solo operador, se utilizaba un aparato fácil y sencillo tanto de construcción como de manejo, sólo se necesitaba una doble punción venosa, era un circuito cerrado donde no se exponía la sangre al medio exterior, la sangre permanecía afuera de los vasos apenas unos segundos, la solución citratada impedía la coagulación y a pesar de ser un conductor cerrado se podía calcular con toda precisión la cantidad de sangre inyectada. Sin embargo,

seguía siendo un método de transfusión directa, brazo a brazo, para lo cual era necesario que el donante estuviera al lado del paciente.

En abril de 1919, Parietti relata (38) que dado lo reciente de este método, solo ha tenido oportunidad de usarlo en varias sangrías y una transfusión. Las sangrías se realizaron con el fin de probar el equipo y ajustar sus componentes. Se extrajeron en espacio de 3 a 4 minutos cantidades de sangre que oscilaron entre 200 y 350 cc y dicha sangre se mantuvo perfectamente líquida, sin un coágulo, hasta dos horas. La transfusión la realizó en la sala Pedro Visca del Hospital Maciel, en presencia de los doctores Prat, Barcia, Haedo y Bevilacqua y permitió inyectar al receptor, en espacio de 3 a 4 minutos, 150 a 180 cc de sangre sin ningún accidente. La cantidad de sangre inyectada no fue mayor porque no se trataba de un sujeto que hubiera tenido hemorragias, sino de un enfermo en el que se practicaba la transfusión por motivos de otro orden terapéutico pero, no dice cuales ni hace referencia a si se determinaron los grupos sanguíneos y se realizaron las pruebas de compatibilidad entre donante y receptor.

Luego, Julio César Estol mandó fabricar a Europa, a la casa Doyen de Paris, jeringas de 200 a 300 ml que eran de volumen suficiente para la mayoría de las transfusiones. Se aspiraba en ellas primero una solución de citrato de sodio y con agujas de platino se obtenía la sangre que iba a ser transfundida (figura 2.3). Pero, las jeringas vinieron de Europa con el pico central lo cual dificultaba el procedimiento. El ángulo de posición que debía mantenerse durante la infusión al paciente era muy grande y al menor movimiento hacía salir la aguja de la vena, perforándola. Para salvar esta dificultad se adaptó al pico de la jeringa un pedazo de caño de 10 cm de largo lo que permitía puncionar la vena con toda comodidad e inyectar la sangre o extraerla sin problemas. Pero, como el ideal era reducir al mínimo los intermediarios de la jeringa se solicitó a Europa, a través de la Casas Stapff y Ferrando de Montevideo, la fabricación de jeringas con pico excéntrico que resultaron mucho más prácticas. Entre 1923 y 1927 se realizaron con ellas más de 400 transfusiones (39).

En 1924, Estol se graduó como doctor en Medicina y Cirugía y en 1927 publica un libro "La Transfusión de Sangre" prologado



Figura 2.3 - Jeringa de vidrio de 200 cc con pico central para realizar transfusiones directas donante-receptor junto con una ampolla de solución de citrato de sodio al 4% utilizada como anticoagulante pertenecientes al Dr. Ricardo Magri.

por Augusto Turenne (39) donde describe 202 pacientes con resúmenes de sus historias clínicas y cerca de 500 actos transfusionales.

Una publicación previa, titulada "Rol del plasma en los accidentes producidos por la transfusión de sangre" (40), fue presentada en la Sociedad de Ginecotología del Uruguay en la sesión de setiembre de 1926. En esta presentación, publicada en la Revista Médica del Uruguay, establece claramente que "en el año 1917, cuando iniciamos nuestras primeras transfusiones en la Casa de la Maternidad, los grupos sanguíneos (Jansky y Moss) no habían sido difundidos en la forma que los son actualmente y sólo disponíamos como garantía relativa a toda operación de esta índole la llamada prueba cruzada que consiste en poner en presencia suspensión de hemacias del donante y suero del receptor (prueba cruzada mayor) por una parte, y por otra, suspensión de hematíes del receptor con suero del donante (prueba cruzada menor), una vez efectuadas las mezclas se observan éstas al microscopio durante una hora y si no se constata aglutinación se interpreta el caso como favorable". Julio César Estol fue Profesor Agregado de Bacteriología de la Facultad

de Medicina, Jefe del Laboratorio del Hospital Pereira Rossell y del Laboratorio del Hospital Británico.

Recién desde agosto de 1924 se utilizan en Uruguay los sueros tipos números II y III de Moss para clasificar a los enfermos de acuerdo a la Ley de grupos sanguíneos.

Jansky en 1907 (41) y Moss en 1910 (42) adjudican números romanos a los antígenos del sistema ABO descubierto por Landsteiner a principios del siglo XX. Jansky asignaba el número I al grupo 0, II al B, III al A y IV al AB y por su parte Moss lo hacía a la inversa número I al AB, II al A, III al B y IV al 0. La clasificación de Moss era la recomendada por la American Medical Association y en ella se establecía que el grupo I (AB) era el receptor universal y el grupo IV (0) era el donante universal. A partir de 1928, dada la confusión que se presentaba entre ambas clasificaciones la Liga de las Naciones establece la nomenclatura alfabética (A, B, AB y 0) que se mantiene hasta el momento actual (10).

En el libro publicado por la Central de Sangre y Plasma, de la Facultad de Medicina, en 1947 Héctor Mazzella escribe el capítulo de grupos sanguíneos ABO y establece que en el año 1945 se determinó la frecuencia de los antígenos de este sistema en 3893 donantes de Montevideo (0= 44,85%, A= 41,38%, B= 9,04% y AB= 3,73%) (43). Un año después, en 1946, Dobson e Ikin publican una frecuencia similar en Inglaterra (0= 46,626, A= 41,780, B= 8,555 y AB= 3,039) (44).

El método de los sueros hemoclasificadores II y III de Moss utilizados por Julio César Estol a partir de 1924 lo llenó de entusiasmo por su sencillez y rapidez, por lo cual, hicieron más de cien transfusiones sin ningún accidente. Así, creyeron que el problema de las transfusiones estaría resuelto y lo difundieron. Sin embargo, el 3 de setiembre de 1925 con la aparición de un caso clínico de una reacción transfusional apareció la primera señal de alarma. Era una enferma con diagnóstico de fibroma uterino que presentaba una anemia de 3.000.000 de eritrocitos por mm^3 debido a las metrorragias. Se resuelve hacer una transfusión para elevar el monto de sus glóbulos rojos antes de operarla. La paciente era del tipo I de Moss o sea receptor universal y el donante del grupo II. La transfusión se hizo muy lentamente y se suspendió a los 80 cc dado la

aparición de síntomas como malestar, vértigo, escalofríos, fuerte dolor en el raquis, vómitos y abundantes evacuaciones diarreicas. El cuadro calma espontáneamente. A los 14 días la paciente presentaba 4.000.000 de eritrocitos por mm^3 y días después se opera. Postoperatorio bueno y regresa curada a su domicilio.

En otro caso, una paciente con anemia perniciosa que necesitaba transfusión “procedimos a clasificar a la enferma y a los donantes (5 hermanas). Todas resultaron tipo II de Moss. De acuerdo a la Ley de grupos transfusión perfecta.” Al llegar a los 10 cc inyectados la enferma presentó fenómenos serios de intolerancia :opresión torácica, dolores en el raquis y región lumbar, congestión cérvico-facial intensa y angustia. La sintomatología desaparece espontáneamente. Ocho días después se realizó el grupo sanguíneo de la paciente y los donantes ratificando el primer hallazgo, todos del grupo II. Se decidió utilizar otra de las donantes, se realizó la transfusión y no hubo absolutamente ninguna molestia. Posteriormente y usando la misma donante, se le practicaron a la enferma 13 transfusiones entre 80 y 120 cc todas perfectamente toleradas y con un resultado excelente para la paciente. “Este caso, agregado a otros observados, nos llevó a pensar que la ley de grupos si bien resultaba de una utilidad innegable, no resolvía completamente el problema. La idea de subgrupos fue la que primero se nos ocurrió la cual había sido corroborada por los autores americanos Guthrie y Huck (45). Posteriormente, pensamos en la posibilidad de una marcada toxicidad al plasma de ciertos sujetos y esta idea nos propusimos desarrollarla. En cuanto tuviésemos un accidente de intolerancia, a pesar de la observancia rigurosa de la ley de Moss, haríamos al mismo enfermo y con plasma del mismo donante, una inyección endovenosa para ver si era posible realizar el accidente típico de la sangre total”.

El 10 de setiembre de 1926 se extrajeron 60 cc citratada que fue centrifugada para separar el plasma de los glóbulos. Se inyectó el plasma a una paciente que había experimentado un cuadro de intolerancia con la transfusión de sangre total del mismo donante. Pasado los primeros 4cc la enferma anunció síntomas similares a los que había sufrido con la sangre total con lo cual, Julio César Estol demostró por primera vez que este tipo de reacciones

transfusionales sin la presencia de hemoglobina en la orina se debían al plasma y no a los eritrocitos. Concluye que las reacciones se deben al plasma pues con la prolongada centrifugación estaba seguro de haber eliminado los leucocitos a los cuales se le podía imputar el accidente de acuerdo con el reciente trabajo americano de Doan de mayo de 1926 (46).

Julio César Estol debe ser considerado el primer médico hemoterapeuta del Uruguay por su rigor científico y académico y en reconocimiento de ello el Servicio Nacional de Sangre lleva su nombre a partir de 1991 (Ley 16.214 de 1/10/1991) (figura 2.4).

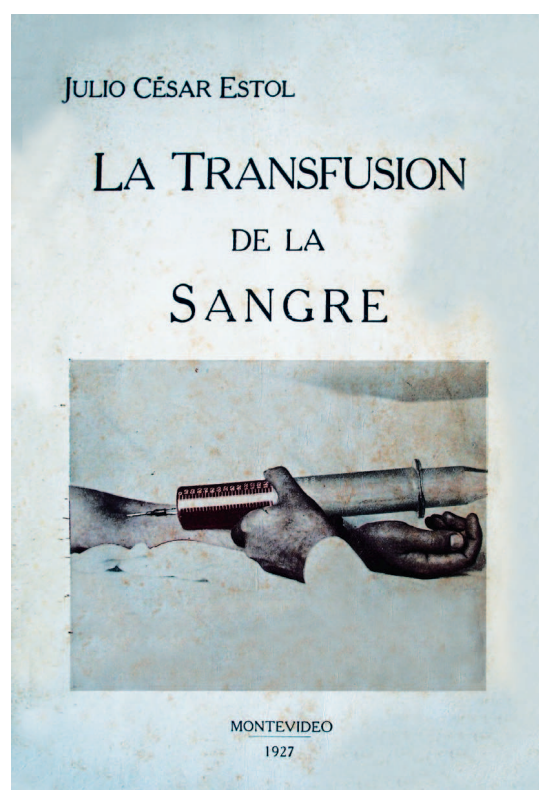


Figura 2.4 - Libro publicado por Julio César Estol en 1927 y placa colocada en el Servicio Nacional de Sangre cuando se le designa con el nombre del Dr. Julio César Estol.

A pesar de que la sangre era anticoagulada con citrato, ésta era utilizada para transfusión dentro de las primeras horas de la donación y a veces en forma inmediata, sin existir un almacenamiento prolongado lo cual se alcanzó con la creación de los primeros bancos de sangre después del fallecimiento de Julio César Estol en 1935.

En una publicación de mayo de 1985 “Cuarenta años al frente de la Hemoterapia nacional” (47), Ricardo Magri establece que efectuó su primera transfusión de sangre el 19 de setiembre de 1939 siendo practicante externo del hospital Pereira Rossell y actuando en la sala dos de Ginecología cuyo jefe era Manuel Rodríguez López.

La receptora fue una mujer joven de 23 años que ingresó por un cuadro hemorrágico por rotura de un embarazo tubario. Magri le realizó dos transfusiones de 250cc cada una mediante una jeringa con sangre citratada y una tubuladura de goma que unía el pico de la jeringa a la aguja. Pocos días después la paciente fue dada de alta sin ninguna complicación.

Por esa época, los Bancos de Sangre no existían y los donantes eran escasos y dispersos. En las vitrinas o armarios de los hospitales solían guardarse cajas o bandejas con todo lo necesario para una transfusión: una o dos jeringas grandes de vidrio de 150 a 300 cc con un pico en la parte inferior, las agujas que permitían primero la extracción y luego la infusión de la sangre al paciente y un frasco color caramelo que llevaba la solución de citrato de sodio como anticoagulante. Cuando se indicaba una transfusión, la primera y más relevante medida era conseguir el donante adecuado. Era común que en las salas hospitalarias existieran enfermeros, monjas, practicantes e incluso médicos que se convertían en donantes altruistas.

En 1942, Magri ocupa el cargo de practicante interno en el servicio de Asistencia Externa del MSP donde realizó transfusiones de urgencia, unas quince en total. Para ello, había una lista de dadores oficiales, confeccionada por el Ministerio con análisis al día y sangre universal (grupo 0 o IV de Moss). Se les iba a buscar en ambulancia para dirigirse a la casa del enfermo. Este Cuerpo de Dadores que organizaba el MSP contaba con una estructura bastante aceptable para la época. Cada tres meses debían someterse a un exa-

men general, otro serológico para la sífilis y hemograma, además de obtener el carné de salud. Con la constancia de la donación el donante podía cobrar. Se le pagaba a razón de 100 pesos el litro de sangre. La donación familiar prácticamente no existía, ni aún en los hospitales y se trabajaba casi únicamente con sangre universal.

Ese mismo año, Magri pasó de practicante interno de la Asistencia Pública a la Colonia Saint Bois que estaba asignada a la asistencia de pacientes tuberculosos donde se le asignó la responsabilidad de las transfusiones. Por esa época ya el MSP había montado servicios de transfusiones en varios hospitales a través de Alberto Scaltritti que era el Director del Laboratorio Central de Serología del Ministerio de Salud Pública.

BIBLIOGRAFÍA

1. Estrategias clínicas para evitar y controlar la hemorragia y la anemia sin transfusiones de sangre en pacientes quirúrgicos. Servicios d Información sobre Hospitales, de los testigos de Jehová. Watch Toser Bible and Tract Society of Pennsylvania-USA, 2003.
2. Ott DA, Cooley DA. Cardiovascular surgery in Jehovah's witnesses. Report of 542 operations without blood transfusion. *JAMA* 1977;238:1256-1258.
3. Perseghin P, Vigano M, Rocco G, Della Pona C, Buscemi A, Rizzi A. Effectiveness of leucocyte filters in reducing tumor cell contamination after intraoperative blood salvage in lung cancer patients. *Vox Sang* 1997;72:221-224.
4. Hansen E, Knuechel R, Altmeyen J, Taeger K. Blood irradiation for intraoperative autotransfusion in cancer surgery: demonstration of efficient elimination of contaminating tumor cells. *Transfusion* 1999;39:608-615.
5. Yamada T, Ikeda A, Okamoto Y, Yu Okamoto Y, Okamoto K, Kanda T, Vekia M. Intraoperative blood salvage in abdominal simple total hysterectomy for uterine myoma. *Int J Gynecol Obstet* 1997;59:233-236.
6. Medicina Transfusional en el perioperatorio: pautas clínicas de indicaciones de hemocomponentes y hemoderivados. *Biomedicina* 2007;3:209-226.
7. Bauer AW. From blood transfusion to hemotherapy- The anniversary of the German Society for Transfusion Medicine and Immunology (DGTI) from a Medicinal-Historical and Bioethical Perspective. *Transfus Med Hemother* 2004;31:2-6.
8. Lindegom GA. The history of a blood transfusion to a pope. *J Hist Med* 1954;9:455-462.
9. Broer R: William Harvey (1578-1657); in Eckart WU, Gradmann C (Hrsg): *Arztelexikon. Von der Antike bis zum 20. Jahrhundert*. Munchen, Beck, 1995: 171-174.
10. Keynes G. Historia de la transfusión de sangre. Aguilar S.A. Ediciones Madrid, 1953.
11. Gilder SSB. Francesco Folli and blood transfusion. *Canad Med Assoc J* 1954;71:172-73.
12. Starr D. Historia de la Sangre. Leyendas, Ciencia y Negocio. Barcelona, Ediciones BSA, 2000.
13. Giangrande PLF. The history of blood transfusion. *Br J Hematol* 2000;110:758-767.
14. Schmidt PJ. Edinburgh and early transfusion in the New World. *Vox Sang* 2004;87(suppl 2):S81-S83.
15. Schmidt PJ, Leacock AG. Forgotten transfusion history: John Leacock of Barbados. *Br Med J* 2002;325:1485-1487.
16. Blair JSG. Medicine in Edinburgh in the 19th century. *Vox Sang* 2004;87(suppl 2):S79-S80.
17. Lane S. Hemorrhagic diathesis: successful transfusion of blood. *Lancet* 1840;1:185-188.
18. Thomas GT. The intravenous injection of milk as a substitute for the transfusion of blood. D. Appleton Ed. New York, 1878.
19. Schmidt PJ. The first photography of blood transfusion. *Transfusion* 2001;41:968-969.
20. Lefrere JJ, Danic B. Pictorial representation of transfusion over the years. *Transfusion* 2009;49:1007-1017.
21. Schmidt PJ. The surgeon's work, transfusion 100 years ago. *Transfusion Today* 2008; 76. www.isbt-web.org. 25/11/2009.
22. Hammarsten O. Untersuchungen ueber die faserstoffgerinnung. Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum. Uppsala, Series III, 1875;10:1-130.
23. Arthus M, Pagés C. Nouvelle théorie clinique de la coagulation du sang. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique* Paris 1890 ;2 (series 5) :739-746.
24. Wright AE. A new method of blood transfusion. *Br Med J* 1891;ii:1203.
25. Griesbach H. Beitrage zur kenntniss des blutes. *Archiv fur die Gesamte Physiologie* 1891;15:473-550.
26. Pekelharing CA. Ueber die gerinnung des blutes. *Deutsches Medizinisches Wochenschrift* 1892;18:1133-1136.
27. Arthus MM. De le action anticoagulante du citrate de soude. *Comptes rendus hebdomadaires de la Société de Biologie*. Paris 1902 ;54 :526-529.
28. Boycott AE, Douglas CG. Observations by the carbon monoxide method on a chlorotic anaemia in a rabbit and on transfusion. *J Path Bact* 1909;13:414-428.
29. Hustin A. Note sur une nouvelle méthode de transfusion. *Annales et Bulletin des Séances: Société*

- des Sciences Médicales et Naturelles de Bruxelles
1914;72 année:104-111.
30. Hustin A. Renouveau de la transfusion sanguine au XX siecle. Livre Jubilaire Offert au Dr Albert Hustin. Imprimerie Des Sciences, Bruxelles.
 31. Agote L. Nuevo procedimiento para la transfusión de sangre. *Anales del Instituto Modelo de Clínica Médica* 1915;1:24-31.
 32. Lewisohn R. A new and greatly simplified method of blood transfusión. A preliminary report. *Medical Record (New York)* 1915;87:141-142.
 33. Duprat PE. Técnica de la transfusión de sangre. *Rev Med Urug* 1914;17:278-281.
 34. Duprat PE. Indicaciones de la transfusión de sangre. *Rev Med Urug* 1914;17:364-369.
 35. Turenne A. Un caso de transfusión de sangre. *Rev Med Urug de la Sociedad de Medicina de Montevideo* 1917;20:207-213.
 36. Rizzi M. Historia de la transfusión de la sangre. Sus comienzos en Uruguay. *Rev Med Urug* 1999;15:165-182.
 37. Platero HF. Sobre una fácil técnica para la transfusión de la sangre. *Rev Med Urug de la Sociedad de Medicina de Montevideo* 1918;21:268-281.
 38. Parietti JD. Nuevo método para la transfusión de sangre. *An Fac Med* 1919;4:413.
 39. Estol JC. La transfusión de sangre. Montevideo. Palacio del Libro 1927: 256.
 40. Estol JC. Rol del plasma en los accidentes producidos por la transfusión de sangre. *Rev Med del Urug* Tomo XXIX número II año XXIX Fasc 338, 1926.
 41. Jansky J. Hematologické studie u psychotiken (Etudes hematologiques dans les maladies mentales). *Sborn Klin Praha* 1907;8:85 Resumen en francés en *J Immunol* 1931;20:136.
 42. Moss WL. Studies on isoagglutinins and isohemolysins. *Bull John Hopk Hosp* 1910;21:63.
 43. Curso de Hemoterapia. Facultad de Medicina. Montevideo. Imprenta Rosgal Marzo de 1947.
 44. Dobson AM, Ikin EW. The ABO blood group in the United Kingdom. Frequencies based in very large samples. *J Path Bact* 1946;58:221.
 45. Guthrie CG, Huck JG. On the existence of more than four isoagglutinin groups in human blood. *Bull John Hopk Hosp* 1923;34:37.
 46. Doan CA. The recognition of a biologic differentiation in the white blood cells with especial reference to blood transfusion. *JAMA* 1926;86:1593-1597.
 47. Magri R. 40 años al frente de la hemoterapia nacional. Librería Selecta Editorial. Montevideo-Uruguay, mayo de 1985.

Historia de los Bancos de Sangre y Plasma

El primer servicio de donantes de sangre fue establecido por Percy Oliver de la Cruz Roja de Londres en 1921. No era médico pero había trabajado con los refugiados de la primera guerra mundial. En octubre de 1921, el hospital King's College realiza un llamado a la Cruz Roja para obtener voluntarios para donar sangre. Se establece un panel de donantes que pueden ser llamados cuando se necesite sangre fresca. Los donantes generalmente eran requeridos por la policía dado que, en aquel momento, no existían comúnmente teléfonos en las casas particulares. A cada voluntario se le realizaba un examen físico y una prueba serológica para establecer el grupo sanguíneo y excluir la sífilis (1). El servicio de Oliver fue llamado solamente 13 veces en 1922 pero, en 1925, la asistencia con donantes se incrementó a 428 veces. En el primer congreso de la International Society of Blood Transfusion (ISBT), que se desarrolló en Roma en 1935, se rindió tributo al trabajo de Percy Oliver en organizar el primer servicio de donantes disponible a cualquier hora y con la posibilidad de enviar al donante a cualquier centro asistencial donde se solicitara. Sin embargo, tenía el inconveniente obvio de que el donante era llamado justo cuando se requería la sangre y seguíamos sin tener un almacenamiento prolongado que solucionara este problema.

Los primeros intentos para conservar sangre para transfusión se realizaron en Rusia a partir de 1930. Previamente, en 1927 Shamov, del Instituto de Transfusiones de Sangre de Jarkov en Ucrania, luego de realizar una serie de experimentos en perros, sugiere que la sangre cadavérica puede ser una fuente segura y constante para ser almacenada (2). Descubrió que el grado de contaminación bacteriana de la sangre cadavérica dependía del tiempo y lu-

gar de extracción. Las bacterias se difundían a partir del aparato digestivo por lo cual la sangre del abdomen se infectaba más rápidamente que la de los músculos, articulaciones, cerebro o médula. En estos puntos alejados del abdomen la sangre permanecía estéril durante una semana. Luego exsangüinó a perros y los repuso con sangre cadavérica logrando la recuperación vital de los animales y demostrando que los eritrocitos de cadáver mantienen la función de transporte de oxígeno. Serge Yudin, asistió a la presentación que hizo Shamov de sus descubrimientos en el Congreso Quirúrgico Ucraniano en setiembre de 1928. Comenzó a utilizar en el Instituto Sklifosovsky (Sklif) de Moscú, un hospital especializado en urgencias, sangre de cadáver para transfusión llegando a crear un pequeño depósito de sangre citratada conservada a 4 grados. Este centro asistencial lleva el nombre Nikolai Vasilyevich Sklifosovsky pionero ruso de la cirugía de urgencia y de guerra. Yudin continuó la obra de su predecesor el Dr. Alexander Bogdanov con igual dedicación. Bogdanov que había viajado a Londres y había conocido la organización de Percy Oliver intentó organizar una infraestructura nacional de transfusiones en su país. En 1926 fundó en Moscú el Instituto Central de Hematología primero en el mundo dedicado a las investigaciones sobre las transfusiones sanguíneas. Basado en la filosofía comunista creó un "colectivismo fisiológico" formando un círculo con sus alumnos en el que intercambiaba transfusiones de sangre mutuamente. En abril de 1928 él se realizó la duodécima transfusión de sangre de un alumno del mismo grupo ABO pero, sufrió una reacción hemolítica con una insuficiencia renal durante 15 días y después irónicamente falleció.

En 1932, ya se habían realizado los primeros 100 casos exitosos de transfusiones de sangre cadavérica en Sklif y en 1937 se publican en la revista *Lancet* las primeras 1000 transfusiones (3). Hacia 1938, se habían inyectado sangre de esta procedencia a 2.500 personas de las cuales 7 murieron y 125 experimentaron reacciones leves como fiebre y escalofríos (1). Esta técnica, se utilizaba en personas que habían fallecido de muerte súbita o inesperada como los accidentes de tránsito, ataques cardíacos, homicidios, suicidios o derrames cerebrales pero libre de neoplasias y de enfermedades infecciosas. Se les realizaba una adecuada autopsia, con una colecta dentro de las seis primeras horas de fallecido y con cultivos bacterianos negativos. Fue presentada en el primer Congreso de la ISBT de Roma en 1935. Yudin establece que la fibrinolisis postmortem obvia la necesidad de anticoagulación en los pacientes de muerte súbita y la sangre puede ser conservada a 4 grados por más de tres semanas (4). A pesar de que este programa ruso fue ampliamente conocido no fue adoptado por otros países. Sólo conocemos dos reportes en USA. En uno, de sangre citratada obtenida de 35 cadáveres entre 1936 y 1938 fue transfundida en un pequeño hospital privado de Chicago pero este programa no fue publicado hasta 1960 (5).

En el otro, Jack Kevorkian del Hospital General Pontiac de Michigan transfundió con sangre cadavérica a siete pacientes de los cuales cinco sobrevivieron y dos fallecieron. En ningún caso se presentaron reacciones debidas a la sangre inyectada y los dos pacientes que fallecieron fueron como consecuencia de sus enfermedades.

El Instituto Sklifosovsky de Moscú siguió realizando esta técnica hasta finales de la década de 1960, inclusive en el artículo de Transfusion (6) se publica una fotografía tomada en 1969. En este instituto se almacenó sangre citratada de cadáveres pero también de donantes y placenta. En los programas soviéticos de donación de sangre de las décadas de 1970 y 1980 ya no se menciona la obtención de sangre cadavérica.

A pesar de que el citrato fue hallado en 1914 como un anticoagulante seguro, desde la primera Guerra Mundial hasta la Guerra Civil Española, la sangre citratada de donantes vivos se usaba principalmente en transfu-

siones directas donante-receptor en el mismo sitio donde se encontraba el paciente.

En 1936, Frederic Durán-Jordá crea en Barcelona el primer Banco de Sangre y servicio de transfusiones a distancia. En aquella época en Barcelona se realizaban fundamentalmente transfusiones directas brazo a brazo donde se utilizaban por lo general las jeringas de Louis Jubé (7).

En el año 1935 se habían realizado en el Servicio de Transfusión Sanguínea del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo 128 transfusiones todas ellas en forma directa a partir de familiares, donantes del hospital o donantes profesionales. Las transfusiones directas en ocasiones obligaban a la exposición quirúrgica de la vena del brazo lo que dificultaba ulteriores donaciones o transfusiones. Las transfusiones indirectas con sangre citratada eran realizadas por José Antonio Grifols Roig a través de un equipo transfusor que el mismo había diseñado: un recipiente de vidrio donde se recogía la sangre del donante en citrato y se infundía posteriormente al paciente mediante la inyección de aire al recipiente. Técnicamente era de realización complicada y al utilizar un circuito abierto al exterior, no permitía su almacenamiento mas allá de unas pocas horas, debido al riesgo de contaminación bacteriana (www.wikipedia.org/FredericDuran).

Cuando comienza la Guerra Civil española Durán se incorpora al Hospital 18 situado en el monte de Montjuic para colaborar con la atención de los heridos que llenaban los hospitales de la ciudad. Allí pudo observar que la cantidad de sangre que se tenía que transfundir era mayor que la que podían aportar los donantes mediante la transfusión directa. A su vez, recibe una carta de sus amigos Wenceslao Dutrem y Serafina Palma, destacados en el frente, donde se lamentan de la falta de sangre para tratar los heridos. Estos dos hechos lo deciden a abandonar el hospital y con el apoyo del Servicio de Sanidad del Ejército Republicano es encargado de crear un servicio que proporcionara la sangre necesaria para los heridos tanto militares como civiles.

En 1934, el médico ruso Serge Yudin visitó España y promovió la conveniencia de usar sangre preservada en citrato y almacenada a cuatro grados. Durán-Jordá aplicó este método pero en lugar de usar sangre cadavérica como los médicos rusos lo utilizó en donantes vivos

para mantener un stock de sangre suficiente para los heridos de la guerra (3). Los donantes donaban sangre una vez por mes, preferiblemente en la mañana y en ayunas total para evitar la bacteriemia que se produce luego de la ingestión de alimentos. En la primera visita del donante se realizaba un historial médico, un examen físico y una extracción para determinar su grupo sanguíneo y realizar la prueba de Wassermann-Bordet para la sífilis. Si todas las pruebas eran correctas se le citaba a la semana siguiente para la extracción. En principio sólo se extraía sangre del grupo 0 que iría al frente de combate y del grupo A que se reservaba para los hospitales de la ciudad donde se transfundía previa determinación del grupo sanguíneo del receptor.

La cantidad de sangre extraída oscilaba entre 300 y 400cc que se mezclaba con una solución de citrato al 4%. Con el donante en decúbito en la camilla, la zona de venipuntura, generalmente el pliegue del codo, se desinfectaba con yodo y alcohol y se delimitaba con toallas estériles. La sangre fluía en unos matraces de vidrio de 500 ml que se agitaban continuamente para favorecer la mezcla de la sangre con el citrato con la ayuda de un sistema de vacío. Posteriormente se verificaba la esterilidad de la sangre contenida en el matraz extrayendo una muestra que se sembraba en tubos de agar y el sobrante se utilizaba para comprobar el grupo sanguíneo. Si la extracción era considerada correcta, se mezclaba la sangre de seis donantes del mismo grupo en otro matraz de vidrio de dos litros, haciéndola pasar por un tejido de seda con un tamaño de poro de 250 micras para eliminar los coágulos y agregados que se podían haber formado durante la sangría.

Los matraces vacíos eran lavados con agua a alta presión y esterilizados durante 30 minutos a 130 grados entre 2 a 5 atmósferas para ser utilizados nuevamente.

Gracias a la colaboración de los laboratorios Pujol-Cullel se obtuvo un recipiente de vidrio cerrado bajo presión con un arco voltaico. Eran los llamados frascos Rapide dado que permitían realizar la transfusión, sin ningún aparato transfusor, solamente con la aguja y el filtro que llevaban conectados. Las botellas con sangre se almacenaban en posición vertical un máximo de 15 días y antes de utilizarlas se comprobaba que la in-

terfase clara entre los eritrocitos y el plasma mantuviera su color amarillento. Las botellas con hemólisis eran descartadas y si el aspecto de la botella era el correcto se calentaban en baño María a 37 grados antes de su infusión.

Un camión Diamon de cuatro toneladas con dos grupos electrógenos del Sr. Vidal que se dedicaba al transporte de pescado en el norte del país, convenientemente acondicionado, permitió a finales de 1936, por primera vez en la historia, transportar sangre para transfusión a una distancia de unos 300 km. En “El Rasgo” se hacían envíos semanales al frente y se intentaba mantener una existencia de 35 litros de sangre en cada hospital.

Al final de la guerra civil, en 1939, durante los 30 meses que funcionó el Servicio de Transfusión de Barcelona se registraron más de 28.000 donantes y se procesaron para transfundir 9.000 litros de sangre.

En febrero de 1939, cuando las tropas del general Franco ocupan Cataluña, Frederic Durán-Jordá emigra al Reino Unido invitado por Janet Vaughan de la Cruz Roja Británica con quien comienza a trabajar, ante la inminencia de la segunda guerra mundial, en el almacenamiento y suministro de sangre. Fallece de leucemia el 30 de marzo de 1957 a los 51 años de edad en un hospital de Manchester.

Norman Bethune, cirujano canadiense del Hospital Sacré Coeur de Montreal abandona su puesto y llega a España en noviembre 1936 para organizar y coordinar la ayuda médica que se envía de Canadá. Desarrolla, en primer lugar, una incansable actividad sanitaria en los frentes cercanos a Madrid. El 23 de diciembre de 1936 Bethune realizó la primera transfusión sanguínea en la ciudad universitaria de Madrid. En febrero de 1937 le llega la noticia que más de 100.000 malagueños huyen de la ciudad hacia Almería. Con una rudimentaria furgoneta que hacía la función de ambulancia, junto a sus ayudantes Hazen Sise y Thomas Worsley crearon el primer servicio móvil de transfusión de sangre que atendía a los heridos de la guerra civil, sobre todo niños, en la carretera Almería-Málaga.

Expresó sus experiencias en el libro “Crimen del camino Málaga-Almería”. Sus palabras lo dicen todo “Me niego a vivir sin revelarme contra el mundo que genera crimen y corrupción” “No he venido a España a derramar sangre sino a darla”.

Bethune se adelantó en el tiempo ejerciendo como médico sin fronteras. En 1937 vuelve a Canadá para recaudar fondos para la democracia española. En 1938 se va a China para prestar sus servicios médicos en la lucha contra la invasión japonesa. Allí murió en 1939 por una infección que se transformó en septicemia.

El 7 de febrero de 2006, el Ayuntamiento de Málaga inauguró el Paseo de los Canadienses. Este paseo discurre paralelo a la playa del Peñón del Cuervo en dirección a Almería. La placa conmemorativa dice: “En memoria de la ayuda que el pueblo de Canadá de la mano de Norman Bethune prestó a los malagueños fugitivos en febrero de 1937”. Se plantó un olivo y un arce, árboles representativos de España y Canadá.

En 1938 Janet Vaughan trabajando en el hospital Hammersmith de Londres recogió sangre de voluntarios y la almacenó en frascos de vidrio con citrato. De esta manera logró reunir cincuenta frascos, el mayor depósito de sangre en Londres hasta esa época. Sin embargo, era totalmente insuficiente para sobrellevar una guerra y en una ciudad sometida a bombardeos aéreos sería imposible convocar a los donantes. Los cirujanos, atareados en los quirófanos, no podrían realizar las transfusiones directas como hasta ese momento. Un grupo de médicos liderados por Vaughan, basados en las experiencias rusas y de Barcelona, decidió utilizar botellas de leche para almacenar la sangre citratada y los camiones de helados para su transporte. Concibieron cuatro centros de almacenamiento en lugar de uno y en las afueras de Londres, en cuatro puntos cardinales, para evitar que fueran destruidos en su totalidad por los bombardeos. Estos depósitos se encontraban cerca de la mayor densidad hospitalaria pero lejos del centro de Londres donde probablemente cayesen las bombas.

El depósito del noreste se encontraba en el ala abandonada de un hospital en la población industrial de Luton y el del sureste en la zona rural de Maidstone en dos casas adaptadas para la función. El centro del noroeste funcionaba en un ex club social de la ciudad de Slough dirigido por Janet Vaughan y el del suroeste se encontraba en una escuela para adultos de la ciudad dormitorio de Sutton. En este centro comenzó a trabajar Patrick Mollison quien al igual que los otros médicos rea-

lizaron el reclutamiento de donantes voluntarios. “Todo resultaba muy nuevo, nadie había hecho esto antes” dijo Mollison.

Si bien Londres no fue bombardeada durante el primer año de guerra la primera gran experiencia ocurrió fuera de tierras británicas en Dunkerque al norte de Francia, donde se emplearon 190 litros de sangre y plasma. Se demostró que la sangre no sólo se mantenía útil por varias semanas sino que además soportaba el rudo transporte.

En la tarde del sábado 7 de setiembre de 1940 los aviones alemanes sobrevolaron Londres y destruyeron los barrios a lo largo del río Támesis pero fue sólo el comienzo de una seguidilla de bombardeos nocturnos durante cuatro meses. No existen estadísticas sobre el consumo de sangre durante los bombardeos pero el Medical Research Council calculó que a lo largo de toda la guerra, los depósitos de Londres, que por su disposición estratégica se salvaron de los bombardeos nazis, recogieron y distribuyeron más de 260.000 litros de sangre. Janet Vaughan fue elegida una de las seis mujeres del siglo XX por la serie de la BBC “Women of the Century” en 1984.

Bernard Fantus del Hospital Cook County de Chicago y uno de los primeros editores del Manual Merck, establece el primer banco de sangre de USA en 1937 en el cual, la sangre citratada era almacenada en botellas de vidrio en un refrigerador por más de 10 días. Fantus introduce el concepto de Banco de Sangre “it is obvious that one cannot obtain blood unless one has deposited blood” utilizando su similitud con el procedimiento en un banco de dinero. Esta denominación no se basaba sólo en la metáfora sino que los primeros registros del First National Bank of Blood eran establecidos en una planilla denominada “Blood Bank Account” con columnas de “Debit” o “Credit” donde se anotaban los movimientos de las unidades de sangre (8). A su vez, el médico interno cobraba 10 dólares al paciente para pagar al donante. El concepto de Banco de Sangre y la donación comunitaria se desarrollaron con la segunda guerra mundial y luego con la formación de la American Association of Blood Bank (AABB) en 1947. De esta manera el término Banco de Sangre se introdujo tanto en el lenguaje profesional como popular apareciendo conjuntamente en el diccionario médico y en las páginas ama-

rillas de las guías telefónicas (8). Como ya hemos mencionado, también en un hospital privado del área de Chicago, se desarrolla en 1935, un programa de transfusiones a partir de sangre cadavérica lo cual no fue revelado hasta 25 años después cuando el cirujano encargado del proyecto Leonard Charpier publica un artículo “Transfusion of cadaver blood. A contribution of the history of blood transfusion” en el Bulletin of the American Association of Blood Bank (8). Esta publicación de la AABB fue el predecesor de la revista Transfusion que se comienza a publicar a partir de 1961 y que actualmente conmemora sus 50 años de existencia.

Se estima que entre 1935 y 1937 se transfundieron en Chicago unos 35 pacientes con sangre cadavérica. Es probable que dichas transfusiones se hayan realizado en el Hospital Little Company of Mary fundado en 1930 del cual Charpier era director médico y jefe del departamento de cirugía. En 1950, en este hospital de Chicago el cirujano Richard Lawler realiza el primer trasplante de un órgano cadavérico. En 1990, Joseph Murray quien obtuvo el premio Nobel por sus trabajos en trasplante renal compartido con Donnall Thomas por los trasplantes de médula ósea, en su conferencia cuando recibe el premio, cita el caso del trasplante de Chicago (8). Coincidentemente, los dos primeros cirujanos que reportan trasplantes renales cadavéricos, Voronoy en Ucrania, quien publica el caso en una revista española en 1936 y Lawler en USA, trabajaron junto a los dos cirujanos que realizaron las primeras transfusiones cadavéricas, Shamov en el este y Charpier en el oeste.

En USA, la obtención de plasma para el tratamiento del shock hipovolémico en la guerra se inició en gran parte gracias a los trabajos de John Elliott en la década de 1930.

Elliott a partir de 1918 trabajó en la Marina de USA y fue asignado como técnico de laboratorio en la Naval Medical School de Washington. Estando en la Marina se casa con Frances Porter de Salisbury. En 1929, se mudan a esta ciudad donde abren un laboratorio privado que funciona con el Hospital Salisbury luego reorganizado a Rowan Memorial Hospital. Trabajando en el laboratorio del Hospital Rowan Memorial de Salisbury en Carolina del Norte su gran proyecto fue producir suero y plasma estéril. Creó, en 1936, el

primer frasco de vidrio al vacío conteniendo una solución de citrato para obtener sangre y luego separar el plasma (9).

En 1931, tres doctores Donald Baxter, Ralph Fox y su hermano Harry fundaron la compañía Baxter Intravenous Product Corporation que fue el primer fabricante de soluciones intravenosas.

En 1939, Elliott entra en contacto con Naumice Nasset de Baxter y juntos desarrollan el primer frasco de vidrio comercial para obtener sangre, denominado “Transfuso Vac”, sustituyendo a las copas de vidrio, frascos de boca ancha o botellas de leche que se utilizaban hasta ese momento. El nuevo frasco se puso a prueba con más de 800 transfusiones en seis hospitales. Originalmente contenía citrato de sodio pero luego, con el desarrollo del ACD como anticoagulante durante la segunda guerra mundial, éste se utilizó en los frascos de vidrio al vacío para prolongar el almacenamiento de la sangre a 21 días (10). En 1941, Baxter y Elliott crean el “Plasma Vac” frasco de vidrio al vacío para separar el plasma de la sangre total.

En 1937, la Cruz Roja Americana se interesa por primera vez en la colecta de sangre. Su director William DeKleine recluta donantes voluntarios para ser enviados a los hospitales y realizar transfusiones directas, basándose en el programa de la Cruz Roja Británica desarrollado por Percy Oliver en 1921.

John Elliott lee en el periódico la nueva actividad de la Cruz Roja y le envía correspondencia a DeKleine explicando su proyecto para obtener plasma líquido.

En 1939, el director de la Cruz Roja visita Carolina del Norte, queda impresionado con el trabajo de Elliott y a partir de este momento la Cruz Roja fomenta su difusión por varios estados de USA. En 1940, la Cruz Roja Británica solicita a la Americana que le envíe plasma líquido. El programa de recolección y envío de plasma líquido por el método de Elliott comienza en agosto de 1940. Pero, el programa colapsa en enero de 1941 cuando DeKleine descubre que la Cruz Roja Británica no ha usado el plasma americano por contaminación bacteriana (11). La Armada americana a su vez elige el plasma liofilizado en lugar del plasma líquido para su uso en la guerra.

John Elliott no era médico. Sus doctores amigos le aportaron el título de “Doctor of

Science” (honorary) del Coatawba College de Salisbury. De esta manera, John Elliott utilizaba en sus publicaciones la abreviatura ScD.

En 1945, Elliott estando de vacaciones en Hollywood, en la Florida, visita el Dade County Blood Bank en Miami al cual había ayudado a organizar en 1941. A partir de febrero de 1946 se muda de Salisbury a Miami y comienza a trabajar en este Banco de Sangre.

Funda la compañía Dade Reagents Inc. la cual se dedica a crear sueros hemoclasificadores. En 1949 esta firma comercializaba la mayoría de los sueros hemoclasificadores que se usaban en USA.

En 1947 es electo primer presidente de la Florida Association of Blood Banks. Fue el primer estado del país en tener una agrupación de los bancos de sangre.

En ese año, la Cruz Roja Americana decide restaurar su programa de donación de sangre y se designa a Louis Diamond como director médico.

Se produce también la mayor explosión de un tanque de petróleo en el Port of Houston en Texas matando e hiriendo a cientos de personas. Este incendio, mostró la necesidad de contar con una infraestructura nacional de Bancos de Sangre siendo la piedra fundamental para la creación de la American Association of Blood Banks (AABB). En noviembre de 1947 en Dallas-Texas, se funda la AABB siendo John Scudder el primer presidente.

John Elliott integra el primer Directorio y será luego vicepresidente.

En el primer Annual Meeting de la AABB en 1948 presenta un trabajo titulado “Red cell suspension for transfusion”. En 1949, inicia un programa formal de entrenamiento para técnicos de otros bancos de sangre de forma similar a lo que en Uruguay realiza la Escuela Universitaria de Tecnología Médica (EUTM) dependiente de la Facultad de Medicina.

Junto con Jack Griffiths, quien luego sería el noveno presidente de la AABB, escriben el primer manual de procedimientos técnicos para el equipo del Blood Bank Dade County.

Mucho del contenido de este documento se transfiere en 1951 al “Manual of Procedures” de la Florida Association of Blood Banks. En 1953, la AABB publica la primera edición del Manual of Technical and Procedures (figura 3.1) que se ha seguido publicando hasta el día de hoy siendo la 15a la última edición.

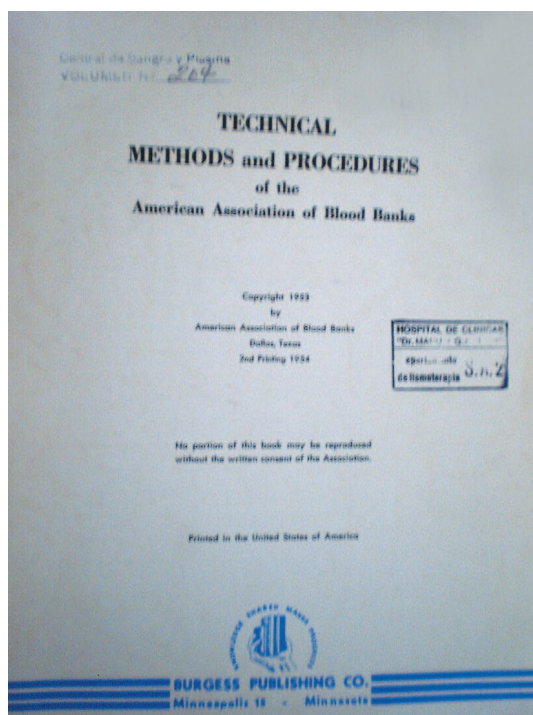
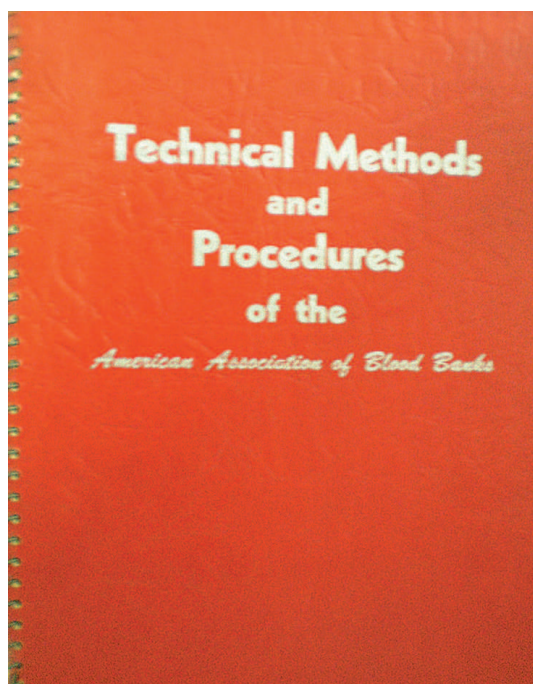


Figura 3.1 - Primera edición del Manual de la American Association of Blood Bank (AABB). Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional.

En agosto de 1954, John Elliott que era un gran fumador, muere de un ataque cardíaco estando en Haití como consultante para organizar un banco de sangre. Unos pocos días después

el Dade County Blood Bank fue denominado John Elliott Blood Bank denominación que se mantuvo hasta 1981 cuando este banco de sangre pasó a formar parte de la Cruz Roja Americana. A partir de 1956, en el meeting conjunto de la AABB y la ISBT que se realizó en Boston, la AABB establece un Premio en honor a John Elliott (the John Elliott Memorial Award). En 1971 se coloca una placa recordatoria en el Rowan Memorial Hospital de Salisbury siendo el orador del acto su amigo Jack Griffiths.

En una carta escrita en 1953, el año antes de su muerte, establece que "There is no doubt that the plasma bank established at Rowan Memorial Hospital in 1936 antedated the Cook County Hospital Blood Bank established during the same year".

John Elliott a pesar de no ser médico, debe ser reconocido como una persona que desarrolló equipamiento, produjo reactivos, adiestró técnicos y estandarizó los procedimientos de los florecientes bancos de sangre de USA.

Puede considerarse que a partir de 1914 el conocimiento y desarrollo de la conservación ex vivo de la sangre, la creación de los Bancos de Sangre así como muchos de los adelantos técnicos actuales fueron inducidos por los conflictos bélicos como las dos guerras mundiales, la de Corea, Vietnam y la del Golfo continuando hoy en Afganistán e Iraq.

Precisamente, en un estudio reciente, se demuestra el microquimerismo transfusional, que es más frecuente en los pacientes con trauma excombatientes de la guerra de Vietnam (12).

El primer trabajo sobre conservación de los eritrocitos ex vivo fue publicado por Fleig (13) en 1910 quien extrajo 80 ml de sangre desde conejos y la desfibrinó. Luego, los eritrocitos fueron lavados con una solución isotónica de agua termal y almacenados durante 7 días en una caja de hielo hasta que fueron devueltos al animal donante. El aumento del número de células circulantes sugirió que la mayoría de las células inyectadas eran viables.

Weil (14) en 1915 demuestra que la sangre citratada puede ser almacenada en una caja de frío durante varios días para luego transfundirla con seguridad en animales.

En la primera guerra mundial Robertson (15) utilizó sangre citratada en frascos de vi-

drio con una solución de Rous y Turner que contenía glucosa la cual, podía actuar como un coloide impidiendo la hemólisis dado que, en esa época, se pensaba que los eritrocitos eran impermeables a la glucosa. Luego, se demostró el metabolismo anaerobio de los glóbulos rojos siendo la glucosa su principal fuente energética. En 1958, Robertson, Rous y Turner reciben el premio Landsteiner de la AABB por sus estudios pioneros en la preservación de los eritrocitos (16).

En la segunda guerra mundial se utilizó una solución de citrato y glucosa de mucho menor volumen luego que se demostró en 1940 que la glucosa actuaba preservando los eritrocitos y estos tenían una sobrevivencia normal cuando eran infundidos. Entre 1938 y 1942, varios trabajos demostraron que la liberación de potasio intracelular y la hemólisis que ocurría en la conservación de los eritrocitos en soluciones de citrato-dextrosa podía ser disminuidas agregando un diluyente ácido. A su vez, las soluciones de citrato-dextrosa en los frascos de vidrio que se esterilizaban en el autoclave se caramelizaban lo cual era un inconveniente. En cambio, en las soluciones acidificadas de citrato dextrosa no se producía este cambio de color del anticoagulante (17). Así surgió el ACD, ácido cítrico dextrosa, cuya introducción rutinaria como solución anticoagulante y preservadora de los eritrocitos ex vivo en el Reino Unido se realizó luego de finalizada la segunda guerra mundial. Después de los estudios sistemáticos de los beneficios así como de los posibles efectos deletéreos del ACD realizados por Loutit en 1943, los glóbulos rojos se comienzan a conservar en ACD en los bancos de sangre a 4 grados durante 21 días.

En la década de 1960 se demuestra que los eritrocitos presentan menos lesiones de conservación manteniendo mejores niveles de ATP y 2,3-DPG en soluciones de citrato fosfato dextrosa que contienen menos ácido cítrico. Nace así una nueva solución anticoagulante conservadora el CPD (Citric acid-Phosphate-Dextrose) que prolonga el período de conservación in vitro a 28 días (18).

La idea de almacenar separadamente los eritrocitos con soluciones nutritivas de adenina y glucosa fue propuesta inicialmente por Fischer en 1965 (19).

El agregado de adenina como nutriente de

los eritrocitos mejora su viabilidad. En la solución de CPD-A, cuando la adenina se agrega a los glóbulos rojos luego que el plasma es retirado de la sangre total, la sobrevivencia de los eritrocitos a 4 grados se prolonga a 35 días.

Actualmente, la mayoría de los bancos de sangre utilizan una solución anticoagulante de CPD y una conservadora de Saline-Adenine-Glucose-Manitol (SAGMAN) que mantiene los glóbulos rojos viables por 42 días.

En Uruguay, el 12 de noviembre de 1942 se inaugura el primer Banco de Sangre del país que se denomina Central de Sangre y Plasma. Comienza a funcionar en el Instituto de Patología de la Facultad de Medicina siendo decano Julio C. García Otero. Sus primeros directores fueron Dinor Invernizzi, Raúl Canzani y Silio Yannicelli.

En 1947, la Central de Sangre y Plasma realizó un curso de Hemoterapia el cual fue auspiciado por la Comisión del Interior de la Facultad de Medicina cuyo presidente era Domingo Prat. El objetivo era divulgar y enseñar el conocimiento de los adelantos de la hemoterapia y la plasmoterapia en forma teórico-práctica principalmente para médicos y técnicos del interior del país ya que la Central de Sangre y Plasma había colaborado, en todo lo que pudo, en instalar los servicios de transfusiones en Salto, Trinidad, San José así como el que se deseaba realizar por esa fecha en Melo. Los temas tratados fueron publicados, por la Facultad de Medicina, en un libro "Curso de Hemoterapia" editado en marzo de 1947 por la imprenta Rosgal de Montevideo (figura 3.2).

El primer capítulo sobre los sistemas de grupos sanguíneos ABO, MN y P fue escrito por Héctor Mazzella nuestro querido profesor de Fisiología cuando ingresamos a la Facultad de Medicina en 1970. Roberto Caldeyro-Barcia escribe dos capítulos de este libro, uno sobre las soluciones anticoagulantes y otro sobre la conservación del plasma. Euclides Peluffo, Profesor Agregado de Pediatría, relata el capítulo sobre Eritroblastosis Perinatales término que sugiere sustituir por el de Enfermedad Hemolítica Congénita (EHC). Describe las formas clínicas y establece que en varias oportunidades han realizado recambios parciales de sangre del niño de 40 o 50 cc, una o dos veces por día, durante varios días según la gravedad del cuadro clínico. Silio Yannicelli es autor del

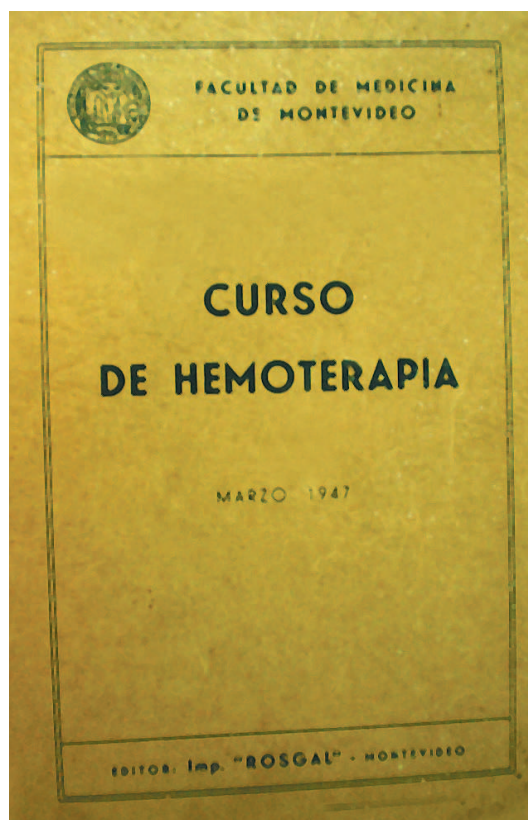


Figura 3.2 - Curso de Hemoterapia realizado en 1947 por la Central de Sangre y Plasma de la Facultad de Medicina de Montevideo, Uruguay e impreso por la imprenta Rosgal. Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional.

capítulo sobre la Isoinmunización materna por factores Rh-Hr y ABO en las eritroblastosis perinatales donde describe las características, constitución, genética, nomenclatura y aplicación del factor Rh descubierto por Landsteiner y Wiener siete años antes en 1940. A su vez, establece el mecanismo fisiopatológico de la EHC basado en los conceptos de Levine y Stetson sobre la inmunización materna causada por antígenos fetales y ausentes en ella. En lo esencial, establece que la fisiopatología de la EHC involucra un problema de inmunología clínica. Se plantean como tratamientos neonatales las transfusiones de sangre Rh negativas o las exsanguinotransfusiones parciales o totales. Como medidas preventivas se propone evitar las transfusiones en mujeres en edad procreativa e incluso en niñas y en el sentido de eliminar las aglutininas residuales antes del nuevo embarazo se ensayan sangrías terapéuticas.

Por último, Alfredo Ubaldo Ramón Guerra, Profesor Agregado de Pediatría, escribe

el capítulo sobre Hemo y Plasmoterapia en el Lactante (sangre y sus derivados principales) estableciendo cuando, qué, cuánto y cómo se debe transfundir.

En 1952 se resuelve integrar la Central de Sangre y Plasma al Hospital de Clínicas siendo el primer servicio médico del hospital. Un año después, con el ingreso de los primeros pacientes a la Clínica Semiológica del piso 8, pasa a denominarse Servicio de Transfusiones ocupando la planta física donde funciona actualmente, la Cátedra de Hemoterapia primero y de Medicina Transfusional después, a partir de su creación en 1978 (www.hc.edu.uy). El Servicio de Transfusiones del Hospital de Clínicas “Dr Manuel Quintela” es dirigido por Dinor Invernizzi a partir de 1952 hasta 1962 (figura 3.3). Escribe dos trabajos uno sobre “hemólisis intravascular por transfusión de sangre incompatible” (figura 3.4) donde expone un caso clínico de una incompatibilidad ABO en una paciente de 54 años a la que, el 22 de diciembre de 1949, se le realizó una operación de Halsted por un neoplasma de mama derecha. Hace consideraciones diagnósticas y terapéuticas y compara este caso con dos publicados por Wiener.



Figura 3.3 - Placa recordatoria al Dr. Dinor Invernizzi que se encuentra en el Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas en reconocimiento a quien fue su primer Director Médico entre 1952 y 1962.

En el otro artículo “Epidemiología y profilaxis de la hepatitis infecciosa epidémica y de la hepatitis por inoculación”, publicado en 1953, establece que la hepatitis por inoculación es producida por un agente filtrable muy similar al que produce la hepatitis infecciosa. Algunos autores ingleses llaman virus A al que produce la hepatitis infecciosa y virus B, al que produce la hepatitis por inoculación

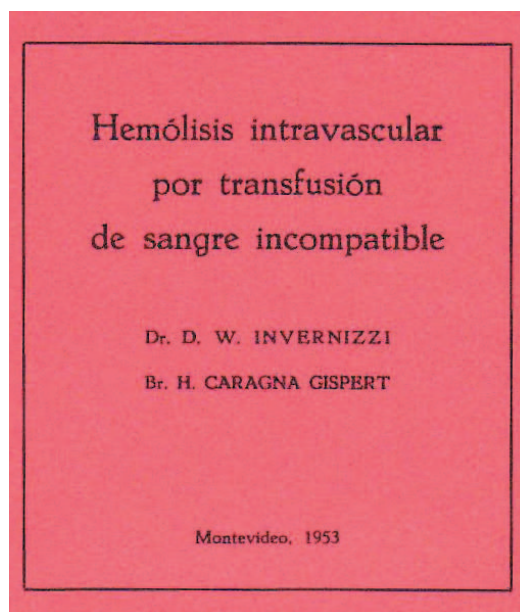


Figura 3.4 - Publicación “Hemólisis intravascular por transfusión de sangre incompatible” del Dr. Dinor Invernizzi. Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

(téngase presente que el virus de la hepatitis B fue descubierto recién en 1965, ver historia de las enfermedades transmisibles). Entre las medidas preventivas, establece en el punto i) “Es obligatorio extremar el cuidado en la limpieza y esterilización de todo el material utilizado para inyecciones o extracciones de sangre (agujas, lancetas, jeringas, pipetas, equipos para venoclisis, etc). Un método sencillo es el de utilizar como lancetas, púas de gramófono cromadas insertadas en un pequeño tapón de corcho, que se esterilizan con calor seco (estufa) colocando 4 o 5 dentro de un tubo de ensayo (figura 3.5).

Julio César Beltrán continúa con la dirección del Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas desde el 1° de marzo de 1963 hasta 1970. Desarrolló y centralizó la atención de los pacientes con hemofilia en este servicio universitario. Realiza un trabajo sobre esta patología (tema puesto al día) publicado en 1952, donde se exponen tres casos clínicos (figura 3.6). El primero es un paciente de 27 años enviado del interior por hematuria con el diagnóstico de hemofilia que es tratado con 900 cc de plasma. El segundo caso es un niño de 3 años que llega a la consulta por tumefacción de tobillo y panto-rrilla izquierda con un voluminoso hematoma

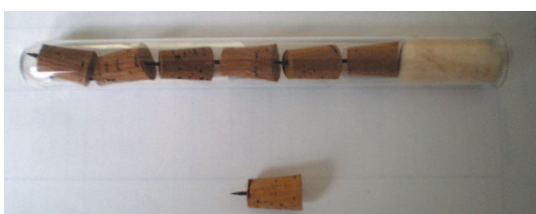
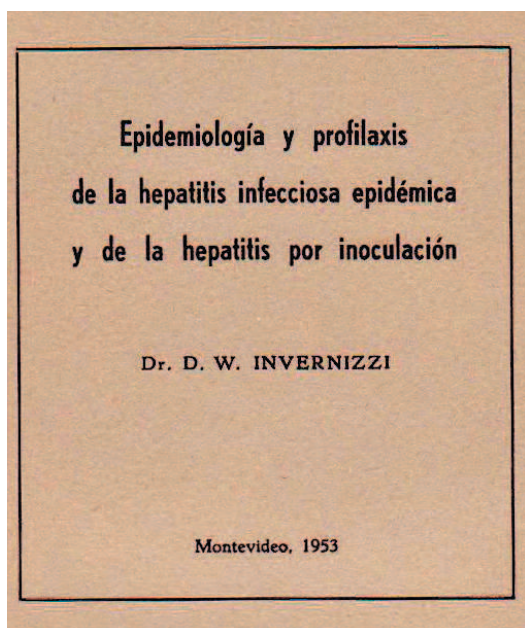


Figura 3.5 - Publicación "Epidemiología y profilaxis de la hepatitis infecciosa epidémica y de la hepatitis por inoculación" del Dr. Dinor Invernizzi y lancetas para punción digital utilizando púas de gramófono cromadas insertadas en un pequeño tapón de corcho. Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

de región anterior del tórax provocado por una punción esternal. Recibe transfusiones de sangre y plasma con medicación antianémica. Tratamiento de la hemartrosis con reposo, hielo y vendaje compresivo. Tratamiento local de las heridas con espuma de fibrina, trombina y venenos de serpiente. El último caso es también un niño de 4 años enviado del Hospital Pedro Visca por gingivorragias y equimosis. A los tres días de edad presentó hemorragia grave del cordón umbilical que sólo pudo ser cohibida por transfusiones y en 1948 ingresó por un gran hematoma de región glútea que al ser escindido drenó sangre sin coagular presentando una anemia severa. El cuadro actual es tratado con transfusiones de sangre (250 cc), vitaminas K y C con medicación antianémica. En este trabajo, dice Beltrán, que en el servicio Central de Sangre y Plasma de la

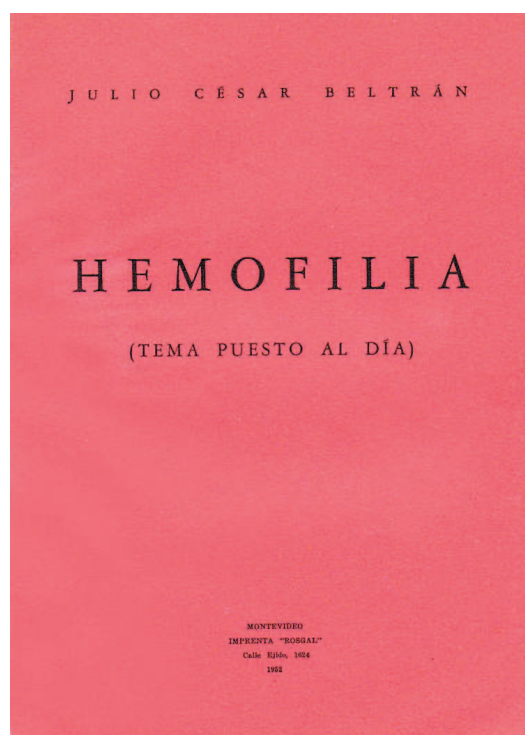


Figura 3.6 - Publicación sobre "Hemofilia" del Dr. Julio César Beltrán. Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

Facultad de Medicina (Hospital de Clínicas) funciona una policlínica de síndromes hemoragíparos donde se estudian y se tratan estos enfermos. Esta policlínica queda a disposición de los colegas que deseen enviar sus pacientes, ya sea para completar su estudio, ya sea para el tratamiento con transfusiones al igual que en el momento actual.

Entre 1970 y 1973 el Departamento de Hemoterapia es dirigido por Victor Vila quien continúa con el desarrollo de la atención de los pacientes con hemofilia e introduce mejoras en el fraccionamiento de los hemocomponentes principalmente del crioprecipitado.

Germán Surraco ocupó la dirección desde el 22 de abril de 1974 hasta el 31 de marzo de 1976 no pudiendo finalizar el período por razones de salud. El 1º de abril de 1976 asume la jefatura Alcides Rodríguez hasta el 31 de marzo de 1978 en que se crea la Cátedra de Hemoterapia (figura 3.7) y se lo designa como primer Profesor grado 5, cargo que ocupa hasta el 30 de junio de 1987. Los profesores siguientes fueron Victor Vila desde el 1º



Figura 3.7 - Foto actual de la Cátedra de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay, que funciona desde su creación en la planta baja del Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela.

de agosto de 1988 hasta el 31 de julio de 1990 y posteriormente en una segunda oportunidad desde el 28 de agosto de 1997 al 27 de agosto de 1999. En el intervalo de tiempo entre 1990 y 1997 la Cátedra de Hemoterapia, por disposición del Consejo de la Facultad, estuvo dirigida por un triunvirato conformado por Martha Nese, Walter Alallón y David Sempol. Luego, desde el 23 de marzo del 2001 hasta el 19 de enero del 2005 asume Antonio Arago y finalmente desde el 10 de agosto de 2006 hasta la actualidad Jorge Decaro.

Uno de los gestores de la Central de Sangre y Plasma de la Facultad de Medicina fue Pedro Larghero, profesor titular de Patología Quirúrgica desde 1939, según consta el artículo del diario *El Día* publicado el 16 de julio de 1963 es decir, dos días después de su muerte. Como cirujano, se preocupó para que existiera sangre disponible para realizar las intervenciones quirúrgicas a sus pacientes. En la sesión del 8 de octubre de 1938 de la Sociedad de Cirugía de Montevideo Larghero establece que “en los servicios de urgencia de nuestros hospitales no es posible hacer una transfusión masiva, implica declarar, generalizando a todas las anemias agudas lo afirmado para las hemorragias gastro-duodenales, es decir que en el estado actual de nuestra organización, no nos encontramos en condiciones de tratar con eficiencia una anemia aguda grave y confesar que a veces los enfermos mueren por una deficiencia del servicio”. Por tanto, a continuación

presenta una moción que dice así: “La Sociedad de Cirugía de Montevideo, considerando que el tratamiento heroico de una anemia aguda grave no puede ser realizado integralmente en todos los casos en los Servicios de Urgencia de nuestros Hospitales, por la imposibilidad de ejecutar en el momento oportuno la transfusión masiva sanguínea de reposición, se dirige al Ministerio de Salud Pública instruyéndolo de la imperiosa e impostergable necesidad de la creación de un Servicio Central de Transfusión de Sangre de Urgencia”. A su vez establece que las garantías máximas de inocuidad de las dosis masivas sólo pueden ser obtenidas cuando la operación es confiada en todas sus fases a un especialista. La necesidad de esta especialización se acrecienta si consideramos que desde el punto de vista práctico, para disponer al momento del recurso heroico, forzoso es recurrir al método de la sangre extraída con anterioridad, vuelta incoagulable y conservada. Resumiendo puede decirse que la tríada de exigencia para la transfusión de sangre heroica, de reposición, puede ser sintetizada así: “Que ella pueda ser administrada en el momento oportuno, en la cantidad necesaria, con el máximo de garantías en la acepción más amplia del vocablo” (Boletín de la Sociedad de Cirugía de Montevideo 1938;9:341-344) la cual sigue teniendo validez hasta el momento actual.

Pero, esta iniciativa de Larghero no tuvo éxito ni respuesta. Cinco meses más tarde, la muerte de un enfermo que llegó a la puerta del Hospital Maciel sangrando en blanco por una pequeña herida del pliegue del codo, con sección de la arteria humeral y herida de epigastrio sin lesión visceral, provocó de parte de Larghero el envío de una nota al MSP colocando el asunto en su verdadero terreno del punto de vista técnico-administrativo, es decir, deslindando responsabilidades. El día 11 de abril de 1939 el MSP creó el Servicio de Transfusiones encargando a Alberto Scaltritti y a Larghero su organización.

Sin embargo, la fase administrativa, continuaba diciendo Larghero, colocada bajo la superintendencia del Servicio de Asistencia Externa ha acusado en repetidas ocasiones defectos, cuyas causas no son del caso considerar aquí, pero cuyas consecuencias hemos podido apreciar los que como cirujanos de urgencia, debemos recurrir a menudo a ella.

Es decir, que para los casos de extrema urgencia, a cualquier hora del día o de la noche, no siempre es posible contar en cantidad y oportunidad, con una masa de sangre suficiente para las transfusiones de reposición.

En la reunión del 4 de junio de 1942 de la Comisión de Mejoramiento Técnico de la Sociedad de Cirugía, comuniqué, dice Larghero, que Dinor Invernizzi había preparado en el Laboratorio de Patología plasma humano para uso terapéutico, resolviendo por primera vez en nuestro país, un problema de extraordinaria importancia práctica. Llevó este hecho a conocimiento de la Sociedad dando lectura a la nota que con ese motivo dirigió al Consejo Directivo de la Facultad de Medicina. Esta necesidad de masa sanguínea, o de su sustituto, el plasma humano citratado me ha llevado a confiar a Invernizzi, encargado de la parte de fisiología y fisiopatología experimental en el Laboratorio de la Cátedra, de su preparación. El problema de la obtención de plasma humano para uso terapéutico, presenta dos fases: 1- Fuentes de aprovisionamiento de la sangre y 2- técnica de preparación, conservación y contralor bacteriológico y biológico del producto. He aquí como han sido resueltas por el Dr. Invernizzi. Para la Técnica A) local adecuado e instrumental para la extracción de la sangre, en las condiciones de asepsia requeridas (sala de operaciones del Servicio de Navarro), B) Frascos para la recepción de la sangre (provisión al Laboratorio de Patología por el Economato de la Facultad de Medicina), C) centrifugación (centrífugas del Instituto de Medicina Experimental), H) heladeras para la conservación del Instituto de Medicina Experimental, E) control biológico para la sífilis (Dispensario Central del MSP) y F) control bacteriológico (Instituto de Higiene Experimental).

El Servicio de Transfusiones del MSP abona a los dadores 10 centésimos por gramo de sangre. Considerando que el rendimiento en plasma es del 50%, 1 litro de plasma en materia prima, cuesta en el momento de la extracción doscientos pesos. Aunque el producto extranjero no ha llegado aún a nuestro país, tenemos la información de que costaría trescientos pesos. Para la obtención de materia prima el Dr. Larghero junto con Invernizzi iniciaron una solicitud ante los estudiantes de Medicina y médicos, a fin de obtener de cada

sujeto la donación gratuita de 100 gramos de sangre. Apenas iniciada la campaña registraron más de 30 dadores honorarios en el medio médico-estudiantil y otros tantos en el medio extramédico. Pero, esta solución que enaltece a los donantes no puede tener carácter definitivo. En tanto no pueda ser resuelto el problema en sus verdaderos términos, es decir, de la financiación de la materia prima, dos soluciones se nos presentan: 1- campaña ante el estudiantado y cuerpo médico para que la donación de 100 gramos de sangre sea generalizada y 2- propaganda en el medio hospitalario y civil para obtener donantes gratuitos. Es en este último sentido es que nos dirigimos al Consejo Directivo solicitando la autorización pertinente para iniciar la propaganda en los Servicios de Clínica de la Facultad de Medicina dirigida sobre todo a familiares y visitantes de los enfermos y por publicaciones en la prensa, cuyas condiciones básicas deben constituirlo, su carácter impersonal y la tutela de la Facultad. En el bien entendido de que el plasma obtenido se destina exclusivamente para los hospitales, si esta propaganda diera el resultado esperado, la obtención en masa del producto desborda las posibilidades personales materiales de Invernizzi, por lo cual someto el asunto a consideración del Consejo para encarar el estudio de su organización o el destino que el Consejo estime conveniente para su preparación dentro de los Institutos de la Facultad.

En la noche del 15 de enero de 1944 se produjo un terremoto de magnitud 6,9 en la escala de Richter con epicentro vecino a la ciudad de San Juan en Argentina con decenas de miles de muertos y heridos. El Presidente uruguayo Juan José de Amézaga y su ministro de Salud Pública disponen una misión de auxilio, la que fue liderada por José Luis Bado. Dentro del equipo de cirujanos viajó Pedro Larghero y llevaron como hemoterapeuta a Freire Muñoz (Rev. Med. Urug. 2008; 24:140-145).

Entre los meses de febrero y julio de 1963, inclusive hasta unos pocos días antes de su fallecimiento, Larghero concurrió al canal 10 de televisión, con el periodista Carlos Giaccosa, con el fin de realizar una campaña a nivel nacional para promover la donación voluntaria de sangre. En el libro "Pedro Larghero: cirugía y pasión" escrito por Pedro Bene-

dek, Jorge Pradines, Guaymirán Ríos Bruno, Felipe Vázquez Varini y Walter Venturino, publicado en el año 2000, existe una foto en el canal 10 de televisión con Larghero en el centro, Juan José Crottogini a la izquierda y el periodista Carlos Giacosa a la derecha.

En el libro, se relata también que en 1962, el famoso cirujano vascular Michael DeBakey organizó en Houston-Texas una reunión mundial sobre Cirugía de la Aorta a la que invitó a Larghero por intermedio de Roberto Scarsi. Éste pone al tanto de la patología aórtica que sufría Larghero a DeBakey para que tratara de convencerlo de la necesidad de una operación. Aunque no se conocen los pormenores de la entrevista de Larghero con DeBakey sabemos que aquel no le comentó a éste su enfermedad por lo cual DeBakey no tuvo oportunidad de abordar el tema. Larghero concurre a Houston, su último viaje al exterior, sin su segunda esposa por su situación económica. Se piensa que su silencio frente a DeBakey acerca de su aneurisma se debió precisamente a que no podía afrontar financieramente una operación de ese tipo en USA.

Diez meses después, en la tarde del domingo 14 de julio de 1963 Larghero comenzó con intensos dolores tóraco-abdominales imposibles de calmar en su domicilio por lo cual fue internado en el Sanatorio IQT (Instituto Quirúrgico Traumatológico) fundado por José Luis Bado luego denominado Pedro Larghero y hoy conocido como sanatorio Juan Pablo II. Curiosamente, su discípulo, nuestro profesor de Clínica Quirúrgica, Jorge Pradines, uno de los autores del relato, falleció también un 14 de julio de 2005. Tal vez una marca del destino para señalar la unidad del maestro con su discípulo (Antonio Turnes, “Falleció en Houston, el Dr Michael Ellis DeBakey” en www.diariosalud.net 24 de julio de 2008). DeBakey también está ligado a la historia de la Medicina Transfusional.

En 1924 Alfred Beck desarrolló en Alemania una bomba de transfusión sanguínea manual donante-receptor que usaba un sistema de rodillos (molinillo de Beck). Este principio fue utilizado en una bomba descrita por DeBakey en 1934 destinada a la transfusión sanguínea veno-venosa pero, el desarrollo de la sangre citrada hizo que cayeran en desuso las transfusiones directas. Sin embargo, el sistema le fue sugerido a Gibbon quien

desarrolló las bombas peristálticas para la circulación extracorpórea usadas ampliamente en cirugía cardíaca a partir de 1953. Las mismas bombas de rodillo fueron utilizadas luego, con el desarrollo de la hemaféresis, en los separadores celulares que se utilizan hasta el momento actual (ver capítulo historia de la hemaféresis).

Luego de la muerte de Larghero se crea la “Fundación Pro-Sangre Dr Pedro Larghero” publicándose sus estatutos en 1966 y siendo su primer presidente Diego Estol Ancell. En noviembre 1973, se realiza el III Congreso de la Federación Panamericana Pro Donación voluntaria de Sangre en Montevideo y el Correo del Uruguay imprime un sello conmemorativo.

El 18 de julio de 1908 se funda en Montevideo el Hospital Militar luego denominado Hospital Central de las Fuerzas Armadas (HC.FF.AA). En 1940, “en una piecita de reducidas dimensiones, situada en la entrada de la sala 1, Freire Muñoz con la colaboración del director del Laboratorio de Análisis Clínicos Saúl Puppo crearon un grupo de donantes y realizaron las primeras transfusiones” según relata Gualberto Oliva en su discurso, conmemorando el 50 aniversario del Servicio de Hemoterapia, publicado en la Revista del Servicio de Sanidad de las Fuerzas Armadas de Uruguay, volumen 13, número 3 de noviembre –diciembre de 1990. Los primeros sueros hemoclasificadores fueron aportados por Alberto Scaltritti. En 1944, se inicia en este hospital, la conservación de sangre en frascos de 200 cc durante 8 días en un refrigerador familiar. Freire Muñoz ejerció la jefatura del servicio de hemoterapia del HCFFAA hasta el año 1951. Hasta fines de 1952 es encargada interinamente la Jefa del Laboratorio Livia Dávila y a partir de 1953 es designado Gualberto Oliva quien, a pesar de no ser médico, contribuyó al desarrollo de la especialidad, siendo luego también director del Servicio de Hemoterapia del Sanatorio Larghero.

En 1950, a impulsos de Mario Cassinoni, Decano de la Facultad de Medicina, se crea y organiza la Sección Auxiliares del Médico. El primer coordinador y director fue Eugenio Fulquet (www.eutm.fmed.edu.uy). El curso de técnico transfusionista fue uno de los primeros en dictarse. Cassinoni además puso en funcionamiento el Hospital de Clínicas y creó la

Escuela de Graduados que permanecen hasta el momento actual.

En 1965 se cambia la denominación de la Sección Auxiliares del Médico a Escuela de Colaboradores del Médico. En 1979 se organiza la escuela en Paysandú donde también se dicta el curso de hemoterapia. En 1994, se cambia nuevamente la denominación a Escuela Universitaria de Tecnología Médica (EUTM) y se designa como directora a Blanca Tasende que es la primera directora egresada de esa Escuela. Se aprueba en el Parlamento la Ley 16.614 de Profesionales Tecnólogos. El curso de tecnólogo en hemoterapia que se dicta en el EUTM en el piso tres del Hospital de Clínicas tiene una duración de tres años.

En 1998 se funda la Asociación Uruguaya de Técnicos en Hemoterapia (AUTHEM) y realizan el primer Congreso los días 14 y 15 de agosto de 2009 en Minas Lavalleja.

En 1945 comienza a funcionar, en la calle Misiones, el Banco de Sangre privado denominado GABO por las iniciales de los apellidos de sus cuatro dueños (Gordon, Amoroso, Bazzano y Oliva) con intensa actividad ya que cubría más del 80% de las transfusiones particulares. Se trabajaba con sangre universal grupo 0 pero aún no se tipificaba el sistema Rh. Luego, este banco privado se muda a la calle Ejido y Colonia. Uno de los sanatorios privados donde se realizaban las transfusiones por parte de GABO era el Sanatorio Navarro en la avenida Agraciada y Suárez donde operaba Pedro Larghero quien comenzaba puntualmente a la seis de la mañana.

Otro de los sanatorios privados que contaban con la asistencia de GABO para realizar las transfusiones era el Sanatorio Americano inaugurado el 19 de setiembre 1948. La asistencia que brindaba GABO al sanatorio era muy buena pero, tenía tres inconvenientes. Primero, demora en los traslados desde su sede en la calle Ejido la cual se hacía más notoria en caso de urgencia. Segundo, los donantes debían realizar la donación de sangre en la sede de GABO fuera del sanatorio y tercero, como se trabajaba casi exclusivamente con sangre del grupo 0 la reposición se exigía de ese mismo grupo lo cual, a veces, no era fácil de cumplir. Por ello, a mediados de 1949 el sanatorio le propuso a GABO la necesidad de instalar un Banco de Sangre en el propio sanatorio lo cual GABO no aceptó.

El primero de noviembre de 1949 el sanatorio Americano inaugura su Banco de Sangre propio dirigido por Ricardo Magri. Comienzan a realizarse la tipificación del donante y receptor en los sistemas ABO y Rh. A partir de 1950, mediante muestras enviadas del Laboratorio Martínez Prado, vinculado al Banco de Sangre física y espiritualmente, se comenzó a realizar la determinación del sistema Rh en gestantes con sueros hemoclasificadores importados de USA (Immunohematology Research of Ortho Foundation). En abril de 1950, se realizó en el sanatorio Americano un ciclo de conferencias de dos distinguidos técnicos argentinos, Alfredo Pavlosky y Augusto Romero Álvarez. Este último, recomendó sustituir el citrato de sodio al 3,8% que se utilizaba como anticoagulante hasta ese momento por el Ácido Cítrico Dextrosa (ACD). Así, en el Banco de Sangre del sanatorio Americano se comenzaron a usar frascos de vidrio reutilizables para la donación con ACD como anticoagulante. En octubre de ese mismo año se realiza en Buenos Aires-Argentina el Primer Congreso Nacional de Hemoterapia y Hematología.

El día 5 de junio de 1948 se inauguró oficialmente la Central de Hemoterapia de la Colonia Saint Bois. Estaban presentes en representación del Presidente de la nación su esposa Matilde Ibáñez de Batlle Berres y Uruguay Marino Director de la Colonia. Como encargado de este servicio se designó a Ricardo Magri.

En 1952, se crea el Banco de Sangre del Hospital Británico de Montevideo siendo dirigido por Diego Estol Ancell quien al fallecer su padre Julio César Estol en 1939, a los 19 años de edad ingresa al Hospital Británico como ayudante de Laboratorio y en 1957 se gradúa de médico.

En 1953 se promulga la Ley 12.072 que crea el Servicio Nacional de Sangre (SNS) como organismo dependiente del Ministerio de Salud Pública (MSP). En el artículo 11 se determina para su financiamiento, un impuesto del 1% sobre las primas de Seguros o de Capitalización que emita el Banco de Seguros del Estado (BSE) o las Compañías particulares, en las transacciones que se realicen en el territorio nacional.

En 1967 se nombra la Comisión Interventora Honoraria del SNS integrada por Silio Yannicelli, Germán Surraco y Diego Estol Ancell.

En 1979 se firma el decreto PE 392/979 que fija los cometidos del SNS y donde se establecen cuatro programas: 1- Banco de Sangre de Reserva e Intercambio, 2- Programa de elaboración de sueros hemoclasificadores, 3- Programa de hemoconcentrados y 4- Programa de preprocesamiento de plasma. En el programa 2 se ha establecido, en la actualidad, el Laboratorio de Referencia Nacional en Inmunoematología con certificado de calidad, otorgado por el programa de control de calidad de la OPS:

Dentro del programa 1 el SNS deberá a) mantener en la medida de lo posible y en forma permanente un stock de grupos ABO y Rh menos frecuentes para apoyar en caso de necesidad a los Servicios de Hemoterapia públicos y privados mediante el régimen de créditos y reposición, b) centralizar la información sobre el inventario diario de sangre, plasma y componentes existentes en los servicios de Hemoterapia y c) organizar el intercambio de estos productos por parte de los servicios entre sí y con el propio SNS mediante el régimen de créditos y reposición.

Se crea el “crédito personal” que se le entregará a cada donante que efectúe la donación de sangre en el local del SNS o sus unidades móviles el cual será expedido a su nombre y será válido en el sistema de intercambio por una unidad de sangre o su equivalente en plasma (artículo 21). Los servicios de hemoterapia podrán canjear los créditos personales que reciban únicamente ante el SNS por las unidades de sangre correspondientes y sólo podrán ser utilizados, antes de los 13 meses de emitidos, para la cancelación de deudas adquiridas por dichos servicios en su participación del Sistema de Intercambio.

En el artículo 22 se determina el “crédito personal permanente” para las personas que hayan efectuado en un período de 24 meses por lo menos cuatro donaciones de sangre en el SNS y mantengan en él, ulteriormente la condición de donante periódico. Éste será válido para cancelar cualquier deuda de sangre del titular y de sus familiares directos (padres, hijos, cónyuges).

La coordinación de cada servicio de hemoterapia con el SNS en el sistema de intercambio se establece en los artículos 6 al 8 del decreto y generará la apertura de una Cuenta Corriente o crédito institucional que quedará

abierta mientras se mantenga dicha coordinación (artículo 23).

En su artículo 28 establece que queda prohibido en todo el territorio nacional la plasmaféresis salvo la que se realiza con fines terapéuticos directos. Se exceptúa de esta disposición al SNS y a aquellos servicios de hemoterapia a quienes el MSP expresamente autorice.

Luego, en 1994 el decreto PE 497/994 modifica los artículos 21 y 22 del decreto PE 392/79 reglamentario de la Ley 12.072. Se establece que el valor de cada crédito personal será equivalente a una unidad de sangre o hemocomponente pero, para aquellos servicios de Hemoterapia que demuestren preparar hemocomponentes en más del 65% de las unidades extraídas, el crédito personal tendrá un valor de dos unidades de sangre o hemocomponentes. A su vez, se crea la categoría de “donante vitalicio” para aquellas personas que hubieran donado sangre más de 30 veces al SNS y sean mayores de 65 años.

La Sociedad de Hemoterapia del Uruguay se constituyó el 28 de octubre de 1958. Una vez que los posibles integrantes de la sociedad fueron citados, el 4 de noviembre se realizó el acto eleccionario resultando presidente Silio Yannicelli, secretario Germán Surraco y tesorero Ricardo Magri. Con un esfuerzo constante y sostenido la sociedad llegó a contar con 50 asociados pero luego de culminar el primer mandato se desmembró por profundas diferencias con Aparicio Méndez ministro de Salud Pública de la época (1961-1964).

En la ciudad de Montevideo, el día martes 2 de mayo de 1978, en el local del SNS, un grupo de médicos hemoterapeutas fundan nuevamente la Sociedad de Hemoterapia e Inmunoematología del Uruguay como asociación civil que tiene como cometidos: 1- promover el conocimiento científico de la hemoterapia y de la Inmunoematología, 2- estimular el perfeccionamiento de sus integrantes y del personal de los servicios de Hemoterapia, 3- difundir los conocimientos relacionados con la especialidad y de su aplicación clínica, 4- proponer a las autoridades todas las medidas que sean necesarias para mejorar los servicios de Hemoterapia y 5- procurar la formulación de leyes, ordenanzas o disposiciones destinadas a mejorar el funcionamiento de los servicios de Hemoterapia.

En los años siguientes, se imprimen varios números de Hemoterapia-Revista de Medicina Transfusional y publicación oficial de la Sociedad (figura 3.8).

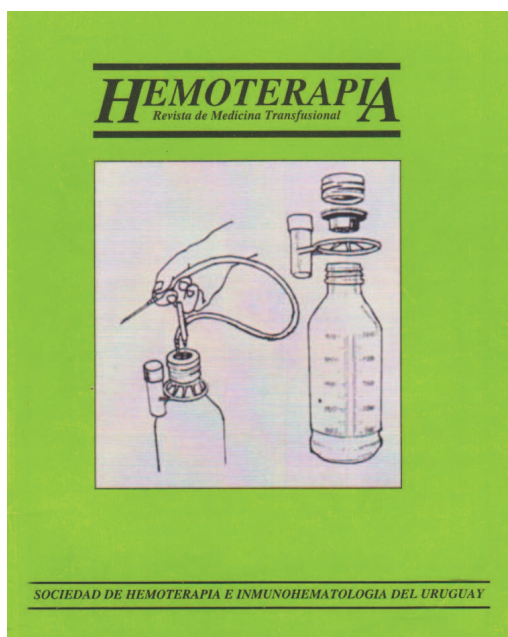


Figura 3.8 - Revista "Hemoterapia". Publicación oficial de la Sociedad de Hemoterapia e Inmunohematología del Uruguay.

En 1980 renuncian Yannicelli y Surraco asumiendo la Dirección del SNS Diego Estol, cargo que ocupa hasta 1990 cuando se retira por jubilación. Formó clubes de donantes de sangre para el SNS y en 1984 desarrolló el convenio con la planta fraccionadora de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC) en Argentina que se mantiene hasta la actualidad. En 1980, el SNS publica el Manual de Normas Técnico Administrativas de los Bancos de Sangre y en 1989 las Normas para el uso de Sangre Humana y sus componentes (figura 3.9).

En 1985, se establece el decreto PE 614/985 que reglamenta la reposición de sangre y componentes transfundidos. En este decreto, por primera vez, "se entiende por volumen de sangre a la unidad de sangre total" (artículo 7.1). Se determina que en la actividad privada o mutual podrá establecerse un depósito-garantía equivalente a dos unidades reajustables. Si las unidades transfundidas son repuestas en un período de 45 días se devolverá el depósito-garantía. En caso de no devolución, el monto sólo podrá utilizarse en el mejoramiento o complementación de los elementos técnicos afectados a los servicios de hemoterapia previa anuencia del SNS.



Figura 3.9 - Manual de Normas Técnico Administrativas de los Bancos de Sangre (1980) y Normas para el uso de sangre y sus componentes (1989), publicadas por el Servicio Nacional de Sangre (SNS).

Entre 1990 y 1992 la dirección del SNS estuvo a cargo de Antonio Arago, desde octubre de 1992 hasta junio 2009 por Andrew Miller y a partir de esta fecha por María Lourdes Viano.

En 1991 mediante la Ley 16.168 se establece que todo trabajador de la actividad pública o privada que realice una donación de sangre a bancos de sangre oficiales o que se encuentren bajo reglamentación del SNS, con la sola presentación del documento que acredite fehacientemente dicho acto, tendrá derecho a no concurrir a su trabajo ese día y el mismo será abonado como trabajado. Este derecho no podrá ser ejecutado más de dos veces en el año.

En 1992, a través del decreto PE 420/92 se determina el 12 de noviembre como el día nacional del donante voluntario de sangre dado que en esa fecha se conmemoran 50 años de la creación del primer Banco de Sangre en Uruguay, la Central de Sangre y Plasma.

La OMS designa al 14 de junio de cada año como el día internacional del donante de sangre voluntario que coincide con la fecha de nacimiento de Karl Landsteiner.

A partir de 1992 el SNS establece conjuntamente con el Departamento de Laboratorios del MSP un control de calidad externo de las técnicas de tamizaje serológico de las enfermedades infecciosas transmisibles por la sangre que realizan los Bancos de Sangre públicos y privados. A su vez, el SNS participa del programa de control de calidad externo regional auspiciado por la OPS con muestras enviadas desde el Laboratorio de Referencia en San Pablo-Brasil.

En 1997, se crea por el SNS un Programa de control de calidad externo de las técnicas en Inmunohematología.

En noviembre 1999, la OPS-OMS publica los “Estándares de Trabajo para los Bancos de Sangre” que fueron preparados con base en el sistema ISO 9000 con la colaboración de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) y validados por el Comité Consultivo Ad Hoc de Bancos de Sangre de la OPS después de haber sido discutidos durante la II Conferencia Latinoamericana de Bancos de Sangre que se desarrolló en Cartagena de Indias, Colombia, en mayo-junio de 1999 y en la cual participó Andrew Miller como Director del SNS.

A partir de la década de 1990 se empezaron a utilizar en el Uruguay programas de compu-

tación específicos para servicios de Hemoterapia lo que mejoró notablemente la calidad de los registros de los procesos, su trazabilidad, disponibilidad inmediata de datos y estadística. Pero, carecemos en el momento actual de un programa único para todos los servicios de hemoterapia del país y su conexión a una red, para intercambio de información por el número de cédula de identidad del donante y/o paciente manteniendo la confidencialidad. A su vez, los servicios computarizados deben tener un sistema alternativo de registro de datos en caso que el sistema electrónico no esté disponible. Los registros deben guardarse por lo menos durante cinco años.

El decreto PE 317/994 reglamenta los aspectos de bioseguridad en el ámbito del funcionamiento de los Laboratorios y Servicios de Hemoterapia del Sistema Nacional con el fin de mejorar las condiciones y formas de trabajo, minimizando los riesgos y efectuando una efectiva prevención de accidentes.

En el año 2000, con la llegada del nuevo milenio, el MSP aplica la Resolución GMC del MERCOSUR número 41/2000 a nivel nacional mediante el decreto PE 384/000 de fecha 26 de diciembre, que establece el “Reglamento Técnico de los Niveles de Complejidad de los Servicios de Hemoterapia”. En él se establecen cuatro niveles de estructura y función de los servicios de Hemoterapia. Se encuentra en vigencia para establecer la habilitación y registro de cada uno de los servicios. Relacionado con la aplicación de este decreto el MSP-ASSE-SNS publican en julio del 2001 una “Guía de Evaluación de las Unidades de Medicina Transfusional”. Este es un documento, de uso nacional, adaptado de la Guía de Inspección de Unidades de Medicina Transfusional elaborado por el grupo técnico del MERCOSUR.

De forma simultánea al decreto PE 384/000, se adopta la Resolución GMC del MERCOSUR número 42/2000 para su aplicación nacional. A través del decreto PE 385/000 entra en vigencia a partir del 9/01/2001 el “Reglamento Técnico de Medicina Transfusional”. Uruguay fue el primer país de los integrantes del MERCOSUR en aplicar estas resoluciones inclusive algunos miembros aún no lo han hecho. En este reglamento vigente se establece que las Unidades de Hemoterapia o Servicios de Medicina Transfusional estarán

a cargo de un Jefe o Director que deberá ser médico especialista en Hemoterapia. Propone que la donación de sangre debe ser voluntaria y altruista. Determina criterios técnicos para los donantes de sangre, la hemaféresis, los receptores, la transfusión de hemocomponentes y hemoderivados, las complicaciones transfusionales, la transfusión autóloga, las células progenitoras hematopoyéticas, sobre los registros y el control de calidad. También a partir de este decreto se comienza a realizar de forma obligatoria a todos los donantes de sangre la técnica serológica para la determinación de los anticuerpos anti-core del virus de la hepatitis B y para los virus linfotrópicos humanos tipo I/II (HTLV-I/II) que se suman a las ya existentes para sífilis, Chagas, antígeno Australia o de superficie para hepatitis B, hepatitis C y Virus de Inmunodeficiencia humana tipo 1-2 (VIH 1-2).

En abril de 2001, el SNS publica la “Guía para la indicación de la transfusión de sangre y hemocomponentes” con el fin de racionalizar su uso a nivel clínico y dando cumplimiento a la resolución CD41.R15 de la OPS del 27 de setiembre de 1999 que establece en el literal d) “la promoción en los estados parte del uso eficiente de las unidades de sangre donadas en la Región”. El stock de hemocomponentes de un servicio de Medicina Transfusional no sólo depende de la afluencia de donantes de sangre sino también del número de transfusiones y de su correcta indicación basada en un estricto balance riesgo beneficio.

La sangre y los hemocomponentes son un producto biológico de disponibilidad limitada y alto costo. Pese a todos los esfuerzos realizados para garantizar la seguridad de los productos, su transfusión conlleva un riesgo de reacciones adversas por lo cual su indicación debe basarse en todos los casos a un criterio terapéutico estrictamente avalado por criterios aceptados universalmente y adecuadamente valorados en cada caso. Por el contrario, el riesgo de complicaciones secundarias a la transfusión no debe impedir su realización cuando la transfusión está correctamente indicada. Todo médico habilitado por la autoridad sanitaria nacional para ejercer la medicina puede indicar una transfusión de sangre, hemocomponente y/o hemoderivado, no obstante alentamos a los profesionales a solicitar la consulta con el médico especialista en Medicina Transfusional toda vez que lo

crean conveniente para la evaluación conjunta del paciente.

El lema adoptado por la OMS para el año 2000, promocionando el Día Mundial de la Salud el 7 de abril, fue “La seguridad de la sangre depende de mí”. En la 41 Asamblea de Ministros de Salud de OPS que se llevó a cabo en San Juan de Puerto Rico en octubre de 1999, se aprobó la recomendación de que los países miembros dieran prioridad a los temas relacionados con la organización de la transfusión de sangre y en especial, a todos los aspectos atinentes a la obtención de sangre a partir de “donantes voluntarios”, a los efectos de asegurar la disponibilidad de sangre para transfusión y mejorar su calidad y seguridad en la región de las Américas.

Del 11 al 13 de setiembre de 1999 se llevó a cabo en Montevideo un Taller Multidisciplinario convocado por la OPS con el objeto de aunar criterios en la región respecto a la selección de donantes y generar una guía que fuera lo más efectiva posible para preservar los derechos de los donantes, la responsabilidad de los Bancos de Sangre en la producción de los hemocomponentes y el derecho de los pacientes a la transfusión de los mismos con una garantía de calidad adecuada. Las conclusiones del taller fueron consideradas por el SNS conjuntamente con la Sociedad de Hemoterapia e Inmunohematología del Uruguay elaborándose un documento que fue publicado como “Selección de Donantes en Bancos de Sangre” por el MSP-ASSE-SNS en cooperación con OPS/OMS en junio del 2001. Básicamente, el proceso de selección del donante comprende una estrategia en la cual participan múltiples factores en forma sinérgica. En primer lugar, la información brindada al donante debe ser clara y precisa para que éste pueda actuar con la mayor libertad posible y en forma responsable. Las dos etapas siguientes son la entrevista y el examen físico seguida por la extracción y la autoexclusión confidencial. Las tres instancias deben cumplirse cuidadosamente logrando la confianza y credibilidad del donante y en forma sinérgica ya que una sin la otra no tienen la misma eficiencia. En el documento se adjunta un modelo de “Historia del Donante” y un modelo de cartilla de Autoexclusión para empleo luego de la donación mientras se realiza la recuperación del donante mediante la ingesta de líquidos y sólidos.



Figura 3.10 - Sello emitido por el Correo del Uruguay para conmemorar el día nacional del donante de sangre voluntario de sangre (12 de noviembre de 2001).

Este documento se complementa en junio del 2001 con la edición, por parte del MSP, ASSE y el SNS con la cooperación técnica de la OPS/OMS, del “Manual del Entrevistador” para la adecuada selección de donantes con el fin de establecer rechazos transitorios o definitivos similares en todos los servicios de hemoterapia. Establece además, que la guía de selección, deberá ser periódicamente revisada y actualizada de acuerdo a la evolución del conocimiento epidemiológico relacionado con la Medicina Transfusional.

El 12 de noviembre del año 2001, el Correo del Uruguay realiza una emisión de 25.000 sellos con un valor de 12 pesos cada uno para conmemorar el día nacional del donante voluntario (figura 3.10). Utiliza el logotipo la “gotita” o el “gotito” habitualmente empleado por el SNS con fines promocionales y se ha podido comprobar que esta representación gráfica irradia una alegría y simpatía contagiosa que identifica los fines sociales y principios éticos del SNS (www.snsangreuy.org).

En marzo del 2002, también el MSP, ASSE y el SNS establecen las pautas para la “Consejería en el Banco de Sangre” para ser aplicadas en aquellos donantes con estudios serológicos reactivos para alguna o varias enfermedades infecciosas transmisibles por la sangre. Estas pautas están organizadas en tres partes. En la parte I se aborda la temática de la

consejería en el donante de sangre en general, en la parte II la consejería específica para el HTLV y en la parte III se incluyen documentos y material informativo para ser empleados en toda la dinámica de la consejería como material de apoyo, para facilitar la tarea y mejorar su eficacia.

En Diciembre de 2004 se realiza una revisión del algoritmo para el tamizaje serológico de marcadores infecciosos en las unidades de sangre y hemocomponentes extraídos con fines transfusionales (MSP-ASSE-SNS). Teniendo en cuenta el tiempo transcurrido desde la adopción del algoritmo original en 1997 y la experiencia adquirida con su aplicación se considera oportuno realizar una actualización del mismo. A partir de este momento se establece un algoritmo diagnóstico por técnicas manuales y otro para cuando se utilizan equipos automatizados.

En marzo del año 2006, a través del decreto PE 56/006 se aprueba la nueva reglamentación que regula el Sistema Nacional de Intercambio de Hemocomponentes entre los Servicios de Sangre el cual deroga específicamente los artículos 6, 7, y 8 del decreto PE 392/979.

En la actualidad, en el año 2010, existen 80 servicios de hemoterapia, públicos y privados, registrados en el SNS de los cuales 24 se encuentran en Montevideo y 56 en el interior del país.

En el período de diez años, 1995-2004, se extrajeron un promedio de 109.235 unidades de sangre por año en todo el país con un valor máximo de 116.626 en 1998 y un mínimo de 96.993 en el 2004. Del total de unidades donadas se extrajo el 11% en los servicios de hemoterapia oficiales, el 36% en ASSE, el 43% en las Instituciones de Asistencia Médica Colectiva (IAMC) y el 10% en servicios privados.

Sin embargo, según la OPS un país necesita para lograr la autosuficiencia de hemocomponentes que el 5% de la población done sangre. En Uruguay los donantes de sangre corresponden al 2,93% por lo cual sería necesario un 2,07% adicional lo cual corresponde a 68.310 donaciones. La OMS por su parte establece como nivel de autosuficiencia 50.000 donaciones por millón de habitantes por lo cual en Uruguay faltarían 68.007 donaciones. Como vemos ambos índices de autosuficiencia son muy similares.

En el mismo período de tiempo (1995-2004) el promedio de hemocomponentes transfundidos fue de 162.379 con un valor máximo en 1996 de 178.829 y un mínimo de 139.951 en el año 2001. Del total de hemocomponentes transfundidos los servicios oficiales realizaron el 10% de las transfusiones, ASSE el 33%, las IAMC el 43% y los privados el 10% restante.

Se hicieron un total de 18.693 transfusiones autólogas con un promedio anual de 1870 lo cual corresponde al 1,15% del total de transfusiones o el 1,71% del total de las donaciones.

En Europa se realizan un promedio de 4,2% de transfusiones autólogas aunque la diferencia entre los países es considerable y oscila entre el 8,9% en Italia y el 0,05% en el Reino Unido. En España existe un porcentaje del 2,4% de transfusiones autólogas.

Los médicos deben conocer las técnicas de transfusión autóloga como depósito preoperatorio, hemodilución normovolémica y la recuperación de sangre del campo quirúrgico con el fin de asegurar un uso racional de la sangre y evitar los riesgos inmunológicos o de transmitir infecciones de la transfusión alogénica. Además, estimula la eritropoyesis del paciente y aumenta las reservas de hemocomponentes por lo cual la transfusión autóloga no sólo aporta beneficios para los pacientes sino también para los servicios de Medicina Transfusional.

El primer caso de donación autóloga de predepósito fue descrito por Grant en 1921 en un paciente con policitemia al que se le realizaría una intervención quirúrgica pues presentaba un meningioma (20). En 1937 Fantus describe un programa de autotransfusión preoperatorio en el Cook County Hospital de Chicago (21) y en 1955 Boerema y Fierstra publican su experiencia en cincuenta casos (22). En 1968 Turner describe su utilización en los procedimientos de cirugía ortopédica (23) y luego, la transfusión autóloga, fue utilizada por otros investigadores en casos de cirugía electiva.

Milles, Langston y D'Alessandro publican sus primeras experiencias con autotransfusión en 1962 y 1963 (24). En 1971, en una monografía, mostraron el valor de la transfusión autóloga como alternativa a la infusión de eritrocitos alogénicos. Utilizando la autotransfusión eliminaron la necesidad de transfusión alogénica en el 53,8% de los pacientes de

cirugía torácica en el Sanatorio de Tuberculosis de Chicago durante la década de 1960. Extrajeron 534 unidades de sangre autóloga de 458 pacientes con hemoglobina mayor de 11 g/dl. En 98% de las unidades autólogas fueron transfundidas en el intraoperatorio o en las 48 horas siguientes (25). Estos autores fueron pioneros en demostrar la utilidad de la donación autóloga preoperatoria y la posterior autotransfusión.

Todas estas publicaciones mostraban que la autotransfusión mediante el método de predepósito era un procedimiento seguro pero su uso no había sido evaluado en niños o adolescentes. Cowell y Swickard en Wilmington, Delaware-USA realizan un programa de autotransfusión en 193 niños y adultos jóvenes que serían sometidos a cirugía ortopédica de elección. Los pacientes donaron entre una y tres unidades preoperatorias que fueron utilizadas para reemplazar la pérdida de sangre durante la cirugía.

Se realizaron un total de 444 flebotomías en los 193 pacientes sometidos a 203 cirugías.

Este programa demostró ser beneficioso para niños y adultos jóvenes. Los resultados preliminares fueron leídos en el Annual Meeting of The American Academy of Orthopedic Surgeons que se realizó en Washington el 2 de febrero de 1972 y luego publicados en el Journal of Bone and Joint Surgery de 1974 (26).

Otra práctica de transfusión autóloga es la hemodilución normovolémica. La hemodilución intencional indica la reducción proporcional de todos los constituyentes celulares y plasmáticos de la sangre. La pérdida sanguínea es reemplazada por fluidos no sanguíneos.

En el siglo XVII Christopher Wren inyecta vino en las venas de perros como sustituto sanguíneo. En 1880 de la misma forma se utiliza leche de vaca. Unos pocos años después, en 1876 Barnes y Little describen el uso de la solución salina para restablecer el equilibrio del sistema circulatorio (27).

En 1886, el cirujano suizo Kronecker demostró que los perros sobrevivían a un intercambio isovolémico de sangre con solución salina al 9,6% hasta que el hematocrito no se reduce por debajo del 15%. El término hemodilución fue introducido por primera vez por Zuhdi y colaboradores (28) en 1963 cuando reportan una cirugía con la máquina corazón-pulmón

y la utilización de una solución de dextrosa al 5% para inducir la hemodilución.

Takaori y Safar (29) en 1966 reportan la supervivencia de perros diluidos hasta una concentración de hemoglobina de 3 gramos/dl. Messmer y colaboradores (30) en 1967 demuestran que los perros sobreviven a un recambio sanguíneo realizado con dextrán 60 (coloide) hasta una concentración de hemoglobina de 2,8 gramos en sangre. Estos autores, en 1973 fueron los primeros en demostrar que la hemodilución normovolémica no comprometía la oxigenación de varios órganos. Este grupo de investigadores introducen en 1974 la hemodilución normovolémica como alternativa a la transfusión de sangre homóloga principalmente en cirugía (31). En 1996, un reporte de la American Society of Anesthesiologists Task Force on Blood Component Therapy determina que la hemodilución normovolémica es un método efectivo y no costoso para reducir el riesgo de la exposición a sangre alogénica (32).

La teoría detrás de la hemodilución normovolémica es muy simple: la sangre autóloga para cirugía es provista por la inducción y tolerancia de una anemia normovolémica intraoperatoria. Antes de la cirugía la sangre es extraída y el volumen es reemplazado con soluciones cristaloides y/o coloides para mantener al paciente normovolémico. La sangre que circula por el paciente permanece diluida por lo cual la masa eritrocitaria que se pierde en la cirugía está disminuida. La sangre autóloga se retorna al paciente de acuerdo al nivel de hemoglobina durante la cirugía o cuando finaliza para proveer de eritrocitos y factores de la coagulación. Este mecanismo teóricamente reduce las necesidades de hemocomponentes alogénicos. Ofrece algunas ventajas frente a la sangre autóloga obtenida por predepósito. Su costo es menor dado que el paciente no debe concurrir varias veces al centro hospitalario, su realización consume menos tiempo, necesita una mínima preparación preoperatoria por lo cual, se puede utilizar tanto en cirugías de urgencia como de coordinación. Como se realiza el día de la cirugía, en el mismo bloque quirúrgico, no tiene costos administrativos, de almacenamiento y de estudios de laboratorio. La edad no es una contraindicación pero no se aconseja realizar hemodilución normovolémica en pacientes con enfermedad coronaria, pulmonar o con alteraciones de la hemostasis.

Un tercer método de autotransfusión es la recuperación de sangre autóloga del campo operatorio para su posterior infusión en el mismo acto quirúrgico.

En 1886 Duncan (33) usó autotransfusión durante una cirugía de amputación de un miembro. Extrajo la sangre del miembro amputado retornándola al paciente por vía femoral.

En 1914, el obstetra alemán Theis (34) retornó exitosamente la sangre perdida por la rotura de gestaciones ectópicas en tres mujeres utilizando gasas como filtro.

En 1818 el obstetra inglés Blundell (35) también realiza transfusión autóloga obteniendo sangre vaginal de una paciente con una hemorragia posparto severa. La sangre colectada del sitio de sangrado era lavada con solución salina y reinfundida a la paciente. Esta técnica, poco sofisticada, resultaba en un 75% de mortalidad pero marcó el inicio de la recuperación de la pérdida de sangre por hemorragia como método de transfusión autóloga.

Loyal Davis y Harvey Cushing reportan en 1925 el uso beneficioso de este tipo de transfusión autóloga en neurocirugías (36). En 1951, Stager hace una revisión de la literatura médica encontrando que la autotransfusión había sido utilizada con éxito en 500 pacientes (37).

En 1953, Dyer and Klebanoff (27) desarrollan un equipo para recuperar sangre a través de los laboratorios Bentley siendo ésta la primera máquina en ser utilizada para autotransfusión. Sin embargo, este equipo fue discontinuado porque la sangre se contaminaba con impurezas que frecuentemente producían coagulopatías y embolismo gaseoso. Luego, en 1976, la empresa Haemonetics utilizando el Bowl de Latham desarrolla un "CellSaver" que es utilizado en el intra y postoperatorio inmediato. Haemonetics ha seguido desarrollando el modelo CellSaver y a partir de 2005 produce el equipo OrthoPat para ser utilizado en cirugía ortopédica con una capacidad para procesar 800 a 1000 ml de sangre por hora y con la posibilidad de eliminar contaminantes químicos y celulares.

Este sistema de autotransfusión, de tamaño pequeño y totalmente automatizado, realiza un lavado y concentración efectivos de la sangre recuperada, eliminando del 70 al 95% de los leucocitos, plaquetas, hemoglobina libre, citoquinas y potasio, al tiempo que recupera el

80% de los eritrocitos. Puede ser utilizado también para la recuperación de sangre absorbida en compresas y gasas durante la cirugía (38).

A partir de 1988 Dideco desarrolla los modelos Stat, Stat P, Compact y actualmente el Electa (39). Nosotros utilizamos, a partir de la década de 1990, la máquina Stap P en la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos en cirugías cardiovasculares, ortopédicas o neurológicas pero este modelo ha sido discontinuado. En la Cátedra de Medicina Transfusional, en el Hospital de Clínicas, aún funciona el modelo Compact el cual se utiliza para los trasplantes hepáticos dado el convenio entre el Hospital Militar y la Universidad de la República.

Actualmente existen, además de los mencionados, varios modelos de equipos recuperadores de sangre del campo quirúrgico como el CAT (contionous autotransfusion system) de Fresenius, el Cobe-Brat y el Sequestra 1000 de Medtronic (40) los cuales no se encuentran disponibles en nuestro país.

De acuerdo a las guías de la American Association of Blood Banks (AABB) la sangre obtenida del campo quirúrgico y lavada en solución salina debe ser reinfundida dentro de las seis horas siguientes si se mantiene a temperatura ambiente. En caso de refrigerarla, a temperatura de heladera, dentro de las seis horas de obtenida, se puede almacenar por un período de 24 horas (41). Nosotros sugerimos infundirla en el mismo acto quirúrgico o al finalizar el mismo.

La transfusión de hemocomponentes y hemoderivados ha dejado de ser un problema estrictamente médico para ser asumido por la comunidad. Ésta, dona la sangre voluntariamente a través de sus individuos sanos, la red de servicios de Medicina Transfusional la estudian y procesan para obtener los hemocomponentes y hemoderivados lo más seguros posibles, los cuales son almacenados por períodos de tiempo variables, hasta que algún individuo enfermo de la misma comunidad los necesite. En suma, la sangre así como sus componentes o fracciones pertenecen siempre a la comunidad. Como respuesta a ello, las naciones, las fuerzas políticas y las autoridades sanitarias han determinado prioridad a la necesidad de organizar los servicios de Medicina Transfusional de forma eficiente, evitando la falta de sangre, hemocomponentes

y hemoderivados, asegurando la autosuficiencia y mejorando la calidad y seguridad de la hemoterapia.

Las fallas en el sistema transfusional se transforman generalmente en críticas de la gestión de los poderes políticos-gubernamentales y de toda la sociedad. La eficiencia de este sistema por el contrario es un índice de la madurez y solidaridad de la comunidad y para lograrla influyen una serie de factores siendo los más importantes culturales, económicos, desarrollo del sistema sanitario, recursos humanos, geográficos y demográficos.

Por tanto, la medicina transfusional no sólo gravita en el uso clínico adecuado de los hemocomponentes y hemoderivados (hemoterapia) sino también en la Salud Pública mediante la prevención y diagnóstico de enfermedades transmisibles por la sangre o mediante la prevención de la aloinmunización sobre todo en gestantes o en mujeres en edad reproductiva activa. Participa directamente del trasplante de órganos sólidos (riñón, reno-pancreático, corazón y hepático) así como de la infusión de células progenitoras adultas (terapia celular y medicina regenerativa).

Casi todos los servicios de hemoterapia existentes hoy en todo el país han surgido, de una manera descentralizada, como respuesta a las necesidades asistenciales de los centros de salud públicos o privados; pero ninguno de ellos es autosuficiente en hemocomponentes y hemoderivados. La mayoría realizan la cadena vena a vena es decir, la selección del donante, la extracción, el tamizaje serológico, la preparación de hemocomponentes y su infusión lo cual, al trabajar en forma individual, aumenta los costos operativos.

Sólo unos pocos realizan Medicina Transfusional.

Existe un proyecto del MSP-ASSE-SNS de transformación de la organización de los servicios de hemoterapia con el fin de concentrar la actividad en cuatro centros regionales que realicen la cobertura asistencial en todo el país. El SNS se transformaría en el Banco de Sangre Metropolitano que cubriría a la población de Montevideo. La ubicación de los otros tres Banco de Sangre Regionales se han seleccionado de acuerdo a las vías de comunicación, área de influencia, infraestructura actual, volumen de producción y por haberse ya perfilado en tal sentido en forma espontánea. La regional norte

abarcaría a los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro, Rivera y Tacuarembó proponiéndose como sede la ciudad de Paysandú. En la regional Suroeste se agruparían los departamentos de Soriano, Colonia, San José, Flores, Florida, Canelones y Durazno siendo su sede la ciudad de San José. Por último, la regional Este incluye los departamentos de Cerro Largo, Treinta y Tres, Maldonado, Lavalleja y Rocha siendo la sede la ciudad de Maldonado. Los Bancos de Sangre Regionales extraerían sangre a donantes voluntarios en su sede o en colectas externas en unidades móviles o mediante la adecuación de áreas de extracción en los lugares de trabajo o en congregaciones de la comunidad. A su vez recibiría unidades extraídas en los centros departamentales. En el centro regional se centraliza la preparación de hemocomponentes, el tamizaje serológico de enfermedades transmisibles e inmunohematología y se enviarían los componentes aptos producidos igualitariamente con las garantías de seguridad necesarias a los servicios de hemoterapia de los centros asistenciales de la región. A su vez, el Centro Regional centralizaría la producción de hemoderivados a través del convenio con la Universidad Nacional de Córdoba y su almacenamiento y distribución a los servicios de hemoterapia de acuerdo a las necesidades asistenciales racionalizando, de esta manera, el uso de hemocomponentes y hemoderivados. Los servicios de hemoterapia departamentales se dedicarían exclusivamente a la parte final de la cadena vena a vena, el uso clínico de los hemocomponentes y hemoderivados así como los procedimientos de hemaféresis terapéutica y de transfusión autóloga en todas sus modalidades. Se integrará al médico hemoterapeuta a los equipos de salud hematológicos, oncológicos, quirúrgicos, obstétricos, pediátricos, neonatales, intensivistas, etc, con el fin de asegurar un tratamiento efectivo, racional y personalizado de cada paciente. Actuará además en programas de prevención y de seguimiento y desarrollará la hemovigilancia.

El 20 de octubre de 2009, se ha inaugurado el primer Centro Regional en la ciudad de Maldonado (Figura 3.11) que se utilizará como plan piloto para el desarrollo de los demás centros regionales. En el desarrollo del proyecto han participado activamente técnicos del MSP-ASSE-SNS, la Cátedra de Medicina Transfusional, médicos y técnicos



Figura 3.11 - Hemocentro del departamento de Maldonado, Uruguay.

del departamento de Maldonado así como representantes de la comunidad. La comunidad de Maldonado a través de la fundación Hemovida ha promovido el desarrollo de este Hemocentro y ha colaborado con su aporte económico recaudado principalmente por la donación de los individuos de la sociedad lo cual se ha utilizado principalmente en la compra del instrumental necesario para su funcionamiento. El resto de la economía, en su mayoría aportado por el MSP-ASSE se utilizó en el desarrollo de la planta física, recursos humanos y materiales. A su vez, el terreno anexo al Hospital de Maldonado fue donado por la Intendencia Municipal de Maldonado y aprobado por la Junta Departamental. Este centro abarcará a nivel departamental como regional a la asistencia pública y privada siguiendo los objetivos del Plan Nacional Integrado de Salud.

Por último, se propone una integración regional de la Medicina Transfusional a nivel del MERCOSUR, el HEMOSUR y el Grupo Iberoamericano de Medicina Transfusional con el fin de desarrollar programas nacionales y regionales, fomentar la donación de sangre voluntaria y altruista, capacitar recursos humanos, realizar intercambio de información científica y práctica y estimular el desarrollo tecnológico de la Medicina Transfusional con el objetivo de lograr una mayor seguridad y calidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Giangrande PLF. The history of blood transfusión. *Br J Haematol* 2000;110:758-767.
- Shamov WN. The transfusion of stored cadaver blood. *Lancet* 1937;ii:306-309.
- Yudin SS. Transfusion of stored cadaver blood. Practical considerations: the first 1000 cases. *Lancet* 1937;2:361-366.
- Schmidt PJ. Cadaver blood. *Transfusion Today* 2008;74:15 www.isbt-web.org 15/12/2009.
- Farmer DF. Transfusion of cadaver blood: a contribution to the history of blood transfusions. *Bull AABB* 1960;13:229-234.
- Vaughn J. Blood transfusion in the USSR. *Transfusion* 1967;7:212-219.
- Grifols JR. The contribution of Dr Duran-Jorda to the advancement and development of European blood transfusion. *ISBT Science Series* 2007;2:134-138.
- Ramsey G, Schmidt PJ. Transfusion Medicine in Chicago, before and after the "Blood Bank". *Transfus Med Rev* 2009;23:310-321.
- Schmidt PJ. The men behind the plasma war. *Transfusion Today* 2009;79:16. www.isbt-web.org. 24/2/2010.
- Schmidt PJ. John Elliott and the evolution of American blood banking, 1934 to 1954. *Transfusion* 2000;40:608-612.
- De Kleine W. The history of the American National Red Cross, Vol XXXIII-B : Early history of Red Cross participation in civilian blood donor services and in the blood procurement program for the Army and Navy. Washington DC: American National Red Cross, 1950.
- Utter GH, Lee TH, Rivers R, Montalvo L, Wen L, Chafets DM, Reed WF, Busch MP. Microchimerism decades after transfusion among combat-injured US veterans from Vietnam, Korean and World War II conflicts. *Transfusion* 2008;48:1609-1615.
- Fleig C. Les aux minérales. Milieux vitaux. Sérothérapie artificielle et balnéothérapie tissulaire par leur injection dans le organisme. Academie des Sciences et Lettres de Montpellier. Mémoires de la Section de Médecine, 2^e série 3, 1 :1910.
- Weil R. Sodium citrate in the transfusion of blood. *JAMA* 1915;64:425.
- Robertson OH. A method of citrated blood transfusion. *Br Med J* 1918;i:477-479.
- Mollison PL. The introduction of citrate as an anticoagulant for transfusion and of glucose as a red cell preservative. *Br J Haematol* 2000;108:13-18.
- Loutit JF, Mollison PL, Young IM. Citric acid-sodium citrate-glucose mixture for blood storage. *Q J Exp Physiol* 1943;32:183-202.
- Gibson JG, Gregory CB, Button LN. Citrate-phosphate-dextrose solution for preservation of human blood: a further report. *Transfusion* 1961;1:280-287.
- Fischer H. Preservation of human blood in the liquid state: the practical importance of some new media. 10th Congress of ISBT Estocolmo. *Bibl Haematol* 1965;231:616.
- Grant FC. Autotransfusion. *Ann Surg* 1921 ;74 :253-254.
- Fantus B. The therapy of the Cook County Hospital. Blood Preservation. *JAMA* 1937;109:128-131.
- Boerema I, Fierstra A. Prae-operatieve blordverdunding. *Nederlandsch Tijdschr Geneesk* 1955;99:69-73.
- Turner RS. Autologous blood for surgical autotransfusion. In Proceedings of The American Academy of Orthopaedic Surgeons. *J Bone Joint Surg* 1968;50-A:834.
- Milles G, Langston HT, Dalessandro W. Experiencies with autotransfusions. *Surg Gynecol Obstet* 1962 ;115 :689-694.
- Milles G, Langston HT, Dalessandro W. Autologous transfusion. Springfield, Illinois, Charles C Thomas, 1971.
- Cowell HR, Swickard JW. Autotransfusion in children's orthopaedics. *J Bone Joint Surg* 1974;56:908-912.
- Spence RK. Brief history of bloodless medicine and surgery. In *Transfusion Medicine and Alternatives to Blood Transfusion*. NATA Textbook Edition 2000. www.nataonline.com 23/11/2009.
- Zuhdi N, Carey J, Cutter J, Rader L, Greer A. Intentional hemodilution. *Arch Surg* 1963;87:554-559.
- Takaori M, Safar P. Treatment of massive hemorrhage with colloid and crystalloid solutions: studies in dogs. *JAMA* 1967;199:297-302.
- Messmer K, Sunder-Plassmann L, Jesch F, Gornandt L, Sinagowitz E, Kessler M, Pfeiffer R, Horn E, Hoper J, Joachimsmeier K. Oxygen supply to the tissues during limited normovolemic hemodilution. *Res Exp Med (Berl)* 1973;159:152-166.
- Shander A, Perelman S. The long and winding road of acute normovolemic hemodilution. *Transfusion* 2006;46:1075-1079.
- Practice guidelines for blood component therapy. A report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Blood Component Therapy. *Anesthesiology* 1996;84:732-747.
- Duncan J. On re-infusion of blood in primary and other amputations. *Br Med J* 1886;1:192.
- Theis J. Zur behandlung der extrauterine gravidataet. *Zbl. Gynaek* 1914;38:1191-1194.
- Blundell J. Experiments on the transfusion of blood by syringe. *Medical-Chirurgical Journal* 1918;9:59.
- Davis L, Cushing L. Experiences with blood replacement during and after major in tracraniel operations. *Surg Gynec Obstet* 1925;40:310-316.
- Stager W. Blood conservation by autotransfusion. *Arch Surg* 1951;63:78-83.
- Muñoz M, Ariza D, Romero A, Muñoz E, Prat I, Gómez A. Evaluación del sistema de autotransfusión OrthoPAT utilizando modelos experimentales de simulación de recuperación de sangre intra y postoperatoria. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 2005;52:321-327.
- Valbonesi M, Florio G, Bruni R, Lercari G, Morelli F. Preliminary evaluation of a new autologous blood cell separator Dideco Electa. *Transfus Apher Sci* 2001 ;24 :215.
- Kochamba GS, Pfeffer TA, Sintek CF, Khonsari S. Intraoperative autotransfusion reduce blood loss after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1996;61:900-903.
- Manual Técnico de la American Association of Blood Banks (AABB). 15^a Ed en español. Buenos Aires –Argentina, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. 2007:132.

Historia de los Hemocomponentes y Hemoderivados

El concepto de hemocomponentes fue introducido por el químico norteamericano Edwin Cohn quien sostenía que administrar sangre total era un derroche dado que este fluido contenía numerosos constituyentes útiles. Hasta 1940, el plasma era separado de la sangre y conservado en forma líquida pero luego, la compañía Sharp and Dohme de Filadelfia produce el plasma liofilizado que es utilizado para el tratamiento del shock en los heridos de la segunda guerra mundial. Edwin Cohn, trabajando en la Facultad de Medicina de Harvard en Boston, conocía que al añadir alcohol etílico al plasma las proteínas precipitaban en el fondo del tubo de ensayo pero, todas juntas. Al agregar concentraciones crecientes de alcohol etílico en distintas condiciones de sal, temperatura y pH observó que unas proteínas precipitaban antes que las demás (1). A este método se le denominó fraccionamiento plasmático y se utilizó luego como procedimiento industrial para la preparación de hemoderivados de origen humano. Edwin Cohn publica en 1946 “A brief survey of its chemical components and their natural function and clinical uses” en el primer número de la revista *Blood*, publicación oficial de la American Society of Hematology (ASH) que se encuentra en la biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional (ver figura 4.1) (*Blood* 1946;1:3-9).

La fracción I del método de Cohn contenía principalmente fibrinógeno y factores de la coagulación mientras que en las fracciones II y III precipitaban las globulinas. La fracción IV era una mezcla de varias proteínas y en la V precipitaba la albúmina. Dada su capacidad osmótica, cinco veces superior a la del plasma, la albúmina fue rápidamente utilizada como

expansor plasmático en el tratamiento del shock hipovolémico. Así, el 7 de diciembre de 1941 cuando los japoneses invaden Pearl Harbor el stock de albúmina fue enviado totalmente y utilizado por primera vez para tratar los heridos de guerra sin estudios clínicos previos (2). Por tanto, la albúmina fue el primer hemoderivado transfundido con fines terapéuticos.

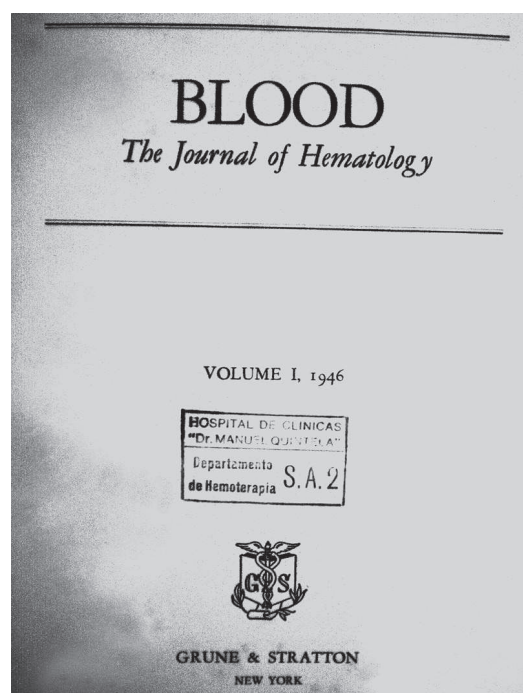


Figura 4.1 - Primer número de la revista *Blood* (año 1946). Publicación oficial de la American Society of Hematology (ASH). Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional.

Cuando Isidor Radvin, un cirujano de la Universidad de Pensilvania, regresa a Boston desde Pearl Harbor, relata en su informe el tratamiento con albúmina en 87 pacientes con

un resultado prometedor con lo cual, sugiere al gobierno de USA que ya realizaba el programa de plasma liofilizado que se embarque en desarrollar también uno para la producción de albúmina en gran escala (3). Pero, cada vez más cantidad de sangre donada se necesitaba para cubrir ambos programas. La American Red Cross basada en la colecta anterior de sangre a gran escala para el envío de plasma a Inglaterra tomó la tarea abriendo varios centros de donación en grandes ciudades.

La Cruz Roja recogía la sangre, utilizaba hielo para su transporte ferroviario en cajas herméticas hacia los nueve laboratorios farmacéuticos que producían plasma liofilizado. Las botellas conteniendo una unidad de plasma liofilizado eran colocadas en latas protectoras y le adjuntaban agua destilada como reconstituyente. Sin embargo, una persona que deseara realizar una transfusión de este plasma debía abrir el embalaje y las latas, extraer el tubo de goma con una aguja en cada extremo, introducir éstas a través de los tapones de goma de las dos botellas (plasma liofilizado y agua destilada), agitarlo y luego administrarlo. El procedimiento duraba 15 minutos o más lo cual es una eternidad cuando se trabaja bajo el fuego enemigo (3).

Por el contrario, la albúmina podía ser envasada como líquido de empleo inmediato y sin riesgo de contaminación bacteriana ya que en el laboratorio de Cohn se le realizaba un proceso de pasteurización es decir, un calentamiento a 60 grados durante 10 horas. Se necesitaba una semana para obtener cada lote de albúmina en estas condiciones. Mientras que Cohn y su grupo de químicos seguían trabajando en el laboratorio de Boston en el perfeccionamiento del método del fraccionamiento plasmático, las empresas afiliadas, como Squibb and Sons, Cutter, Lederle entre otras, construyeron plantas asociadas con grandes tanques de acero, frigoríficos y centrifugadoras lo que le daban aspecto similar a las plantas lecheras. Sus directores se ponían semanalmente en contacto con Boston para conocer los últimos perfeccionamientos del proceso industrial. Hacia finales de 1943 la Armada de USA, al comienzo de la segunda guerra mundial, había recibido más de dos millones y medio de unidades de plasma liofilizado y 125.000 ampollas de albúmina.

Cuando los militares entregaron el exce-

dente de plasma liofilizado de la guerra a la Cruz Roja, ésta comenzó a utilizarla en pacientes. Tras el fallecimiento de varias personas por hepatitis lo retiró como producto terapéutico y contrató a la compañía Squibb para que lo fraccionase en hemoderivados que no transmitieran la enfermedad. Entre estos productos figuraban las inmunoglobulinas.

En 1830 Liebig y Mulder analizan una sustancia que denominan “albumin” (4) y en 1862 Schmidt desarrolla el término “globulin” para las proteínas plasmáticas que son insolubles en agua y precipitaban en pequeños glóbulos (5). En 1894 Gurber cristaliza la albúmina equina (6). En 1930, el bioquímico sueco Tiselius inventa el procedimiento de electroforesis en búfer para separar las proteínas plasmáticas (7). En 1939, Tiselius y Kabat (8) demuestran que en la fracción gamma del plasma contiene grandes cantidades de inmunoglobulinas. Por sus investigaciones Tiselius recibe el premio Nobel de Química en 1948 y en su honor es designado con su nombre un cráter de la luna.

La primera inmunoglobulina fue descubierta por Bence Jones en 1845 (9) y la última fue la IgE en 1966 (10). La Organización Mundial de la Salud en el encuentro de Praga en 1964 establece el sistema de nomenclatura para designar a las inmunoglobulinas (11).

En el siglo XX dos grupos de investigadores revolucionaron el fraccionamiento de las proteínas plasmáticas. Uno en Boston, liderado como ya vimos por Edwin Cohn que mediante el uso de etanol, durante la segunda guerra mundial obtuvo grandes cantidades de albúmina e inmunoglobulinas para uso terapéutico. El segundo fue el Instituto Behring el cual usando una técnica de precipitación con Rivanol separa las inmunoglobulinas. El Rivanol precipita la albúmina, el fibrinógeno y las alfa y betaglobulinas mientras que las gamma permanecen en solución (12).

En 1901, Emil von Behring, bacteriólogo alemán, es el primer ganador del premio Nobel de Fisiología y Medicina por sus trabajos en terapia sérica. Descubre la antitoxina del tétanos en 1890 y la de la difteria en 1891. En 1904 crea Behringwerke que produce sueros y vacunas para combatir enfermedades infecciosas. En 1946, Behringwerke es la primera compañía en Europa en comenzar con el fraccionamiento plasmático a gran es-

cala a partir de plasma humano (www.cslbehring.com).

La albúmina fue la primera proteína plasmática en obtener licencia para su uso terapéutico el 27 de agosto de 1941. La IgG para uso intramuscular la obtuvo en 1943. La primera IgG de uso intravenoso el 11 de setiembre de 1981 (13) y en el 2006 la de uso subcutáneo (www.cslbehring.com). Actualmente, la albúmina se utiliza para el tratamiento del shock, en quemados, hipoalbuminemias por síndrome nefrótico, cirrosis, insuficiencia hepática, ascitis, en ictericia del recién nacido y como líquido de reemplazo en una solución al 4% en los recambios plasmáticos terapéuticos.

En 1962, Kistler y Nitschmann realizan una modificación del método de Cohn para obtener un mayor rendimiento en la obtención de proteínas plasmáticas (14).

Luego, el método de Cohn o de Kistler se combinan con la cromatografía con la finalidad de aumentar el rendimiento, la pureza y la seguridad de los hemoderivados así como para la obtención de nuevas proteínas plasmáticas de uso terapéutico: factores de la coagulación, inhibidores (proteína C, AT III) y la alfa 1 antitripsina que es un inhibidor de las proteasas séricas sintetizado en el hígado. Cuando falta este inhibidor las proteasas séricas atacan las paredes del alvéolo produciendo enfisema. Este inhibidor fue descubierto, purificado y caracterizado por primera vez en 1955 por Berhringwerke.

Mikhail Tswett, botánico ruso, es quien describe los principios de las técnicas de separación de los pigmentos vegetales (clorofila) y usa por primera vez el término cromatografía en 1906 (15). La introducción del intercambio de iones por Peterson y Sobers (16), las columnas de sephadex por Porath y Flodin en 1959 (17), el gel de poliacrilamida en 1961 y la agarosa en 1964 por Hjertén (18) iniciaron la revolución de las técnicas de absorción y purificación de las proteínas plasmáticas.

Actualmente más de 22 millones de litros de plasma se usan mundialmente para el fraccionamiento industrial con el fin de obtener hemoderivados para uso terapéutico. Entre 50.000 Kg de albúmina y 25.000 de inmunoglobulinas son distribuidos anualmente en USA (19).

Las inmunoglobulinas obtenidas del fraccionamiento plasmático demostraron ser efec-

tivas para la prevención de una variedad de infecciones. Uno de los primeros trabajos, realizado por Ordman en 1944 demostró la protección temporal contra la rubéola producida por la administración de inmunoglobulina (20).

Utilizando el material proporcionado por Squibb los investigadores aislaron la gammaglobulina para la polio. En 1951, el doctor William McDowell Hammond de la Universidad de Pittsburg, demostró que la inyección de esta gammaglobulina podía crear una resistencia pasiva frente a la polio por lo menos por un mes (21).

Además de ser utilizadas para el tratamiento de la inmunodeficiencia primaria, el uso clínico de las inmunoglobulinas polivalentes intravenosas se ha expandido significativamente. La FDA ha aprobado su uso en seis condiciones clínicas: inmunodeficiencia primaria, púrpura trombocitopénico autoinmune (PTA), prevención de infecciones bacterianas en pacientes con hipogammaglobulinemia, infecciones bacterianas recurrentes o ambas asociadas a leucemia linfocítica crónica, prevención de las infecciones luego de un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH), prevención de infecciones en pacientes HIV pediátricos y en la enfermedad de Kawasaki (22).

En los mielomas con hipogammaglobulinemia e infecciones recurrentes y la inmunomodulación en el síndrome de Guillain-Barré son indicaciones aceptadas por la European Medicine Agency (EMA). Sin embargo su uso clínico se ha expandido a otras patologías como inmunodeficiencias secundarias, neuroinmunológicas, infecciones, dermatológicas, hematológicas, auto y aloinmunes, inflamatorias e inclusive idiopáticas.

Otra inmunoglobulina derivada del plasma humano fue utilizada para la prevención de la aloinmunización anti-D primero en gestantes RhD negativas y luego también en receptores RhD negativos transfundidos con hemocomponentes RhD positivos.

A partir de 1960 dos grupos de investigadores, uno en Liverpool y otro en New York, comienzan a realizar trabajos experimentales sobre la prevención de la inmunización anti-D. El grupo de Liverpool basa sus trabajos en los hallazgos anteriores de la protección ABO y la técnica de Kleihauer. El grupo de New

York en cambio, desarrolla sus trabajos experimentales basados en el trabajo de Theobald Smith de 1909 en que demuestra que la respuesta inmune frente al toxoide de la difteria podía ser inhibida por un exceso de antitoxina (23). En 1960, Finn en un simposio médico en Liverpool sugiere “It might be posible to destroy any fetal red cell found in their maternal circulation following delivery by means of a suitable antibody. If successful, this would prevent the development of erythroblastosis, so mimicking natural protection afforded by ABO incompatibility”. El primer trabajo científico fue realizado por Stern y colaboradores en 1961 en el cual a 16 hombres voluntarios 0Rh D negativos se les inyectó repetidamente eritrocitos 0RhD positivos sensibilizados con suero anti-D. Ninguno de los 16 hombres se inmunizó mientras que en subsecuentes inyecciones de eritrocitos no sensibilizados en 10 hombres produjo la inmunización anti-D en 5, después de la segunda inyección (24).

También en 1961, Finn y colaboradores determinan la incidencia y cantidad de eritrocitos fetales en la circulación de 256 madres Rh negativas. Los glóbulos rojos fetales fueron encontrados en 30 muestras (11.7%) y en cuatro (1.6%) el volumen de la hemorragia feto-materna fue superior a 5 ml (25). En la misma publicación, Finn y colaboradores inyectan hombres voluntarios Rh negativos con eritrocitos Rh positivos. La siguiente administración intravenosa de suero anti-D conteniendo inmunoglobulinas M y G, acelera la desaparición de los eritrocitos Rh positivos. Concluyen que una manera de prevenir la inmunización anti-D, en madres ABO compatibles, puede ser mediante la rápida destrucción de los glóbulos rojos fetales inyectando suero anti-D.

En 1963 Clarke y colaboradores, del grupo de Liverpool, realizan tres series de experimentos donde hombres voluntarios Rh negativos son inyectados con eritrocitos Rh positivos. En el primer experimento, 30 minutos después de la inyección de los eritrocitos, a la mitad de los hombres se les administró plasma conteniendo anticuerpos anti-D del tipo IgM lo cual tendría un efecto de protección similar a los anticuerpos ABO. En el segundo, la mitad de los hombres voluntarios fueron inyectados con 30-50 ml de plasma que contenía anticuerpos anti-D del tipo IgG.

Ocho de 13 hombres tratados con anti-D IgM desarrollan inmunización (54%) mientras que 1 de 11 no tratados (9%) se inmuniza. Concluyen que los anticuerpos anti-D completos (IgM) no sólo no previenen la inmunización anti-D sino que parecen estimularla. Tres de 21 hombres tratados con IgG anti-D (14%) y 11 de los 21 no tratados (54%) desarrollan inmunización lo cual, sugiere una protección mediante anticuerpos incompletos (IgG). En el tercer trabajo, se demuestra que los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos IgG desaparecen más rápido de la circulación sanguínea (26).

También en 1963, Freda, Gorman y Pollack del grupo de New York, introducen una preparación con alto título de anti-D (inmunoglobulina anti-D) en sus programas de investigación. Freda y Gorman que pertenecían a la Universidad de Columbia y Pollack a la Ortho Research Foundation, demuestran que la administración de 5 ml de esta inmunoglobulina anti-D 24 horas después de la inyección de eritrocitos Rh positivos a 5 hombres voluntarios Rh negativos, mensualmente durante 5 meses, produce una protección total para la inmunización anti-D. Sin embargo, 4 de 5 hombres no protegidos con esta inmunoglobulina anti-D se inmunizan (27). En 1964, el mismo grupo de investigadores, establece que la inmunoglobulina anti-D protege el 100% de los voluntarios cuando es administrada por vía intramuscular hasta 72 horas después de la inyección de eritrocitos Rh positivos (28).

El primer trabajo sobre la prevención de la inmunización anti-D en gestantes fue publicado por Clarke y Sheppard del grupo de Liverpool en 1965 en una carta enviada a la revista *The Lancet* (29). En ninguna de las 27 madres tratadas en el post-parto con inmunoglobulina anti-D (IgG) se encontró signos de inmunización en un seguimiento realizado a los 3 y 6 meses del parto mientras que 9 de las 29 no protegidas con inmunoglobulina se inmunizaron. También en una carta enviada a la revista *The Lancet* ese mismo año (30), Freda y colaboradores del grupo de New York reportan sus resultados clínicos preliminares. Ninguna de las 34 madres que recibieron inmunoglobulina anti-D postparto mostró inmunización a los 6 y 18 meses después del parto mientras que 6 de las 56 del grupo control se inmunizaron al antígeno D. En 1967, se publica un trabajo

sobre la tasa de inmunización en 329 madres tratadas con inmunoglobulina anti-D y 337 no tratadas recopiladas del grupo inglés, americano y alemán (31). Mientras que ninguna del grupo tratado se inmunizó, 46 (14%) del grupo control presentaron anticuerpos anti-D.

En 1968 se aprueba por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos de Norteamérica (USA) la primera preparación comercial de inmunoglobulina anti-D, Rhogam de Ortho Diagnostics.

En 1969, se obtiene en Francia la primera preparación de inmunoglobulina anti-D para uso intravenoso (32). La administración de 300 mcg de IgG anti-D junto con 0,5 ml de eritrocitos Rh pos demostró un "clearance" de 6 horas para la vía intravenosa y de más de 48 horas para la intramuscular.

Con el seguimiento de número mayor de madres que recibieron inmunoglobulina anti-D postparto se demostró que el riesgo de inmunización anti D no era cero como lo mostraban los trabajos hasta aquí publicados.

En 1971 Woodrow y colaboradores establecen que en 1.015 mujeres estudiadas el fallo de la inmunoprofilaxis postparto es de 3 en 844 casos (0,36%) después del primer parto y de 3 en 171 (1,8%) luego del segundo (33).

Schneider recoge la información estadística de la inmunoprofilaxis en 10 países encontrando que 93 de 22.239 mujeres (0,42%) tratadas con IgG anti-D desarrollan inmunización después del primer parto y 303 de 5266 (5,75%) de las que no recibieron inmunoglobulina lo cual se corresponde con una tasa de protección del 92,8%. Luego de la segunda gestación la tasa fue de 90,3% (34).

En 1971, Pollack y colaboradores establecen la relación de la cantidad de inmunoglobulina anti-D (IgRhD) necesaria para neutralizar un volumen determinado de eritrocitos fetales : 20 microgramos (mcg) de Ig RhD por ml de eritrocitos o 10 mcg por ml de sangre fetal (35).

En 1954, Bruce Chown trabajando en el Laboratorio Rhesus del Hospital Pediátrico de Winnipeg en Canadá demuestra que la hemorragia feto materna es la responsable de la inmunización materna. Subsecuentemente, Zipursky y colaboradores utilizando la técnica de Kleihauer, fueron los primeros investigadores en reconocer que en un número determinado de gestaciones existía un pasaje

transplacentario de eritrocitos fetales antes del parto (36).

La primera profilaxis RhD antenatal, durante la gestación, fue publicada por John Bowman en Manitoba-Canadá en 1978. En la fase inicial 300 mcg de IgRhD eran administrados a las 34 semanas de gestación. Luego, se cambia el protocolo y se administra una dosis a las 28 semanas y otra similar a las 34. Por último, la profilaxis antenatal se redujo a una sola dosis a las 28 semanas de gestación y una segunda IgRhD era administrada post parto si el recién nacido era Rh positivo (37). John (Jack) Bowman se graduó como pediatra en 1956 y trabajó en el Hospital Pediátrico de Winnipeg en Canadá. En 1946 conoce a Bruce Chown cuando dona sangre siendo estudiante de medicina. Como su san-gre era del grupo RhD negativo Chown la utilizaba periódicamente para realizar exsanguinotransfusiones a los recién nacidos con enfermedad hemolítica perinatal. Bowman fue luego uno de los tres pediatras que Bruce Chown entrenó para realizar exsanguinotransfusiones a los recién nacidos por lo cual tuvo una activa participación en el Departamento de Neonatología del Hospital. En 1961, fue denominado director clínico del Laboratorio Rhesus mientras que Bruce Chown se dedicaba exclusivamente a la investigación. En 1963 cuando Liley de Nueva Zelanda describe la transfusión intrauterina intraperitoneal Bowman aplica rápidamente esta técnica en una nurse de Winnipeg que presentaba una gestación con una afectación fetal severa. El 2 de enero de 1964 se reporta la primera transfusión intrauterina en América del Norte. Cuatro meses después nace el niño y la madre en gratitud se convierte en donante regular de plasma para obtener inmunoglobulina anti-D (37). En 1969, se crea por ley en Manitoba-Canadá el Instituto Rh de Winnipeg fundado por Chown, Bowman, Lewis y Bowles siendo nombrado director médico John Bowman.

En 1970, Bowman y Chown establecen contacto con el Jim Jamieson del Departamento de Química de la Universidad de Manitoba para que el plasma pueda ser fraccionado y obtener inmunoglobulina anti-D para la profilaxis de la enfermedad hemolítica perinatal.

Se construye un laboratorio en el Fort Garry Campus de la Universidad de Manitoba cercano al departamento de Química y se co-

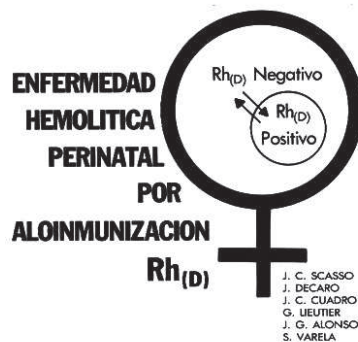
mienza a aplicar la técnica de fraccionamiento por columnas de DEAE-Sephadex descrita por Hans Hoppe en Hamburgo. El plasma era obtenido de mujeres RhD negativas inmunizadas con anticuerpos anti-D que lo donaban voluntariamente mediante plasmaféresis (37).

El laboratorio de fraccionamiento plasmático abrió sus puertas oficialmente en febrero de 1973. La inmunoglobulina anti-D se denominó inicialmente Winnipeg Rho y luego WinRho como se conoce actualmente. El producto era muy puro y podía ser administrado intravenoso mientras que las otras preparaciones de inmunoglobulinas presentes en el mercado de América del Norte como la RhoGam eran de uso intramuscular. Luego de aproximadamente 8 años, y mediante un trabajo clínico realizado por Bowman en 1980 WinRho recibe su aprobación para su uso general (37). En 1984, la dirección del Instituto decide vender el laboratorio de fraccionamiento plasmático a Apotex una compañía farmacéutica canadiense. El Instituto Rh pasa a denominarse a partir de ese momento Rh Institute Cangene Corporation. Cangene es actualmente una compañía productora de vacunas e inmunoglobulinas que funciona en el Campus de la Universidad de Manitoba en Canadá. El laboratorio Rh original forma parte actualmente de la Facultad de Música.

En suma, las dos mayores contribuciones del grupo de Winnipeg fue la aplicación de la inmunoprofilaxis antenatal y la producción de WinRho para uso intravenoso.

En 1979, publicamos en Uruguay el primer trabajo sobre la transfusión feto materna y la profilaxis por inmunoglobulina anti-D (38).

En 1982 se publican las primeras Normas para la Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Hemolítica por conflicto Rh donde en el capítulo 4 se exponen los protocolos de inmunoprofilaxis. Este trabajo recibe el Premio "Sandoz" de la Asociación Médica del Uruguay (39) y luego el MSP las adopta como normas nacionales. También en 1982 escribimos el capítulo "Inmunoprofilaxis", en colaboración con Andrew Miller asistente de la Cátedra de Hemoterapia y luego director del Servicio Nacional de Sangre, en el libro *Enfermedad Hemolítica Perinatal por conflicto RhD* que obtuvo el premio "El País" de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay (40) (figura 4.2).



1983 MONTEVIDEO- REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY



Figura 4.2 - Libro de Enfermedad Hemolítica Perinatal por Aloinmunización Rh(D). Premio "El País" 1982 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional.

En el año 2001 entra en vigencia el Reglamento Técnico del Mercosur Decreto PE 385/00 que en el capítulo L dedica cinco incisos a la profilaxis con inmunoglobulina anti-D en las gestantes Rh negativas (41).

En el nuevo milenio se introduce una inmunoglobulina anti-RhD de uso indistinto intramuscular o intravenoso (WinRho). Es preparada a partir de plasma humano por un proceso de cromatografía por lo cual se obtiene un producto de alta pureza comparado con los que utilizan el método de fraccionamiento de Cohn con etanol. Se agregan dos procesos de inactivación viral, el solvente-detergente (SD) para remover los virus con cubierta lipídica (HIV, hepatitis B y C) y la nanofiltración (F) para remover otros virus sin cubierta (parvovirus B19, hepatitis

A). Se obtiene de plasma humano proveniente exclusivamente de América del Norte con el fin de evitar la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD). No contiene preservativos y niveles mínimos de IgA. Puede ser usada también para el tratamiento del púrpura trombocitopénico autoinmune (PTA) en pacientes Rh (D) positivos no esplenectomizados o para inmunoprofilaxis en receptores Rh (D) negativos que reciben glóbulos Rh (D) positivos.

En el año 2003, realizamos una revisión sobre la Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP) producida actualmente no sólo por el antígeno D sino por una variedad de anticuerpos antieritrocitarios (42) (figura 4.3). En ella, proponemos un nuevo seguimiento inmunohematológico de la gestación y protocolos de inmunoprofilaxis por vía intravenosa o intramuscular.

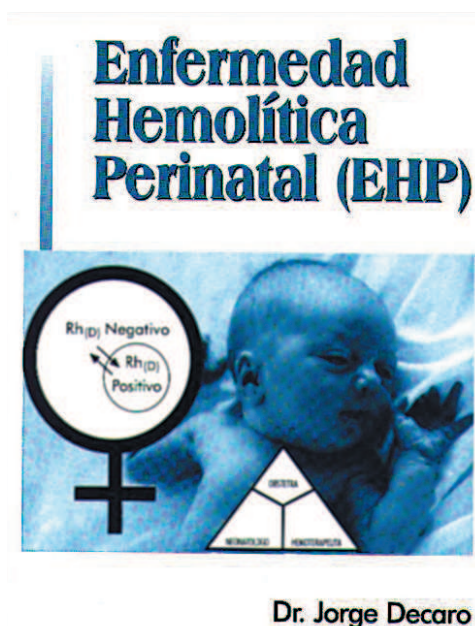


Figura 4.3 - Libro de Enfermedad Hemolítica Perinatal publicado en el año 2003. Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional.

En el año 2005, luego del trabajo en talleres de equipos multidisciplinarios, se logró un consenso sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la EHP que ha sido publicado (43) y presentado al programa prioritario de Salud y Género del MSP para su revisión y adopción como nuevas pautas nacionales.

Hasta 1980, las preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas no transmitieron infecciones virales. Sin embargo, en las dos décadas siguientes algunos casos de transmisión de hepatitis fueron reportados (44). A su vez, los preparados de inmunoglobulinas endovenosas pueden realizar una transferencia pasiva de anticuerpos anti-HBc, anti-HBs, anti-HAV o anti-parvovirus B19 lo cual si bien no son patógenas deben ser tenidas en cuenta para realizar un correcto diagnóstico del receptor. Inclusive muchos de estos anticuerpos neutralizantes presentes en las preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas son utilizados para el tratamiento de infecciones agudas como es el caso del parvovirus B19.

La terapéutica biológica, como es el caso de los hemoderivados, debe cumplir con tres condiciones: eficacia terapéutica, buena tolerancia clínica y seguridad (no deben transmitir infecciones). La contaminación viral de un producto biológico puede provenir de la fuente del material en este caso el plasma humano o de las soluciones introducidas en el proceso de elaboración del producto. Se interponen varios pasos para evitar la contaminación del producto final con patógenos. En primer lugar un estricto protocolo de selección de donantes y los estudios serológicos para infecciones transmisibles por la sangre.

En Europa, es obligatorio determinar en el plasma donado los anticuerpos anti-VIH 1-2, Anti-HCV así como el antígeno Australia (HBsAg) y una prueba de ácidos nucleicos para HCV. En USA, se realizan pruebas para anti-VIH 1-2, HBsAg, anti-HCV, sífilis y a partir de la década de 1990 test de ácidos nucleicos (NAT) para VIH-ARN y HCV-ARN.

Algunos patógenos son intracelulares y su posible transmisión está asociada a la transfusión de hemocomponentes pero no se transmiten por hemoderivados plasmáticos como por ejemplo los HTLV I-II, CMV, EBV, sífilis, Chagas y malaria. Por ello, hasta el momento actual, las pruebas obligatorias para el fraccionamiento plasmático son para la detección de VIH 1-2, HCV y HBsAg. En algunos países como el Uruguay, a partir del año 2001, se realiza el estudio para la determinación de los anticuerpos anti-HBcore con el fin de disminuir el riesgo de transmisión del HBV dado que cubre el período de la segunda ventana inmunológica. Sin embargo, un plasma que

ha sido encontrado con anticuerpos anti-HBcore pero HBsAg negativo y con un título suficiente de anticuerpos anti-HBs es aceptado para el fraccionamiento industrial lo cual es beneficioso dado que los anticuerpos anti-HBs pueden neutralizar un HBV que puede estar presente en el pool.

Además de estas pruebas individuales que se realizan en los servicios que colectan el plasma para fraccionamiento se estudian los ácidos nucleicos virales (VIH 1-2, HCV) por PCR en minipool de 500 individuos en las plantas fraccionadoras, antes de iniciar el proceso industrial. Luego, en el fraccionamiento plasmático se interponen procesos de remoción o de inactivación de patógenos principalmente virales. Los métodos de remoción son el fraccionamiento por etanol, la cromatografía y la nanofiltración que utilizando filtros con un tamaño del poro de 15 nanómetros elimina los virus sin cubierta lipídica como el de la hepatitis A y el parvovirus B19.

Los métodos de inactivación viral son el solvente detergente, la pasteurización, calentamiento por vapor o el tratamiento por calor seco del producto final.

Hasta la década de 1950 las hemofilias se trataban con sangre total y luego con plasma de origen humano. A partir de 1954 el plasma animal, bovino o porcino, fue usado en Oxford para el tratamiento de estas coagulopatías congénitas pero, su uso fue limitado por las frecuentes reacciones alérgicas que producía, particularmente en exposiciones repetidas (45).

A finales de la década de 1950 se desarrollan los primeros concentrados liofilizados de factores VIII (Kekwick y Wolf, 1957) (46) y de factor IX (Biggs en 1961) (47) que tienen como ventaja que se conoce la concentración de cada factor, se pueden almacenar en un refrigerador doméstico y no es necesario respetar la compatibilidad de grupo sanguíneo del receptor. Sin embargo, la producción industrial a gran escala de estos hemoderivados recién se obtuvo en los países desarrollados en la década de 1970. Se inicia el sueño de los pacientes hemofílicos dado que los concentrados comerciales no sólo mejoraban el tratamiento sino también la calidad de vida. Comienza por ejemplo el tratamiento domiciliario con factor VIII. Sin embargo, en la década de 1980, este sueño se ve truncado

por uno de los mayores desastres iatrogénicos de la historia de la medicina en la que muchos pacientes hemofílicos se infectaron con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y por el de la hepatitis C (HCV). A nivel mundial, entre el 70 a 90% de los pacientes que recibieron factores de la coagulación liofilizados se infectaron.

En 1983 la división Hyland de Baxter obtuvo la primera patente para el tratamiento térmico de los concentrados de FVIII. A partir de 1984 aparece el primer hemoderivado virus inactivado por calor y luego se desarrollan las técnicas de solvente-detergente para los virus de cubierta lipídica (VIH, HCV, HBV) y la nanofiltración para los virus desnudos como el virus de la hepatitis A (HAV) y el parvovirus B19.

En 1982 se realiza la clonación del factor IX y en 1984 la del factor VIII. En 1989, se publica el primer avance con el factor VIII recombinante. En 1996 aparece el factor VII recombinante y en 1997 el factor IX. Así, en la década de 1990 se producen los factores de coagulación recombinantes de primera generación y en el nuevo milenio, los de segunda y tercera. En los concentrados de FVIII recombinantes de segunda generación se sustituye la albúmina humana por sacarosa para evitar la posible transmisión del parvovirus B19 y el TTV y se someten igualmente a métodos de inactivación viral (solvente-detergente) y de remoción (nanofiltración). Los de tercera generación, además de carecer de proteínas humanas como la albúmina, tampoco presentan proteínas animales en su preparación.

Otros factores recombinantes disponibles en los últimos años son el FVII, la eritropoyetina (EPO), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y su versión glicosilada (Polyethylene glycol- PEG-G-CSF).

En Uruguay, en setiembre de 1998 se establece entre el MSP y la Federación Mundial de Hemofilia la “operación acceso” que es un programa destinado al tratamiento integral de la hemofilia en los países en vías de desarrollo. En una primera etapa, la FMH se compromete a donar al MSP concentrados de FVIII y FIX aprobados para su uso clínico por la FDA a razón de 2.5 millones de unidades por año durante tres años, con un costo aproximado de 1.200.000 dólares por año. Dichos concentrados comerciales serán distribuidos

por el SNS. A su vez el MSP se compromete a continuar con dicho programa de atención a los pacientes hemofílicos una vez concluida la operación acceso.

A partir de 1999, comienza a funcionar en Uruguay el Programa Nacional de Atención Integral de la Hemofilia (PAIHE) lo cual permite a la población de pacientes hemofílicos que se atienden en los servicios públicos recibir hemoderivados seguros, iniciar tratamientos domiciliarios, de profilaxis, mejorando la calidad de vida y la calidad de los tratamientos médicos-quirúrgicos. De los 230 pacientes hemofílicos diagnosticados según el censo 2008, 64 pacientes pediátricos se atienden en el centro de referencia del Centro Hospitalario Pereira Rossell que casualmente ha cumplido 100 años desde su apertura en 1909. Por otra parte, 55 pacientes adultos registrados se atienden en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas centro de referencia para el tratamiento de ésta y otras coagulopatías tanto para pacientes de Montevideo como del interior del país.

Ambos centros de referencia reciben la totalidad de los hemoderivados necesarios para los protocolos de tratamiento y profilaxis del PAIHE.

Cada 17 de abril se celebra el día mundial del paciente hemofílico y la propuesta de la WFH para el año 2009 fue “entre todos, un tratamiento mejor” destacando la importancia del tratamiento integral y multidisciplinario de esta patología.

En el año 1979, a través del Decreto PE 392/979 donde se fijan los cometidos del Servicio Nacional de Sangre (SNS), se establece el Programa de Pre-Procesamiento de Plasma (artículos 15 al 18) y el 11 de diciembre de 1984 se firma un Acuerdo Nacional para el intercambio de plasma y hemoderivados entre el Ministerio de Salud Pública (MSP) y la Universidad Nacional de Córdoba (UNC) en Argentina. Básicamente el acuerdo establece el envío de plasma desde Uruguay a la planta de la Universidad de Córdoba y ésta se compromete a enviar a nuestro país hemoderivados producidos a partir de ese plasma: Albúmina humana al 20% en frascos de 50, 20 y 10 ml, Inmunoglobulina G Endovenosa líquida en frascos de 2,5 gramos y factor VIII liofilizado en frascos de 250UI.

El Programa de Pre-Procesamiento (PPP)

de plasma se encarga de la recepción, acopio, control, evaluación, acondicionamiento y embalaje de las unidades de plasma enviados por los Bancos de Sangre coordinados con el programa a nivel nacional. Coordina el despacho y el traslado del plasma humano hacia el área de fraccionamiento industrial de acuerdo a las normativas vigentes y a las condiciones solicitadas por la Universidad de Córdoba.

Realiza la recepción, control de calidad y distribución de los hemoderivados obtenidos por retribución.

A partir del 2001, la UNC como ente industrializador, por ordenanza de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica (ANMAT) debe certificar a todos los entes recolectores de plasma. Cumpliendo con dicha disposición, a partir de esa fecha, personal de la UNC y el SNS han realizado la certificación de los servicios proveedores.

A partir del año 2001, al entrar en vigencia el Reglamento Técnico de Medicina Transfusional (decreto PE 385/00), a todos los donantes de sangre se les realiza, en forma obligatoria, la determinación de anticuerpos para sífilis, Chagas, HTLV I-II, anti-VIH 1-2, anti-HBc, anti-HCV y antígeno Australia (HBsAg). A partir del 2006, algunos servicios introducen en el diagnóstico serológico los test “combos” que determinan simultáneamente anticuerpos y antígenos virales para VIH y HCV con el fin de disminuir el período de ventana inmunológica. Estas pruebas combo tienen una efectividad similar a los NAT pero son de fácil realización en los Bancos de Sangre y son recomendados para países en vías de desarrollo (48).

En el año 2008, se promulga la Ley 18.307 donde se declara de interés nacional la sangre humana, plasma, hemocomponentes y hemoderivados con fines terapéuticos. El artículo quinto faculta al SNS a establecer un Programa de Plasmaféresis (en donantes) para obtener plasma fresco congelado para su fraccionamiento. El artículo seis faculta al MSP a contratar y establecer convenios que permitan el fraccionamiento de dicho plasma y crear una planta de fraccionamiento nacional. Además de aumentar la obtención de plasma esta ley tiene como objetivo también disponer la aplicación de criterios que hagan racional el uso de la sangre con fines terapéuticos (artí-

culo 3) con el fin de ahorrar el uso de plasma.

Sin embargo, hasta el momento actual nuestro país no es autosuficiente en la obtención de hemoderivados con fines terapéuticos. Esto se produce debido a varias circunstancias:

1 – El volumen de plasma enviado no supera los 10.000 litros anuales. Para lograr una autosuficiencia de hemoderivados el país debería fraccionar entre 30 y 50.000 litros anualmente. Si bien el año 1999 se enviaron 7.103 litros y en el 2008 se aumentó esta cifra a 9.490 litros aún estamos lejos de los niveles de autosuficiencia. De estos 9.490 litros 6.306 corresponden a plasma fresco y 3.184 a plasma conservado lo cual limita la obtención del FVIII como hemoderivado que se obtiene solamente del plasma fresco enviado.

2 – No todos los servicios de hemoterapia del país, públicos y privados, envían plasma al SNS.

3 – La obtención de plasma se realiza a partir de la centrifugación de la sangre total donada unitariamente y como plasma excedentario de los compromisos terapéuticos.

Es necesario implementar programas de plasmaféresis en donantes normales con el fin de obtener un volumen mayor de plasma fresco en cada procedimiento y a lo largo del año del mismo donante (no más de dos veces por semana separadas por lo menos 24 horas y no más de 24 donaciones al año) dado que los eritrocitos son devueltos en un circuito de circulación extracorpórea (www.fda.org).

Los “Standards of the American Association of Blood Bank (AABB)” en la sección H, en la página 29, de la edición 18th de 1997, establece la diferencia entre donante de plasma no frecuente (1 donación cada 4 semanas) y frecuente (más de una donación por mes). En los donantes infrecuentes no se requiere la realización de estudios de las proteínas séricas.

En los donantes frecuentes se permite por plasmaféresis manual la extracción de 500 ml por sesión y no más de un litro en 48 horas utilizando como fluido de reposición solución salina fisiológica. Si el donante pesa más de 80 Kg se permite extraer 600 ml por sesión y no más de 1200cc en 48 horas.

A su vez, se deben disminuir al mínimo las indicaciones de plasma y realizar una terapéutica específica con hemoderivados que tienen mejor efecto terapéutico, menos reacciones adversas y son más seguros.

Un programa de fraccionamiento por contrato, como el que tiene Uruguay, no sólo debe basarse en el costo y cantidad del plasma obtenido sino también en la calidad y seguridad de los procedimientos de acuerdo a la aplicación de buenas prácticas de manufactura (GMP, Good Manufacturing Practices). Recientemente, en el año 2005, la OMS ha publicado las recomendaciones que explican todos los requerimientos necesarios para la colecta de plasma para fraccionamiento (www.who.int/bloodproducts).

La seguridad del plasma obtenido depende de una correcta selección de los donantes, de los estudios serológicos realizados y de la eliminación o inactivación de los patógenos contaminantes.

La calidad del plasma depende de las buenas prácticas en los procesos de separación del plasma de la sangre total mediante centrífugas refrigeradas o plasmaféresis, del congelado rápido, del mantenimiento de la cadena de frío durante el almacenamiento y traslado hacia la planta procesadora así como de la aplicación de GMP en el proceso de fraccionamiento.

Finalmente, la seguridad y calidad del producto final debe ser evaluada en el tiempo mediante programas de hemovigilancia de los receptores de hemoderivados de origen plasmático.

Además de albúmina, inmunoglobulina G polivalente endovenosa y factor VIII que son los hemoderivados que el Uruguay recibe de la UNC actualmente del fraccionamiento industrial del plasma humano se obtienen otros productos como factores de la coagulación (FIX, FvW, FXI, fibrinógeno, FXIII, complejo protrombínico y complejo protrombínico activado), inhibidores (proteína C, AT-III, alfa-1 antitripsina, C1 inhibidor) selladores de fibrina para uso tópico, inmunoglobulinas de uso intramuscular (hepatitis A, hepatitis B, tétanos, rabia, varicella/zoster, anti-RhD), inmunoglobulina G intravenosa (CMV, hepatitis B, anti-RhD) o inmunoglobulina M. Una vez realizada la mezcla o “pool” de los plasmas individuales la primera etapa del fraccionamiento industrial es la crioprecipitación. De la fracción crioprecipitado se obtiene FVIII, FvW y fibrinógeno. Del sobrenadante tratado con etanol los factores IX, VII, complejo protrombínico (FII, VII, IX y

X) y proteína C. La siguiente precipitación es la fracción I de Cohn con la cual se obtiene el factor XIII y del sobrenadante el FXI y la AT III. En la fracción II/III las inmunoglobulinas, de la IV la alfa-1 antitripsina y finalmente de la fracción V la albúmina.

En Uruguay existen actualmente, por importación, hemoderivados plasmáticos como factores de la coagulación, FVIII de pureza intermedia que contienen aproximadamente la mitad de unidades de FvW, FVIII y FvW de alta pureza con niveles prácticamente similares de ambos factores, concentrado de FIX y concentrados de complejo protrombínico de segunda generación que además de los factores II, VII, IX y X vitamina K dependientes, contiene inhibidores como proteínas C, S y Z y heparina para disminuir el riesgo trombótico. También selladores de fibrina de uso tópico e inmunoglobulinas endovenosas o intramusculares. No contamos hasta el momento con inhibidores de la coagulación.

Podemos afirmar que en la actualidad tenemos los hemoderivados más seguros desde el punto de vista de la transmisión de patógenos los cuales (FVIII, FIX, Ig e IgRhD) están incluidos en la lista de medicamentos esenciales publicada por la OMS cuya última edición es de marzo del 2007 (www.who.int). Sin embargo, en el tratamiento de las hemofilias existe una paradoja, es decir una contradicción aparente. Pues bien, en el siglo de la biotecnología en el que se dispone de los mejores tratamientos para la enfermedad, la Federación Mundial de Hemofilia (FMH o WFH en inglés) establece que, a nivel mundial, el 70% de los pacientes no está diagnosticado y el 75% no está tratado. Pensamos pues que el objetivo fundamental será entonces lograr la “socialización” del tratamiento de las hemofilias.

A su vez, en el año 2000, las Américas y Europa consumían el 83% del FVIII derivado del plasma y la mayoría de los productos recombinantes. En el mismo estudio, Europa y América del Norte utilizan los tres cuartos de la producción de inmunoglobulina endovenosa mientras que África aproximadamente el 1% del total.

USA exporta más de 6.5 millones de litros de plasma anualmente principalmente a Europa y sobre todo a aquellos países de riesgo de transmisión de vCJD como Gran Bretaña.

Edwin Cohn sostenía que administrar sangre total constituía un derroche. Así, lo había demostrado con el plasma a partir de 1940. Ahora, una década después estimaba que podía separar los componentes celulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). De una unidad de sangre total pretendía obtener varias unidades de productos celulares utilizables. Llamaba a este enfoque “terapia con hemocomponentes o economía de la sangre”. Cohn presentó esta idea en 1949, en una conferencia organizada por el National Research Council y las Fuerzas Armadas de USA dado que los médicos que visitaron Hiroshima luego de la rendición, observaron que los rayos gamma producían un descenso importante de los componentes celulares de la sangre en los sobrevivientes de la explosión. Los estadounidenses comprendieron que en caso de una guerra atómica la sangre y sus componentes serían más vitales que nunca.

Cohn desarrolló una máquina para separar hemocomponentes celulares de la sangre total (49) que la presentó luego, en una conferencia en el Instituto Superior Técnico de Lisboa acompañado por su discípulo James Tullis. Para demostrar su funcionamiento en público él mismo se sometió a la extracción de sangre y mientras hablaba la máquina procesaba su sangre. Todas las superficies que entraban en contacto con la sangre estaban recubiertas de silicona para evitar la adhesión plaquetaria pero, el técnico había administrado demasiada silicona lo cual obturó un canal de salida aumentando la presión por detrás. Luego de más de cinco minutos de procedimiento algo estalló y la sangre del conferencista llovió sobre los oyentes de la primera fila. Mientras Cohn proseguía la exposición, los médicos de la primera fila fueron re-distribuidos en un sitio más seguro del auditorio. Todo el mundo comprendió la terapia con hemocomponentes celulares como siguiente fase de desarrollo del fraccionamiento de la sangre.

Pero, hasta el momento actual, la sangre era recogida en frascos de vidrio con citrato y las tubuladuras de goma transportaban, en un circuito abierto, los elementos de la sangre de un frasco a otro. Este sistema tenía riesgos de contaminación bacteriana o por pirógenos e inconvenientes como la rotura de los frascos en la centrifugación, la caramelización del citrato y la no viabilidad plaquetaria o

leucocitaria lo cual fue luego solucionado con el agregado de ácido cítrico al anticoagulante y de silicona a las paredes de vidrio. A su vez, para realizar una infusión rápida la única solución era infundir aire al frasco a través de una pera de goma.

Cohn comprendió que si deseaba realizar una terapia con hemocomponentes a gran escala debía sustituir el envase de vidrio por algo más práctico.

Del otro lado del laboratorio de Cohn en Boston trabajaba el cirujano Carl Walter, nacido en Cleveland, en procedimientos de asepsia desarrollando nuevos métodos de esterilización de instrumentos y de eliminación de contaminantes ambientales. Walter pensaba que los frascos de vidrio eran depósitos de contaminación puesto que la sangre entraba en contacto con el aire y para extraer componentes, cada tubo de goma o aguja era un punto de posible contaminación bacteriana. La solución era un recipiente de plástico flexible sin aire y con las tubuladuras, agujas y recipientes satélites anexados formando un circuito cerrado estéril.

Además, el recipiente debía ser lo suficientemente resistente para soportar los rudos traslados durante las guerras, poder ser lanzado desde un avión a baja altura y que con la sola presión de las manos aumentara su velocidad de infusión sin dañar los hemocomponentes. Trabajó años tratando de cristalizar esta idea hasta que encontró el polímero adecuado y con una bolsa plástica llena de sangre se dirigió al laboratorio de Cohn y la lanzó al suelo. Para probar su resistencia se subió en ella.

En 1935, Carl Walter fue uno de los fundadores de la compañía Fenwal Inc. con su amigo y pariente Wilfred Turenne que trabajaba como reparador de refrigeradores. En los primeros años de existencia Fenwal desarrolló termostatos industriales lo cual le permitió importantes ganancias. A partir de 1948 comienza a desarrollar bolsas plásticas (figura 6.1 en el capítulo 6). El nombre de la compañía se formaba por el apellido Fenn de un vecino de Walter que había aportado dinero para desarrollar la tecnología y las tres primeras letras de su propio apellido (Fen-Wal). En 1959, la compañía Baxter de Chicago, que se había fundado en 1931 como fabricante de soluciones intravenosas, compra Fenwal (www.latinoamerica.baxter.com).

Es de hacer notar que en la ciudad de Chicago donde se instala el primer Banco de Sangre en 1937 por Bernard Fantus, se desarrollan tres compañías que van ha incidir tecnológicamente en el desarrollo de la Medicina Transfusional como son Fenwal, Baxter y laboratorios Abbott.

En Uruguay, las bolsas plásticas se comienzan a utilizar en la década de 1980. Hasta ese entonces los recipientes para la sangre y el plasma eran los frascos de vidrio luego siliconados para obtener plaquetas (figura 4.4).



Figura 4.4 - Frascos de vidrio al vacío de 500 cc utilizados para extraer sangre en Uruguay hasta la década de 1980 (arriba). El frasco de la derecha conserva la etiqueta con el grupo sanguíneo y la fecha de extracción del 12 de setiembre de 1975. En la foto inferior frascos al vacío de distinta capacidad para extraer plasma de la sangre total.

Desde su inicio, las bolsas plásticas fueron sufriendo algunas modificaciones para perfeccionar su rendimiento y utilidad que se mantiene hasta el momento actual. La evolución en las soluciones anticoagulantes (ACD, CPD, CPD-A, CPD-Sagman) ha llevado a la

prolongación del período de almacenamiento de los eritrocitos de 21 a 42 días y en mejores condiciones mediante el agregado soluciones nutritivas (adenina y Sagman) (ver capítulo de historia de los Bancos de Sangre). Los cambios en los polímeros constituyentes de las bolsas satélites han prolongado la sobrevivencia plaquetaria *in vitro* a 3, 5 y últimamente a 7 días.

Se han incorporado filtros de leucoreducción “en línea” en las tubuladuras entre la bolsa madre y las satélites con el fin de obtener hemocomponentes celulares pobres en leucocitos antes de su almacenamiento (ver historia de la leucoreducción).

Se ha desarrollado una división en Y de la tubuladura, inmediatamente después de la aguja de extracción, con el fin de desviar los primeros 15 a 20 ml de sangre a una pequeña bolsa o a un tubo al vacío que se utilizan para realizar los estudios de laboratorio (figura 6.1). De esta manera el técnico no entra en contacto con la sangre del donante por un lado (bioseguridad) y por otro, la desviación de los primeros mililitros de sangre evita la contaminación bacteriana que se puede producir por los gérmenes de la piel en el momento de la punción (50).

En los últimos años se han instrumentado sistemas automáticos de preparación de hemocomponentes luego de la centrifugación diferencial y más recientemente, sobretodo en los países europeos, para la obtención de plaquetas del “buffy-coat”. Una mezcla de cuatro bolsas con buffy coat contiene una cantidad de plaquetas similar a los concentrados obtenidos por hemaféresis. Este procedimiento, Atreus de Caridien, lo observamos directamente en nuestra visita en el año 2007 al centro de Donación y Transfusión de la Comunidad Autónoma de Madrid.

El plasma sin fraccionar en hemoderivados, obtenido en una bolsa satélite luego de una centrifugación de la bolsa madre con sangre total y anticoagulante, es también considerado un hemocomponente que puede ser conservado a temperaturas bajo cero durante largos períodos de tiempo sin perder sus propiedades fisiológicas. Cuando la congelación rápida es realizada dentro de las seis horas siguientes a la extracción se considera Plasma Fresco (PF) y mantiene la concentración de los factores lábiles por ejemplo el FVIII y FV de la coagulación. Cuando se mantiene a tem-

peratura ambiente, de heladera o es congelado después del período indicado se denomina Plasma Conservado (PC).

En 1965, Judith Pool y colaboradores (51) en California, USA demuestran que la crioprecipitación del plasma concentra algunas proteínas como el factor VIII, FvW y fibrinógeno (FI). Así, nace un nuevo hemocomponente, el crioprecipitado (C), que es utilizado para el tratamiento de los pacientes con hemofilia A, enfermedad de von Willebrand y para la reposición de fibrinógeno sobre todo en las hemorragias masivas.

El producto final tenía un volumen de 50 ml con una concentración de factores similar al plasma lo cual, permitió alcanzar concentraciones mayores sin producir sobrecargas de volumen como con el plasma, sobre todo para la realización de cirugías o procedimientos invasivos en este tipo de pacientes. En Uruguay, se comenzó a utilizar el crioprecipitado en la década de 1970 pero en frascos de vidrio. Actualmente, ha sido sustituido por los concentrados comerciales de factores plasmáticos mucho más eficientes y seguros por lo cual muchos servicios ya no lo preparan.

Al igual que en los hemoderivados desarrollados por la industria farmacéutica los hemocomponentes están soportando métodos de remoción e inactivación viral.

Cada día nuevas técnicas de diagnóstico aparecen pero también nuevos agentes patógenos son reconocidos y el riesgo potencial de transmisión por la sangre aumenta. Con cada nuevo agente patógeno identificado un nuevo test diagnóstico debe ser desarrollado, aprobado, manufacturado e implementado. En esa loca carrera aumentamos sensiblemente los costos sin poder alcanzar hasta el momento hemocomponentes con riesgo cero y de uso universal.

Por ello, la investigación científica se ha volcado, en los últimos años, hacia el otro extremo: la eliminación o inactivación de los agentes patógenos (virus, bacterias y parásitos) de los componentes o derivados sanguíneos con el fin de obtener productos estériles o con riesgo cero sin alterar la función y sin producir efectos adversos en el receptor.

Las técnicas de inactivación o eliminación de agentes infecciosos más reportadas hasta el momento utilizan un tratamiento térmico (calor seco, vapor caliente, pasteuriza-

ción), por irradiación (ultravioleta, gamma), por remoción (ultrafiltración, nanofiltración) o químico (solvente-detergente, azul de metileno, psoralen, riboflavina).

Desde hace años se están utilizando alguno de estos métodos o la combinación de ellos para evitar la transmisión de agentes patógenos en hemoderivados. Por ejemplo, la albúmina humana sufre un proceso de pasteurización es decir, un calentamiento a 60 grados por 10 horas, siendo éste uno de los procedimientos más antiguos.

Luego de la catástrofe producida por el SIDA los concentrados de los factores de la coagulación son inactivados por calor seco o húmedo asociados a solvente detergente.

La inmunoglobulina anti-D SDF de uso intravenoso e intramuscular, recientemente incorporada en nuestro país, está doblemente inactivada, con solvente detergente (SD) que elimina los virus con cubierta lipídica (VIH, HBV, HCV) y por nanofiltración (F) para virus sin cubierta lipídica (parvovirus B19, HAV). Pero, en este campo, el de los hemoderivados, la biotecnología se ha desarrollado rápidamente obteniendo productos recombinantes, como ya vimos, sin riesgo de transmisión de infecciones.

En los hemocomponentes en cambio donde la biotecnología no ha podido producir sustitutos de los elementos celulares, se han desarrollado en los últimos años técnicas de inactivación de patógenos con resultados muy satisfactorios.

La mayoría de estos métodos utilizan compuestos, como el psoralen, azul de metileno o riboflavina, que tienen gran afinidad con los ácidos nucleicos provocando un daño permanente e irreversible en las bacterias, virus y parásitos mediante el agregado, por lo general, de irradiación ultravioleta (52). Las células que carecen de núcleo como las plaquetas y los glóbulos rojos y por supuesto el plasma no son afectados por este sistema. Sin embargo, esta tecnología no puede aplicarse para las infusiones de células progenitoras hematopoyéticas (stem cells) o de linfocitos y/o granulocitos por ser células nucleadas. Pero, esta técnica de inactivación haría innecesaria la irradiación gamma de los hemocomponentes celulares con el fin de evitar la reacción de injerto versus huésped como se realiza en el momento actual (53).

Por lo menos cuatro firmas comerciales, han desarrollado procedimientos para inactivar patógenos en los hemocomponentes. Baxter Healthcare Corporation (Chicago, Illinois) y Cerus Corporation (Concord, California) han ideado un sistema de inactivación de patógenos denominado Intercept Blood System que consiste en el agregado de psoralen sintético S59 para los concentrados de plaquetas y plasma mientras que utiliza el psoralen S303 para los concentrados de glóbulos rojos con una irradiación de luz ultravioleta durante no más de 10 minutos. Esta tecnología fue primeramente desarrollada en concentrados plaquetarios a los que se les agregó altos niveles de patógenos previamente a la inactivación fotoquímica y al comportamiento in vivo de los concentrados inactivados. Un reciente estudio toxicológico fue desarrollado para determinar la seguridad de esta nueva tecnología que usa psoralen y luz ultravioleta (54). El 15 de marzo del 2003 la revista Blood de la American Society of Hematology publica los resultados del trabajo denominado euroSPRITE, un trabajo europeo multicéntrico, clínico fase III, realizado para confirmar la eficacia terapéutica y seguridad del sistema Intercept en los concentrados plaquetarios obtenidos de buffy coat y transfundidos en pool (55). Concentrados de plaquetas convencionales y tratados con el sistema Intercept fueron suministrados a 103 pacientes con trombocitopenia por cáncer o trasplante de células madres hematopoyéticas pertenecientes a centros asistenciales del Reino Unido, Francia, Holanda y Suecia. Los resultados de este estudio mostraron que los concentrados plaquetarios a los que se les aplicó esta tecnología de inactivación de patógenos, establecida para aumentar la seguridad sanguínea, no sufrieron alteraciones de la función in vivo, sin producir además, aumento de reacciones adversas en el receptor. Esto fue el factor determinante para que el sistema Intercept fuera aprobado para su uso clínico en Europa a partir del año 2003. Tuvimos oportunidad de observar esta nueva tecnología precisamente en el servicio de Donación de Sangre de la Cruz Roja de Madrid en el año 2007. Se ha demostrado, que esta técnica inactiva patógenos que contengan ARN o ADN (inhibe la replicación) como por ejemplo virus con cubierta lipídica (el HIV 1-2, HBV, HCV,

CMV y HTLV) o sin ella (parvovirus B19), bacterias gram negativas (*Yersinia enterocolitica*, *E. Coli*) o gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *aureus* o el *Bacillus cereus*), protozoarios (*Tripanosoma Cruzi*), *Treponema pallidum* y patógenos emergentes como el virus del NO y el coronavirus del SARS. La mayoría de estos trabajos fueron presentados en el congreso de la American Association of Blood Bank (AABB) en noviembre del 2003 y en el de la American Association of Hematology (ASH) en diciembre del 2003, ambos realizados en San Diego-California.

En un trabajo reciente se evaluó la aplicación de esta tecnología en las plaquetas obtenidas por aféresis no mostrando el procedimiento de inactivación la alteración de la función plaquetaria *in vitro* (56). El sistema Intercept ha demostrado también ser efectivo para inactivar los leucocitos contaminantes de los concentrados plaquetarios (inhibición de la replicación y de la síntesis de citoquinas) lo cual puede utilizarse para prevenir la reacción de injerto versus huésped que hasta ahora era suprimida por la irradiación gamma (57). Antes de aplicar esta tecnología a la inactivación de patógenos se usó el 8-methoxypsoralen con luz ultravioleta (PUVA) en el tratamiento de la psoriasis y como terapia *ex vivo* del linfoma cutáneo a células T o síndrome de Sézary. El psoralen puede provocar reacciones alérgicas en algunas personas y eritema en los neonatos que están bajo tratamiento de fototerapia. En un trabajo multicéntrico europeo se evaluó la seguridad de 5106 transfusiones de plaquetas inactivadas por Intercept Blood System demostrándose que en el 99.2% de las transfusiones se presentaron sin reacciones adversas atribuibles a esta tecnología (58).

Otra empresa Gambro BCT (actualmente Caridien) conjuntamente con Navigant Biotechnologies han desarrollado una tecnología de reducción de patógenos (PRT) de los hemocomponentes basados en el mismo principio pero utilizando riboflavina (vitamina B2) y luz ultravioleta en lugar de psoralen, para el tratamiento de los concentrados plaquetarios (59). Este sistema puede aplicarse para la inactivación de patógenos en plasma, concentrados de plaquetas y glóbulos rojos.

Se utiliza también el azul de metileno junto a la luz ultravioleta (Maco-Pharma Maco-Tro-

nic System) para la inactivación de patógenos en el plasma humano (60). Si bien con esta técnica no se alteraría la función de los factores de la coagulación existiría un pequeño descenso en la concentración de los mismos (61). En un trabajo reciente (62), el plasma tratado con azul de metileno fue menos efectivo que el plasma fresco (FFP) en el tratamiento de pacientes con púrpura trombocitopénico trombótico (PTT) mediante recambio plasmático.

A partir de 1991, la compañía Octapharma produce el primer plasma virus inactivado para transfusión (Octaplas), congelado o liofilizado. Hasta el momento con más de dos millones de unidades transfundidas no existen reportes de transmisión viral.

En marzo del 2007 se realiza, en Ontario-Canadá una conferencia de consenso sobre todos los procedimientos de inactivación de patógenos y cuyas conclusiones y revisiones han sido publicadas en enero de 2008 (63).

Por último, se realizaron dos trabajos para evaluar el costo beneficio de la técnica de inactivación de patógenos, uno en España (64) y otro en USA (65). En ambos se llega a la conclusión que costo-efectividad del sistema Intercept es similar al generado por otras intervenciones en seguridad transfusional como los test de ácidos nucleicos (NAT).

Sin embargo, esta tecnología de inactivación de hemocomponentes tiene como ventajas frente a los NAT que no existe período de ventana inmunológica, que se cubre un amplio espectro de gérmenes patógenos inclusive aquellos emergentes como el virus NO y el coronavirus (SARS) y elimina la necesidad de aplicar irradiación gamma a los hemocomponentes celulares para evitar la reacción de injerto versus huésped.

Si bien pensamos que con el desarrollo de esta tecnología, en un futuro cercano, lleguemos a tener riesgo cero para la transmisión de enfermedades infecciosas por la sangre, la gran pregunta es si esta tecnología alcanzará a todos los receptores de transfusiones del planeta tierra cuando en la actualidad el 80% de la población mundial tiene acceso solamente al 20% de la reserva mundial de sangre tamizada (www.who.int).

Una mañana de setiembre, estando en su despacho hablando por teléfono con su amigo el químico George Scatchard de Massachusetts, Edwin Cohn sufrió un derrame cerebral

masivo muriendo unos días más tarde en el hospital de Boston a los 71 años de edad.

Como decía su amigo Scatchard “Cohn no era un hombre sino dos” y creo que todos los hemoterapeutas estamos de acuerdo con esta afirmación dado que desarrolló primero el fraccionamiento plasmático lo que permitió la terapia con hemoderivados y luego, su equipo de separación de componentes celulares, dio origen a los procedimientos de hemaféresis por un lado y a la terapia específica con hemocomponentes por otro.

La historia de los “sustitutos sanguíneos” comienza en 1856 cuando Christopher Wren realiza infusiones intravenosas de vino en animales (66). En 1878, Gaillard Thomas desarrolla las “infusiones lácteas” al administrar por vía intravenosa leche de vaca. Él justificaba sus experimentos en el hecho que tanto la linfa como la leche contienen grasas que son emulsionadas al estado fluido. Thomas presenta tres casos de pacientes moribundos a los cuales inyectó aproximadamente 8 onzas de leche fresca de vaca. Un paciente sobrevivió y dos fallecieron pero él atribuyó las muertes a otras causas no relacionadas con la infusión (67).

El sustituto sanguíneo ideal es aquel que aporta todas las funciones de la sangre y ninguno de los problemas relacionados con la infusión de la misma. Pero, el término sustituto sanguíneo en realidad no describe realmente los productos que se han desarrollado y que se encuentran aún en fase de investigación. Hasta el momento actual no se ha podido obtener ningún producto en el laboratorio que sustituya todas las funciones de la sangre y los sustitutos en fase de experimentación se refieren a transportadores de oxígeno.

Amberson y colaboradores en 1933, realizaron experimentos en gatos en los cuales reemplazaron completamente la sangre de los animales con soluciones de hemoglobina en lactato-Ringer y demostraron que podían mantener con vida al animal (68). Sin embargo, el efecto duraba muy poco y causaba daño renal. A pesar de estas observaciones el mismo grupo de investigadores realizó en 1949 un trabajo clínico utilizando soluciones de hemoglobina en lactato-Ringer pero desafortunadamente produjo falla renal en 5 de 14 pacientes (69). Amberson y colaboradores abandonaron sus estudios concluyendo

que las soluciones de hemoglobina requerían mayor desarrollo debido al daño renal y la hipertensión que producían.

En 1950, la Marina de USA trató a 47 marinos con anemia y fiebre con una o más infusiones de soluciones de hemoglobina, 17 de ellos desarrollaron hipertensión y 12 tuvieron problemas renales (70). Varios años pasaron hasta que mediante la aplicación de técnicas de ultra-purificación se pudo remover el estroma y otros detritus celulares de las soluciones de hemoglobina con lo cual se solucionó la toxicidad renal y la inmunización por los grupos sanguíneos dado que los antígenos se encuentran en la membrana del eritrocito (71). Sin embargo, nuevos problemas emergieron. Por un lado, la hemoglobina que tiene una conformación tetramérica cuando se libera del eritrocito rápidamente se transforma en dímeros con un peso molecular de 34.000 daltons los cuales filtran por el glómerulo renal. In vivo, existe un mecanismo para evitar la pérdida de los dímeros por el riñón mediante una glicoproteína sanguínea, la hemopexina, que tiene como función unirse a los dímeros aumentando su peso molecular para evitar su eliminación por la orina.

A su vez, en la hemoglobina libre se reduce el contacto con los fosfatos lo cual hace que la curva de disociación de la hemoglobina se desplace hacia la izquierda resultando en una alta afinidad por el oxígeno con poca liberación a nivel tisular.

A continuación se comenzó con la experimentación principalmente para estabilizar la molécula de hemoglobina y modificarla químicamente para prevenir la disociación a dímeros y evitar la desviación de la curva de disociación a izquierda. En un estudio, la hemoglobina se unió a una macromolécula (dextrán) y demostró mantener con vida gatos y perros en ausencia de eritrocitos (72) utilizando un mecanismo similar a la hemopexina in vivo para evitar la filtración renal.

Actualmente existen tres productos Hem-Assist (Baxter), PolyHeme (Northfield) y Hemopure (Biopure) que se encuentran en trabajos clínicos fase II y fase III pero hasta ahora ninguno ha sido aprobado por la FDA. Sin embargo, el Medicine Control Council de South Africa aprobó el Hemopure en abril del 2001 para su uso en pacientes anémicos debido a la alta prevalencia de HIV en la pobla-

ción. Este sustituto sanguíneo o mejor dicho transportador de oxígeno provee una alternativa segura frente a la sangre donada (71).

En 1998 se desarrolló un modelo “in vitro” para la producción glóbulos rojos humanos a partir de CPH obtenidas de médula ósea, cordón umbilical o sangre periférica (73).

En 2004 un grupo de investigadores franceses describe la producción ex vivo en gran escala de glóbulos rojos maduros a partir de CPH CD34+ obtenidas de cordón umbilical (74) lo cual tiene implicancias directas sobre la terapia génica, la medicina transfusional y la medicina tropical. En caso que se pueda estandarizar e industrializar dicha técnica se produciría un gran avance en la biología celular con varias aplicaciones terapéuticas. En primer lugar, la posibilidad de obtener eritrocitos autólogos del paciente sobre todo en pacientes anémicos dado que las técnicas actuales de donación de predepósito no lo permiten. En las transfusiones alogénicas se evitaría la necesidad de obtener donantes previamente al igual que en las transfusiones de grupos “raros”. A su vez, la población de eritrocitos obtenidos por hematopoyesis ex vivo tendrán todos una edad de 120 días mientras que los transfundidos a partir de donantes de sangre tienen distintas edades por lo cual la sobrevida in vivo es menor. Este nuevo modelo de producción de eritrocitos ex vivo serviría además para revertir, vía terapia génica, las anomalías congénitas de los eritrocitos como talasemias, anemia falciforme, hemoglobinuria paroxística nocturna entre otras.

En la revista Blood de la American Society of Hematology (ASH) del 1º de diciembre del 2008, Lu y colaboradores describen un nuevo método para diferenciar in vitro células madres embrionarias (CME) humanas en grandes cantidades de glóbulos rojos maduros (75). Las ventajas de esta producción de células rojas serían que evitaría la necesidad de donantes de sangre así como el costoso proceso de preparación de hemocomponentes. Se evitaría la transmisión de agentes infecciosos, inclusive los patógenos emergentes, sin necesidad de realizar métodos de inactivación.

Se podrían obtener eritrocitos de grupos sanguíneos menos frecuentes como 0 RhD negativo en gran escala con una sobrevida de 120 días.

Sin embargo, algunos problemas deben

ser solucionados antes de que comience la producción industrial in vitro de eritrocitos a partir de CME. El primero, es el número de células que se pueden obtener por este método dado que el número que existe en cada unidad de glóbulos rojos (220 ml) para transfusión es considerable (dos trillones de eritrocitos). Lu y colaboradores producen más de 10 billones e inclusive varios de los pasos del protocolo en el procedimiento se pueden expandir. Por tanto, se debe alcanzar un número suficiente de células in vitro con fines transfusionales antes de iniciar la producción industrial.

El costo final del proceso de manufactura así como el nivel de pureza y la cantidad de pruebas necesarias para su aprobación por las agencias regulatorias deben ser razonables.

Además de la cantidad, un segundo punto a considerar es que los eritrocitos producidos in vitro deben tener una funcionalidad normal in vivo. En el método descrito por Lu y colaboradores se obtienen glóbulos rojos con un fenotipo fetal como los que se producen en los períodos iniciales de la gestación. Que estos eritrocitos pueden ser usados para transfusión es un aspecto que aún queda por resolver debido a los múltiples pasos de diferenciación que ocurren entre los eritrocitos fetales y adultos. Lu y colaboradores crean un 95% de glóbulos rojos nucleados de un tamaño mayor (10 micras) y el 65% contienen hemoglobina fetal. Las curvas de equilibrio de oxígeno son comparables a los eritrocitos adultos y responden a los cambios de pH y de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG). Sin embargo, la obtención de eritrocitos adultos a partir de CME es un proceso que aún queda por resolver. De forma interesante, el análisis del fenotipo por PCR muestra que 2 de las 20 líneas de CME estudiadas son RhD negativas (MA99 y MA133) es decir, no expresan el antígeno D. El estudio inmunológico de los eritrocitos generados por la línea celular MA99 no expresan el antígeno D mientras que los obtenidos de la línea MA01 son RhD positivos.

Con respecto al sistema ABO, las células MA01 expresan el antígeno A, las MA99 el antígeno B y las WA01 no expresan los antígenos A ni B por lo cual corresponden al grupo 0. De esta manera se puede manipular la producción in vitro de glóbulos rojos por ejemplo del grupo 0 RhD negativo que en la

población del Uruguay es tan solo del 5% lo cual genera un stock insuficiente para el tratamiento de receptores de este grupo sobre todo en hemorragias masivas y particularmente en mujeres en edad reproductiva activa.

Sin embargo, algunas preguntas quedan por responder como por ejemplo cual es la vida media, la inmunogenicidad y la eliminación de células indiferenciadas que pueden provocar el desarrollo de tumores en el futuro (76). Pero, el saltar dichos obstáculos en el proceso de generación in vitro de eritrocitos a partir de CME puede allanar el camino para la producción de otros tipos de células sanguíneas en un futuro cercano.

En el año 2009, la biotecnología ha producido partículas con biomateriales que tienen la habilidad de transportar oxígeno, con un diámetro y deformabilidad similar a los eritrocitos, con el fin de poder circular a nivel de los capilares (77). Estos biomateriales proveen también una plataforma tecnológica para otras aplicaciones médicas como transporte y liberación de drogas (dextrans y heparina) o como agentes de contraste para resonancia magnética por ejemplo cuando se le unen nanopartículas de óxido de hierro a su superficie (77).

BIBLIOGRAFÍA

- Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissue and fluids. *JACS* 1946;68:459-475.
- Giangrande PLF. The history of blood transfusion. *Br J Haematol* 2000;110:758-767.
- Starr D. Historia de la Sangre. Leyendas, ciencia y negocio. Barcelona. Ediciones BSA, 2000:146.
- Anderson NL, Anderson NG. The Human Plasma Proteome. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:11:845-867.
- Putnam FW. The plasma protein structure, function and genetic control. Putnam FW Ed. pag 1-55, Academic Press New York, 1975-1987.
- Gurber A. Sitzungsber. *Phys Med Ges Wurzburg* 1894, 143.
- Black CA. A brief history of the discovery of the immunoglobulins and the origin of the modern immunoglobulin nomenclature. *Immunol Cell Biol* 1997;75:65-68.
- Tiselius A, Kabat EA. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J Exp Med* 1939;69:119-131.
- Jones HB. Papers on chemical pathology: prefaced by the Gulstonian lectures read at the Royal College of Physicians. *Lancet* 1846;2: 88-92.
- Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook M. Physicochemical properties of reaginic antibody. V Correlation of reaginic activity and gamma E-globulin antibody. *J Immunol* 1966;97:840-853.
- Ceppellini R, Dray S, Edelman G. Nomenclature for Human Immunoglobulins. *Bull World Health Org* 1964;30:447-450.
- Horejsi J, Smetana R. The isolation of gamma globulin from blood serum by Rivarol. *Acta Med Scand* 1956;155:65.
- Curling J. Integrating new technology into blood plasma fractionation. *BioPharm Setiembre* 2002: 16-26. www.biopharmainternational.com. 2/02/2010.
- Kistler P, Nitschmann H. Large scale production of human plasma fractions. *Vox Sang.* 1962;7:414-424.
- Curling J. History of chromatography. www.biopharmainternational.com 2/02/2010
- Peterson Ea, Sorber HA. Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange and sorbents. *Am Chem Soc* 1954;76:751-755.
- Porath J, Flodin P. Gel filtration: A method for desailing and group separation. *Nature* 1959;183:1657.
- Hjertén S. Agarose as a anticonvection agent in zone electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1961;53:514-517.
- Carbone J. Adverse reactions and pathogen safety of intravenous immunoglobulin. *Curr Drug Saf* 2007;2:9-18.
- Ordman CW, Jennings CG, Janeway CA. Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XII. The use of concentrated normal human serum gamma globulin in the prevention and attenuation of measles. *J Clin Invest* 1944;23:541-555.
- Starr D. Historia de la Sangre. Leyendas, ciencia y negocio. Barcelona, Ediciones BSA, 2000: 235.
- Orange JS, Hossny EM, Weiler CR, Ballow M, Berger M, Bonilla FA, Buckley R, Chinen J, El-Gamal Y, Nazer BD, Nelson PR Jr, Patel DD, Secord E, Sorensen RV, Wassermann RL, Cunningham-Rundles C. Use of intravenous immunoglobulin in human disease: A review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2005;117:525-553.
- Smith T. Active immunity produced by so called balanced or neutral mixtures of diphtheria toxin and antitoxin. *J Exp Med* 1909;11:241-256.
- Stern K, Goodman H, Berger M. Experimental immunization to hemoantigens in man. *J Immunol* 1961;87: 189-198.

25. Finn R, Clarke CA, Donohoe WTA, Mc Connell RB, Sheppard PM, Lehane D, Kulke W. Experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease. *Br Med J* 1961; II : 1486-1490.
26. Clarke CA, Donohoe WTA, Mc Connell RB, Woodeow JC, Finn R, Krevans JR, Kulke W, Lehane D, Sheppard PM. Further experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease. *Br Med J* 1963 ; II : 979-984.
27. Freda J, Gorman JG, Pollack W. Succesful prevention of sensitizacion to Rh with experimental anti-Rh gammaglobulin antibody preparation. *Fed Proc* 1963;22:374.
28. Gorman JG, Freda J, Pollack W. Prevention of sensitization of Rh with anti-Rh gamma globulin. *Fed Proc* 1964; 23: 238.
29. Clarke CA, Sheppard PM. Prevention of rhesus haemolytic disease. *Lancet* 1965;II:526.
30. Freda J, Gorman JG, Pollack W. Prevention of rhesus haemolytic disease. *Lancet* 1965; II: 690.
31. Freda VJ, Gorman JG, Pollack W, Robertson JG, Jennings ER, Sullivan JF. Prevention of Rh isoimmunization. *JAMA* 1967; 199: 390-394.
32. Jouvenceaux A, Adenot N, Berthoux F, Revol L. Lyophilised anti D gamma globulin given intravenously for the prevention of anti-Rh immunization. *Rev Fr Transfus* 1969; 12 (suppl): 341-347.
33. Woodrow JC, Clarke CA, McConnell RB, Towers SH, Donohoe WTA. Prevention of Rh haemolytic disease: results of the Liverpool "low risk" clinical trial. *Br Med J* 1971; II: 610-612.
34. Schneider J. Tagungsberichte. IV. Arbeitstagung zur Prophylaxe der Rhesus-Sensibilisierung mit Immunglobulin-anti-D. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1971; 31: 493-522.
35. Pollack W, Ascari WQ, Crispen JF, O'Connors RR, Ho TY. Studies on Rh Prophylaxis. II Rh prophylaxis after transfusion with Rh-positive blood. *Transfusion* 1971;11:340-344.
36. Zipursky A, Pollock J, Neelands P, Chown B, Israels LG. The transplacental passage of foetal red blood-cells and the pathogenesis of Rh immunization during pregnancy. *Lancet* 1963;II : 489-493.
37. Warren P, Jamieson JC. Jack Bowman: Winnipeg's contributions to the treatment and prevention of Rhesus Hemolytic Disease of the Newborn. *Transfus Med Rev* 2010;24:68-76.
38. Rodríguez A, Decaro J, Borelli C. La transfusión feto materna y la profilaxis por inmunoglobulina anti-Rh(D). *An Fac Med* 1979;2:123-127.
39. Cuadro JC, Scasso JC, Decaro J, Gutierrez C, Alonso JG, Varela S, Miller A. Normas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica por conflicto Rh(D), Montevideo, Ediciones Delta, 1981.
40. Scasso JC, Decaro J, Cuadro JC, Lieutier G, Alonso JG, Varela S. Enfermedad Hemolítica Perinatal por aloinmunización Rh (D). Montevideo, Ediciones de la Plaza, 1983.
41. Reglamento Técnico MERCOSUR de Medicina Transfusional. Decreto PE 385/00. Diario Oficial. Montevideo Ed. IMPO. 9 de enero 2001:22-40.
42. Decaro J. Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP). Montevideo, Editorial Rimarco, 2003.
43. Recomendaciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica feto-neonatal y para la inmunoprofilaxis anti-D. *Arch Gin Obstet* 2005;43: 169-176.
44. Quinti I, Pierdominici M, Marziali M, Giovanetti A, Donnanno S, Chapel H, Bjorkander J, Aiuti F. European surveillance of immunoglobulin safety. Results of initial survey of 1243 patients with primary immunodeficiencies in 16 countries. *Clin Immunol* 2002;104:231-236.
45. McFarlane RG, Biggs R, Bidwell E. Bovine anti-haemophilic globulin in the treatment of haemophilia. *Lancet* 1954;i:1316-1319.
46. Kekwick RA, Wolf P. A concentrate of human antihaemophilic factor – its use in six cases. *Lancet* 1957;i:647-650.
47. Biggs R, Bidwell E, Handley DA, Mac Farlane RG, Trueta J, Elliot-Smith A, Dike GW, ASH BJ. The preparation and assay of a Christmas-factor (factor IX) concentrate and its use in the treatment of two patients. *Br J Haematol* 1961;7:349-364.
48. Laperche S. Antigen-antibody combination assays for blood donor screening : weighing the advantages and costs. *Transfusion* 2008;48:576-579.
49. Corbin F, Cullis Hm, Freireich EJ. Development of apheresis instrumentation in McLeod BC, Price Th and Drew MJ Eds. Apheresis: Principles and Practices. Bethesda, MD AABB Press 1997.
50. De Korte D, Marcelis JH, Verhoeven AJ, Soeterbock AM. Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections. *Vox Sang* 2002;83:13-16.
51. Pool JG, Shannon AE. Production of a high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed bag system. *N Engl J Med* 1965;273:1443-1444.
52. Regan F, Taylor C. Blood Transfusion Medicine. *Br Med J* 2002;325:143-147.
53. Lin L, Cook DN, Wiesehahn GP, Alfonso R, Berhman B, Cimino GD, Corten L, Damonte PB, Dikeman R, Dupuis K, Fang YM, Hanson CV, Hearst JZ, Lin CY, Londe HF, Metchette K, Nezio AT, Pu JJ, Reames AA, Rheinschmidt M, Tessman J, Isaacs ST, Wollowitz S, Corash L. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psolaren and long-wave length ultraviolet light. *Transfusion* 1997;37(4): 423-435.
54. Ciaravino V, Mc Cullough T, Cimino G. The role of toxicology assessment in transfusion medicine. *Transfusion* 2003;43:1481-1492.
55. Van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Kluter H, Vermeij H, Kappe RS, Klunnie M, de Greef G, Laforet M, Lioure B, Davis K, Marbilie S, Mayaudon V, Flament J, Coulan M, Lin L, Metzel P, Bucholz D, Corash L. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. The euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101(6):2426-2433.
56. Janetzko K, Lin L, Eichler H, Mayaudon V, Flament J, Kluter H. Implementation of the Intercept Blood System for platelets into routine blood bank manufacturing procedures: evaluation of apheresis platelet. *Vox Sang* 2004;86(4):239-245.
57. Luban NL. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by inactivation of T cells in

- platelet components. *Semin Hematol* 2001;38 (suppl 11):34-45.
58. Osselaer JC, Messe N, Herving T, Bueno J, Castro E, Espinosa A, Accorsi P, Junge K, Jacquet M, Flament J, Corash L. A prospective observational cohort safety study of 5106 platelet transfusions with components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2008;48:1061-1071.
59. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard L, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using Riboflavin and light. *Transfusion* 2004;44(6):877-885.
60. Corbin F 3rd. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using Riboflavin as a photosensitizer. *Int J Hematol* 2002;76(suppl 2):253-257.
61. Williamson L, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: What is the contribution to blood safety? *Transfusion* 2003;43:1322-1329.
62. Hornsey VS, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse CV. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco-Pharma Maco-Tronic System. *Transf Med* 2001;11(1):31-36.
63. Weibert K, Cserti C, Hannon J, Lin Y, Pavenski K, Pedergrast JM, Blajchman MA. Proceedings of a Consensus Conference: Pathogen Inactivation Making Decisions About New Technologies. *Transfus Med Rev* 2008;22:1-34.
64. Álvarez-Larran A, Del Rio J, Ramirez C. Coste efectividad de las transfusiones de componentes plaquetarios preparados con tratamiento de inactivación de patógenos en España. *Rev Esp Econ Salud* 2003;2(3):166-175.
65. Bell Ce, Botteman MF, Gao X, Weissfeld JL, Postma MJ, Pashos CL, Triulzi D, Staginnus U. Cost-effectiveness of transfusion of platelet components prepared with pathogen inactivation treatment in the United States. *Clin Ther* 2003;25(9):2464-2486.
66. Sturgis CC. The history of blood transfusion. *Bull Med Libr Assoc* 1942;30:105-112.
67. Thomas TG. The intravenous injection of milk as a substitute for the transfusion of blood. *NY State J Med* 1878;47:449-465.
68. Amberson WR, Mulder AG, Steggerda FR et al. Mammalian life without blood corpuscles. *Science* 1933;78:106-107.
69. Amberson WR, Jennings JJ, Rhode CM. Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *J Appl Physiol* 1949;1:469-489.
70. Winslow RM. The results of 62 large volume hemoglobin infusions in man. Hemoglobin-Based Red Cell Substitutes. Baltimore and London: Johns Hopkins University Press 1992;177-178.
71. Chen JY, Scerbo M, Kramer G. A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *Clinics* 2009;64:803-813.
72. Humphries RG, Killingback PG, Mann J. Exchange transfusion with dextran-hemoglobin, hemoglobin and dextran solutions in anaesthetized cats. *Br J Pharmacol* 1980;74:266.
73. Malik P, Fisher T, Barsky L, Zeng L, Izadi P, Luinberg KI, Coates TD, Meiselman HJ, Kohn DB. An In vitro model of human red blood cell production from hematopoietic progenitors cells. *Blood* 1998;91:2664-2671.
74. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajchman H, Douay L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;10:1038-1047.
75. Lu SJ, Fena Q, Park Js, Vida L, Lee BS, Strausbauch M, Wettstein PJ, Honig GR, Lanza R. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008;112:4475-4484.
76. Bouhassira EE. Toward the manufacture of red blood cells? *Blood* 2008;112:4362-4363.
77. Doshi N, Zahr AS, Bhaskar S, Lahann J, Mitragotri S. Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles. *PNAS* 2009;106:21495-21499. www.pnas.org 23/03/2010.

Historia de la Hemaféresis

En 1914, John Jacob Abel y colaboradores utilizan por primera vez el término plasmáfesis que proviene de la palabra griega “aphaíresis” que significa extraer. Describieron el procedimiento de extracción del plasma retornando los elementos celulares de la sangre como tratamiento experimental de la toxemia en perros nefrectomizados (1).

El primer procedimiento de plasmáfesis manual en humanos fue realizado en 1944 por Tui y colaboradores, con fines también experimentales, para determinar la tasa normal de regeneración proteica en seis donantes voluntarios (2). Encontraron que la habilidad de regenerar proteínas en el hombre normal es virtualmente ilimitada siempre y cuando se devuelvan los eritrocitos. Pero, uno de los donantes experimentó una reacción a pirógenos debido a la contaminación de los frascos de vidrio reutilizables que se empleaban en estos procedimientos.

El primer objetivo de realizar plasmáfesis manual en donantes fue obtener plasma para reponer la volemia en las hemorragias y shock tanto para el tratamiento de soldados en la guerra como de civiles.

En 1936, se colecta en Barcelona sangre de civiles para ser utilizada en el frente de guerra, durante la guerra civil española (3). En USA, la obtención de plasma para el tratamiento del shock hipovolémico en la guerra se inició en gran parte gracias a los trabajos de John Elliot en la década de 1930. Trabajando en el laboratorio del Hospital Rowan Memorial de Salisbury en Carolina del Norte su gran proyecto fue producir suero y plasma estéril. Creó, en 1936, el primer frasco de vidrio al vacío conteniendo una solución de citrato para obtener sangre y luego también para separar el plasma (4).

En 1931, tres doctores Donald Baxter, Ralph Fox y su hermano Harry fundaron la compañía Baxter Intravenous Product Corporation que fue el primer fabricante de soluciones intravenosas.

En 1939, Elliot entra en contacto con Maurice Nasset de Baxter y juntos desarrollan el primer frasco de vidrio comercial para obtener sangre denominado “Transfuso Vac” sustituyendo a las copas de vidrio, frascos de boca ancha o botellas de leche que se utilizaban hasta ese momento para colectar sangre. El nuevo frasco se puso a prueba con más de 800 transfusiones en seis hospitales. Originalmente contenía citrato de sodio como anticoagulante pero luego, con el desarrollo del ACD como anticoagulante durante la segunda guerra mundial, éste se utilizó en los frascos de vidrio al vacío para conservar sangre durante 21 días.

En 1941, Baxter y Elliot crean el “Plasma Vac” frasco de vidrio al vacío para separar el plasma de la sangre total.

En 1937, la Cruz Roja Americana se interesa por primera vez en la colecta de sangre. Su director William DeKleine recluta donantes voluntarios para ser enviados a los hospitales y para realizar transfusiones directas basándose en el programa de la Cruz Roja Británica desarrollado por Percy Oliver en 1921.

John Elliot lee en el periódico la nueva actividad de la Cruz Roja y le envía correspondencia a DeKleine explicando su proyecto para obtener plasma líquido.

En 1939, el director de la Cruz Roja visita Carolina del Norte, queda impresionado con el trabajo de Elliot y a partir de este momento la Cruz Roja fomenta su difusión por varios estados de USA. En 1940, la Cruz Roja Británica solicita a la Americana que le envíe

plasma líquido. El programa de recolección y envío de plasma líquido por el método de Elliot comienza en agosto de 1940. Pero, el programa colapsa en enero de 1941 cuando DeKleine descubre que la Cruz Roja Británica no ha usado el plasma americano por contaminación bacteriana. La Armada americana a su vez elige el plasma liofilizado en lugar del plasma líquido para su uso en la guerra.

En 1940, Edwin Cohn en Harvard, Boston desarrolla el método de fraccionamiento plasmático con etanol obteniendo en la fracción I fibrinógeno, en la fracción II y III inmunoglobulinas y en la fracción V albúmina (5). En 1941, en el ataque sorpresa de Pearl Harbor en la isla de Oahu en Hawai, ejecutado por la Armada Imperial Japonesa, el cirujano Isodor Ravdin utiliza la albúmina para tratar a 87 pacientes con shock (6).

Aquí, surge el segundo objetivo de la plasmaféresis manual en donantes normales que es la obtención de plasma en grandes cantidades para el fraccionamiento industrial.

Un gran adelanto para realizar este procedimiento manual fue la introducción de la bolsa plástica en lugar del frasco de vidrio al vacío para la recolección de sangre.

En 1935, Carl Walter un cirujano de Harvard Medical School, conjuntamente con Wilfred Turenne, pariente y amigo, que se dedicaba a la reparación de refrigeradores, fundan la compañía Fenwall que inicialmente se dedica a la fabricación de termostatos.

En 1948, Carl Walter describe un nuevo sistema para colectar, procesar, conservar e infundir sangre mediante bolsas plásticas (7). Tiene como ventajas frente al frasco de vidrio que se trabaja en un circuito cerrado, estéril, con bolsas satélites interconectadas y totalmente descartable.

En 1952, en Barcelona, José Antonio Grifols i Lucas realiza la primera plasmaféresis manual en donantes normales con el fin de obtener plasma para producir hemoderivados (8). Mediante esta técnica se extraen unos 400 ml de sangre en ACD como anticoagulante. La sangre es centrifugada y luego mantenida en el refrigerador hasta la próxima semana cuando el plasma es removido y los eritrocitos resuspendidos en suero fisiológico son reinfundidos al donante. Así, el donante es sangrado cada semana para obtener exclusivamente el plasma, unos 200 ml aproximada-

mente. En algunos casos se realizan extracciones todas las semanas durante un año sin interrupciones. Este procedimiento tiene la ventaja que no se desperdician los glóbulos rojos como ocurría en los primeros procedimientos para obtener plasma para los heridos de guerra donde los requerimientos de plasma eran muy superiores a los de eritrocitos. Además, las extracciones se realizaban en un circuito abierto en frascos de vidrio reutilizables con riesgo de contaminación bacteriana y por pirógenos.

Luego, se perfecciona esta técnica de plasmaféresis manual con el objetivo de obtener un mayor rendimiento plasmático. Así, la sangre es colectada en una bolsa plástica con ACD unida a bolsas satélites. Se mantenía la punción venosa con un suero salino mientras la bolsa era centrifugada, reteniendo el plasma en una de las bolsas satélites mientras que los eritrocitos eran devueltos al donante. En el mismo acto se repetía la extracción de sangre total para realizar una plasmaféresis doble y obtener unos 500 ml de plasma del mismo donante. Con las centrífugas refrigeradas introducidas en la década de 1950, este procedimiento manual duraba aproximadamente una hora.

Las plasmaféresis manuales utilizando donantes pagos fueron la fuente de plasma para fraccionamiento industrial hasta la década de 1980.

Esta tecnología tuvo un rápido desarrollo por lo cual la American Association of Blood Bank (AABB) en 1963 establece por primera vez las guías regulatorias de la plasmaféresis en su publicación de "Standards of Blood Bank" (www.aabb.org).

El tercer objetivo de los métodos de plasmaféresis manual fue su aplicación no en donantes normales sino en pacientes con el fin de extraer sustancias patológicas presentes en el plasma (plasmaféresis terapéutica).

En 1952, Adams y colaboradores, utilizan un sofisticado sistema de plasmaféresis manual a través de un sistema cerrado de frascos al vacío para tratar la paraproteinemia en un paciente con mieloma múltiple (9).

En 1959, Skoog y Adams (10) reportan el uso de plasmaféresis manual utilizando bolsas plásticas para el tratamiento de un paciente con macroglobulinemia de Waldenström. Varios pacientes fueron tratados con

éxito mediante plasmaféresis para disminuir la paraproteinemia y el síndrome de hiperviscosidad plasmática en los años siguientes.

En 1961, Allan Kliman del Clinical Center Blood Bank of the U.S. National Institutes of Health utilizando bolsas plásticas realiza plasmaféresis manual para obtener plasma rico en plaquetas que luego es centrifugado obteniendo plasma y concentrados plaquetarios, devolviendo los eritrocitos al donante (11).

Paul Schwab (12) reporta la realización de más de 500 plasmaféresis manuales con bolsas plásticas para el tratamiento de la hiperviscosidad en pacientes con macroglobulinemia de Waldstrom y sin complicaciones.

En 1968, Bowman y colaboradores (13) de la Universidad de Manitoba en Canadá, describen el primer caso de una gestante con una aloinmunización anti-RhD severa tratada con plasmaféresis manual. El mismo año, Powell reporta ocho gestantes que son sometidas a plasmaféresis de 2 a 4 litros por semana durante una a 18 semanas con una media de 13 litros de plasma extraído. En todos los casos hubo una reducción del título del anticuerpo anti-D plasmático pero sólo dos de seis fetos Rh positivos sobrevivieron (14).

Con el trabajo de Kliman en 1961 (11) se utiliza la aféresis para obtener un componente celular muy requerido para tratar pacientes con leucemia sometidos a quimioterapia y trombocitopénicos. Este autor demuestra que es posible colectar más de 1000 ml de plasma rico en plaquetas de un mismo donante por semana durante tres meses dando origen a un nuevo procedimiento de aféresis, la plaquetaféresis.

Como ocurrió con la plasmaféresis que se utilizó primero en donantes normales y luego en pacientes con fines terapéuticos, Colman y colaboradores (15) en 1966 aplican la plaquetaféresis para tratar pacientes con trombocitosis sintomática. El procedimiento consiste en obtener sangre total en bolsas plásticas con anticoagulante y mediante una centrifugación a bajas revoluciones obtener eritrocitos y plasma rico en plaquetas (PRP) en una bolsa satélite. Luego el PRP es centrifugado a altas revoluciones para separar el plasma de las plaquetas. El plasma pobre en plaquetas y los eritrocitos son reinfundidos al paciente y se repite el procedimiento varias veces hasta que se produce un descenso en el recuento plaquetario y la desaparición de la sintomatología.

La posibilidad de aumentar las defensas del receptor mediante la infusión de leucocitos fue explorada hace más de 75 años. En 1934, Strumia inyectó una “crema de leucocitos” intramuscularmente en pacientes con neutropenia y demostró que la inyección aumentaba el recuento de polimorfonucleares en sangre en 9 de los 10 pacientes (16).

En 1931, la neutropenia fue implicada como factor etiológico de las infecciones bacterianas mortales. Recién 35 años después Bodey y colaboradores demuestran la relación cuantitativa entre el nivel de los granulocitos circulantes y la prevalencia de infecciones en pacientes con leucemia (17). En 1953, se transfunden por primera vez leucocitos normales en perros que fueron irradiados previamente (18). Los mismos investigadores demuestran que leucocitos obtenidos de ratas mantienen su actividad fisiológica cuando son inyectados en ratones.

La leucaféresis (obtención de leucocitos) fue primariamente realizada en humanos en 1964. Se obtuvieron polimorfonucleares de pacientes con leucemia mieloide crónica con fines transfusionales en pacientes con leucemia linfocítica aguda y crisis febriles. La técnica manual consistía en extraer sangre en bolsas plásticas con anticoagulante y agregar un agente sedimentante de los eritrocitos (macromoléculas, dextranos) con el fin de aumentar la separación del buffy coat devolviendo el plasma y los eritrocitos al paciente. La diferencia con las técnicas de aféresis anteriores era que aquí el procedimiento se realiza de un paciente donante a un paciente receptor (19).

Sin embargo, esta terapia fue discontinuada por la aparición del primer caso clínico de injerto versus huésped (20).

Las técnicas manuales de leucaféresis se utilizaron después con fines terapéuticos en pacientes con leucemia mieloide crónica que desarrollaban síntomas por leucoestasis.

Seguidamente dos métodos de obtención de leucocitos de donantes normales fueron utilizados: la leucaféresis por filtración (figura 5.1) y la leucaféresis por sedimentación o gravedad.

Ambos métodos fueron reportados por primera vez por Isaac Djerassi, la filtración por flujo continuo en 1972 (21) y la sedimentación en 1977 (22).



Figura 5.1 - Primer procedimiento de leucaféresis por filtración realizado en un donante de sangre a principio de la década de 1980, utilizando un circuito de circulación extracorpórea mediante la bomba auxiliar del separador celular Celltrifuge-Aminco de flujo continuo. Hospital de Clínicas, Cátedra de Medicina Transfusional.

Esta última es una técnica sencilla que se utiliza a partir de unidades de sangre obtenidas en bolsas plásticas con anticoagulante. El donante es previamente estimulado con 10 mg de dexametasona para aumentar el pool sanguíneo de granulocitos. Luego se extrae una unidad de sangre total y se centrifuga a bajas revoluciones para obtener PRP que es centrifugado ahora a altas revoluciones para obtener por un lado plaquetas en una bolsa satélite y PPP en la otra. A la bolsa con los eritrocitos y el buffy coat se le agrega un agente sedimentante de los glóbulos rojos como hydroxiethylstarch (HAES) al 6% en una relación 1/4. En minutos se pueden obtener los eritrocitos sedimentados que se devuelven junto con el PPP al donante. Con esta técnica se pueden obtener aproximadamente el 80% de los granulocitos de una unidad de sangre total. Para procesar seis unidades, aproximadamente tres litros, el procedimiento requiere entre 5 a 6 horas. Los granulocitos obtenidos por sedimentación no presentan alteraciones morfológicas ni funcionales. El HAES produce la formación de rouleaux en los eritrocitos pero no altera la función de las plaquetas o los granulocitos. Sin embargo, el número de granulocitos que se obtiene es bajo sobre todo para el tratamiento de un paciente adulto. En 1985 aplicamos esta técnica en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas, ocho años después de su descripción (figura 5.2) para la obtención de granulocitos de donantes normales para el tratamiento de la sepsis neonatal dado que existía una mejor correlación

entre dosis y peso corporal que en el adulto. Las bolsas plásticas a pesar de que fueron utilizadas a partir de la década de 1950, en Uruguay su utilización se realizó a partir de la década de 1980.

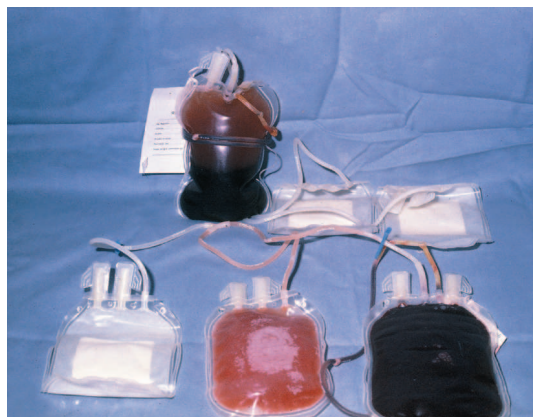


Figura 5.2 - Laucaféresis por sedimentación utilizando bolsas plásticas (1985).

Dado que los neonatos pueden presentar neutropenia y alteraciones funcionales de los PMN tienen un riesgo mayor de infecciones que niños mayores. Como los PMN juegan un rol primordial en la defensa del organismo y en la inflamación, los cambios cuantitativos y cualitativos de los PMN en el período neonatal pueden resultar en una disminución de las defensas principalmente ante infecciones bacterianas con una respuesta inflamatoria deprimida. En neonatos con sepsis y neutro-

pénicos las tasas de mortalidad varían entre el 60 y 90%.

En la década del 80 realizamos en Uruguay las primeras transfusiones de granulocitos en neonatos con sepsis bacteriana (23). La efectividad clínica de estos granulocitos fue evaluada después de la infusión a tres neonatos sépticos y neutropénicos mostrando incrementos post-transfusionales razonables. La funcionalidad celular estuvo conservada cuando se utilizó sangre entre 5 y 24 horas de extraída.

Esta técnica de sedimentación globular con HAES la utilizamos en el momento actual para concentrar las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) CD34+ para reducir el volumen y la contaminación eritrocitaria del producto obtenido por punción de médula ósea, de sangre periférica por aféresis o de cordón umbilical.

La leucaféresis por filtración descrita por primera vez en 1972. Consiste en un sistema de circulación extracorpórea con una bomba peristáltica donde la sangre extraída de una vena periférica del donante pasa a través de dos filtros con fibras de nylon (Lucopack) conectados en paralelo, que retienen los leucocitos y el resto de la sangre es devuelta al donante mediante flujo continuo a través de otra vena periférica (figura 5.1). El volumen del circuito extracorpóreo es de aproximadamente 200 ml. Los donantes son medicados con 8 a 10 mg de dexametasona intravenosa para aumentar el pool circulante de granulocitos. Se administra una dosis única de 17.500 UI de heparina sódica como anticoagulante. El flujo de donación es de 20 ml por minuto con una duración total del procedimiento de una hora aproximadamente. Se utilizó el tiempo de coagulación activado (TCA) con celite como control de la anticoagulación de manera similar a como se realizaba en cirugía cardíaca. El TCA fue determinado de sangre total por el método descrito anteriormente por Hattersley en 1966 (24). Dos mililitros de sangre aspirados con jeringa de plástico del donante se colocaban en un tubo de vidrio con 12 mg de celite. El tubo era invertido varias veces durante los primeros 30 segundos y luego se colocaba en un baño a 37 grados. El cronómetro se disparaba cuando la sangre entraba en contacto con el tubo y se detenía cuando el coágulo se hacía visible. De acuerdo al resultado del TCA los donantes recibían clor-

hidrato de protamina (10 mg/ml) intravenoso al final del procedimiento para neutralizar la anticoagulación.

Una vez desconectado el donante, se realizaba la elusión ácida de los leucocitos retenidos en los filtros mediante 1500 cc de una mezcla de 250 cc de ACD, 250 cc de plasma ABO compatible extraído en ACD y un litro de solución salina fisiológica. El pH final de la solución varió entre 5,4 y 5,8. El eluido fue centrifugado a 2800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y el volumen final del concentrado de leucocitos varió entre 200 y 300 ml.

El primer trabajo clínico usando granulocitos obtenidos por filtración fue realizado en 1975 donde se reportan 24 pacientes críticos con leucopenia severa con una recuperación evidente en 20 de ellos (25). Un segundo estudio publicado en el New England Journal of Medicine de 1977 demuestra la eficacia clínica de los granulocitos obtenidos por leucaféresis de filtración en pacientes con evidencia clínica de infección y una granulocitopenia menor a 500 células por milímetro cúbico (26). Los pacientes fueron randomizados, un grupo de 19 recibieron la terapia convencional y a otro grupo de 17 pacientes se le asoció la transfusión de granulocitos obtenidos de un donante y durante cuatro días. Cinco pacientes del grupo control sobreviven mientras que en el grupo transfundido lo hacen 15 de 17 pacientes.

En los años siguientes varios trabajos muestran que los leucocitos obtenidos de leucaféresis por filtración tienen anormalidades morfológicas y funcionales producidas por el método de obtención.

Desarrollo de máquinas de hemaféresis o separadores celulares

En 1951 Edwin Cohn de la Escuela de Medicina de Harvard, pensó en un equipo para separar componentes sanguíneos durante el proceso de donación de la sangre, sin circuito extracorpóreo. Con la ayuda expertos mecánicos como Fred Gilchrist, Charles Gordon y Robert Tinch, Cohn diseñó y construyó un bowl o receptáculo removible para ser utilizado en las centrífugas de los bancos de sangre (27).

La sangre entera decalcificada o citratada fluía bajo presión hacia la porción superior cónica de la cámara de separación rotatoria a 2000 rpm.

Como la sangre en la cámara rotatoria fluye en forma descendente por la gravedad, los componentes más livianos como el plasma son separados de los componentes más pesados como los eritrocitos. Cuando la cámara superior se llena, el mecanismo dinámico de la válvula (abierto por la fuerza de la centrifugación) cerca del eje de rotación permite salir al plasma hacia la cámara baja, desde donde fluye libremente hacia la zona periférica del recipiente fijo de recolección y luego a una bolsa de almacenamiento.

Mientras tanto los eritrocitos se continúan acumulando en la cámara superior cuya capacidad es de aproximadamente 500 ml. En este momento el motor de la centrífuga se detiene. La válvula dinámica se cierra y los eritrocitos fluyen por gravedad a la zona central del recipiente de colección y de ahí a una nueva etapa de separación o a una bolsa de recolección.

Para separar plaquetas o leucocitos se realizaron variaciones de esta versión.

También se usó para extraer gradualmente el glicerol de los eritrocitos almacenados congelados.

Los equipos originales tenían sellos de rotación externos con anillos de acero, fabricados en los talleres de Harvard. El mecanismo de centrifugación era aplicado en forma externa a los recipientes cónicos, por lo cual los elementos de recolección y separación debían ser armados y esterilizados como una unidad, permitiendo así que la sangre se procesara en un sistema cerrado esterilizado.

Como los recipientes de centrifugación y los sellos debían ser reusados esto requería que debían desarmarse, lavarse y rearmarse en cada uso.

Dos empresas la American Optical Company y la Arthur D. Little Inc. desarrollaron versiones del sistema de Cohn con fines de investigación. El último equipo diseñado (Cohn ADL centrifuge) tuvo cierto éxito como para procesar eritrocitos congelados, más de 1/3 de los eritrocitos transfundidos en el Hospital Naval de Chelsea a fines de la década de 1950 fueron preparados en esa forma.

Las limitaciones de estos equipos junto con los avances simultáneos en el procesamiento de unidades individuales citradas en bolsas plásticas, limitaron su uso clínico en forma masiva.

Sin embargo el concepto de separación

inmediata de la sangre donada, denominado “fraccionamiento de hemocomponentes” sirvió como base para continuar el desarrollo de los equipos tanto por centrifugación como con membranas en las cuales se separan los elementos celulares del plasma por tamaño.

Allan “Jack” Latham modifica el prototipo del bowl de separación celular de Cohn de acero y reutilizable previa esterilización por uno de plástico descartable. Este Bowl de Latham podía ser utilizado en las centrífugas de los bancos de sangre entre 3000 y 6000 rpm. A mediados de la década de 1960, Latham desarrolla una máquina procesadora de sangre que denomina modelo 10 que, por un breve período de tiempo, es comercializada por los laboratorios Abbott (28).

Luego Latham funda la compañía Haemonetics que en la década de 1970 crea el separador celular de flujo discontinuo modelo 30S que es el primero en utilizar un equipo estéril totalmente descartable. El volumen del bowl de centrifugación era de 225 ml con un volumen extracorpóreo de aproximadamente 400 ml. Más tarde se desarrolla un bowl descartable de 125 ml para uso pediátrico. El modelo 30S luego es sustituido por el V50 que utiliza también el bowl descartable de Latham.

En la década de 1980, Haemonetics (www.haemonetics.com) desarrolla un sistema automático de recolección de plasma que obtiene varias unidades de un solo donante para preparar hemoderivados por fraccionamiento industrial (automated plasma collection system, PCS).

Entre 1990 y 1993 aparecen en el mercado los separadores celulares de la línea MCS que constituyen en la actualidad el modelo más pequeño y portátil de hemaféresis que se puede utilizar tanto en donantes como pacientes. El modelo MCS+ (plus) tiene una bomba adicional de plasma, obtiene plaquetas con menos leucocitos contaminantes y es más rápido dado que procesa 42 ml por minuto contra 37 ml del MCS.

Partiendo de la observación que la transfusión de plaquetas viables contenidas en la sangre total reducían la hemorragia en pacientes trombocitopénicos, se desarrollaron procedimientos manuales para colectar 2-4 unidades de plasma rico en plaquetas (PRP) de un solo donante. Podía realizarse semanalmente con un sistema cerrado de 2 bolsas plásticas

usando centrífugas comerciales. Esta plaquetaféresis resultó efectiva para reponer las células disminuyendo así la morbimortalidad por hemorragia en pacientes hematológicos. El disponer de concentrados plaquetarios para transfusión resultó un cambio dramático en la evolución y pronóstico de estas enfermedades.

Frente a esto y dada la alta mortalidad por infección asociada a neutropenia en pacientes oncológicos, se pensó en la posibilidad que, mediante aféresis, se podrían recolectar granulocitos con el fin de que reponiéndolos se obtendrían mejorías en la incidencia de infecciones. Pero, dadas la corta vida media y la baja concentración de granulocitos en los donantes esta técnica no resultó efectiva. Sin embargo, colectaron granulocitos de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) no tratada, en fase benigna, para tratamiento de pacientes pediátricos sépticos con buenos resultados (29).

Mientras desarrollaban estas técnicas en 1962 el hijo de 17 años del ingeniero George Judson de IBM, contrajo LMC, por lo cual consultó a su médico McLeod con el fin de contribuir con el tratamiento de esta enfermedad y específicamente para ayudar a su hijo. Dicho ingeniero convenció a IBM de trabajar en un proyecto junto al Instituto Nacional del Cáncer (NCI) para colaborar en la investigación y desarrollo de equipos para la obtención de granulocitos.

Se plantearon objetivos que son la base de los procedimientos de aféresis:

Los granulocitos pueden ser separados de la sangre total en forma eficiente por sedimentación en una centrífuga.

Debe realizarse en flujo continuo a velocidad óptima y eficientemente con el fin de permitir procesar grandes volúmenes de sangre.

Debe evitarse la punción arterial y usarse la punción venosa.

Debe usarse anticoagulación en el circuito extracorpóreo para no anticoagular al donante evitando así los riesgos asociados.

Debe minimizarse la pérdida de plaquetas, eritrocitos y plasma para permitir procesar grandes volúmenes de sangre de un único donante y en forma reiterada.

El sistema debe ser completamente cerrado y evitar la interfase aire-sangre para no producir riesgo de embolia gaseosa y contaminación bacteriana.

El sistema debe ser fácil de limpiar, descartable y lo suficientemente automatizado para ser operado por un técnico.

El sistema debe contener un volumen de sangre extracorpóreo que no supere los 500 ml en ninguna etapa.

Comenzaron usando voluntarios no aptos para donación por enfermedades infecciosas para probar el equipo. Se utilizaban para coleccionar buffy coats. El problema principal que debieron sortear fue lograr la integridad entre las partes fijas y móviles de la centrífuga.

En abril de 1963 comenzaron con los estudios clínicos en pacientes voluntarios con LMC en fase benigna y demostraron que podían procesar 11 litros de sangre en flujo continuo sin complicaciones (30).

Con estos resultados lograron la financiación del NCI por 18 meses para que IBM desarrollara un prototipo para uso clínico. La primera versión fue probada en 1964 presentando debilidades mecánicas como bombas peristálticas inefectivas y traumáticas para los eritrocitos, pérdidas por los sellos por lo cual los componentes se contaminaban durante el procedimiento de separación y no se evitaba la entrada de aire. El equipo oficialmente denominado "2990" estaba listo para ser probado en diciembre de 1966, los procedimientos realizados fueron linfocitoaféresis en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC).

El separador celular por centrifugación de flujo continuo NCI-IBM 2990 fue el primero utilizado para obtener leucocitos para transfusión. En setiembre de 1969 comenzaron a trabajar con hidroxietilalmidón (HAES) como sedimentador de eritrocitos para mejorar la separación de un mayor número de granulocitos.

Una máquina similar al 2990 fue desarrollada por la compañía Fenwal-Baxter, la Aminco Celltrifuge que utilizaba tubuladuras descartables pero con bowl reutilizable previo lavado y esterilización. El primer recambio plasmático con esta máquina fue reportado en 1973. La ventaja de los separadores de flujo continuo es que la sangre se procesa más rápidamente y el volumen extracorpóreo es menor (275 ml) que los de flujo discontinuo pero se necesitan dos punciones en lugar de una y las máquinas son más pesadas y menos móviles. Luego una segunda versión de este separador celular la Aminco Celltrifuge II presentó un

equipo y bowl totalmente descartables como el modelo Haemonetics 30S.

En 1977 IBM desarrolla el modelo 2997 de flujo continuo que es el primero en usar una cámara de centrifugación en cinturón (belt system) en lugar de bowl como hasta ahora (31).

En 1979, la firma Baxter presenta el separador celular de flujo continuo CS-3000 que utiliza también un cinturón de separación siendo además el primer equipo computarizado para realizar los procedimientos de hemaféresis (32).

Sin embargo, es el de mayor tamaño hasta el momento actual.

En 1984, IBM pierde interés en el desarrollo de estas máquinas y vende su patente a COBE Laboratorios, fundada en 1964, la cual crea la división Blood Component Technology (BCT). En 1988, COBE anuncia su modelo Spectra que utiliza cinturón de separación y totalmente computarizado (33). En 1996, agrega el sistema de leucoreducción (LRS, Leuco Reduction System) en los procedimientos de plaquetaféresis con el fin de obtener plaquetas sin leucocitos contaminantes previamente a su almacenamiento, a temperatura ambiente y en agitación continua. El modelo Spectra se utiliza para realizar hemaféresis tanto en donantes como pacientes. En 1990, Gambro adquiere COBE. En 1997, se produce el modelo Trima-Accel para ser utilizado en donantes. No realiza procedimientos de plasmáfesis o citaféresis terapéuticas.

En el 2007, Gambro presenta el modelo Spectra Optia sobre una plataforma de Trima más portable y de menor tamaño con el sistema AIM (automatic interface management) tanto para donantes o pacientes y mediante un sistema extracorpóreo de flujo continuo.

En el 2008, Gambro cambia de nombre a Caridian-BCT (www.caridianbct.com).

En 1996, la FDA aprueba el separador celular Amicus de Baxter para la realización de plaquetaféresis. Este nuevo modelo computarizado es más pequeño y portátil que el anterior CS3000.

También la firma Fresenius en la década de 1990 presenta el modelo AS104 con un cinturón de centrifugación por flujo continuo que tiene el menor volumen extracorpóreo de 175 ml. Es prácticamente similar a la Cobe-Spectra por su tamaño y funcionamiento.

Existe una variedad de equipos de afé-

sis disponibles actualmente, cada uno con sus ventajas y desventajas pero la vigorosa competencia entre las marcas ha resultado en avances tecnológicos significativos.

Como ya vimos, de acuerdo al método empleado las técnicas de hemaféresis pueden clasificarse en métodos manuales o mecánicos. La aféresis manual requiere de un sistema de bolsas plásticas múltiples y una centrífuga refrigerada. Aunque el procedimiento es muy sencillo y económico consume mucho tiempo, es menos eficiente, es incómodo para el donante y con el riesgo potencial del error técnico o administrativo en los componentes que se devuelven al donante.

En cambio, la aféresis mecánica es aquella en la que empleamos un tipo de instrumento especialmente diseñado para ello (separadores celulares). Las primeras máquinas diseñadas para tal fin eran manuales con una gran participación del operador. Luego se fueron utilizando máquinas cada vez más automáticas y computarizadas con una participación mínima del operador en el proceso de aféresis, con un completo sistema de alarmas y de corte. La mayoría de estos equipos se basan en la separación celular de los elementos formes de la sangre por un proceso de sedimentación por centrifugación de acuerdo a su peso específico. A medida que la sangre es extraída se mezcla con el anticoagulante en la proporción adecuada y entra al recipiente rotatorio de la centrífuga (bowl en los equipos Haemonetics y cinturón en los de flujo continuo). De acuerdo a como retornan los componentes no retenidos al donante o paciente, los instrumentos se clasifican en flujo continuo o intermitente. El hecho que en el procedimiento se retornen al individuo el resto de los componentes sanguíneos, permite repetirlo sin necesidad de esperar las 8 a 12 semanas reglamentarias que deben espaciar una donación de sangre total en bolsa plástica. De esta manera, un mismo donante puede ser utilizado varias veces para un mismo paciente. La mayoría de los equipos disponibles actualmente permiten extraer más de un hemocomponente como plaquetas y plasma por ejemplo. A medida que evolucionó la tecnología, los equipos automáticos de última generación permiten obtener grandes cantidades de células. Por ejemplo, para una plaquetaféresis el mínimo de células establecido para un concentrado es de 3 por

10¹¹. Muchas veces los productos obtenidos superan esta cifra obteniéndose hemocomponentes dobles o triples.

Actualmente los procedimientos de hemaféresis se realizan prácticamente todos con equipos automatizados.

En Uruguay, la historia de la hemaféresis mecánica comienza a principios de la década de 1980 con la llegada de los primeros separadores celulares. Uno de flujo continuo, Aminco Celltrifuge, para la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas (figura 5.3) y dos de flujo discontinuo Haemonetics modelo 30S para el servicio de Hemoterapia del Hospital Militar y del Hospital Británico (figura 5.4).



Figura 5.3 - Separador celular de flujo continuo Celltrifuge-Aminco utilizado en donantes y pacientes a partir del año 1981 en el Hospital de Clínicas, Cátedra de Medicina Transfusional.

En la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas conectamos al separador celular el primer donante de aféresis el 23 de noviembre de 1981. En el período transcurrido entre el mes de noviembre de 1981 y abril de 1986, realizamos 336 procedimientos de hemafé-



Figura 5.4 - Separador celular de flujo discontinuo Haemonetics modelo 30S.

sis, de los cuales 183 fueron en donantes (116 en el separador Aminco y 67 de filtración de flujo continuo).

Las técnicas de hemaféresis pueden realizarse en donantes para extraer hemocomponentes normales con fines transfusionales a pacientes con alteraciones cuali o cuantitativas de los mismos o para obtener materia prima para obtener hemoderivados por fraccionamiento industrial. De esta manera se pueden obtener componentes celulares (citaféresis) o plasmáticos (plasmaféresis) normales. Las técnicas de aféresis también pueden utilizarse para remover componentes patológicos de sangre ya sea celulares o plasmáticos (citaféresis y plasmaféresis terapéuticas).

Como ya mencionamos, el 23 de noviembre de 1981 conectamos, en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas, el primer donante voluntario al separador Aminco para realizar un procedimiento de plaquetaféresis. En 1983, publicamos la experiencia de los primeros 30 procedimientos de plaquetafé-

sis mecánica mediante el método descrito previamente por Herzig y colaboradores (34) en 1971. En este estudio realizamos el análisis morfológico y funcional de las plaquetas obtenidas por centrifugación de flujo continuo (CFC) y por centrifugación diferencial (CD) en bolsas plásticas múltiples (35). Desde el punto de vista funcional encontramos algo interesante que debimos resolver como muchas cosas en medicina. Las plaquetas obtenidas por CFC agregaban normalmente *in vitro* con ADP y adrenalina pero las obtenidas por CD lo hacían débilmente a pesar de que ambas tenían una buena respuesta clínica *in vivo*. Luego de estudiar varios parámetros que podían influenciar la curva de agregación plaquetaria *in vitro*, llegamos a la conclusión que “las diferencias en las curvas de agregación *in vitro* con ADP y adrenalina en las plaquetas obtenidas por CFC y CD se deben a una variación de la relación anticoagulante/sangre pues mientras en la CD la relación citrato/sangre era de 4/1 en la CFC es menor al utilizarse una mezcla de ACD con heparina”. Por tanto, en las plaquetas obtenidas por CFC la concentración de calcio ionizado es mayor y posibilita la agregación ante agentes fisiológicos calcio dependientes. Por el contrario, en la CD la mayor acción quelante del ACD o CPD hacen que los niveles de calcio no sean suficientes para permitir la agregación *in vitro* lo cual se revierte *in vivo* en la sangre del receptor. Sugerimos y demostramos que la agregación de las plaquetas de CD debía medirse *in vitro* con ristocetina que no es calcio dependiente o mediante ADP o adrenalina previo agregado de ión calcio.

Para los estudios morfológicos se realizaron microfotografías en el microscopio electrónico de la División Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable en Montevideo.

Las plaquetas de CFC contenían menos gránulos de glucógeno. Las de CD menor cantidad de cuerpos densos y mayor activación dada por la presencia de pseudopodios.

La plaquetaféresis mecánica es un procedimiento que se sigue realizando en el Uruguay sobre todo en centros asistenciales donde se realizan trasplantes o para el tratamiento de pacientes hematológicos. Las máquinas actuales son automatizadas y computarizadas, permiten obtener mayor concentración de plaquetas en menos tiempo, con una viabilidad *in*

vitro de 5 días y con mejor calidad dado que tienen menos elementos celulares contaminantes. A su vez, los hemocomponentes son leucoreducidos en el proceso de su preparación (sistema LRS, Leuco Reduction System) o mediante filtros en las tubuladuras (filtración en línea). La plaquetaféresis mecánica al igual que los métodos de transfusión autóloga tuvieron un gran desarrollo en la década de 1980 debido a la pandemia del VIH. Con los procedimientos de aféresis se obtiene una cantidad mínima equivalente a por lo menos seis concentrados de CD lo que permite limitar la exposición a donantes múltiples. A su vez, el donante de aféresis puede volver a donar a las 72 horas y en forma reiterada para un mismo paciente disminuyendo el riesgo de enfermedades transmisibles por exposición a donantes múltiples.

En Uruguay, se produjo un incremento progresivo de la plaquetaféresis a partir del año 1995 cuando el Fondo Nacional de Recursos (FNR) incluye al trasplante de médula ósea dentro de los Institutos de Medicina Altamente Especializada (IMAE). Según datos estadísticos aportados por el Servicio Nacional de Sangre en 1995 se realizaron 1106 plaquetaféresis, 1159 en 1996, 1599 en 1997, 1560 en 1998, 1792 en 1999 y 1853 en el año 2000 lo cual demuestra un incremento significativo.

La plaquetaféresis terapéutica tiene como único objetivo extraer plaquetas del espacio intravascular en aquellos pacientes con trombocitosis sintomáticos lo cual, por lo general, ocurre con recuentos de más de 1 por 10^6 plaquetas en sangre. En 1975, Greenberg y Watson-Williams (36) reportan la realización de seis procedimientos de plaquetaféresis en un paciente utilizando un separador celular Haemonetics de flujo discontinuo resultando en un descenso del recuento plaquetario entre 33 y 66%.

Taft y colaboradores en 1977 (37), realizan plaquetaféresis en cinco pacientes utilizando un separador de flujo continuo Aminco Cell-trifuge o discontinuo Haemonetics procesando 3 a 11 litros de sangre durante 3 a 4 horas. La mayoría de los pacientes requerían dos o tres procedimientos para lograr una reducción efectiva. Burgstaler y Pineda en 1994 (38) utilizando un separador Cobe-Spectra muestran una reducción del recuento plaquetario promedio del 43% en 34 pacientes luego de un proce-

diminución de aféresis y de 53% en 32 pacientes utilizando aféresis con un separador Haemonetics V50 o 30S. Sin embargo, el recuento plaquetario no se correlaciona con la aparición o desaparición de los síntomas. Según las primeras guías de plaquetaféresis terapéutica de la American Society for Apheresis (ASFA) y la American Association of Blood Bank (AABB) publicadas en 1992, ésta es indicación de terapia primaria o de primera línea en el caso de trombocitosis sintomáticas (39).

Continuando con la hemaféresis en donantes realizamos en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas las primeras leucaféresis para realizar el tratamiento en pacientes inmunocomprometidos con recuentos de granulocitos inferiores a 500 células por milímetro cúbico e infecciones bacterianas o micóticas. El primer estudio que mostró un efecto beneficioso de la transfusión de granulocitos normales en pacientes con infecciones fue reportado por el National Cancer Institute de USA en 1972 (40).

En 1977, Herzig y colaboradores demuestran que la transfusión de granulocitos es un complemento apropiado de la antibioticoterapia para el tratamiento de pacientes con septicemia de gérmenes gram negativos. En este trabajo (41), los granulocitos fueron obtenidos por filtración (FL) o por CFC en un separador Aminco Celltrifuge.

Cinco años después, en 1982 presentábamos en el II Congreso Latinoamericano de Hemoterapia e Inmunoematología que se desarrolló en Buenos Aires en diciembre, nuestra experiencia en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas en la realización de 60 leucaféresis en donantes normales, 30 por filtración de flujo continuo utilizando filtros de nylon (leucopack) y 30 por CFC (42). En ambos casos se usaba la premedicación con dexametasona para aumentar la cantidad de neutrófilos circulantes.

En la CFC se utilizaban además, agentes sedimentantes de los eritrocitos (macromoléculas) para permitir una mejor extracción del buffy coat.

En el estudio morfológico los granulocitos obtenidos por CFC mantuvieron su estructura normal in vitro mientras que los de FL muestran la presencia de vacuolas y pseudopodios según las microfotografías realizadas en el Instituto Clemente Estable de Montevideo.

Como hemos documentado, la leucaféresis en donantes normales se realizó por primera vez en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas utilizando las tres técnicas disponibles en ese momento: la leucaféresis por sedimentación o gravedad en bolsas plásticas, por filtración y utilizando un separador celular de flujo continuo. El hospital de Clínicas fue el único centro asistencial que realizó este tipo de terapia impulsada también por la Cátedra de Hematología que dirigía Roberto De Bellis.

Entre 1985 y 1995 la leucaféresis de donantes normales fue discontinuada en la mayoría de los países incluyendo Uruguay, principalmente por la aparición de nuevos antibióticos y porque las dosis obtenidas de granulocitos junto con la vida media muy corta no eran suficientes para el tratamiento de pacientes adultos.

Después de 1995 con la utilización clínica del factor recombinante estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF) se abrió una nueva era en la transfusión de granulocitos dado que la administración de este factor solo o asociado a dexametasona en sujetos normales 12 horas antes de la colecta incrementaba sensiblemente la concentración de granulocitos obtenidos por aféresis (43). Los granulocitos obtenidos por esta técnica han mostrado tener una función normal tanto in vitro como in vivo. En algunos países se ha retomado la leucaféresis en donantes para realizar transfusiones granulocitarias en pacientes inmunodeprimidos con neutropenia e infecciones bacterianas o micóticas.

Las guías británicas sobre la transfusión de hemocomponentes en neonatos y niños mayores (44), recomiendan el uso de la transfusión de granulocitos en neonatos con sepsis cuando existe un deterioro del estado general aún luego de la terapia con antibióticos y con una neutropenia severa por más de 24 horas. Estos pacientes pueden también responder a la administración de G-CSF y actualmente no está claro cual de estas dos opciones es más efectiva.

Otros trabajos recientes, muestran la eficacia de la transfusión de granulocitos en niños con infecciones a hongos (aspergilosis) y en pacientes con neutropenia y fiebre que recibieron un trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (45) (46).

Se está realizando en el momento actual el estudio multicéntrico RING, un trabajo clínico en fase III, para determinar la eficacia de la transfusión de granulocitos en pacientes adultos. Los resultados estarán disponibles recién en tres o cuatro años.

En nuestro país, a pesar de contar con la tecnología para hacerlo no se ha retomado la leucaféresis en donantes quizá porque es un procedimiento que no está incluido por el FNR dentro de los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas.

La leucaféresis terapéutica está indicada en el caso de recuentos de leucocitos mayores de 100.000 por mm^3 para reducir la carga tumoral antes del inicio de quimioterapia de inducción en leucemias agudas y así evitar el síndrome de lisis tumoral. De igual modo puede utilizarse en pacientes con leucemias agudas o crónicas cuando el recuento elevado constituye un riesgo de leucoestasis cerebral o pulmonar y en algunos casos puede ser un procedimiento requerido de emergencia.

En 1984, realizamos en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas, leucaféresis terapéuticas en un paciente de 50 años con síndrome de Sézary refractario a la quimioterapia (figura 5.5). Presentaba, desde hacía nueve meses, linfadenomaegalias y lesiones de piel generalizadas descamantes producidas por la infiltración de células T patológicas (núcleo polilobulado). Se realizaron cinco procedimientos de leucaféresis en el separador de flujo continuo Aminco Celltrifuge en

un período de dos semanas removiendo un total de 6,9 por 10^9 leucocitos de los cuales el 90% eran células de Sézary. Luego del quinto procedimiento, disminuyeron las linfadenomegalias y retrocedieron completamente las lesiones de piel. Este trabajo fue publicado en inglés, en la revista Vox Sanguinis, Journal of International Society Blood Transfusion (ISBT) con sede en Amsterdam (47).

Actualmente, este linfoma a células T con manifestaciones cutáneas, al igual que la reacción de injerto versus huésped crónica, son sometidos a leucaféresis para obtener leucocitos patológicos que son tratados ex vivo por fotoféresis mediante 8-metoxypsoralen que se fija a los ácidos nucleicos y luz ultravioleta que hace esta unión irreversible. Se inhibe la capacidad mitótica de estas células antes de ser reinfundidas al paciente junto con los eritrocitos, plaquetas y plasma autólogos no tratados con fotoféresis (48). Dentro de las indicaciones actuales en investigación de la fotoféresis están el tratamiento del rechazo agudo de órganos sólidos y algunas enfermedades autoinmunes (49).

El objetivo de la obtención de linfocitos, linfocitaféresis, es la realización de inmunoterapia adoptiva. Este término fue propuesto por primera vez por Mathé en la década de 1960 para describir la transferencia pasiva de células inmunocompetentes de un donante normal a un receptor inmunodeficiente como por ejemplo los pacientes hematológicos (50). A principios de la década de 1970 se realizaron los primeros trabajos de experimentación animal.

En 1981, Weiden y colaboradores (51) describen el efecto beneficioso de la enfermedad de injerto versus huésped (GVHD) en prevenir la recaída de leucemia. En los pacientes con GVHD crónica la disminución en la tasa de recaída se asociaba a mejor supervivencia.

En ese mismo año, se pone en evidencia el rol de las células T en la producción de GVHD cuando se utilizan injertos deplecionados de estas células para prevenir la enfermedad de GVHD. Sin embargo, la depleción de células T de los injertos hizo aumentar el número de recaídas en varios tipos de leucemia y en especial en la LMC.

En la década de 1980 se define entonces que las células T son responsables de una reacción no deseada la GVHD y de un efecto bene-

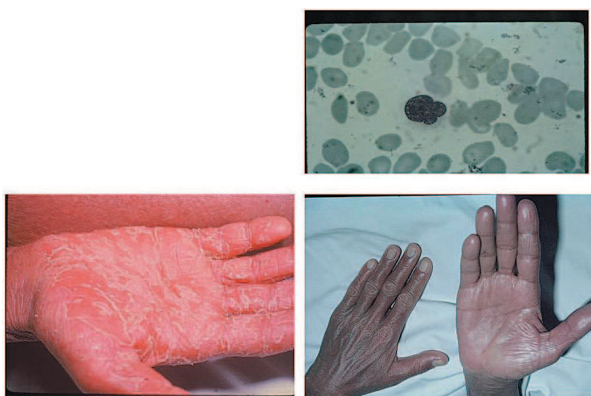


Figura 5.5 - Leucaféresis terapéutica realizada en 1984 con el separador celular Celltrifuge-Aminco en un paciente con Síndrome de Sézary. Arriba a la derecha las células de Sézary extraídas (típico linfocito T con núcleo polilobulado). Abajo a la izquierda la mano del paciente cuando se realiza el diagnóstico y a la derecha después de los procedimientos de leucaféresis.

ficioso para el receptor que se define como de “injerto versus leucemia” (GVL) (52).

El objetivo del trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas para el tratamiento de enfermedades hematológicas consiste en prevenir la GVHD pero sin disminuir el GVL. El problema es que ambos efectos son producidos en el receptor por la misma célula. De esta manera se propone realizar el trasplante alogénico deplecionado en células T para evitar la GVHD, luego esperar por lo menos 8 semanas hasta que se produzca el quimerismo y la tolerancia inmunológica del injerto para luego realizar inmunoterapia adoptiva inyectando linfocitos obtenidos por aféresis del mismo donante del injerto con el fin de producir GVL. En 1988, se realizan las primeras infusiones de linfocitos (DLI, donor lymphocyte infusion) para el tratamiento de las recaídas postrasplante de LMC. En el 70 a 80% de los pacientes tratados con DLI se obtiene una remisión citogenética completa (53). Las remisiones son duraderas. Los primeros pacientes tratados en 1988 aún se encuentran en remisión. El 50% de los pacientes presentan remisión sin signos de GVHD lo cual indica que hay una GVL separada de GVHD o una GVHD sin signos clínicos.

En Uruguay, las primeras linfocitaféresis para realizar DLI, en las recaídas de los trasplantes alogénicos principalmente de LMC, se comenzaron a realizar a finales de la década de 1990 en las unidades de trasplante de médula ósea del Hospital Maciel y la Asociación Española de Montevideo.

La linfocitaféresis la realizamos en un separador celular Cobe-Spectra de flujo continuo (figura 5.6) del mismo donante del trasplante alogénico. El objetivo es obtener células inmunocompetentes que tienen el antígeno de diferenciación celular CD3+. El control de calidad del producto de aféresis se realiza por citometría de flujo donde se establece la cantidad de células CD3+. Las infusiones al paciente se realizan siguiendo un protocolo de dosis crecientes por lo cual el producto obtenido se divide en alícuotas para su criopreservación en nitrógeno líquido. En los trasplantes HLA idénticos se comienza con dosis de 5 por 10^6 por kilo de peso, en los de donantes no relacionados con 0,5 por 10^6 y en los de HLA haploidénticos con 1 por 10^5 .

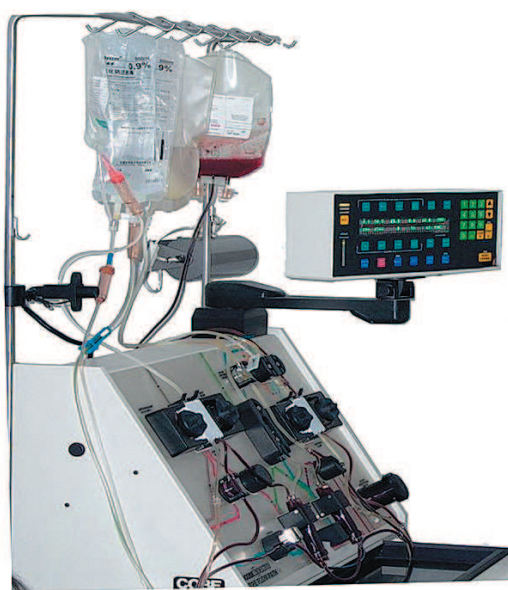


Figura 5.6 - Separador celular de flujo continuo Cobe-Spectra que se comienza a usar en Uruguay en la década de 1990. Es el que se utiliza actualmente en los cuatro centros de trasplante de médula ósea (IMAE) para cosechar células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica.

Esta técnica de linfocitaféresis la seguimos realizando hasta el momento actual.

En el nuevo milenio, los inhibidores de la tirosina-quinasa revolucionaron el tratamiento de la LMC debido a su alta eficiencia y baja toxicidad (54). La mayoría de los pacientes con recaída hematológica responden al imatinib con remisión citogenética. Pero, la mayoría de los pacientes recaen cuando la droga es discontinuada o las mutaciones de la tirosina-quinasa producen resistencia al imatinib. Por ello, algunos investigadores han propuesto realizar una terapia combinada con imatinib y DLI para tratar las recaídas postrasplante de LMC y lograr remisiones completas y duraderas (55).

A finales de la década de 1990 se establece que las células dendríticas o células presentadoras de antígeno pueden ser obtenidas para su aplicación clínica. Dada su baja concentración en sangre periférica, se realizan monocitaféresis es decir, extracción de monocitos circulantes para luego ex vivo mediante ciertos estimulantes (GM-CSF e IL-4) producir la maduración y diferenciación a células dendríticas. Actualmente contamos con un sistema de aféresis específico para obtener monocitos a través de un separador Cobe-Spectra que

es el Elutra System. Mediante este sistema de aféresis de alto rendimiento se pueden obtener monocitos de un paciente con cáncer, realizar la diferenciación in vitro a células dendríticas, agregarle péptidos tumorales y reinyectarlas como tales al paciente para que estimulen su respuesta inmune antitumor. Así, mediante esta técnica se están utilizando vacunas antitumorales con buenos resultados en los casos de melanomas por ejemplo.

En el curso de hemaféresis, que organizamos en el XXXI World Congress of the International Society of Hematology (ISH) y que se realizó por primera vez en Uruguay en marzo del 2007, invitamos a Gunnar Kvalheim del Departamento de Terapia Celular de la Universidad de Oslo en Noruega a dictar una conferencia sobre "Obtaining monocytes for production of dendritic cells by Elutra system" (56). En dicha conferencia, Kvalheim expuso su experiencia en la producción de autovacunas antitumorales mediante células dendríticas en 28 pacientes con melanoma y en 23 con cáncer de próstata.

Esta técnica aún no se realiza en Uruguay pero la Cátedra de Medicina Transfusional presentó un proyecto aprobado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República que se encuentra en desarrollo junto con el Departamento Básico de Medicina y el INDT para crear una factoría de terapia celular en el Hospital de Clínicas. Uno de los objetivos es producir autovacunas tumorales a partir de células dendríticas.

En 1949, Leon Jacobson (57) demuestra que los ratones expuestos a irradiación letal pueden sobrevivir si sus bazo y en posteriores estudios la médula ósea eran resguardados. La infusión de su médula ósea a estos ratones producía la sobrevida por un efecto celular más que humoral. En 1956, Barnes y colaboradores (58), reportan el tratamiento de ratones con leucemia con la infusión de médula ósea normal luego de irradiación letal.

En 1955, Donnall Thomas comienza a trabajar en el Mary Imogene Bassett Hospital en Cooperstone de New York junto con Joseph Ferrebee. Ambos, en 1957, describen la primera experiencia de trasplante alogénico de médula ósea en humanos en seis pacientes con leucemia tratados con irradiación y quimio-terapia. Se infundieron intravenosamente con médula

ósea de donantes normales pero solamente un injerto transitorio fue observado (59). El único trasplante exitoso fue realizado por Thomas en 1959 entre gemelos idénticos (60).

En 1965, Mathé y colaboradores (61) reportan el primer trasplante alogénico duradero en un paciente con leucemia pero el paciente fallece por complicaciones que probablemente se debieran a GVHD crónica.

En 1968, Gatti y colaboradores (62) realizan el primer trasplante alogénico exitoso en un paciente con inmunodeficiencia. Estudios posteriores demostraron que el donante y receptor sólo diferían en un antígeno del sistema HLA.

En 1963, Donall Thomas se muda a Seattle donde con sus colegas desarrolla un sistema rudimentario para tipificar antígenos caninos de histocompatibilidad. Al mismo tiempo, se describe el primer método para determinar HLA y Thomas decide retomar su experiencia en los trasplantes de médula ósea. En 1969, el grupo de Seattle comienza con los trabajos clínicos de trasplante alogénico de médula ósea con tipificación HLA.

En 1975, un artículo de revisión, describe el estado del trasplante alogénico en ese momento (63). Se presentan los resultados de 37 pacientes con anemia aplásica y 73 con leucemia, todos trasplantados ante el fallo de la terapia convencional. La respuesta fue notable en los pacientes con anemia aplásica mientras que sobrevivieron en remisión solo algunos de los pacientes con leucemia.

En 1999, los resultados clínicos acumulados durante 20 años del trasplante de médula ósea en distintas patologías fueron descritos por Thomas en el libro "Hematopoietic Cell Transplantation" (64).

El trasplante autólogo de médula ósea comenzó su experiencia en humanos en la década de 1950. En un reporte reciente (65), se describe un paciente con linfoma que recibe altas dosis de mostaza nitrogenada y un trasplante autólogo de médula ósea en 1959 con una remisión de 21 años de duración. Desde los finales de la década de 1970, los trasplantes autólogos tuvieron un dramático incremento en el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas y tumores sólidos.

Los primeros estudios de trasplante utilizaron células obtenidas de la médula ósea ya sean autólogas o alogénicas. Luego, en 1991

se demuestra que las células CD34+ separadas de la médula ósea son efectivas para el injerto (66) y se comienzan a obtener estas células por hemaféresis de sangre periférica lo que lleva al cambio de denominación de trasplante de médula ósea (TMO) al de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) las cuales actualmente se obtienen también de cordón umbilical.

Las primeras experiencias con CPH periféricas comienzan con los estudios que demuestran la presencia de estas células en sangre de ratones, perros y primates entre 1962 y 1977 (67) (68) (69). La cosecha de CPH de sangre periférica comienza prácticamente con el desarrollo de los separadores celulares por un lado y con la demostración entre 1987 y 1990 que la cantidad de CPH en sangre puede ser incrementada mediante la administración de factores recombinantes de crecimiento hematopoyéticos (70). Las ventajas de la hemaféresis para colectar CPH es que el donante no debe concurrir a block quirúrgico, no recibe anestesia general ni múltiples punciones de la cresta iliaca pósterio-superior. A su vez, el número de células CD34+ que se colectan por vía periférica es muy superior al de la médula ósea, con menos elementos celulares contaminantes y con una respuesta del injerto más acelerada.

En el Uruguay, los primeros trasplantes que se realizan en el Hospital Británico a partir de 1985 las CPH se obtienen de médula ósea. Luego de 1995 cuando el Fondo Nacional de Recursos incluye el trasplante de MO dentro de los Institutos de Medicina Altamente especializada (IMAE) se crean tres centros de trasplante de MO: uno público en el Hospital Maciel y dos privados Impasa y Asociación Española. Éste es el último centro autorizado por el FNR en 1997 pero consta de dos unidades de trasplante de MO una para pacientes adultos y otra pediátrica donde se concentra casi el 100% de los trasplantes hasta los 15 años de edad.

A partir de 1997 en Uruguay se comienza a producir un incremento significativo de la hemaféresis de sangre periférica como fuente de obtención de CPH siendo a partir del año 2000 la principal vía de obtención de CPH tanto para trasplantes autólogos como alogénicos, en pacientes adultos o pediátricos aún con bajo peso.

En la Asociación Española, centro donde trabajamos, en el período de 1997 a 2000 se realizaron un total de 162 cosechas de sangre periférica (SCP, stem cell periféricas) y 39 de médula ósea en 103 pacientes. Pero, en 1997 en 12 pacientes se realizaron 11 MO y 10 SCP mientras que en el año 2000 67 SCP y 5 MO en 41 pacientes.

En las cuatro unidades de trasplante funcionando en Uruguay actualmente todas utilizan un separador Cobe-Spectra para realizar la colecta de CPH de sangre periférica por hemaféresis con lo cual se unifican los protocolos.

Desde 1994, en que Demeocq (71) reporta el primer trabajo de cosecha periférica de CPH en niños con menos de 25 kilos una gran cantidad de reportes científicos han demostrado que las cosechas periféricas son de fácil realización, menos traumáticas y de recuperación hematológica más rápida del receptor.

En los pacientes pediátricos con menos de 20 kilos para realizar la hemaféresis en primer lugar debemos contar con un buen acceso venoso tanto en pacientes como en donantes normales. En los pacientes por lo general el sistema venoso periférico no se encuentra en buenas condiciones para realizar la extracción e infusión continua de cuatro o cinco volemias. Generalmente, en los pacientes se coloca un catéter de doble luz ideado por Robert Hickman. En los donantes normales si no existen buenos flujos venosos periféricos se coloca por lo general un catéter femoral el cual se retira luego del procedimiento y del recuento celular del producto obtenido por hemaféresis. En todos los casos, el inicio de la colecta de CPH de sangre periférica está determinado por el conteo de estas células CD34+ por citometría de flujo. Se comienza la cosecha cuando existen más de 10 células CD34+ por mm³.

El segundo aspecto en los pacientes de bajo peso es a veces la falta de cooperación por lo cual el donante recibe medicación sedante en estos casos. Es conveniente que por lo menos uno de los padres esté presente en el procedimiento.

Para compensar el volumen del circuito extracorpóreo se ceba la máquina con una unidad de sangre desplasmatizada compatible, leucoreducida e irradiada con irradiación gamma.

Para evitar la hipotermia se calefacciona la vía de retorno al donante mediante un calefactor en línea de temperatura controlada.

Previo al procedimiento se solicita rutinariamente un hemograma, un ionograma y un estudio de hemostasis básico o algún otro estudio específico de acuerdo a la situación clínica del paciente o donante. Para corregir la hipocalcemia producida por el anticoagulante ACD se administra calcio por vía oral durante y/o después del procedimiento de por lo menos tres volemias en una misma sesión.

Otro de los elementos a tener en cuenta sobre todo cuando el donante es el mismo paciente es la trombocitopenia que puede producir el procedimiento en el 30 a 60% de los casos según distintas series de trabajos.

Para discutir y compartir la experiencia sobre los aspectos de la hemaféresis de grandes volúmenes para colectar CPH invitamos, en el curso de hemaféresis que se desarrolló en el XXXI Congreso Mundial de la ISH en marzo del 2007 en Uruguay, al Jefe de la Unidad de Trasplante del Instituto Argentino de Diagnóstico y Tratamiento quien mostró su experiencia en 48 procedimientos de colecta de CPH en 22 niños de menos de 15 kilogramos (72).

Los niños más pequeños con menos de 10 kilos son extremadamente sensibles a la hipocalcemia. Las manifestaciones clínicas incluyen convulsiones e hipotensión severa. Los niños pequeños no reportan parestesias incipientes sobre todo peribucal como los niños mayores o los adultos. Se puede realizar el procedimiento con heparina o si se utiliza ACD realizar un monitoreo del calcio ionizado y un goteo continuo intravenoso.

Nosotros preferimos esta última opción. El 28/04/2009, Rossana Mezzano del equipo de Medicina Transfusional de la Asociación Española, realizó la colecta de CPH en sangre periférica, mediante un catéter femoral y con un separador Cobe-Spectra en una donante de 7900 gramos para realizar el trasplante alogénico a su hermano mayor histocompatible que sufría una inmunodeficiencia congénita. Ésta es la colecta de CPH de menor peso que se ha realizado en el Uruguay hasta el momento actual, sin complicaciones y en un procedimiento de hemaféresis se obtuvo un número de células CD34+ de 7,41 por 10^6 por kilo de peso, suficientes para realizar el trasplante el día 3 de junio del 2009.

Recientemente, hemos publicado nuestra experiencia durante 10 años en el trasplante de CPH en pediatría (73) la cual fue presentada en el Congreso Nacional de Hematología en noviembre de 2009. En Uruguay, la sobrevida de los niños con cáncer es comparable a la de los países desarrollados. Con el objetivo de mejorar los resultados en pacientes con peor pronóstico y ofrecer opciones terapéuticas curativas a algunas enfermedades no malignas, en el año 1997 se inicia un programa de trasplante de CPH en pediatría con el financiamiento del FNR. La unidad de trasplante fue creada en el sanatorio de la Asociación Española compuesta de tres habitaciones dotadas de sistemas sofisticados de aislamiento. En 10 años se realizaron 131 trasplantes de CPH en 129 pacientes con una edad promedio de 7 años al tiempo del trasplante. Noventa pacientes fueron varones y 39 de sexo femenino. 92 trasplantes fueron autólogos y 39 alogénicos (37 relacionados HLA idénticos y dos no relacionados, uno de sangre de cordón y el otro de médula ósea). Un paciente recibió un segundo trasplante alogénico del mismo donante 22 meses más tarde del primero y otro paciente recibió dos trasplantes autólogos en "tandem" con diferencia de 40 días. El promedio del tiempo de estadía en la unidad desde el inicio del acondicionamiento hasta el alta fue de 30 días. 84 pacientes recibieron CPH obtenidas por hemaféresis de sangre periférica (16 alogénicos y 68 autólogos) y 37 pacientes CPH de MO (23 alogénicos y 14 autólogos). En nueve pacientes se obtuvieron CPH de ambos orígenes. En el paciente restante las CPH fueron de sangre de cordón siendo el primer trasplante de este tipo que se realizó en el país. La cantidad de células CD34+ infundidas tuvo una media de 5,5 por 10^6 por kilo de peso.

A pesar de tratarse de una experiencia institucional, bien puede considerarse como nacional ya que incluye casi el 100% de los trasplantes pediátricos con CPH realizados en Uruguay entre enero de 1997 y diciembre de 2006.

Actualmente existe la posibilidad de realizar eritrocitaféresis tanto en donantes como pacientes. Para obtener un doble producto de glóbulos rojos de un donante la compañía Caridian ha presentado un sistema para el separador Trima Accel. Los protocolos aprobados por la AABB y la FDA (74) (75) permiten

la extracción automatizada de dos unidades de eritrocitos autólogos o alogénicos cada 16 semanas. Para minimizar la pérdida de volumen se emplea solución salina fisiológica y el procedimiento se lleva a cabo en personas con mayor superficie corporal y hematocrito que los donantes comunes de una unidad de glóbulos rojos (varones 67,5 Kg y 1,60 m, mujeres 58,5 Kg y 1,55 m con hematocrito superior a 40% para ambos sexos).

La eritraféresis terapéutica se realiza por métodos automáticos utilizando un separador celular en los casos de malaria grave, en las complicaciones o crisis hemolíticas de la anemia falciforme u otras hemoglobinopatías (76). En el caso de la anemia drepanocítica el objetivo es recambiar los eritrocitos que tienen hemoglobina S por glóbulos rojos normales con hemoglobina A hasta una proporción del 60 al 80%. Para evitar el incremento de la viscosidad sanguínea en este tipo de pacientes el hematocrito final debe estar entre 30 y 35%. También se puede utilizar la eritraféresis terapéutica automática en los casos de policitemia con hipervolemia e hiperviscosidad sanguínea.

Es de hacer notar que, en el momento actual, existen máquinas separadoras celulares que se utilizan para hemaféresis en donantes pero con las cuales no se puede realizar hemaféresis terapéutica. En cambio, existen otros separadores que se utilizan tanto en procedimientos de pacientes como de donantes.

Plasmaféresis usando equipos automáticos

Cuando se extraen cantidades pequeñas de plasma (500-650 ml) sin solución de reemplazo o sólo con suero fisiológico el término apropiado es plasmaféresis (plasmapheresis).

Cuando se extraen cantidades mayores de plasma y se infunden cristaloides o coloides y ocasionalmente plasma de reemplazo, el término correcto es recambio plasmático (plasma exchange).

La plasmaféresis automática se utiliza para obtener plasma de donantes normales para el fraccionamiento industrial y la producción de hemoderivados como albúmina, inmunoglobulinas, factores de la coagulación, etc.

El recambio plasmático se utiliza en pacientes con el fin de remover sustancias patológicas plasmáticas (recambio plasmático terapéutico).

Como ya mencionamos, entre 1960 y 1980 las compañías comerciales obtenían el plasma a través de métodos de plasmaféresis manuales.

Una de las primeras colectas de plasma por métodos automáticos fue realizada por Rock y colaboradores en 1981(77) utilizando una modificación del modelo 50 de Haemonetics.

Las ventajas del método automático es que las células eran retornadas al donante en el mismo acto de extracción por un circuito de circulación extracorpóreo con la mitad del volumen del método manual. El procedimiento a su vez era más rápido que el manual y con mejor confort para el donante. Su desventaja era su alto costo.

Luego, a finales de la década de 1980, el modelo 50 fue reemplazado por el Plasma Collection System (PCS) una versión móvil de Haemonetics. Esta máquina semiautomática que utilizaba un bowl descartable, necesitaba una sola punción venosa para recolectar 600 ml de plasma en 30 minutos (78).

Durante las décadas de 1960 y 1970, Cobe Laboratories abastecía de sistemas extracorpóreos para hemodiálisis y la cirugía de bypass cardiovascular. Luego, desarrolla una membrana para separación del plasma de la sangre total que inicialmente se denominó Centry TPE System. Este fue el primer método de plasmaféresis por filtración aprobado por la FDA en 1982. Pero, en 1995 fue discontinuado (79).

En 1983, Lysaght y colaboradores (80) describen un novedoso sistema de “plasmaféresis por filtración espontánea” sin necesidad de bombas de circulación extracorpórea. El plasma se separa por gravedad y por la fuerza de la presión sanguínea a través de una membrana.

También en la década de 1980, Baxter desarrolla el sistema AutoPheresis C System (APC) por filtración de membrana para obtener plasma de donantes normales pero no separa los elementos celulares de la sangre (78).

En estos equipos, la sangre entera circula a través de una membrana con poros de tamaño definido. La presión más elevada de la sangre que en el filtrado posibilita el pasaje del plasma. En la mayoría, las membranas se disponen como fibras huecas o en placas planas.

Recientemente, Ashi Kasei Kuraray Medical Co. (www.apheresis.com) desarrolló un sistema de recambio plasmático terapéutico mediante filtración de membranas donde los

elementos celulares y el fluido de recambio plasmático son infundidos al paciente (Plasmaflotm AP-05H-L).

Recambio Plasmático Terapéutico (RPT)

1 – Las disproteinemias se caracterizan por la presencia en el plasma de proteínas anormales y generalmente de la clase de inmunoglobulinas. Cuando estas son producidas por una clona de células malignas se denominan paraproteínas o gamapatía monoclonal. Los síntomas y signos clínicos asociados a la paraproteinemia generalmente son producidos por hiperviscosidad, hipervolemia, sangrados, falla renal, neuropatía periférica o crioglobulinemia.

1.1- Mieloma múltiple

Se produce por una proliferación monoclonal de linfocitos B que sintetizan IgG (paraproteína). En el proteinograma electroforético (PEF) se observa un pico M en espejo con el de la albúmina a nivel de las inmunoglobulinas. El síndrome de hiperviscosidad ocurre solo en el 5% de los pacientes con mieloma. El RPT mejora la sintomatología de hiperviscosidad y disminuye el pico M o sea el nivel plasmático de paraproteína (figura 5.7). Sin embargo, no altera el curso de la enfermedad primaria por lo cual debe iniciarse en forma conjunta con el RPT la quimioterapia u otras terapéuticas que inhiban la síntesis de las paraproteínas.

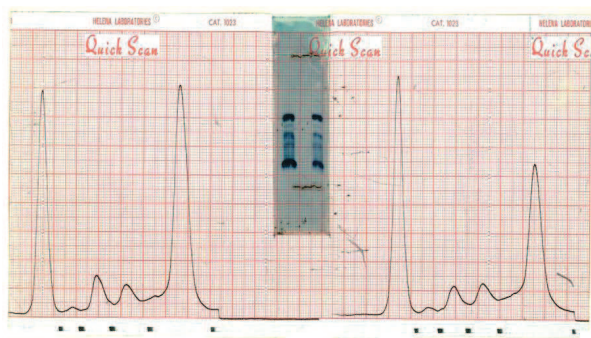


Figura 5.7 - Proteinograma electroforético en un paciente con mieloma, donde se observa el pico M en espejo con el de la albúmina (a la izquierda) y el descenso del mismo después de un recambio plasmático terapéutico realizado con un separador Celltrifuge-Aminco en el Hospital de Clínicas, Cátedra de Medicina Transfusional.

1.2- Macroglobulinemia de Waldeström

Es un síndrome linfoproliferativo donde los linfocitos B producen IgM monoclonal.

Más del 70% de los pacientes desarrollan síndrome de hiperviscosidad que se caracteriza por la tríada clínica de síntomas y signos neurológicos, oftalmológicos y hemorrágicos. Generalmente se presenta con un estado confusional, alteraciones de la visión y audición, sangrados mucosos y gastrointestinales y una retinopatía en el fondo de ojo (dilatación vasos sanguíneos, hemorragias retinianas y/o edema de papila).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1944 por el médico sueco Jan Gosta Waldeström nacido en Estocolmo el 17 de abril de 1906. Waldeström relata los casos clínicos de dos pacientes con hemorragias oronasales, linfadenomegalias, anemia normocrómica, aumento de la velocidad de eritrosedimentación (VES), trombocitopenia, hipoalbuminemia, hipofibrinogenemia y un número aumentado de células linfoides en la médula ósea (81). Contrasta esta condición clínica con el mieloma dado que no existían dolores óseos y las radiografías óseas eran normales. Además el exceso de células en la médula ósea eran linfoides y no plasmocitos como en el mieloma. Waldeström modifica el viscosímetro de Ostwald y demuestra un aumento de la viscosidad plasmática en ambos pacientes.

Si bien el síndrome de hiperviscosidad es de diagnóstico clínico en muchos centros asistenciales no existe la posibilidad de medir la viscosidad plasmática. El valor de la viscosidad sanguínea puede estar alterado por la anemia que presentan estos pacientes por lo cual lo correcto es medir la viscosidad plasmática y no compensar con transfusiones la anemia de estos pacientes.

En la década de 1980, en la Cátedra de Medicina Transfusional desarrollamos un método sencillo para la determinación de la viscosidad plasmática que nos sirve además para controlar la efectividad de la terapéutica y determinar el valor umbral para cada paciente en el cual aparece la sintomatología. El método que utilizamos fue una variación del descrito previamente por Wright y Jenkins en 1970 (82). Básicamente consiste en hacer pasar el plasma del paciente a través del capilar de la pipeta de recuento de glóbulos rojos o de glóbulos blancos mediante la fuerza de la gravedad (figura 5.8). Es decir, estamos reproduciendo in vitro lo que sucede in vivo en los capilares

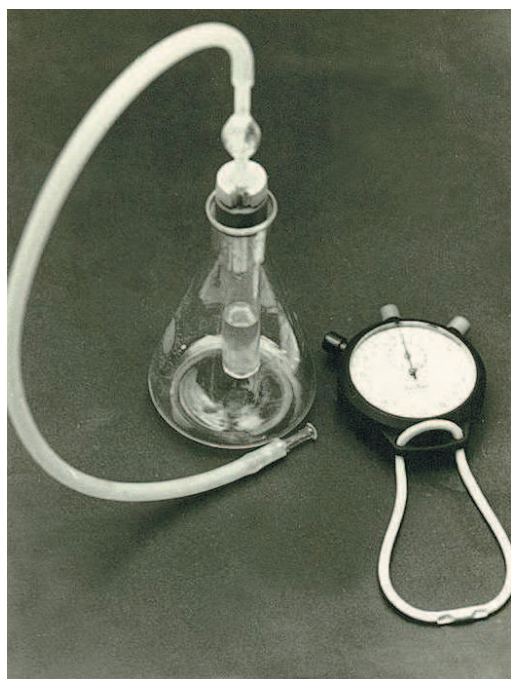


Figura 5.8 - Método para medir la viscosidad plasmática utilizando una pipeta capilar de recuento de glóbulos blancos. Hospital de Clínicas, Cátedra de Medicina Transfusional.

sanguíneos. Se mide el tiempo que demora en vaciarse la pipeta entre dos marcas (pre y post bulbo) comparado con el tiempo de un plasma normal y el agua. Así comparamos, la viscosidad plasmática capilar en 46 donantes normales de sangre y dos pacientes con paraproteíнемia y síndrome de hiperviscosidad clínico (un mieloma y una enfermedad de Waldeström). Ambos pacientes fueron tratados con RPT bisemanal utilizando el separador celular Aminco Celltrifuge de flujo continuo hasta la desaparición de la sintomatología midiendo antes y después de cada recambio la concentración de las paraproteínas por electroforesis e inmunodifusión radial así como la viscosidad plasmática capilar. En el paciente con mieloma se recambiaron 18 litros de plasma en un total de seis procedimientos y en el de Waldeström 6 litros en dos RPT. En ambos casos se produjo un descenso importante de las paraproteínas después de cada procedimiento así como de la viscosidad plasmática. Por ejemplo, en el caso del mieloma, luego del RPT de 18 litros la viscosidad plasmática absoluta medida con una pipeta capilar de recuento de leucocitos descendió de un valor inicial de 60,88 segundos a 11,96, la relativa

al agua destilada de 9,4 a 1,9 y la relativa al plasma normal de 6,8 a 1,3 (83).

Este método simple que publicamos en 1983 es un "point of care" actual dado que se realiza al lado de la cama del paciente, es de fácil realización, requiere sólo 1 ml de plasma o suero y es de flujo rápido por lo cual el resultado se obtiene de segundos a minutos.

El RPT no está indicado en el mieloma o en la enfermedad de Waldeström que no tienen síndrome de hiperviscosidad. Por tanto, la verdadera indicación de RPT es la hiperviscosidad plasmática secundaria y no la enfermedad de fondo. En la hiperviscosidad el RPT es una terapéutica de primera línea y de urgencia.

Es importante reconocer que en los pacientes con paraproteíнемia se pueden presentar síndromes hemorrágicos y/o alteraciones en las pruebas de hemostasis in vitro.

En dos pacientes con Macroglobulinemia de Waldeström encontramos una prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) con el resto de los estudios de hemostasis normales. En uno el APTT corregía al realizar diluciones del plasma demostrando la presencia de un inhibidor del factor VIII de interferencia por la paraproteína. En el otro paciente, el APTT prolongado corrigió con plasma normal por lo cual se diagnosticó un déficit de factor VIII (von Willebrand adquirido).

Estos pacientes, fueron presentados por la Cátedra de Medicina Transfusional en el congreso del grupo GLAHT en octubre del 2009 que se realizó en Venezuela.

Uno de los dos pacientes del reporte original de Waldeström presentaba además crioglobulinas (81). La crioglobulinemia se presenta hoy en el 15% de los pacientes con Waldeström lo cual puede aumentar o desencadenar el síndrome de hiperviscosidad y agregar síntomas adicionales como Raynaud, hepatoesplenomegalia, trombosis venosas, etc. Las crioglobulinas son proteínas plasmáticas que precipitan en frío (4 grados) formando un precipitado insoluble blanquecino que se disuelve a 37 grados.

La ocurrencia de la crioglobulinemia como enfermedad fue descrita por primera vez por Wintrobe y Buell en 1933 (84), en una mujer de 56 años con un mieloma múltiple que presentaba un fenómeno de Raynaud, púrpu-

ra, hepatoesplenomegalia y trombosis de las venas retinianas. Su suero contenía proteínas con características de crioglobulinas.

En 1947, Lerner y Watson (85) establecen el primer estudio sistemático de proteínas insolubles en frío que denominan “cryoglobulins”.

Nosotros, también en la Cátedra de Hemoterapia a principios de la década de 1980 realizamos RPT en un paciente de sexo masculino de 64 años que presentaba una enfermedad de Waldeström con síndrome de hiperviscosidad y crioglobulinas. En la figura 5.9 se muestra claramente el precipitado producido por las crioglobulinas y el descenso significativo al final de cada RPT.

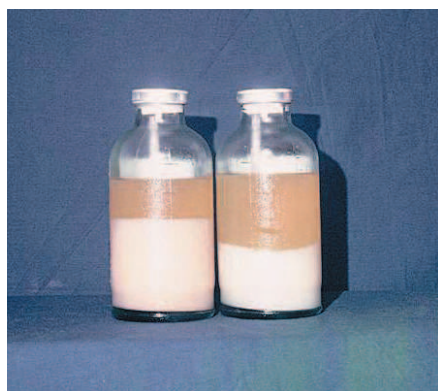


Figura 5.9 - Cantidad de crioglobulinas al inicio (frasco de la izquierda) y al final (frasco de la derecha) de cada procedimiento de recambio plasmático. Hospital de Clínicas, Cátedra de Medicina Transfusional.

En 1980, McLeod y Sasseti (86) describieron un método de “cryoglobulinapheresis” publicado en la revista Blood, que consistía en realizar RPT y el plasma obtenido colocarlo en la heladera a 4 grados para precipitar las crioglobulinas. Luego se extrae el plasma sobrenadante libre de crioglobulinas que es infundido como plasma de reemplazo autólogo en el siguiente RPT. Nosotros utilizamos este método para el tratamiento de este paciente completando el plasma autólogo devuelto al paciente con suero fisiológico y coloides, todos calefaccionados a 37 grados. Es importante en estos procedimientos de RPT con crioglobulinas además de calefaccionar el sistema de circulación extracorpórea hacerlo con el ambiente y también con el paciente de forma similar a cuando se presenta una anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos.

Un método que sirve para cuantificar objetivamente la eficacia del RPT en disminuir la concentración de las crioglobulinas es colocar el suero en un tubo de Wintrobe (que se usa para el hematocrito) a cuatro grados y luego establecer su nivel en la escala graduada (criocrito).

En el 2005, Siami (87) realiza 106 procedimientos de criofiltración en seis pacientes que presentaban un criocrito elevado. Para ello utiliza dos criofiltros Pall en paralelo en el circuito de circulación extracorpórea. Demuestra que la aféresis por criofiltración remueve los crioprecipitados plasmáticos pero reserva más del 90% de las proteínas plasmáticas del propio paciente como la albúmina, inmunoglobulinas y fibrinógeno. No se produce activación del sistema complemento y no requiere la reposición con cristaloides, coloides o plasma como en los RPT realizados en separadores celulares.

Los primeros RPT en gestantes con aloinmunización anti-D severa se realizaron por Graham-Pole y colaboradores entre 1974 y 1977 (88)(89) en un separador celular Aminco Celltrifuge similar al que funcionó en la Cátedra de Hemoterapia a partir de noviembre de 1981. El objetivo de esta terapéutica materna prenatal es descender los niveles de anticuerpos IgG que pasan la placenta hacia el feto con el fin de disminuir la gravedad de la anemia hemolítica fetal.

En 1981, van't Veer-Korthof y colaboradores (90) mostraban resultados favorables del RPT en una serie de gestantes aloinmunizadas inclusive en aquellas mujeres que tenían antecedentes de muerte fetal. En 1982, Rubinstein (91) demuestra que en aquellas gestantes donde el título de anticuerpos disminuía significativamente los fetos sobrevivían.

También en 1982, publicamos el primer caso en Uruguay de RPT intensivo (92) en una embarazada de 40 años que presentaba una aloinmunización anti-D severa, con antecedentes de 6 gestas, 3 abortos espontáneos y 3 óbitos, sin hijos vivos. La inmunización anti-D se había producido por transfusiones con sangre RhD positiva que la señora había recibido en el año 1962, previamente a las gestaciones, por un cuadro de hemorragia digestiva. Cuando recibimos a la gestante a las 27 semanas de gestación presentaba un título de anti-D en sangre de 1/512 con una pen-

diente ascendente del incremento de densidad óptica del líquido amniótico (LA) que la ponía en riesgo nuevamente de muerte intrauterina como en los embarazos anteriores. Se decide comenzar con RPT con el fin de disminuir la hemólisis fetal y estimular la maduración pulmonar con corticoides por un probable parto prematuro. Luego de realizados seis RPT bi-semanales, donde se intercambian 18 litros de plasma, disminuyen los anticuerpos en sangre y la pendiente del LA lo cual demuestra la efectividad del tratamiento materno. Utilizando heparina como anticoagulante que no pasa la placenta no se produjo hipocalcemia en ninguno de los procedimientos.

Luego, el título del anticuerpo materno comienza a incrementarse sucesivamente (respuesta anamnésica) no pudiendo ser disminuido por los RPT. Esto se traduce por

un aumento correlativo de la pendiente del LA pero retrasado en el tiempo dos semanas. Así a la semana 29 de gestación se alcanza el valor previo a los RPT de la semana 27. A las 30 semanas de gestación, con un valor de 2,4 de lecitina-esfingomielina y trazas de fosfatidil-glicerol se decide la interrupción del embarazo por cesárea electiva con anestesia general. Se obtiene un recién nacido de sexo masculino con 2200 g con tinte icterico de cordón umbilical, edema generalizado y hepatoesplenomegalia pero sin derrames serosos y buena reactividad. Fueron necesarias tres exsanguinotransfusiones para disminuir la hiperbilirrubinemia postnatal cuya cifra máxima fue de 17 mg% y cuatro transfusiones de eritrocitos RhD negativos para corregir la anemia en el período neonatal. Se trata entonces de la primera experiencia nacional de RPT, en una gestante de 40 años con aloimmunización anti-D severa, que no tenía hijos vivos por esta causa y que se obtiene un recién nacido vivo con EHP severa pero que presenta una buena evolución con el tratamiento postnatal y al que denominamos cariñosamente “Féresis I” (figura 5.10).

En la actualidad, el RPT para las gestantes aloimmunizadas se considera un tratamiento tedioso, poco confortable y muy costoso. Preferimos realizar tratamientos fetales más efectivos que los maternos como la transfusión intrauterina intravascular por cordocentesis junto con la administración de inmunoglobulina polivalente a altas dosis por esta vía



Figura 5.10 - “Féresis I”. Primer hijo vivo de una gestante aloimmunizada al antígeno D del sistema Rh a la que se le realizaron recambios plasmáticos durante la gestación en 1982. Hospital de Clínicas, Cátedra de Medicina Transfusional.

con los cuales no contábamos en la década de 1980.

Precisamente, en 1994 publicamos en la revista *Journal of Perinatal Medicine* (93) el primer caso a nivel mundial de la administración de IgG intravenosa por cordocentesis al feto para disminuir la hemólisis similar a lo que se realizaba en el recién nacido. En 1999, autores austríacos publican en la revista *Transfusion de la AABB*, 13 casos donde se realiza esta terapéutica fetal con buenos resultados (94).

En el momento actual el RPT en gestantes con aloimmunización severa es una indicación categoría II generalmente previo a la semana 20-22 donde los procedimientos terapéuticos fetales no se pueden realizar. Así por ejemplo, el RPT asociado a IgG intravenosa puede ser efectivo en gestantes aloimmunizadas a otros anticuerpos diferentes al D como el P que produce abortos precoces y el Kell que además de una anemia hemolítica produce una anemia por inhibición de los progenitores hematopoyéticos (95).

La primera experiencia publicada en Uruguay en 1994, sobre hemaféresis en pacientes pediátricos, fue realizada en el Hospital Central de las Fuerzas Armadas en el período 1986 a 1993. Se describen 11 niños a los

cuales se le realizaron 52 procedimientos de hemaféresis utilizando un separador celular Haemonetics 30S de flujo discontinuo con un bowl pediátrico de 125 ml. En los niños de menos de 15 Kg se realizó el cebado del circuito extracorpóreo con sangre compatible. A 8 de ellos se le realizaron RPT por Guillain Barré, miastenia gravis, púrpura trombocitopénico autoinmune y hepatitis fulminante. En los otros 3 pacientes se realizaron procedimientos de leucaféresis terapéutica por síndrome de leucoestasis secundario a hemopatías malignas (96).

Plasmaféresis selectiva por inmunoadsorción

Teóricamente, la extracción selectiva de los componentes plasmáticos patológicos ofrece ventajas frente a la remoción de todo el plasma del paciente. Por ejemplo, en los pacientes con hipercolesterolemia familiar se extraen las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por inmunoadsorción (anticuerpos anti-LDL) o por afinidad química (columnas de dextrán sulfato). Este tipo de aféresis fue introducida en 1981(97).

La columna de proteína A del estafilococo, desarrollada originalmente en Suecia, remueve inmunocomplejos o IgG como en el púrpura trombocitopénico autoinmune agudo y crónico o la artritis reumatoidea refractaria al tratamiento con drogas (98).

Se han comunicado casos clínicos aislados de púrpura trombocitopénico trombótico y síndrome urémico hemolítico refractarios al tratamiento con RPT convencional que respondieron bien a la inmunoadsorción con columnas de proteína A (99).

La infusión del plasma autólogo depurado y de los componentes celulares, reduce o elimina la necesidad de fluidos de reemplazo. La inmunoadsorción puede realizarse en línea luego que el plasma es separado por centrifugación o filtración o bien, extraer el plasma, tratarlo con inmunoadsorción fuera de línea e infundirlo.

Sin embargo, estas técnicas de plasmaféresis selectivas nunca estuvieron disponibles en Uruguay.

La American Association of Blood Bank (AABB) establece estándares para la realización de procedimientos de aféresis de cumplimiento voluntario (www.aabb.org).

La FDA a su vez, estableció requerimientos específicos que se detallan en el código de Reglamentaciones Federales para las actividades de hemaféresis (100).

La American Society For Apheresis (ASFA) publicó guías y recomendaciones adicionales (101).

En Uruguay, en 1997 mediante el decreto PE 61/97 se reglamentan las técnicas de aféresis tanto para pacientes como en donantes.

A partir de 2001 entra en vigencia el Reglamento Técnico de Medicina Transfusional (decreto PE 385/00) el cual, en la sección C, reglamenta la plasmaféresis en donantes, en la D las citaféresis también en donantes y en la sección E la hemaféresis terapéutica. La colecta de células progenitoras hematopoyéticas se reglamenta en la sección P.

En el 2007, el Apheresis Applications Committee de la ASFA (www.asfa.org), compuesto por 10 expertos en hemaféresis de USA, publica en la revista Journal of Clinical Apheresis (102), las categorías en las cuales se colocan las enfermedades con indicación de hemaféresis terapéutica según medicina basada en evidencia.

En la categoría I se incluyen patologías en las cuales la hemaféresis es aceptada como una terapia primaria o como adjunta a otras terapias de primera línea. En esta categoría se incluyen los RPT en crioglobulinemia, hiperviscosidad, púrpura trombocitopénico trombótico (PTT), Guillain Barré, miastenia gravis y el Síndrome de Goodpasture caracterizado por la presencia de anticuerpos anti-membrana basal lo cual, produce hemorragia pulmonar y renal. Dentro de la citaféresis terapéuticas son categoría I el linfoma células T cutáneo (síndrome de Sézary), hiperleucocitosis con leucoestasis y la anemia falciforme.

En la categoría II se encuentran patologías en las cuales la hemaféresis es generalmente aceptada como tratamiento de soporte o adjunto a otras terapéuticas definitivas. Por ejemplo el RPT en el rechazo agudo de riñón o en la incompatibilidad ABO en el trasplante de CPH. Las citaféresis en la Malaria severa, la poliglobulia o la trombocitosis pertenecen a esta categoría.

La categoría III agrupa a aquellas patologías en las cuales existe un beneficio sugerido de la hemaféresis pero la evidencia científica existente es insuficiente tanto para demostrar

su eficacia como para establecer un claro balance riesgo beneficio. Por ejemplo el RPT para el tratamiento del síndrome antifosfolípido, pénfigo, lupus eritematoso, anemias hemolíticas autoinmunes, inhibidores de la coagulación, púrpura postransfusional, insuficiencia hepática aguda, esclerodermia entre otras.

La categoría IV indica patologías en las cuales trabajos controlados no muestran beneficio por lo cual las técnicas de hemaféresis solo se pueden realizar bajo protocolos de experimentación.

La categoría P (pendiente) agrupa a aquellas nuevas tecnologías bajo experimentación en trabajos clínicos y que aún no han sido aprobadas por los organismos regulatorios competentes.

En otro trabajo publicado por los mismos autores en noviembre del 2007, en la revista Transfusion de la AABB (103), en la tabla 2 de la página 1967, se establece que el síndrome de hiperviscosidad secundario a gamopatías monoclonales corresponde a la categoría III cuando en la publicación de la ASFA es categoría I. De acuerdo a nuestra experiencia en hemaféresis y a la bibliografía existente, la categoría I es la correcta.

Actualmente, en el año 2010, existen en Uruguay 14 centros asistenciales con 21 separadores celulares en donde se realizan técnicas de hemaféresis en donantes y/o pacientes. Trece son de Montevideo y uno en el interior, en el Departamento de Maldonado. De los 21 separadores celulares 11 son Cobe-Spectra, 4 Cobe-Trima y 6 Haemonetics. Los cuatro centros de trasplante de CPH utilizan una máquina Cobe-Spectra para la cosecha de células CD34+ de sangre periférica. En el año 2001, publicamos en la revista de Gambro BCT Hispanoamérica (104) un resumen de los 20 años de la hemaféresis en Uruguay que titulamos “Una historia del hombre y la máquina” y en el Curso de Hemaféresis del XXXI World Congress of the International Society of Hematology (ISH) que se realizó en Punta del Este en marzo del 2007 dictábamos una conferencia sobre los “25 años de la Hemaféresis en el Uruguay” lo cual constituyó una experiencia científica pionera en América Latina.

En marzo de 2009, se realiza en Buenos Aires-Argentina el Congreso de la World Apheresis Association (WAA) www.worlda-

pheresis.org y del Grupo Latinoamericano de hemaféresis (GLHEMA) que comienza sus actividades en el año 1992 en San Pablo-Brasil en la reunión anual de la ISBT.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abel J, Rowntree LG, Turner BB. Plasma removal with return of corpuscles. *J Pharmacol Exp Ther* 1914;5:625-627.
2. Tui C, Bartter FC, Wright Am, Holt RB. Red cell reinfusion and frequency of plasma donations; preliminary report of multiple donations in 8 weeks by each of 6 donors. *JAMA* 1944;124:331-336.
3. Schmidt PJ. The men behind the plasma War. *Transfusion Today* 79, June 2009. www.isbt-web.org 23/03/2010.
4. Schmidt PJ. John Elliott and the evolution of American blood banking, 1934 to 1954. *Transfusion* 2000;40:608-612.
5. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *JACS* 1946;68:459-475.
6. Giangrande PLF. The history of blood transfusion. *Br J Haematol* 2000;110:758-767.
7. Walter C, Murphy WP Jr. 1950 Timeline of transfusion medicine. [www.dendrie.com/History of Transfusion Medicine](http://www.dendrie.com/History%20of%20Transfusion%20Medicine). 23/03/2010.
8. Grifols-Lucas JA. Use of plasmapheresis in blood donors. *Br Med J* 1952;1:854.
9. Adams WS, Bland WH, Bassett SH. A method of human plasmapheresis. *Proc Soc Exper Biol Med* 1952;80:377.
10. Skoog WA, Adams WS. Plasmapheresis in a case of Waldenström Macroglobulinemia. *Clin Res* 1959;7:96.
11. Kliman A, Gaydos LA, Schroeder LR, Freireich EJ. Repeated plasmapheresis of blood donors as a source of platelets. *Blood* 1961;18:303-309.
12. Schwab PJ, Fahey JL. Treatment of Waldenström macroglobulinemia by plasmapheresis. *N Engl J Med* 1960;263:574-579.
13. Bowman JM, Peddle LJ, Anderson C. Plasmapheresis in severe Rh iso-immunization. *Vox Sang* 1968;15:272-277.
14. Powell L. Intensive plasmapheresis in the pregnant Rh sensitized woman. *Am J Obstet Gynecol* 1968;101:153-159.

15. Colman RW, Sieners CA, Pugh PP. Trombocytapheresis: a rapid and effective approach to symptomatic thrombocytosis. *J Lab Clin Med* 1966;68:389-399.
16. Strumia MM. The effect of leukocytic cream injections in the treatment of neutropenias. *Am J Med Sci* 1934;187:527-544.
17. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infections in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1966;64:328-340.
18. Brecher G, Wilbur KM, Cronkite EP. Transfusions of separated leukocytes into irradiated dogs with aplastic marrows. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84:54-56.
19. Freireich EJ, Levin RH, Whang J, Carbone PP, Bronson W, Morse EE. The function and fate of transfused leukocytes from donors with chronic myelocytic leukemia in leukopenic recipients. *Ann NY Acad Sci* 1964;113:1081-1090.
20. Graw RG, Buckner CD, Whang-Peng J. Complications of bone marrow transplantation. Graft versus host disease resulting from chronic myelogenous leukaemia leukocyte transfusions. *Lancet* 1970;ii:338.
21. Djerassi I, Kim JS, Suvansri U, Mitakul C, Ciesielka W. Continuous flow filtration leukapheresis. *Transfusion* 1972 ;12 :75.
22. Djerassi I. Gravity leukapheresis : a new method for collection of transfusable granulocytes. *Exp Haematol* 1977;5 (suppl):139.
23. Peña JL, Burghi M, Cancela MJ, Decaro J, Fleitas T. Tratamiento de la sepsis bacteriana del recién nacido. *Clínicas de Ginecología, Obstetricia y Perinatología* 1985;2:511-537.
24. Hattersley PG. Activated coagulation time of whole blood. *JAMA* 1966;196:436.
25. Higby DJ, Yates ES, Henderson, Holland JF. Filtration leukapheresis for granulocyte transfusion therapy. Clinical and laboratory studies. *N Engl J Med* 1975;292:761-766.
26. Alavi JB, Root RK, Djerassi I, Evans AE, Gluckman SJ, Mac Gregor RR, Guerry D, Schreiber AD, Shaw JM, Koch P, Cooper RA. Clinical trial of granulocyte transfusions for infection in acute leukemia. *N Engl J Med* 1977;296:706.
27. Tullis JL, Surgenor DM, Tinch RD, D'Hont M, Gilchrist FL, Driscoll S. New principle of closed system centrifugation. *Science* 1956;124:792-797.
28. Haemonetics History. www.haemonetics.com 23/07/2009.
29. McCulloch J, Higby DJ. Leukapheresis and granulocyte transfusion. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1979;10:275-327.
30. Judson G, Jones A, Kellogg R, Buckner D, Eisel R, Perry S. Greenough W. Closed continuous-flow centrifuge. *Nature* 1968;217:816-818.
31. Corbin F, Cullis HM, Freireich EJ . Development of apheresis instrumentation in McLeod BC, Price Th and Drew MJ Eds. *Apheresis: Principles and Practices*. Bethesda, MD. AABB Press 1997.
32. CS 3000 Baxter Cell Separator. www.baxter.com 23/7/2009.
33. Cobe Spectra Cell Separator. www.caridianbct.com 23/7/2009.
34. Graw RG, Herzig GP, Eisel RJ, Perry S. Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. *Transfusion* 1971;11:94-101.
35. Decaro J, Novoa JE, Silva H, Brauer M, Rodriguez A, De Bellis R. Estudio morfológico y funcional de plaquetas obtenidas por centrifugación de flujo continuo y diferencial en donantes normales. *Rev Arg Transf.* 1983;IX:237-249.
36. Greenberg BR, Watson-Williams EJ. Successful control of life-threatening thrombocytosis with blood processor. *Transfusion* 1975;15:620-622.
37. Taft EG, Babcock RB, Scharfman WB, Tartaglia AP. Plateletapheresis in the management of thrombocytosis. *Blood* 1977;50:927-933.
38. Burgstaler E, Pineda A. Therapeutic cytopheresis: continuous flow versus intermittent flow apheresis systems. *J Clin Apheresis* 1994;9:205-209.
39. Leitman SF, Kucera E, McLeod B. Guidelines for therapeutic hemapheresis. Bethesda MD. AABB 1992.
40. Graw RG Jr, Herzig G, Perry S, Henderson ES. Normal granulocyte transfusion therapy: treatment of septicemia due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 1972;287:367-371.
41. Herzig RH, Herzig GP, Graw RG, Bull MI, Ray KK. Successful granulocyte transfusion therapy for gram-negative septicemia. *N Engl J Med* 1977;296:701-705.
42. Decaro J, Silva H, Alallón W. Leucaféresis por centrifugación de flujo continuo y filtración en donantes normales. Segundo Congreso Latinoamericano de Hemoterapia e Inmunohematología. Buenos Aires-Argentina, 1982.
43. Liles WC, Huang JE, Llewellyn C, Sengupta D, Price TH, Dale DC. A comparative trial of granulocyte-colony-stimulating factor and dexametasone separately and in combination for the mobilization of neutrophils in the peripheral blood of normal volunteers. *Transfusion* 1997;37:182-187.
44. British Committee for Standards in Haematology Transfusion Task Force. Transfusion Guidelines for neonates and older children. *Br J Haematol* 2004;124:433-453.
45. Ikinciogullari A, Dogu F, Solaz N, Reisil I, Kemahli S, Cin S, Babacan E. Granulocyte transfusion in children with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *Ther Apher Dial* 2005;9:137-141.
46. Oza A, Hallemeier C, Goodnough L, Khoury H, Shenoy S, Devine S, Augustin K, Vij R, Trinkaus K, Dipersio Jf, Adkins D. Granulocyte-colony stimulating factor-mobilized prophylactic granulocyte transfusions given after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation result in a modest reduction of febrile days and intravenous antibiotic usage. *Transfusion* 2006;46:14-23.
47. Decaro J, Novoa JE, de Anda G, Galaschi D, Rodriguez A, De Bellis R. Leukapheresis in a patient with Sézary syndrome. *Vox Sang* 1984;47:276-279.
48. Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegasothy B, Heald P, Wintroub B, Vonderhizid E, Knobler R, Wolff K, Plewig G. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal phototherapy: preliminary results. *N Engl J Med* 1987;316:297-303.

49. Dall Amico R, Messina C. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft versus host disease. *Therapeutic Apheresis* 2002;6:296-304.
50. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965;25:1525-1530.
51. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Anti-leukemic effects of chronic graft versus host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1981;304:1529-1531.
52. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan F, Bortin M. Graft versus leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555-562.
53. Kolb HJ. Graft versus leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008;112:4371-4383.
54. Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fisher T, Hochhaus A, Hughes J, Lechner K, Nielsen J, Rousselot P, Reiffers S, Saglio G, Shephers J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman J, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton A, Capdeville R, Druker B. Imatinib compared with interferon and low dose cytarabine for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
55. Savani BN, Montero A, Kurlander R, Childs R, Hensel N, Barret J. Imatinib synergizes with donor lymphocyte infusions to achieve rapid molecular remission of CML relapsing after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:1009-1015.
56. Kvalheim G. Obtaining monocytes for production of dendritic cells by the Elutra system. *Arch Med Int* 2007;XXIX (supl 1):S112.
57. Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ, Gaston E, Zirkle RE. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med* 1949;34:1538-1543.
58. Barnes DWH, Corp Mj, Loutit JF, Neal EF. Treatment of murine leukemia with X rays and homologous bone marrow. *Br Med J* 1956;ii:626-627.
59. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-496.
60. Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee W. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-1716.
61. Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 1999;105:330-339.
62. Gatti RA, Meuwissen JJ, Allen HD, Hong R, Good R. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;ii:1366-1369.
63. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1975;292:832-843.
64. Thomas ED, Blume KG, Forman SJ. Hematopoietic cell transplantation. 2nd edition, Blackwell Science, Boston-USA, 1999.
65. Huarani FI. Thirty one year survival following chemotherapy and autologous bone marrow in malignant lymphoma. *Am J Hematol* 1997;55:35-38.
66. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, García-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 1991;77:1717-1722.
67. Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for stem cell in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962;19:702-714.
68. Cavins JA, Kasakura S, Thomas ED, Ferrebee JW. Recovery of lethally irradiated dogs following infusion of autologous marrow stored at a low temperature in dimethyl-sulphoxide. *Blood* 1962;20:730-734.
69. Storb R, Graham TC, Epstein RB, Sale GE, Thomas ED. Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of baboons by cross circulation. *Blood* 1977;50:537-542.
70. To LB, Juttner CA. Peripheral blood stem cell autografting: a new therapeutic option to AML? *Br J Haematol* 1987;66:285-288.
71. Demeocq F, Kanold J, Chassagne J. Successful blood stem cell collection and transplantation in children weighing less than 25 Kg: a primer. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:43-50.
72. Fernandez D, Lopez O, Denigra C. Large volume peripheral blood progenitor cell (PBPC) harvests for autologous transplantation in pediatric patients weighing less than 15 Kg. *Arch Med Int* 2007;XXIX (supl 1):S112-S115.
73. Dufort G, Castiglioni M, Pagés C, Dabezies A, Decaro J, Castillo L. Trasplante de progenitores hematopoyéticos en pediatría: 10 años de experiencia. *Arch Pediatr Urug* 2008;79:201-209.
74. Food and Drug Administration. Guidance for industry. Recommendations for collecting red blood cells by automated apheresis methods (draft). July 1998. Rockville,MD:CBER Office of Communication, Training and Manufacturer Assistance, 1998.
75. AABB Extracorporeal Therapy Committee. Guidelines for therapeutics hemapheresis. Bethesda, MD. American Association of Blood Bank, 1992.
76. AABB Manual técnico, 13^a Edición. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunoematología, Buenos Aires – Argentina 2001: 131-147.
77. Rock G, McCombie N, Tittley P. A new technique for collection of plasma: machine plasmapheresis. *Transfusion* 1981;21:241-246.
78. Ciavarella D. Blood processors and cell separation. *Transfus Sci* 1989;10:164-165.
79. Quillen K, Berkman EM. Introduction to therapeutic apheresis In McLeod BC, Price TH, Drew MJ,eds. Apheresis: Principles and Practice. Cap 3 pag 45-65. Bethesda,MD:AABB Press,1997.
80. Lysaght MJ, Samtleben W, Schmidt B, Stoffner D, Guland HJ. Spontaneous membrane plasmapheresis. *Transf Am Soc Artif Intern Organs* 1983;29.

81. Waldeström J. Incipient myelomatosis or essential hyperglobulinemia with fibrinogenopenia- A new syndrome? *Acta Med Scand* 1944;216:117.
82. Wright DJ, Jenkins DE. Simplified method for estimation of serum and plasma viscosity in multiple myeloma and related disorders. *Blood* 1970;36:516-522.
83. Decaro J, Silva H, Alallón W, Miller A, Galaschi D. Método simple para la determinación de la viscosidad plasmática en sujetos normales y con paraproteinemia. *Rev Arg Transf.* 1983;IX:181-185.
84. Wintrobe MM, Buell MV. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1933;52:156.
85. Lerner AB, Watson CJ. Studies of cryoglobulins. *Am J Med Sci* 1947;214:410-415.
86. McLeod BC, Sasseti RJ. Plasmapheresis with return of cryoglobulin-depleted autologous plasma (Cryoglobulinpheresis) in cryoglobulinemia. *Blood* 1980;55:866-870.
87. Siami GA. Cryofiltration techniques and clinical indications. *Ther Apher Dial* 2005;9: A7 (Abstracts).
88. Graham Pole JR, Donald I, Barr W. Plasmapheresis in rhesus isoimmunization. *Lancet* 1974;I:1459.
89. Graham Pole JR, Barr W, Wiloughby ML. Continuous flow plasmapheresis in management of severe rhesus disease. *Br Med J* 1977;1:1185-1188.
90. Vant't Veer – Korthof ET, Niterink JSG, Van Nieuwkoop JA, Eernisse JG. IgG subclasses in rhesus D immunization. Effects of weekly small volume plasmapheresis. *Vox Sang* 1981;41:207-211.
91. Rubinstein P. Repeated small volume plasmapheresis in the management of hemolytic disease of the newborn, in Rh hemolytic disease. New strategies for eradication. Eds Frigoletto FD, Jewett JF, Kongres AA, Hall GK. Boston 1982.
92. Scasso JC, Decaro J, Cuadro JC, Lieutier G, Alonso JG, Varela S. Enfermedad hemolítica perinatal por aloinmunización Rh(D). Premio “El País” 1982 de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Montevideo. Ediciones de la Plaza, 1983.
93. Alonso JG, Decaro J, Marrero A, Lavallo E, Martell M, Cuadro JC. Repeated direct fetal intravascular high-dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh hemolytic disease. *J Perinat Med* 1994;22:415-419.
94. Ulm B, Kirchner L, Svolba G, Jilma B, Deutinger J, Bernaschek G, Panzer S. Immunoglobulin administration to fetuses with anemia due to alloimmunization to D. *Transfusion* 1999;39:1235-1238.
95. Fernandez-Jimenez MC, Jimenez-Marco MT, Hernandez D, Gonzalez A, Omeñaca F, de la Cámara C. Treatment with plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in pregnancies complicated with anti-PP1P^k or anti-K immunization: a report of two patients. *Vox Sang* 2001;80:117-120.
96. Vázquez AM, Perdomo S, Perdomo A, Cardeza A, Pereira A. Hemaféresis: experiencia en niños. *Hemoterapia* 1994;6:4-8.
97. Stoffel W, Borberg H, Greve V. Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia. *Lancet* 1981;II:1005-1007.
98. Felson DT, La Valley MP, Baldassare AR, Block JA, Caldwell JR, Cannon GW, Deal C, Evans S, Fleischmann R, Gendreau RM, Harris ER, Matteson EL, Roth SH, Shumacher HR, Weisman MH, Furst DE. The Prosorba column for treatment of refractory rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, controlled trial. *Arthritis Rheum* 1999;42:2153-2159.
99. Borberg H. Quo vadis haemaphereis. Current developments in haemapheresis. *Transf Apher Sci* 2006;34:51-73.
100. Code of federal regulations. Title 21CFR Part 640, Washington DC: US Government Printing Office 1998.
101. American Society for Apheresis. Organizational guidelines for therapeutic apheresis facilities. *J Clin Apher* 1996;11:42-45.
102. Szczepiorkowski ZM, Shaz BH, Bandarenko N, Winters JL. The new approach to assignment of ASFA categories-introduction to the fourth special issue: Clinical applications of therapeutic apheresis. *J Clin Apher* 2007;22:96-105.
103. Shaz BH, Winters JL, Bandarenko N, Szczepiorkowski ZM. How are approach an apheresis request for a category III, category IV, or noncategorized indication. *Transfusion* 2007;47:1963-1971.
104. Decaro J. Una historia del hombre y la máquina. 20 años de la hemaféresis en Uruguay. *Gambro BCT Hispanoamérica* 2001;2:4-8.

Historia de la Filtración de la Sangre y de la Leucoreducción

Los primeros trabajos sobre la filtración de la sangre fueron los realizados por Theis (1) en sangre autóloga recuperada del campo quirúrgico y los del grupo del Memphis Blood Bank los cuales utilizaron varios tipos de gasa estéril (2).

En 1931 los doctores Donald Baxter, Raph Fox y un hermano de éste Harry, fundaron Baxter Intravenous Product Corporation que comienza a funcionar en 1933 en Glenview, Illinois como primer fabricante de soluciones intravenosas de uso comercial.

En 1939 los laboratorios Baxter de Chicago introducen el sistema de recolección de sangre Transfuso-Vac que consistía en una botella de vidrio al vacío que contenía citrato y una interfase con un filtro de metal para retener coágulos de fibrina.(3). El filtro actual, de malla plástica de 170 micras, que se usa en todas las transfusiones de hemocomponentes, fue aplicado clínicamente a gran escala a principios de la década de 1960.

La filtración de la sangre para retener coágulos, restos de fibrina y agregados celulares constituyó el inicio para el desarrollo posterior de filtros para microagregados de 40 micras o para la leucoreducción (retención de leucocitos) de los hemocomponentes.

Al final de la década de 1960, el neurólogo Russell Patterson de New York, deduce que las alteraciones neurológicas que ocurrían luego de la circulación extracorpórea en cirugía cardíaca podrían deberse a la infusión de microémbolos (4). Se pone en contacto con Pall Corporation en New York para que desarrollen un filtro para retener microémbolos.

Davis Boris Pall, un químico nacido en Ontario-Canadá, que luego de graduarse, se

muda a New York donde en 1946 funda la Micro Metallic Corporation, luego Pall Corporation, que se dedica desde su inicio a la construcción de filtros para helicópteros y aviones. Ante la sugerencia de Patterson, Pall Corporation en 1974 crea el primer microfiltro con malla de polyester de 40 micras similar al que se utiliza actualmente (5).

En 1966, Perkins y colaboradores (6) asocian la presencia de leucocitos en la sangre transfundida con las reacciones febriles no hemolíticas (RFNH) que se producían en los receptores. Posteriormente, Wenz y colaboradores (7) en 1980 especulan que la remoción de los agregados de leucocitos mediante el uso de filtros de microagregados puede resultar en una disminución de las RFNH. Estos investigadores conducen un estudio en donde utilizan el filtro Pall Ultipor SQ40S previa centrifugación de las unidades de eritrocitos almacenados a 4 centígrados. Esta técnica, denominada luego “spin and filter” demostró que aproximadamente $1 \log^{10}$ de leucocitos, principalmente granulocitos, eran removidos del hemocomponente. Luego la técnica fue modificada a “spin, cool and filter” agregándose un período de reposo a 4° centígrados luego de la centrifugación, con el fin de estabilizar los microagregados leucocitarios previo a la filtración (8). Durante los siguientes cinco años numerosos trabajos demostraron que con la aplicación de esta técnica se reducían las RFNH (9). Dado la gran popularidad que había adquirido esta tecnología, dos compañías, Asahi y Pall, desarrollan a finales de la década de 1980 los primeros filtros de leucoreducción para extraer más de $3 \log^{10}$ leucocitos de los hemocomponentes (eritrocitos y plaquetas) (10) (11).

La disponibilidad de estos filtros hizo que se desarrollaran varios estudios para explorar los beneficios clínicos de su aplicación. La mayoría de los trabajos confirmaron la reducción de las RFNH (10) (12). Otras indicaciones fueron demostradas como la prevención de la transmisión de la infección del citomegalovirus (CMV). En un estudio randomizado que incluyó más de 500 pacientes inmunodeprimidos sometidos a trasplante de médula ósea mostró que no existía diferencia en las tasas de infección por CMV a los 21 y 100 días en los pacientes que habían sido transfundidos con componentes celulares leucoreducidos y los que habían recibido hemocomponentes serológicamente negativos para CMV (13). En 1997, el estudio TRAP (Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets) fue publicado en el *New England Journal of Medicine* (14). Se demostró que la leucoreducción de los hemocomponentes por filtración fue efectiva en prevenir la aloinmunización plaquetaria responsable de la refractariedad plaquetaria clínica sobre todo en pacientes multitransfundidos. Las plaquetas tienen en su membrana antígenos HLA clase I y antígenos específicos HPA (Human Platelet Antigens).

Para que el receptor desarrolle la respuesta inmune y anticuerpos anti-HLA clase I, que son los más frecuentes, se necesitan células que aporten antígenos HLA clase II como los leucocitos y células dendríticas del donante. Si éstas son removidas por filtración no se produce la respuesta inmune en el receptor. Además de la aloinmunización HLA los leucocitos transfundidos pueden desarrollar en el receptor la formación de anticuerpos antileucocitarios frente a antígenos específicos de los glóbulos blancos los cuales pueden producir mayor número de recurrencias de abortos espontáneos.

Otros beneficios de la leucoreducción por filtración fueron demostrados en la década de 1990. Por ejemplo, la disminución del efecto inmunosupresor producido por las transfusiones de componentes celulares con lo cual se disminuía la recurrencia de cáncer (15) o de las infecciones en el perioperatorio (16).

Sin embargo, dos revisiones sistemáticas y un meta análisis realizados en los años noventa concluyen que la efectividad de la leucoreducción para disminuir la inmunomodulación asociada a transfusiones (TRIM) es decir, la

recurrencia de cáncer, infecciones postoperatorias y mortalidad en pacientes sometidos a cirugía curativa de cáncer, no está probada (17) (18) (19).

Otras infecciones virales que pueden transmitirse por leucocitos son además del CMV el Epstein Barr virus (EBV), el herpes virus 8 (HV8) y los retrovirus linfotrópicos humanos (HTLV) y probablemente los virus de hepatitis G, hepatitis D, virus del Ébola y virus del Nilo. Dentro de las infecciones bacterianas prevenibles por leucoreducción se encuentra la *Yersinia enterocolítica*.

La epidemia de “las vacas locas” sufrida por el Reino Unido a finales de la década del noventa que afecta al hombre como variante de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) llevó a las autoridades sanitarias de este país (ante el supuesto de que pudiera transmitirse por la sangre) a realizar una política de precaución e implementaron la leucoreducción de todos los hemocomponentes denominada leucoreducción universal (LRU). Varios países como Austria, Francia, Canadá y Suiza adoptaron igual posición al Reino Unido en los dos últimos años del siglo XX. Luego, se sumaron Malta, Alemania, Holanda Noruega, Finlandia y España entre otros.

Dado que la leucoreducción solo remueve el 42% de la infectividad por vCJD, en el nuevo milenio, varias firmas comerciales (Pall, MacoPharma y Asahi-Baxter) han desarrollado filtros específicos para remover priones los cuales no retienen por tamaño sino por afinidad molecular. Por ejemplo, el P-Capt Prion Capture filter de MacoPharma es un filtro flexible diseñado para retener priones de concentrados de eritrocitos leucoreducidos previamente.

Es un filtro húmedo que contiene 40 ml de solución SAGM para obtener una óptima performance y donde los priones se adhieren por uniones covalentes a la resina.

Varios trabajos realizados últimamente han demostrado la efectividad de estos filtros para reducir la infección por priones en los hemocomponentes (20) (21).

En nuestro país, donde no existe la vCJD, la leucoreducción se realiza principalmente para prevenir las RFNH, las infecciones virales como el CMV, las bacterianas como *Yersinia* y la aloinmunización plaquetaria y leucocitaria en pacientes inmunodeprimidos,

hematológicos o trasplantados. Además, toda la sangre para transfusión intrauterina o exsanguinotransfusión debe ser leucoreducida así como todos los componentes celulares que reciben los neonatos. Con esta medida ha desaparecido la neumonitis postransfusional de las unidades neonatales.

La presencia de los leucocitos en los componentes sanguíneos es responsable, como ya vimos, de algunas de las complicaciones asociadas a la transfusión. Los receptores reciben leucocitos del donante que en principio, no les causa ningún beneficio y cuya eliminación es necesaria para evitar dichas complicaciones. Leucoreducción, leucofiltración o desleucotización son sinónimos para describir esta tecnología.

Las estrategias para reducir los leucocitos de los hemocomponentes han sido múltiples a lo largo del tiempo como el lavado con suero fisiológico, doble centrifugación, unidades libres de buffy coat y “spin cool and filter”. Pero, mediante la evolución de la tecnología, los filtros leucoreductores han permitido eliminar el 99,9% de los leucocitos de la sangre recolectada.

Los filtros están compuestos por materiales sintéticos (nylon o poliéster) o naturales (acetato de celulosa o algodón). Son elaborados en un material poroso compactado con una distribución de poros de distintos tamaños en toda la matriz del filtro.

La leucoreducción de los hemocomponentes comenzó realizándose con el uso de filtros inmediatamente antes de la transfusión luego del almacenamiento. Sin embargo, a pesar de que se reducía la incidencia de las RFNH postransfusionales éstas no desaparecían. Se pensó entonces que estas reacciones residuales se debían a la liberación de citoquinas durante el almacenamiento de los hemocomponentes. Las citoquinas son sustancias solubles que no son removidas del hemocomponente por los filtros de leucoreducción.

Por ello, se desarrollaron sistemas de leucoreducción pre-almacenamiento.

En los hemocomponentes obtenidos por hemaféresis de donante único la firma Gambro, actualmente Caridian, desarrolló un Leuko-Reduction System (LRS) con un cono interpuesto en la línea del plasma rico en plaquetas, que mediante circuito cerrado y sin filtración extrae los leucocitos (figura 6.1).



Figura 6.1 - Arriba, cono de leucoreducción utilizado por los separadores celulares Cobe para los procedimientos de plaquetaféresis. Abajo, bolsas para extracción de sangre con filtros leucoreductores en línea entre la bolsa con anticoagulante en el extremo derecho y las tres bolsas satélites a la izquierda. A continuación de la aguja arriba a la derecha, tubuladura en Y con una pequeña bolsa satélite para extraer los primeros mililitros de sangre y evitar la contaminación bacteriana del producto.

La fuerza G ejercida por la centrifugación separa las células sanguíneas. Las plaquetas y los leucocitos entran a la cámara (en forma de cono) desde el canal. La geometría de la cámara controla la velocidad del contra flujo de plasma, retiene los leucocitos y libera las plaquetas hacia la bolsa de colecta. De esta manera, las plaquetas obtenidas por aféresis en los separadores celulares marca COBE son leucoreducidas desde su producción antes del almacenamiento a temperatura ambiente. Esta tecnología comenzó a aplicarse rutinariamente a partir de marzo de 1996.

La industria ha desarrollado últimamente numerosos sistemas de filtros integrados en los sistemas de bolsas de sangre triples o cuádruples (filtros en línea) tanto para leucoreducir sangre total, eritrocitos y/o plaquetas (figura 6.1). De esta manera, los hemocomponentes preparados a partir de donantes múltiples son también leucoreducidos desde su producción, antes o después de la centrifugación mediante filtros rígidos (Pall) o flexibles (MacoPharma) siempre antes del período de almacenamiento.

El sistema de hemaféresis Haemonetics también utiliza filtros en línea para la leucoreducción de los concentrados plaquetarios obtenidos de donante único.

Los filtros para la sangre fueron creados primariamente para extraer elementos indeseables como coágulos, restos de fibrina, microagregados o leucocitos de la sangre total o de los hemocomponentes. En la hemaféresis los filtros se utilizaron también para extraer sustancias plasmáticas patológicas como anticuerpos, crioglobulinas, lipoproteínas, paraproteínas entre otras (hemofiltración) y como ya vimos, para extraer leucocitos mediante el sistema LRS o filtración en línea (leucoreducción).

En los últimos años, se han desarrollado sistemas de filtración para obtener hemocomponentes deseables. En la hemaféresis, para separar el plasma de las células que son devueltas al donante o paciente. El plasma obtenido por filtración puede ser utilizado para el fraccionamiento industrial y la obtención de hemoderivados (albúmina, inmunoglobulinas y factores de la coagulación). Si contiene sustancias anormales puede ser derivado a un segundo filtro (filtración en cascada) que retiene la sustancia patógena retornando el plasma autólogo al paciente (plasmaféresis selectiva).

En cuanto a la filtración de la sangre total, Pall Corporation ha desarrollado un filtro, Purecell Select System, para retener células mononucleares (CMN) que generalmente se obtienen en el laboratorio por el método de sedimentación en Ficoll. La filtración con Purecell Select System es un método más rápido, en sistema cerrado, que obtiene mayor concentración de células CMN con una viabilidad de 24 horas. Este método de enriquecimiento de CMN puede utilizarse tanto en sangre periférica, médula ósea o sangre de cordón. Esto determina su aplicación en la terapia celular y medicina regenerativa dado que las CMN obtenidas pueden ser utilizadas para angiogénesis, regenerar miocardio, piel en úlceras o quemaduras, médula espinal post-traumatismo, tejido pancreático, condrocitos, etc (Stem Cell Plasticity).

Varios métodos han sido creados para reducir el volumen, previamente a la criopreservación, de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) CD34 positivas, obtenidas

de sangre periférica, médula ósea o cordón umbilical, como la centrifugación diferencial o la sedimentación con macromoléculas (hydroxiethylstarch, HAES).

Otro problema es la incompatibilidad ABO entre el donante y receptor por lo cual se deben extraer los eritrocitos contaminantes del producto también antes de la criopreservación en nitrógeno líquido. Con estos objetivos, la reducción del volumen con una pérdida mínima de CMN y un máximo de depleción eritrocitaria, Terumo Corporation de Japón ha desarrollado un filtro Procord-TF4 con poros de poliuretano para procesar sangre de cordón umbilical previamente a la criopreservación (22) (23).

Los filtros utilizados para la leucoreducción de hemocomponentes celulares usualmente se descartan. Sin embargo, pueden ser una interesante fuente de células mononucleares para el trabajo en el laboratorio. Se ha reportado que de los leucocitos de estos filtros se han obtenido cantidades suficientes de ADN (24) o linfocitos B purificados (25). Recientemente, dos estudios muestran que se pueden obtener monocitos funcionantes fisiológicamente (24) y células progenitoras endoteliales (26) en un porcentaje del 10 y menos del 1% respectivamente del total de CMN. Estos leucocitos pueden ser utilizados en laboratorios de investigación en ciencias básicas o de diagnóstico, ya sea en fresco o congelados (27).

Dos trabajos recientes muestran que la leucoreducción no sería necesaria en los receptores infectados con el HIV dado que este tipo de pacientes no desarrollan enfermedad de injerto versus huésped o microquimerismo transfusional (28). No existe evidencia de que tengan mayores incidencias de reacciones transfusionales, una infección nueva por CMV o su reactivación cuando se transfunden hemocomponentes no leucoreducidos (29).

BIBLIOGRAFÍA

1. Theis J. Zur behandlung der extrauterine gravidataet. *Zbl Gynaek* 1914;38:1191-1194.
2. American Society for Clinical Pathology. www.ascp.org. 19 de marzo de 2010.
3. Wortham ST, Ortolano GA, Wenz B. A brief history of blood filtration: clot screen, microaggregate removal, and leukocyte reduction. *Transf Med Rev* 2003;17:216-222.
4. Breman RW, Patterson RH Jr, Kessler J: Cerebral blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass: Evidence of microembolic encephalopathy. *Neurology* 1971;21:666-672.
5. Silvay G, Ammar T, Reich DI, Vela-Cantos F, Joffe D, Ergin AM. Cardiopulmonary bypass for adult patients. A survey of equipment and techniques. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1995;9:420-424.
6. Perkins HA, Payne R, Ferguson J, Wood M. Nonhemolytic febrile transfusion reactions. Quantitative effect of blood components with emphasis on isoantigenic incompatibility of leukocytes. *Vox Sang* 1966;11:578-600.
7. Wenz B, Gurtlinger KF, O'Toole AM, Dugan EP. Preparation of granulocyte poor red cells by microaggregate filtration. A simplified method minimize febrile transfusion reactions. *Vox Sang* 1980;39:282-287.
8. Parravicini A, Rebulla P, Apuzzo J, Wenz B, Sirchia G. The preparation of leukocyte poor red cells for transfusion by a simple cost effective technique. *Transfusion* 1984;24:508-509.
9. Vamvakas EC, Blajchman MA. Universal WBC reduction. The case for and against. *Transfusion* 2001;41:691-712.
10. Sirchia G, Rebulla P, Parravicini A. Leukocyte depletion of red cell units at the bedside by transfusion through a new filter. *Transfusion* 1987;27:402-405.
11. Kicler TS, Bell W, Ness PM, Drew H, Pall D. Depletion of white cells from platelet concentrates with a new adsorption filter. *Transfusion* 1989;29:411-414.
12. Wenz B. Microaggregate blood filtration and the febrile transfusion reactions. A comparative study. *Transfusion* 1983;23:95-98.
13. Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, Banaji M, Haake R, Welk K, Fisher L, McCullough J, Miller W. A comparison of filtered leukocyte reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion associated CMV infection after marrow transplant. *Blood* 1995;86:358-603.
14. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *N Engl J Med* 1007;337:1861-1869.
15. Freedman H, Blajchman MA, McCombie N. Canadian Red Cross Society Symposium on Leukodepletion. Report of proceedings. *Transf Med Rev* 1994;8:1-14.
16. Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, Kandler R, Edberg S, Piscitelli V, Pickard C, Napychuk P. Removal of *Yersinia enterocolitica* from AS-1 red cells. *Transfusion* 1992;32:667-672.
17. Vamvakas EC, Blajchman MA. Deleterious clinical effects of transfusion associated immunomodulation: fact or Fiction. *Blood* 2001;97:1180-1195.
18. Vamvakas EC. Transfusion associated cancer recurrence and infection meta analysis of the randomized clinical trials. *Transfusion* 1996;36:175-186.
19. McAlister FA, Clark HD, Wells PS, Laupacis A. A perioperative allogenic blood transfusion does not cause adverse sequelae in patients with cancer a meta analysis of unconfounded studies. *Br J Surg* 1998;85:171-178.
20. Gregori L, MaCombie N, Palmer D, Birch P, Sowemino-Coker S, Giulivi A, Rohwer RG. Effectiveness of leukoreduction for removal of infectivity of transmissible spongiform encephalopathies from blood. *Lancet* 2004;264:529-531.
21. Foster PR. Removal of TSE agents from blood products. *Vox Sang* 2004;87(suppl 2):S7-S10.
22. Dal Cortivo, Robert I, Mangin C, Sameshima T, Kora S, Gluckman E, Benbunan M, Marolleau JP. Cord Blood Banking: volume reduction using Procord Terumo Filter. *J hemother* 2000;9:885-890.
23. Eichler H, kern S, Beck C, Zieger W, Kluter H. Engraftment capacity of umbilical cord blood cells processed by either whole blood preparation or filtration. *Stem Cells* 2003;21:208-216.
24. Ebner S, Neyer S, Hofer S, Nussbaumer W, Romani N, Heufler C. Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats. *J Immunol Methods* 2001;252:93-104.
25. Weitkamp JH, Crowe JE. Blood donor leukocyte reduction filters as a source of human B lymphocytes. *Biotechniques* 2001;31:464-466.
26. Teleron AA, Carlson B, Young PP. Blood donor white blood cell reduction filters as a source of human peripheral blood derived endothelial progenitor cells. *Transfusion* 2005;45:21-25.
27. Néron S, Dussault N, Racine C. Whole blood leukoreduction filters are a source for cryopreserved cells for phenotypic and functional investigations on peripheral blood lymphocytes. *Transfusion* 2006;46:537-544.
28. Collier AC, Kalish LA, Busch MP, Gernsheimer T, Assman SF, Lane TD, Asmuth DM, Lederman MM, Murphy EL, Kumar P, Kelley M, Flanigan TP, Mc Mahon DK, Sacks HS, Kennedy MS, Holland PV. Leucocyte-reduced red blood cell transfusions in patient with anemia and Human Immunodeficiency Virus infection. The Viral Activation Transfusion Study: A randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285:1592-1601.
29. Kruskall MS, Lee TH, Assmann SF, Iacosc M, Kalish La, Lederman MM, Busch MP. Survival of transfused donor white blood cells in HIV-infected recipients. *Blood* 2001;98:272-279.

Historia de la Inmunohematología

Los grupos sanguíneos son sistemas de antígenos y anticuerpos que tienen implicancias genéticas, bioquímicas, inmunitarias y antropológicas. Los antígenos de grupo sanguíneo se hallan bajo control genético y se encuentran en la membrana celular del eritrocito mientras que los anticuerpos existen en la fracción inmunoglobulinas de las proteínas plasmáticas.

Los antígenos de grupo sanguíneo pertenecen al mismo sistema si se demuestran que son alelomorfos es decir, genes sustitutivos que ocupan el mismo lugar sobre un cromosoma en forma tal que sólo uno de dos o más alelomorfos pueden hallarse presentes en dicho locus o en cualquier cromosoma. De esta manera, una secuencia común en el descubrimiento de los sistemas de grupos sanguíneos lo constituye el hallazgo de un anticuerpo que descubre a un antígeno sobre los eritrocitos, seguido por el hallazgo de un segundo anticuerpo, antítesis en su reacción en relación con el primero y que demuestra estar descubriendo el producto de un alelo. Sin embargo, los cuatro primeros sistemas (ABO, MNS, P y Rh) no fueron descubiertos de esta forma.

Adolf Creite, en 1869 publica un trabajo donde establece que las proteínas del suero tienen la propiedad de “dissolving” and “clustering” los eritrocitos que corresponden a los términos actuales de hemólisis y aglutinación con lo cual anticipa el descubrimiento de los anticuerpos un cuarto de siglo (1). En 1859, Claude Bernard establece que la inyección de suero de perros a conejos es causa de orina sanguinolenta y contiene proteínas (2).

Creite también concluye luego de inyectar entre sí suero de animales de distintas especies que el suero tiene ciertas propiedades químicas que afectan directamente a los eri-

trocitos foráneos. No establece con certeza qué sustancia del suero es responsable de este efecto pero sugiere que los ingredientes más activos del suero son las proteínas. Estos experimentos describen la hemólisis intravascular y encuentran una explicación de la aparición de sangre en orina (hoy hemoglobinuria) porque “some blood cells dissolved completely” (hemólisis).

La diferencia en la compatibilidad de la sangre entre las diferentes especies fueron publicadas por Leonard Landois en su tratado titulado “Die Transfusion des Blutes” en 1875, en el cual describe que la mezcla de células sanguíneas de un animal con el suero de otras especies frecuentemente resulta en lisis en menos de dos minutos. Landois que trabajaba en el Physiological Institute en la University of Greifswald en Alemania, demuestra en sus trabajos tanto la hemólisis in vivo como la aglutinación in vitro (3).

Landois además distingue la aglutinación del fenómeno de “rouleaux” para lo cual utiliza el término “like rolls of coins” (como pila de monedas). A igual que Creite, Landois considera que la lisis y aglutinación resultan de algún tipo de interacción del suero con los eritrocitos pero no definen la causa aunque sugieren una reacción química entre suero y células (4).

El descubrimiento del sistema inmune comienza en 1890 con la descripción de los anticuerpos específicos para la toxina antitetánica. Este descubrimiento de aglutininas bacterianas renueva el interés en los aspectos clínicos de las aglutininas y lisis eritrocitarias.

En 1900, Shattock describe en el St Thomas Hospital de Londres la aglutinación de los eritrocitos de un individuo con el suero de otro de la misma especie pero lo relaciona con

infecciones agudas (5). Por otra parte, el serólogo alemán Paul Ehrlich introduce el análisis microscópico de la sangre y establece que la aglutinación de la sangre humana con suero humano debe ser denominada isoaglutinación.

En 1901 Karl Landsteiner (6), bacteriólogo austríaco, trabajando como asistente del Pathological-Anatomical Institute de Viena y basándose en estos trabajos preliminares observó que el suero de personas sanas no sólo aglutinaba los eritrocitos de animales sino también, muchas veces, el de sus semejantes. Describió las reacciones que se producían al mezclar los sueros y eritrocitos de 22 individuos normales y de cinco científicos que trabajaban con él incluyendo su propia sangre. Determinó que en un número de casos (grupo A) el suero reaccionaba con los glóbulos rojos de otro grupo (B) pero no con los eritrocitos del grupo A. A su vez, el suero del grupo B reaccionaba con los glóbulos rojos del grupo A pero no con los eritrocitos del B. En el tercer grupo C el suero aglutinaba los eritrocitos del grupo A y B pero no los del grupo C. Landsteiner establecía entonces que existían al menos dos diferentes tipos de isoaglutininas: una en el grupo A, otra en el B y ambas en el grupo C. Precisamente, según figura en la tabla 1 del trabajo original Landsteiner pertenecía a este último grupo. Una traducción de este trabajo de Landsteiner en 1901 fue publicada en el primer número de la revista *Transfusion de la American Association of Blood Bank (AABB)* en 1961 y en la cual aparecen dos artículos uno escrito por Philip Levine "Memories of Karl Landsteiner" y otro por Wiener "My introduction to Karl Landsteiner" quienes trabajando juntos descubrieron los sistemas M, N y P en 1927, el sistema Rh en 1940 y adjudicaron al antígeno D del sistema Rh la patogenia de la enfermedad hemolítica perinatal en 1941. Al final de la traducción al inglés del trabajo original de Landsteiner publicada en el primer número de la revista *Transfusion* se agrega una foto de la medalla entregada por la Cruz Roja holandesa a Landsteiner el 19 de abril de 1933.

En la frase final de su publicación Landsteiner menciona que las observaciones reportadas pueden explicar varias de las reacciones que ocurren con la transfusión sanguínea.

En 1911, Von Dungern y Hirsfeld (7) fueron los primeros en utilizar la letra O (primera

letra del término alemán "ohne" que significa "without" en inglés o "sin" en español) para describir los eritrocitos que no reaccionaban con las isoaglutininas anti-A y anti-B. Decastello y Sturli en 1902 (8) dos discípulos de Landsteiner en Viena, confirman los hallazgos en un estudio sobre 155 individuos normales e identifican 4 sujetos (2,5%) que no aglutinaban con su propio suero pero lo hacían con el suero de los tres grupos identificados previamente. Los denominaron con el término AB. De esta manera se describe el primer sistema de grupos sanguíneos humanos, el sistema ABO con sus cuatro posibilidades A, B, O y AB. Otra observación importante hecha por Landsteiner era que ninguno de los sueros examinados reaccionaban con sus propios eritrocitos lo cual constituyó la primera descripción de tolerancia inmune.

Pero, estos trabajos publicados en idioma alemán, en una revista científica austríaca no fueron reconocidos inmediatamente por la comunidad científica y la determinación de los grupos sanguíneos no comienza a realizarse rutinariamente hasta después de 1920 (9). Por ejemplo, en la primera transfusión realizada por el cirujano francés Alexis Carrell, en marzo de 1908 en New York, a un recién nacido con sangre de su padre no fueron determinados los grupos sanguíneos de ambos.

Un año después del descubrimiento del sistema ABC, Landsteiner recomienda que se puede utilizar esta determinación para estudios de paternidad lo cual sugiere que él pensaba que los antígenos A y B se determinaban genéticamente aunque no desarrolló esta teoría. Recién en 1911, von Dungern y Hirsfeld (7) determinan que los antígenos A y B se heredan de acuerdo a las leyes mendelianas sugiriendo la existencia de dos genes A y B dominantes cada uno con un alelo recesivo. En el caso del grupo AB se expresa la ley de codominancia.

Landsteiner en sus trabajos de investigación también observa que la reacción de aglutinación puede realizarse aún con muestras de sangre seca. Reproduce sus resultados con sangre de más de una semana de desecada lo cual luego sería de enorme importancia para la medicina forense.

En 1904, solo tres años después de su publicación sobre los grupos sanguíneos, junto con Donath establecen la patogénesis de la hemoglobinuria paroxística nocturna (10).

Luego Landsteiner comienza a trabajar en otras áreas de investigación no desarrollando ni promocionando sus trabajos preliminares. A la edad de 38 años, en 1916, contrae matrimonio con Helene Wlasto. Tienen un hijo Ernst Karl que luego sería cirujano en Providencia, Rhode Island en USA (11). Dado que después de la primera guerra mundial la vida en Viena cambia dramáticamente en 1919 se muda a Holanda. En 1922 a través de contactos de científicos alemanes con Simon Flexner Director del Rockefeller Medical Research Institute emigra a New York donde comienza a trabajar en ese instituto en otras áreas de la inmunología. Él y su familia fueron ciudadanos norteamericanos a partir de 1929.

A pesar del descubrimiento del sistema ABO seguían apareciendo episodios hemolíticos. Recién un cuarto de siglo después, en 1928 Landsteiner y Levine que era su alumno en el Rockefeller Institute, describen los sistemas MN y P inyectando eritrocitos humanos a conejos. Con el suero obtenido observaron que reaccionaba o no con otras muestras de sangre humana (12).

Algunos otros grupos de investigadores se dedicaron al sistema ABO como por ejemplo Jansky de Polonia en 1907 numera a los grupos sanguíneos con números romanos I, II, III y IV por orden de frecuencia y Moss en Baltimore (USA) describe en 1910 los cuatro grupos en orden inverso IV, III, II y I (13). La clasificación de Moss fue usada ampliamente en Inglaterra pero daba lugar a muchas confusiones. Por ello, en el segundo Congreso de la International Society of Blood Transfusión (ISBT) realizado en París se determina que la nomenclatura ABO debe ser adoptada.

En 1930 por sus trabajos en la determinación de los grupos sanguíneos humanos Karl Landsteiner recibe el premio Nobel de Medicina pero él piensa que el premio es excesivo pues su descubrimiento fue accidental. Levine, que fue su discípulo, lo describe como de porte militar pero impregnado de una extrema modestia y simplicidad.

En 1939 Levine y Stetson (14) describieron el caso de una madre que dio a luz un hijo muerto y estuvo a punto de fallecer tras una transfusión de sangre isogrupo ABO de su marido. Estos autores demostraron entonces que la reacción hemolítica se debía a que el suero de la madre aglutinó los hematíes del marido

y de 80 donantes sobre 104 estudiados al azar. El antígeno responsable era independiente de los antígenos ABO, MN y P conocidos hasta ese momento. Los autores formularon la hipótesis según la cual la madre, careciendo de un antígeno presente en su marido y transmitido al hijo, había sido capaz de inmunizarse frente al mismo. Si Levine y Stetson hubieran dado un nombre a este nuevo antígeno y anticuerpo de grupo sanguíneo sería el suyo y no el de Rh que se describe un año después.

En 1940 Landsteiner y Wiener (15) denominan al cuarto sistema de grupo sanguíneo Rh al tomar las iniciales del mono macacus Rhesus que fue la especie con cuyos eritrocitos se realizaron las primeras experiencias de aglutinación. Estos investigadores inmunizan conejos y cobayos con sangre del mono macacus Rhesus. El heteroanticuerpo fabricado por los conejos y cobayos aglutinaban no sólo los hematíes del mono sino también el 85% de los eritrocitos de individuos blancos de la población de New York. En este mismo año, Wiener y Peters (16) demuestran luego de algunas reacciones hemolíticas posttransfusionales, que el suero de los pacientes evidencian un anticuerpo cuya especificidad se revela idéntica a la del anticuerpo de conejo anti-Rhesus. También, el anticuerpo identificado por Levine en 1939 en la mujer embarazada parece poseer asimismo la misma especificidad.

En 1941, Levine y colaboradores (17) explican que la eritroblastosis fetal denominada ya enfermedad hemolítica del recién nacido, es consecuencia de una incompatibilidad del grupo Rhesus entre la madre y el hijo.

El antígeno D del sistema Rh fue inicialmente denominado LW con las iniciales de sus descubridores pero los mismos investigadores sugieren que no es conveniente esta denominación.

El 26 de junio de 1943, seis meses antes que su esposa, fallece Landsteiner súbitamente por un ataque cardíaco y actualmente todos los 14 de junio, día de su nacimiento, se conmemora el día mundial del donante de sangre. En Austria, en los billetes de 1000 chelines figuró la foto de Landsteiner hasta el primero de enero del 2002 cuando fueron sustituidos por el euro (11). También en su honor, la American Association of Blood Bank (AABB) establece el premio Landstei-

ner (Landsteiner Award) que a partir de 1954 se entrega anualmente a científicos relevantes. El primero en recibirlo fue Reubin Ottenberg de New York quien realizó la primera transfusión en esa ciudad en 1907-1908 siendo todavía interno. Él puso en práctica la determinación del grupo sanguíneo AB0 y la prueba cruzada (crossmatching) entre donante y receptor previamente a la transfusión. Ottenberg también inicia la práctica de usar sangre grupo 0 como donante “universal” sobre todo en situaciones de urgencia.

Muchos otros investigadores han obtenido luego los premios Landsteiner, como Levine y Wiener (1956), Race y Sanger (1957), Witebsky (1959), Coombs (1961), Allen y Diamond (1963), Kabat (1966), Dausset (1970), Bruce Chown y Marion Lewis (1971), Mourant (1973), Blumberg (1975), Kolher y Milstein (1982), Montagnier y Gallo (1990) Terasaki (1991), Mullis (1999), Agre (2003) entre otros. Todos ellos son citados por sus descubrimientos en los distintos capítulos de este libro.

Con la descripción posterior de los cinco antígenos (D, C, E, c y e) del sistema Rh aparecen los primeros problemas de terminología. Por un lado, Fischer genetista de Cambridge y Race ambos en Inglaterra los denominan con letras mayúsculas y minúsculas tomando amplia difusión en Europa. Por otro lado, Wiener utiliza la simbología Rh/Hr asociando números a los antígenos lo cual tiene amplia aceptación en USA.

Robert Russell Race, nacido en 1907, es sin duda uno de los investigadores más renombrados por su contribución al desarrollo de la serología y la genética aplicada a los grupos sanguíneos desde 1940 a 1980 y sólo superado por los trabajos anteriores de Landsteiner. En 1945, trabajando en el Galton Serum Laboratory junto con Arthur Mourant y Robert Coombs que era veterinario, desarrollaron un nuevo método para detectar los anticuerpos incompletos por aglutinación de los eritrocitos.

En 1946, Race y Mourant se mudan al Lister Institute of Preventive Medicine en Londres. Race luego es director del Medical Research Council Blood Group Research Unit y Mourant es nombrado director del Blood Group Reference Laboratory.

En 1947 Robert Race conoce a Ruth Sanger quien luego sería su esposa en 1956. Sanger que nació en Australia, se graduó en

la Universidad de Sydney en 1938 e integró el equipo del New South Wales Red Cross Blood Transfusion Service. En 1946 ingresa como investigadora en el Medical Research Council de Londres para realizar su tesis de doctorado “The multiplicity of blood group systems”. Sanger junto con Race inspirados y apoyados por Ronald Fisher establecen la nomenclatura del sistema Rh recientemente descubierto.

En 1933 el químico Elvin Kabat comienza a trabajar en el laboratorio de Michael Heidelberger en Columbia University College of Physicians and Surgeons sobre la inmuquímica cuantitativa de los polisacáridos bacterianos. Lee el trabajo publicado por Karl Landsteiner y Merrill Chase en 1936 sobre la presencia de sustancia grupo A en las preparaciones comerciales de pepsina (www.chemistrydaily.com). Pero, el interés de Kabat sobre las sustancias de los grupos sanguíneos quedó latente hasta que Witebsky y colaboradores en 1945 demuestran que sustancias solubles obtenidas de los estómagos de caballos y cerdos al ser agregadas a la sangre de grupo 0 neutralizan las aglutininas anti-A y anti-B con lo cual mejora la calidad de donante universal de este grupo sanguíneo. Algunas de las preparaciones, que no tenían especificidad química, producían shock anafilácticos en los cerdos y Witebsky sugiere a Kabat que investigue este fenómeno.

En 1949, identifica los oligosacáridos que contienen las sustancias precursoras de los grupos sanguíneos y en las siguientes dos décadas, en paralelo con Walter Morgan y Winifred Watkins del Lister Institute de Londres, determinan las bases bioquímicas de los antígenos de grupo sanguíneo. En 1956, Kabat publica su libro titulado “Blood Group Substances: Their Chemistry and Immunochemistry”. Fue además el que primero describió que los anticuerpos eran inmunoglobulinas. Es considerado actualmente como el padre de la inmuquímica cuantitativa moderna.

Race y Sanger, en 1950 publican la primera edición de su libro “Blood Group in Man”. Luego se publicaron seis ediciones, en varios idiomas, siendo la última en 1975. Es una publicación de referencia para varias generaciones de investigadores que muchos han definido como “la Biblia de la Inmuno-hematología”.

Sanger suplanta a Race como director de la Unidad de Grupos sanguíneos en 1973 retirándose 10 años después. En 1984 fallece Race y ella en el 2001 a los 82 años de edad. No tuvieron hijos.

Otra publicación de referencia en Inmunohematología y Medicina Transfusional es el libro publicado por el Profesor Patrick Loudon Mollison también de Inglaterra cuya primera edición "Blood Transfusion in Clinical Medicine" fue publicada en 1951 realizándose la primera traducción al idioma español en 1955. La última edición 2005 con 891 páginas es editada por Harvey Klein (presidente de la AABB) y David Anstee (Director del Bristol Institute for Transfusion Science, National Blood Services, UK). Mollison es Profesor Emérito de Hematología en la Universidad de Londres y Director de la Experimental Haematology Unit del St Mary Hospital Medical School también en Londres.

Colaboraron con él, en la anterior edición de 1997, Engelfriet Profesor de Inmunohematología de la Universidad de Amsterdam y Presidente de la International Society of Blood Transfusión (ISBT) y Marcela Contreras, nacida en Chile, que fue Directora del North London Blood Transfusion Center.

En 1945, Coombs, Mourant y Race (18) describieron el procedimiento para detectar los anticuerpos unidos a los eritrocitos y que no provocaban aglutinación. Robert Royston Amos Coombs, conocido como Robin, nació en Londres en 1921 pero recibe su educación en África del sur. Cuando retorna a Gran Bretaña estudia en el Royal Veterinary College de Edimburgo donde se gradúa de veterinario en 1943. En 1944 viaja a Cambridge e ingresa como estudiante de postdoctorado al Departamento de Patología. Inyectó a un conejo inmunoglobulinas humanas produciendo en el animal una respuesta inmune humoral. Dado que la fracción Fc de la IgG humana es la fracción antigénica de la molécula, los fragmentos Fab del anticuerpo del conejo (antiglobulina humana) se unen a los Fc de la IgG unida a los eritrocitos formando un puente y haciendo visible su presencia mediante la aglutinación de los glóbulos rojos.

La magnitud de la aglutinación suele ser proporcional a la cantidad de IgG fijada.

Poco después del desarrollo de esta prueba con antiglobulina humana, el grupo de cien-

tíficos descubre que el principio del test ya había sido propuesto y confirmado en la práctica por el científico italiano Carlo Moreschi en 1908. Inclusive, en una conferencia en Roma en 1953, Robert Coombs reconoce al científico italiano al titularla "Moreschi and some recent developments in agglutination".

A mediados de 1950, Coombs junto con otros investigadores fundan la British Society for Immunology (BSI) ocupando el primer cargo de secretario general durante 10 años.

Junto con Philip Gell publican en 1963 el libro "Clinical Aspects of Immunology" editado por Blackwell-Oxford.

La prueba de Coombs directa (PCD) se usa para demostrar la cobertura "in vivo" de los eritrocitos con inmunoglobulinas en particular IgG o fracciones del complemento como C3d. Por ejemplo, a los glóbulos rojos fetales o del RN que pueden sensibilizarse "in vivo" con las IgG maternas, se les realiza la PCD para diagnosticar EHP. Antes de agregar el suero antiglobulina humana (SAGH) se deben lavar los eritrocitos para eliminar las proteínas libres que pueden neutralizar el SAGH y producir falsos resultados negativos.

La prueba de Coombs indirecta (PCI) se utiliza para detectar IgG antieritrocitarias libres, circulantes, no unidas a los glóbulos rojos. Es indirecta porque, a diferencia del caso anterior, antes del agregado de SAGH se necesita una fase previa de sensibilización "in vitro". El suero o plasma en el cual queremos investigar la presencia de IgG antieritrocitarias, se debe incubar "in vitro" con los glóbulos rojos que contengan el antígeno específico. Si existen anticuerpos circulantes éstos se van a fijar al antígeno de la membrana del glóbulo rojo y luego con el agregado de SAGH se hará visible su presencia mediante aglutinación. En esta prueba, además del lavado de los eritrocitos como en la PCD, es muy importante que se enfrente el plasma a glóbulos rojos fenotipados que contengan la mayoría de los antígenos clínicamente significativos.

La mayor cantidad de antígenos eritrocitarios de grupos sanguíneos se descubren luego de la introducción de la prueba de la antiglobulina o test de Coombs.

Hasta nuestros días han aparecido una gran cantidad de otros sistemas de grupos sanguíneos. En algunos el nombre del sistema deriva del individuo en el cual el anticuerpo

fue seleccionado por primera vez. Así, la señora Kell, Lutheran y Duffy y la señorita Kidd han prestado sus apellidos a los sistemas conocidos en la actualidad. A veces las primeras letras (por ej. K o Lu) en otras las últimas (por ej. Fy) han sido utilizadas para nominar los antígenos de cada sistema. Los alelos comunes para cada antígeno son denominados como a y b resultando en Fy^a Fy^b o Lu^a Lu^b, etc.

En 1946, Coombs, Mourant y Race, decidieron ensayar la prueba antiglobulina humana que acababan de definir en eritrocitos de recién nacidos con sospecha de enfermedad hemolítica perinatal para demostrar la sensibilización in vivo. Las muestras fueron enviadas desde varios laboratorios y los resultados confirmaron la presencia de un anticuerpo anti-D unido a los eritrocitos. Pero dos test dieron resultados inesperados en dos recién nacidos con ictericia. Uno, con un test de Coombs directo negativo, la autopsia reveló una sífilis congénita. En el otro, con un resultado aparentemente falso positivo dado que el suero de la madre carecía de anticuerpos anti-D. Así, descubrieron un nuevo anticuerpo en el suero de la señora Kell madre de un hijo nacido icterico. El antígeno correspondiente fue denominado con la letra K (19).

El primer anticuerpo del sistema Lutheran (Lu) fue descrito por Callender y Race en 1946 en un paciente que tenía Lupus eritematoso que había recibido transfusiones de sangre. El primer antígeno fue denominado Lu^a (20).

El primer anticuerpo del sistema Duffy fue hallado en un paciente hemofílico que había recibido transfusiones de sangre durante un período de 20 años llamado Joseph Duffy.

De esta manera Cutbusch, Mollison y Parkin (21) identificaron el primer antígeno denominado Fy^a.

En 1951, Allen, Diamond y Niedziela identificaron en el plasma de la señora Kidd en Boston (USA), cuyo quinto hijo nació afectado por una enfermedad hemolítica, un anticuerpo de especificidad desconocida al que denominaron anti-Jk^a (22) que aglutinaba 146 (77%) de 189 donantes de sangre.

El primer anticuerpo del sistema Diego (Di) fue encontrado en Venezuela por Layrisse, Arends y Domínguez (23) en una mujer que había tenido un hijo con enfermedad hemolítica.

En el sistema Cartwright (Yt), el primer anticuerpo fue descubierto en 1956 por Eaton en el suero de un paciente que había recibido transfusiones (24).

En el sistema Xg los genes se encuentran en el cromosoma X y el primer anticuerpo fue descrito por Mann en 1962 (25).

El sistema Dombrock es un sistema simple compuesto por dos alelos. El primer antígeno Do^a fue identificado por Swanson y colaboradores en 1965 (26) y el segundo antígeno Do^b en 1973 por Moltham y colaboradores en el suero de una mujer que había recibido una transfusión (27).

El antígeno Co^a del sistema Colton fue descrito en Oslo por Heisto en 1967 (28).

Los antígenos del sistema Chido/Rodgers (Ch/Rg) son determinantes de la fracción C4 del complemento descritos por O Neil y Tilley en 1978 (29) (30). Son antígenos plasmáticos que se adsorben a los glóbulos rojos.

El primer anticuerpo del sistema Gerbich (Ge) fue encontrado por Rosenfield en 1960 en sueros de gestantes y puérperas (31).

En el sistema Cromer (Cr) el primer anticuerpo fue descrito en un individuo de raza negra por Stroup y McCreary en 1975 (32).

En el sistema Lewis (Le) el anticuerpo Le^a fue descrito por primera vez por Mourant en 1946 (33). Es un sistema de grupo sanguíneo de antígenos solubles en saliva y plasma Grubb 1952 (34). Los glóbulos rojos adquieren los antígenos Lewis adsorbidos desde el plasma; Sneath y Sneath 1955 (35). Los antígenos del sistema ABO y Lewis provienen del mismo sustrato precursor por lo cual el fenotipo Lewis puede ser modificado por el fenotipo ABO. Andersen en 1948 describe el segundo anticuerpo Le^b (36).

Los 270 antígenos eritrocitarios que se han agrupado actualmente en 30 sistemas. Se pueden consultar en la página web del Internacional Blood Group Referente Laboratory (www.ibgrrl.co.uk).

Esta avalancha de terminología hizo que en 1980 la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (International Society of Blood Transfusion, ISBT) creara un grupo de trabajo con el fin de uniformizar la nomenclatura de los antígenos eritrocitarios (Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens). La ISBT (www.isbt-web.org), fundada en 1935, con sede actualmente en Áms-

terdam representando a más de 96 países, sugiere el uso de letras y números arábigos para denominar los sistemas y códigos de los antígenos. A cada sistema, antigen collection o series de antígenos se le determina un número por ejemplo el sistema ABO es el 001. A su vez a cada antígeno del sistema se le adjudica un símbolo y un número por ejemplo el A es 001 y el B 002. De manera que en el sistema de computación universal el antígeno A es 001001 y el B 001002 siendo el 001 inicial el que corresponde al sistema ABO y el siguiente 001 el que corresponde al antígeno A.

Si se eliminan los ceros se puede expresar el antígeno A como 1.1 y el B como 1.2. En el sistema Rh (004) el antígeno D es 001, C 002, E 003, etc. En el registro computarizado el D es 004001, el C 004002 y el E 004003 o 4.1, 4.2 y 4.3 respectivamente.

Los antígenos de grupos sanguíneos que tienen una relación fenotípica, bioquímica o genética pero que no son alelomorfos no constituyen un sistema y se denominan "antigen collections" (serie 200) donde se encuentran por ejemplo los antígenos I i. La gran mayoría de los eritrocitos adultos tienen el antígeno I mientras los glóbulos rojos de cordón umbilical son intensamente positivos al antígeno i. La transición se realizaría 18 meses después del nacimiento. Los anticuerpos anti-I o anti-HI son los responsables de la mayor parte de las anemias hemolíticas autoinmunes por anticuerpos fríos.

Los antígenos de alta incidencia en la población, en su mayoría con una incidencia superior al 99% son denominados antígenos públicos (serie 900).

Precisamente, en el año 2003 publicamos un caso (37) de una embarazada aloinmunizada con un anticuerpo anti-Vel (901001) que presentó reacciones transfusionales severas pero no produjo EHP. Aunque no es lo frecuente, un caso de EHP por anti-Vel fue descrito en el año 1992 (38). Como es un antígeno de altísima incidencia en la población es muy difícil conseguir individuos que carezcan del mismo con fines transfusionales. De ahí la importancia de realizar el diagnóstico de aloinmunización e identificar el anticuerpo tempranamente durante la gestación porque aunque la EHP sea la excepción, debemos tomar medidas precautorias en caso de anemia materna, como técnicas de transfusión

autóloga y/o administración de eritropoyetina, hierro y ácido fólico con el fin de evitar seguras reacciones transfusionales al administrar sangre incompatible.

El primer anticuerpo anti-Vel responsable de una hemólisis intravascular en un acto transfusional fue descrito por Sussman y Miller en 1952 (39).

Todos los sistemas de grupo sanguíneo tienen variantes raras y éstas a menudo revelan la complejidad del sistema aún cuando al mismo tiempo contribuyan al entendimiento de su estructura. Por ejemplo, existe un número considerable de alelos raros que aparecen ocasionalmente en el locus Rh. Un sustituto para el antígeno C es el C^w que ocurre en menos del 2% de la población británica. En lugar de la combinación habitual de genes CDe un individuo puede ser C^wDe. El antígeno C^w es capaz de estimular la formación de anticuerpos anti-C^w, los cuales en ocasiones aisladas han provocado reacciones hemolíticas durante transfusiones de glóbulos rojos y EHP. El C^x es aún un alelo más raro en el mismo locus, ocurre aproximadamente en 1 de cada 1000 personas pero es también capaz de generar el anticuerpo correspondiente y producir EHP.

El antígeno D débil (weak) o D^u cuantitativo significa que existen menos sitios antígenicos D sobre la membrana eritrocitaria pero tanto donantes, gestantes y recién nacidos D débil deben ser considerados como Rh positivos. Esta variante fue descrita por primera vez por Stratton en 1946 quien la denominó D^u (40) la cual fue remplazada por la denominación D weak en 1992 (41).

A finales de la década de 1950 y en 1960 Wiener y Unger en New Cork y Tippet y Sanger en Londres encuentran que individuos D positivos presentan anticuerpos anti-D (42) (43).

De esta manera se describe por primera vez una variante más rara, un D parcial (D cualitativo) de manera que personas Rh positivas pueden tener anticuerpos anti-D que no reaccionan con sus propias células dado que el anticuerpo está dirigido hacia una parte (epitopo) faltante del antígeno D. Una de las más importantes variantes cualitativas del antígeno D es la variante D^{VI} que difiere en la parte extracelular de la proteína en tres aminoácidos con la proteína D normal. Las emba-

razadas o receptores de hemocomponentes que tienen el fenotipo D^{VI} pueden desarrollar anticuerpos contra los epitopos faltantes de la proteína D por ello, deben ser considerados como Rh negativos y en el caso de la gestación deben recibir inmunoprofilaxis anti-D. La mayoría de los sueros monoclonales anti-D que se utilizan para determinar el grupo sanguíneo están dirigidos contra los epitopos 6/7 que son los más inmunogénicos de la proteína D pero son los que también se encuentran ausentes en la variante D^{VI}. Por tanto, estos sueros son ideales para tipificar embarazadas o receptores ya que los fenotipos D^{VI} serán reconocidos como Rh negativos y de esta manera recibirán hemocomponentes Rh negativos así como inmunoprofilaxis anti-D. Sin embargo, para la tipificación de donantes de sangre se recomienda el uso de sueros anti-D que detecten la variante D^{VI} con el fin de que sean tipificados como Rh positivos para que no sean inmunogénicos en receptores Rh negativos.

En 1984, se reconoce que la cooperación internacional es esencial para transfundir pacientes con grupos sanguíneos denominados “raros” cuando localmente no existe un hemocomponente compatible. Por ello, la ISBT crea The Working Party for Rare Donors con el objetivo de desarrollar guías de estandarización e intercambio, de centralizar un registro web que reproduzca información sobre grupos sanguíneos raros, extender los lazos con el International Blood Group Reference Laboratory (BGRL) en Bristol-UK y contribuir con el WHO International Rare Donor Panel creado en 1964 también por recomendación de la ISBT. Se festejan hoy 25 años de cooperación internacional.

Actualmente, el BGRL cuenta con una base de datos de más de 4000 donantes con grupos sanguíneos raros en 60 centros de 26 países (www.blood.co.uk/ibgri).

En USA, the American Rare Donor Program (ARDP) es creado en 1998 a través de una cooperación entre la American Association of Blood Bank (AABB) y la American Red Cross. Cuenta con una base de datos de aproximadamente 38.000 donantes raros activos centralizada en Philadelphia donde se recibe la información de 81 laboratorios de referencia en inmunohematología. La ARDP define como donantes de grupos sanguíneos

raros a aquellos que sus eritrocitos carecen de un antígeno de alta frecuencia en la población o aquellos de grupo O o A que carecen de los antígenos más comunes que causan inmunización (Rh, Kell, Duffy, Kidd o Ss) o son deficientes en IgA (menos de 0,05 mg/dl) en dos muestras separadas. El primer grupo se utiliza para los pacientes que tienen un anticuerpo frente a un antígeno público, el segundo principalmente para pacientes con patologías generalmente hereditarias, como la anemia falciforme, que necesitan múltiples transfusiones durante varios años y los terceros para los pacientes con deficiencia de IgA. En la actualidad existen registrados 3700 donantes del primer grupo, 34.000 del segundo y 200 del tercero (www.redcross.org).

En febrero de 2010, conmemorando los 50 años de la revista Transfusion de la American Association of Blood Bank se publica un artículo sobre la historia de los grupos sanguíneos escrito por Daniels y Reid (Blood Groups: the past 50 years).

Uno de los grandes avances de la inmunología en el siglo XX fue el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales por Milstein y Köhler en 1975, publicado en la revista Nature (44) y por lo cual se les otorgó el Premio Nobel en 1984. Milstein (1927-2002) era un químico argentino, nacido en Bahía Blanca, que escapó en 1962 de la represión política de su país y se radicó en Cambridge (Inglaterra). Milstein conoció a Köhler de origen alemán cuando en 1973 visitó el Instituto de Inmunobiología de Basilea. Los dos científicos congeniaron inmediatamente y en abril de 1974 Köhler llegó al Laboratory of Molecular Biology of the Medical Research Council (MRC) de la Universidad de Cambridge como becario postdoctoral bajo la dirección de Milstein.

Quien se preguntó si existía límite en el número de anticuerpos específicos que un animal podía producir fue Landsteiner. Su conclusión era que no había tal límite. La inyección en animales de una variedad interminable de productos químicos, naturales o artificiales, siempre daba lugar a anticuerpos que reconocían específicamente a la sustancia inyectada o antígeno. Esta respuesta abrió la caja de Pandora que despertó la curiosidad de muchos científicos en los años subsiguientes. El primer ejemplo del uso de anticuerpos con una función utilitaria, totalmente despojada

de su función biológica, la proporcionó el mismo Landsteiner que con el suero de algunos individuos podía aglutinar los eritrocitos de otros sujetos en un tubo de ensayo. Otro ejemplo, fue el diagnóstico de la sífilis en la clásica reacción de Wassermann.

Reconocer que los anticuerpos son una familia de proteínas fue un camino largo y lleno de dificultades. Lo difícil es que se trata de una familia de proteínas extremadamente similares. Las técnicas más sofisticadas de purificación de proteínas no eran suficientes para preparar anticuerpos químicamente puros. Recién en 1975 fue posible preparar anticuerpos químicamente puros y capaces de ser cristalizados. No fue el resultado de progresos en la purificación de proteínas sino el producto de un simple truco experimental.

Para esa época ya estaba generalmente aceptado, aunque no demostrado formalmente, que cada célula produce una molécula de anticuerpo. La teoría del origen clonal de los anticuerpos fue propuesta por Burnet lo que le valió el premio Nobel en 1960. Como hay miles y miles de clones de células, cada una produciendo un anticuerpo diferente, los anticuerpos secretados se mezclan en el suero y a partir de ese momento es imposible purificarlos. Lo importante entonces es purificar las células productoras del anticuerpo. Cada célula produce un anticuerpo puro pero una célula no produce una alta cantidad de anticuerpo por lo cual se necesita cultivar esa célula para tener poblaciones de células idénticas que produzcan cantidades ilimitadas del mismo anticuerpo. Esto no era posible porque las células productoras de anticuerpos (linfocitos B) se mueren rápidamente fuera del organismo. El truco fue pues immortalizar las células. Se logró fusionando la célula productora de anticuerpos con células de origen tumoral (mieloma) que tienen la capacidad de crecer en un tubo de ensayo. Los híbridos heredan las propiedades de las dos células: la de producir y secretar anticuerpos específicos y la de crecer indefinidamente en botellas de cultivo celular. Una célula que crece y se multiplica da lugar a un gran cultivo monoclonal que puede ser mantenido congelado por tiempo indefinido y que produce siempre el mismo anticuerpo. Actualmente se cumplen 35 años del primer híbrido clonado (híbrido-ma) por Milstein y Köhler. Estos autores

nunca se imaginaron las numerosas aplicaciones que tendría este truco experimental en la Medicina ya que ni siquiera lo patentaron. El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales tuvo muchas más repercusiones que las que sus descubridores pudieron pensar. Imaginemos una gran mezcla de sustancias químicas entre las cuales nos interesa sólo una de ellas. Una sustancia entre millones y millones. Es como una aguja en un pajar. Si tenemos un anticuerpo específico contra una sustancia, este anticuerpo puede funcionar como un imán capaz de ignorar la existencia del pajar y reconocer exclusivamente la aguja. Este simple concepto dio lugar a los llamados “inmunoensayos” que permitieron la medición precisa de hormonas y muchas otras sustancias no sólo en medicina sino en la química analítica en general.

Esto tuvo un efecto inmediato en la industria farmacéutica en el área de los análisis clínicos. El ejemplo más interesante fue el desarrollo del diagnóstico precoz y casero del embarazo con un anticuerpo monoclonal dirigido a la gonadotrofina coriónica en orina.

En la inmunohematología se utilizan los anticuerpos monoclonales para la caracterización de los antígenos eritrocitarios, plaquetarios y leucocitarios. Los anticuerpos producidos por animales reaccionan ante diferentes fracciones del antígeno (epitopes). Los monoclonales pueden reaccionar frente a sólo uno de ellos lo cual sirvió por ejemplo para diferenciar la variante cuantitativa y la cualitativa del antígeno D del sistema Rh ya mencionadas. El primer anticuerpo monoclonal con especificidad de grupo sanguíneo fue producido en 1980 mediante la transformación de los linfocitos B con el virus de Epstein-Barr (EBV). Los linfocitos tomados de sujetos Rh D negativos inmunizados produjeron un IgG anti-D (45) o un anti-D IgM (46). También se lograron obtener anticuerpos monoclonales dirigidos a varias fracciones del sistema complemento (47).

Luego, la avalancha de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos ya reconocidos o no, llevó a realizar el First International Workshop on Red Cell Monoclonal Antibodies en 1980 y el segundo en 1990.

Los anticuerpos monoclonales se utilizaron también para identificar componentes desconocidos de las paredes celulares. Por ejemplo,

cuando uno observa al microscopio la mezcla de células blancas de la sangre, puede diferenciar unos pocos tipos celulares como linfocitos y monocitos. Pero, el número de tipos de células es mucho mayor que aquello que muestran las diferencias morfológicas. Los linfocitos por ejemplo mirados al microscopio son grandes, medianos o pequeños pero hay muchos tipos y éstos no pueden diferenciarse morfológicamente. Por otro lado, las proteínas presentes en la pared celular son de gran complejidad y no compartidas por todos los linfocitos. Estas diferencias pueden ser reconocidas fácilmente por anticuerpos monoclonales que identifican antígenos de diferenciación celular (CD) es decir sustancias que distinguen distintas poblaciones de células. Lo importante es que se producen anticuerpos monoclonales que distinguen moléculas de las paredes celulares previamente desconocidas. Hasta ahora y a través de talleres colaborativos internacionales se han caracterizado, solamente entre las células blancas de la sangre, más de 200 moléculas de diferenciación, cada una de ellas reconocida por anticuerpos monoclonales generados independientemente en centenares de laboratorios del mundo. Por ejemplo, el anticuerpo CD4 reconoce alrededor del 20% de los linfocitos de un animal. Este anticuerpo sirvió para aislar y purificar por cromatografía de afinidad uno de esos antígenos de diferenciación, que resultó ser una proteína desconocida hasta ese entonces. Esto permitió descubrir que las células que contienen el antígeno CD4 son responsables de dar señales que activan las células productoras de anticuerpos. Estos linfocitos CD4+ se denominan "helper" o cooperadores en la respuesta inmune y reconocen moléculas clase II del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC). En cambio, los linfocitos CD8+ se denominan citotóxicos y se unen con moléculas clase I del MHC que se encuentran en la mayoría de las células nucleadas del organismo.

Al microscopio son iguales y sólo pueden distinguirse por antígenos de superficie.

El mismo anticuerpo anti-CD4 permitió establecer que estas son las células destruidas por el virus del SIDA. Más aún, que esa molécula de la superficie celular es una vía de entrada del virus. Hoy en día, es práctica médica común medir el progreso de la enfermedad por la disminución de los linfocitos

CD4 en la sangre de los pacientes y la efectividad de un tratamiento por el aumento de la población de células CD4+.

Similarmente, las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) pueden diferenciarse del resto de las células de la médula ósea por la presencia del antígeno CD34 reconocido por anticuerpos monoclonales actualmente en citometría de flujo. Esto ha traído grandes ventajas en los trasplantes de CPH como por ejemplo poder establecer el momento óptimo de la cosecha por hemaféresis al determinar la cantidad de células CD34+ en sangre periférica. Nos permite realizar también un control de calidad del producto a trasplantar al medir la concentración en la bolsa de cosecha lo cual nos determina el número de leucoaféresis a realizar.

Lo que al inicio fue la identificación e investigación de moléculas presentes en los leucocitos, actualmente se ha extendido a otras células lo cual hace que en el año 2009 haya más de 350 CD descritas. La nomenclatura CD, "Cluster of Differentiation" fue propuesta y establecida en el primer International Workshop Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) que se realizó en París en 1982. A la molécula de superficie identificada por anticuerpos monoclonales (mAbs) se le denomina CD y se le asigna un número cuando es reconocida por lo menos con dos anticuerpos monoclonales específicos. Si la molécula es caracterizada sólo por un mAbs se le asigna un indicador provisorio "w" como por ejemplo CDw 186. Las moléculas CD son utilizadas en varios métodos de diagnóstico como la citometría de flujo. Usualmente las poblaciones celulares se definen usando los símbolos + y - para determinar qué células expresan la molécula y cuales no. Por ejemplo las Stem Cells típicamente son CD34+, CD31-.

Gradualmente el uso de la nomenclatura CD se ha expandido a varios tipos celulares por lo cual se decide en la octava Conference of the HLDA que Human Leukocyte Differentiation Antigens sea sustituido por Human Cell Differentiation Molecules (HCDM).

En lo que respecta a la inmunohematología se han denominado varias moléculas de diferenciación de antígenos de grupo sanguíneo sobre el eritrocito como por ejemplo CD 173 sustancia H, CD 174 Lewis, CD234 Duffy,

CD238 Kell, CD239 Lutheran, CD240 RhCE y RhD, CD241 la proteína asociada al sistema Rhesus y la CD 233 la banda 3 anión que es una proteína de transporte de la membrana que como veremos luego interviene en la penetración por ejemplo, del óxido nítrico al eritrocito. La lista completa de las moléculas CD descritas hasta el momento se puede consultar en la página web www.uniprot.org.

Han salido al comercio diversas baterías (kits) de anticuerpos monoclonales para hacer diagnóstico *in vitro* por ejemplo de agentes infecciosos muchos de los cuales como los test combos por enzoinmunoanálisis para HIV y hepatitis C o la determinación del antígeno Australia de la hepatitis B, son utilizados en Medicina Transfusional.

En 1985 Feizi presenta numerosas pruebas a favor de que la mayoría de los anticuerpos monoclonales aparentemente dirigidos contra antígenos tumorales reconocen en realidad glucoproteínas y glucolípidos de los antígenos de grupo sanguíneo o sus precursores (48).

Muchos de los anticuerpos monoclonales que reaccionan con carcinomas y leucemias mieloides van dirigidos contra determinantes del sistema Lewis. También el anticuerpo Ma reconoce el antígeno I de los hematíes y aparece asociado a carcinomas digestivos de individuos secretores. Estos carbohidratos de la superficie celular pueden generar un tropismo de diferentes agentes infecciosos sirviendo de receptores para ellos o sus toxinas como el antígeno I para el micoplasma *neumoniae* y el antígeno P para el parvovirus B19. Algunos carcinomas particularmente del tubo digestivo, pueden presentar expresión aberrante de los antígenos de grupo sanguíneo.

Es ciertamente interesante el primer caso presentado por Levine en 1951 donde una enferma de fenotipo pp portadora de un cáncer gástrico con expresión aberrante de P, recibió una transfusión de sangre incompatible que originó una fuerte elevación de los anticuerpos anti-P en suero. Esto tuvo probablemente un efecto salvador dado que la enferma sobrevivió 22 años a la resección quirúrgica sin evidencia alguna de recidiva a pesar del alto grado de malignidad del tumor (49).

Así, los anticuerpos monoclonales le dieron posibilidades insospechadas al viejo concepto de la “bala mágica”, introducido por Paul Ehrlich premio Nobel en 1908 por la

teoría general de la inmunidad y de la tolerancia natural a lo propio. Es decir, utilizar los anticuerpos monoclonales para combatir infecciones o tumores. De esta manera, se abrió además de la aplicación diagnóstica de los anticuerpos monoclonales la aplicación terapéutica.

Una de las vías para intentar aplicar la terapia antitumoral es usar los antígenos de diferenciación celular que están presentes en algunos tumores pero también en algunas células normales como nos acabamos de referir. Esto no es tan grave si las células normales se pueden recuperar después del tratamiento.

El antígeno CD20 es una proteína transmembrana con un peso molecular de 35 kD que se encuentra en las células pre-B y en los linfocitos B maduros pero no se encuentra en los plasmocitos ni otros tejidos normales. El CD20 se expresa también en la mayoría de los linfomas no Hodgkin a células B.

Rituximab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que fue aprobado su uso por la FDA en 1994 para ser utilizado sólo en el tratamiento de los linfomas B refractarios o en recaída (50). Luego fue utilizado para inhibir o deplecionar la producción de anticuerpos como por ejemplo en la artritis reumatoide, en la anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos, púrpura trombocitopénica autoinmune o en el rechazo agudo de trasplante renal (51).

Recientemente se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal Eculizumab que inhibe la fracción C5 del complemento y se utiliza para el tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna (52).

Así, los avances en los estudios de los antígenos de diferenciación y otros de ciencia básica como fue la creación de anticuerpos monoclonales humanizados han significado nuevos tratamientos para varias enfermedades.

Para dar un dato numérico, en la actualidad, las ventas de anticuerpos monoclonales usados en terapia representan más del 20% de la venta de todos los productos biotecnológicos destinados a terapéutica.

Pero, los anticuerpos monoclonales no sólo se han utilizado para diagnóstico y tratamiento sino también para la prevención por ejemplo de la inmunización anti-RhD o para inducir tolerancia inmunológica.

La inmunoglobulina IgG anti-D policlonal

es preparada a partir del plasma de individuos inmunizados al antígeno D al cual se le realiza un proceso industrial de fraccionamiento e inactivación viral. Esta preparación acarrea dos problemas principales: uno, el de abastecimiento de la materia prima, el plasma hiperinmune, sobretudo en la Comunidad Europea (CE) donde desde hace años se han prohibido los protocolos de inmunización de sujetos sanos “voluntarios” Rh negativos para la obtención de plasma con fines de fraccionamiento. Las industrias importan plasma de América del Norte (USA y Canadá).

El segundo problema son los aspectos éticos ligados a la inmunización de sujetos sanos, teóricamente voluntarios.

Los anticuerpos monoclonales, tienen como ventaja que no necesitan como fuente plasma humano, reducen los costos de manufactura, son productos de alta pureza y no tienen riesgo de transmitir enfermedades por lo cual no necesitan procedimientos de inactivación de patógenos. Actualmente, por lo que nosotros conocemos, existen cuatro anticuerpos monoclonales anti-D recombinantes que se están utilizando en ensayos clínicos.

Un anticuerpo anti-D de estas características se ha desarrollado en Rusia (Rhesoclone) pero hasta el momento actual se desconocen los resultados sobre su efecto terapéutico y farmacocinética.

El Instituto de Inmunobiología de Berna-Suiza ha desarrollado un anticuerpo monoclonal anti-D (MonoRho). Los estudios clínicos en fase I mostraron que una dosis única de esta inmunoglobulina anti-D recombinante previene la inmunización primaria de glóbulos rojos Rh positivos (53). Comparada con la IgG anti-D policlonal, la recombinante tiene un “clearance” menor de los eritrocitos Rh positivos. No se encontraron evidencias del desarrollo de anticuerpos anti-D hasta seis meses después de la administración de la IgG recombinante para neutralizar los efectos de 15 mililitros de glóbulos Rh positivos.

Es de uso intramuscular e intravenoso. Al igual que en la policlonal la vía intramuscular es más lenta que la intravenosa en alcanzar el pico máximo de concentración en sangre (2-4 días) (54). Ninguno de los 31 individuos RhD negativos a los cuales se les inyectó MonoRho desarrollaron anticuerpos contra la IgG recombinante inyectada (55). Sin embargo, la

demora en el clearance de los eritrocitos RhD positivos puede constituirse en una limitante para su uso a gran escala.

En el Reino Unido, el Laboratorio de Referencia Internacional sobre Grupos Sanguíneos (IBGRL) de Bristol ha desarrollado dos anticuerpos anti-D monoclonales uno IgG1 y otro IgG3 (Bioproducts Laboratories). El clearance de los eritrocitos RhD positivos fue más rápido con estos anticuerpos monoclonales que con la IgG policlonal pero con hemólisis y acumulación de los eritrocitos en el hígado(56). Los dos anticuerpos monoclonales previenen la inmunización anti-D pero paradójicamente estimulan la respuesta inmune anti-D a los dos o tres meses de los estudios de clearance pues la IgG obtenida de roedores puede presentar estructuras no humanas como oligosacáridos que interaccionan con otros receptores (manosa y asialoglicoproteína) que están presentes en macrófagos, células dendríticas o células retículoendoteliales. Estas moléculas participan de la captura y remoción de organismos foráneos, activan el complemento, estimulan la fagocitosis, liberan citoquinas pro-inflamatorias y aumentan la presentación antigénica por parte de las células dendríticas. Estos eventos favorecen la iniciación de la respuesta inmune y la formación de anticuerpos contra antígenos foráneos. Las glicoformas de los anticuerpos monoclonales anti-D pueden ser reconocidas por estas moléculas lo cual explicaría la estimulación de la respuesta inmune anti-D (56).

Por último, el Laboratorio Francés de Fraccionamiento y Biotecnología (LFB) ha desarrollado un anticuerpo monoclonal recombinante. En un estudio primario en voluntarios RhD negativos mostró con el anti-D LFB que la desaparición de los eritrocitos RhD positivos es tan rápida y completa como la que se produce con la IgG anti-D policlonal (57). La preparación de un estudio clínico sobre sujetos Rh negativos está en curso con el fin de demostrar la capacidad de inmunosupresión de estos anticuerpos monoclonales anti-D.

Esta nueva generación de inmunoglobulinas anti-D monoclonales recombinantes quizá, en un futuro cercano, pueda sustituir a la inmunoglobulina policlonal en uso clínico desde el año 1968 cuando RhoGam fue aprobada por la FDA para la inmunoprofilaxis de las gestantes Rh negativas. Sin embargo, en

el momento actual existen más preguntas que respuestas.

Inducción de la tolerancia inmunológica

El sistema inmune responde frente a los estímulos antigénicos pero posee mecanismos que regulan la forma, extensión y duración de la respuesta inmune. La exploración de estos mecanismos reguladores ha sido el inicio para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades autoinmunes, alérgicas o trasplantes. Un método que ha renovado el interés del mundo científico en los últimos años es la regulación de los linfocitos T inducida por antígenos específicos. Los linfocitos T reguladores (supresores) fueron descritos por primera vez en 1971 por Gershon y Kondo (58) quienes demostraron la habilidad de estas células para transferir una tolerancia antígeno específica en animales.

En 1995, se describe el fenotipo de estos linfocitos T que expresan los antígenos CD4 y CD25 (59) y que se encuentran naturalmente presentes en la sangre periférica.

Se define como “tolerancia inmune” a la falta de respuesta inmune frente a un antígeno. Ésta es natural cuando el sistema inmune no responde frente a antígenos propios. Una falla de esta tolerancia inmunológica se traduce en una enfermedad autoinmune.

La tolerancia inducida es la que se crea por antígenos externos que han sido creados para deliberadamente manipular el sistema inmune y serviría por ejemplo para evitar el rechazo del órgano trasplantado. Tanto los linfocitos B como los T pueden ser tolerantes pero es más importante actuar sobre las células T porque las B no pueden producir anticuerpos sin la ayuda de los linfocitos T. Las células T se originan en el timo y cuando maduran expresan el receptor (TCR) lo que les permite responder frente a una variedad de antígenos.

La respuesta inmune frente a antígenos específicos se ha denominado “contacto celular dependiente” pues ella necesita del contacto físico entre las células T y las células presentadoras de antígeno (APC).

La respuesta inmune inicial requiere que el antígeno sea reconocido por el linfocito T.

La prueba de ello es el SIDA en donde se produce un gran descenso de estas células T CD4+ lo cual genera una inmunodeficiencia frente a virus, bacterias o parásitos.

Los antígenos exógenos (inhalados, ingeridos o inyectados) son captados por células presentadoras de antígenos (APC) macrófagos y células dendríticas. En el endosoma fusionado con un lisosoma el antígeno es degradado en fragmentos o péptidos los cuales son liberados hacia la superficie celular donde se unen a las moléculas clase II del complejo de histocompatibilidad (MHC). Aquí recién el antígeno puede ser reconocido por la célula T (CD4+). El receptor TCR del linfocito T se une al péptido que a su vez se encuentra unido a la molécula clase II de la APC formándose un puente entre ambas células. Esta primera señal es potenciada por moléculas de adhesión como CD2, LFA-1 y CD26. Se forma así una verdadera sinapsis entre el linfocito y la APC.

Las células T (CD4+) que se unen al antígeno son estimuladas mediante un complejo sistema de transmisión de señales desde la superficie al interior de la célula y se liberan linfoquinas que estimulan los linfocitos B. Por ello estos linfocitos T se denominan “Helper T cells” (Th) o cooperadores. Los linfocitos B se diferencian y crecen en una clona de células denominadas células plasmáticas o productoras de anticuerpos (inmunidad humoral). Pero, para activar al linfocito T helper no alcanza con la unión del receptor TCR al péptido y la molécula clase II de la APC. Se necesita una segunda señal desde la APC la cual es denominada coestimulación. Una de las más importantes moléculas coestimuladoras de las APC es la B7 que se une a la molécula CD28 del linfocito T. La unión de estas dos moléculas provee la segunda señal necesaria para la estimulación de las células T helper.

En la tolerancia inmune las células que presentan el antígeno propio no expresan la segunda señal o transmiten otra segunda señal que transforma las células T en células T regulatorias (Treg) que expresan el antígeno CD25+ y se vuelven tolerantes o suprimen la respuesta inmune. La destrucción de esta población celular en animales hace que rápidamente se desarrolle un espectro de enfermedades autoinmunes. Las Treg son abundantes en el intestino y serían las responsables de la tolerancia inmunológica frente a antígenos de los alimentos.

La administración vía oral de antígeno induce la formación de células T supresoras

(Treg) (60) e inclusive puede abolir la respuesta inmune a la subsecuente infusión del antígeno por vía parenteral (61). Sin embargo, la administración del antígeno D vía oral diariamente durante dos semanas no tuvo efecto en prevenir la respuesta inmune en voluntarios Rh negativos no inmunizados (62).

Tolerancia inmunológica al antígeno D del sistema Rh

Dos genes compuestos por 10 exones cada uno, el RHD y el RHCE, dan origen a dos proteínas la RhD que contiene el antígeno D (Rh1) y la RhCE que contiene los antígenos C, c, E, e (Rh2 a Rh5). Ambas proteínas están compuestas por 417 aminoácidos con un modelo estructural de 6 ondas extracelulares, 12 transmembrana y 7 segmentos intracelulares (63). Las proteínas RhD y RhCE difieren entre sí por 34 a 37 aminoácidos.

Pero, las proteínas que contienen los antígenos Rh se expresan en la superficie del eritrocito solamente si existe una glicoproteína asociada (RhAG) que es producida por el gen RHAG.

La asociación entre las proteínas Rh y la glicoproteína asociada es denominada “complejo Rh” (64). La RhAG es una glicoproteína de la membrana del eritrocito que permite el transporte de agua y fue denominada aquaporin-1 por Peter Agre su descubridor quien recibe el premio Nobel 2003 por dicho descubrimiento.

En el feto, los antígenos Rh están presentes en la membrana del glóbulo rojo a partir de las seis semanas desde la concepción (65). El antígeno RhD es altamente inmunogénico. Epitopes (fragmentos) de la proteína RhD inducen la proliferación in vitro de células T Helper (Th) obtenidas de donantes aloinmunizados (66), en particular los péptidos Rh 52-66, RhD 97-111, RhD 117-131 y RhD 177-191.

La pregunta es si estos péptidos administrados por una vía que induzca tolerancia inmunológica pueden prevenir la respuesta inmune in vivo frente a la proteína RhD completa. Para responder a ella, Stanislaw Urbaniak de la Universidad de Aberdeen en Escocia ha desarrollado un “modelo animal humanizado”. La expresión del alelo HLA-DRB1-1501 está muy aumentada en los individuos Rh negativos que responden al antígeno D. Un modelo animal con un ratón transgénico

HLA-DR15 fue seleccionado para este estudio previendo que la proteína RhD humana puede generar una respuesta inmune en este modelo (67). Luego, cada uno de los péptidos dominantes fueron testeados para determinar si producían inmunotolerancia cuando se administraban por la mucosa nasal.

En primer lugar, 100 microlitos de una solución de 2mcg/ml de proteína RhD fueron inyectados subcutáneos y dos semanas después intraperitoneal en ratones transgénicos HLA-DR15 y en ratones no transgénicos para ver si desarrollaban anticuerpos anti-D, los cuales, fueron medidos por un método enzimático y por inmunoprecipitación en gel (Diamed) que es la técnica que nosotros utilizamos para detectar anticuerpos durante la gestación. La estimulación de las células Th se demostró por la habilidad de los esplenocitos de los ratones inmunizados para proliferar in vitro en respuesta a la administración de la proteína RhD purificada. Los anticuerpos anti-D que se unen a glóbulos rojos humanos RhD positivos fueron detectados solo en ratones transgénicos al igual que la proliferación de los esplenocitos (67).

En segundo lugar, una vez demostrada la respuesta inmune frente a la proteína RhD del modelo animal humanizado, se administró una dosis única de 50 microlitros de una solución de 2 mcg/ml de cada péptido dominante por vía nasal 15 días antes de la administración de la proteína RhD. La respuesta inmune (producción de anticuerpos anti-D y proliferación de esplenocitos) fue abolida en los ratones transgénicos HLA-DR15.

Dos péptidos el RhD52-66 y el RhD 117-131 fueron los más efectivos en producir tolerancia inmunológica frente a la proteína RhD. La administración de péptidos no dominantes (RhD 302-316) no produjo supresión de la respuesta inmune por lo cual la tolerancia es específica para péptidos dominantes de la proteína RhD (64).

El mecanismo de la supresión activa de la inmunización anti-D difiere al de la administración pasiva de inmunoglobulina anti-D.

La IgG anti-D es un hemoderivado que depende para su producción de donantes humanos RhD negativos inmunizados, tiene un costo de manufactura con procedimientos de inactivación de patógenos, es necesario mantener un stock y produce inmunidad pasi-

va que tiene un efecto temporal por lo cual debe administrarse en cada acto inmunizante y no suprime la respuesta inmune una vez que se ha producido.

Por el contrario, la tolerancia inducida por péptidos no es un producto humano, produce tolerancia inmunológica de forma activa, revierte la respuesta inmune en individuos inmunizados y puede realizarse antes o después de la respuesta inmune por transfusión o embarazo. Es crucial para inducir tolerancia la oportunidad y la ruta de administración de los péptidos dominantes.

Los mecanismos propuestos para la inducción de la tolerancia serían: 1- los péptidos dominantes producirían una falla en la expresión de las moléculas co-estimuladoras (señal 2) B7-CD28, 2- las células T reconocen antígenos específicos que llevan a la apoptosis y no a la estimulación de las células inmunocompetentes, 3- se liberarían linfoquinas inhibidoras IL-10 y TGF-Beta (Transforming Growth Factor Beta) y por último 4 – se produciría la generación de células Treg CD4+/CD25+.

En 1990 se produce otro gran adelanto en la inmunohematología cuando Lapierre y colaboradores describen el método de inmunoprecipitación en gel en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Lyon-Francia (68). En nuestro país este método diagnóstico es utilizado por Victor Silvera a partir del año 1995 en el Laboratorio de Referencia en Inmunohematología del Servicio Nacional de Sangre y a partir de 1996 en la Asociación Española. Actualmente es un método que se utiliza en los servicios de Medicina Transfusional para determinar los sistemas de grupos sanguíneos y/o anticuerpos naturales o inmunes en gestantes, recién nacidos o pacientes además de las pruebas de compatibilidad pretransfusionales.

Es una microtécnica que permite una macrolectura, con reactivos ya incorporados lo cual disminuye el error técnico, con lector automático en un sistema computarizado que transcribe directamente los resultados evitando el error administrativo. El método tiene una mayor sensibilidad que la tradicional técnica en tubo o en lámina de vidrio.

Utilizando esta técnica de inmunoprecipitación en gel, mediante la prueba de Coombs indirecta con Liss y paneles de eritrocitos con fenotipo conocido, realizamos un estudio

de seguimiento inmunohematológico durante cinco años (2001-2005) en 14.860 gestantes que concurren para control de su embarazo a los servicios asistenciales del Banco de Previsión Social. Los resultados fueron presentados en el XXXI World Congress of the International Society of Hematology (ISH) 2007 que se realizó por primera vez en nuestro país en el mes de marzo en Punta del Este (69). Encontramos que 157 (1,05%) de las gestantes estudiadas presentaban anticuerpos anti-eritrocitarios de los cuales 153 eran aloanticuerpos y 4 autoanticuerpos. De los 153 aloanticuerpos 84 (55%) fueron hallados en gestantes RhD positivas mientras que 69 (45%) en RhD negativas. Dentro de las RhD negativas 55 (80%) presentaban un anticuerpo anti-D. De todos los anticuerpos hallados 104 (0,7%) podrían producir EHP.

Hasta ese momento sólo algunos servicios de Hemoterapia realizaban rutinariamente a todas las gestantes la investigación de anticuerpos inmunes. La mayoría sólo estudiaba a las embarazadas RhD negativas. Dado que los resultados del estudio mostraban una prevalencia mayor de anticuerpos inmunes en gestantes RhD positivas y el 20% de las RhD negativas tenían un anticuerpo diferente al anti-D sumado a la aparición de casos clínicos (37) producidos por estos anticuerpos, se propuso realizar un Consenso Nacional sobre la Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la EHP con un nuevo esquema de monitoreo inmunohematológico de la gestación (70).

Más del 90% de los aloanticuerpos hallados, diferentes al D, pertenecían al sistema Rh (C,E,c,e) y Kell para los cuales no existe hasta el momento inmunoprofilaxis. La única prevención es disminuir las transfusiones de eritrocitos en mujeres en edad reproductiva activa y de realizarlas, hacer el fenotipo de los sistemas Rh y Kell.

En un estudio reciente, realizado en Holanda, donde aplican la determinación de anticuerpos inmunes a todas las gestantes en la primera consulta desde el año 1998, la prevalencia de los aloanticuerpos fue de 1,2 % y de 0,4% los que podían producir EHP. Dentro de los anticuerpos diferentes al anti-D los más frecuentes fueron el RhE, anti-Kell y Rhc. La presencia de múltiples anticuerpos se encontró en 14% de los casos (71).

No se separaron las poblaciones en RhD

positivas y RhD negativas como en nuestro estudio.

Por primera vez también, organizamos un curso internacional sobre Inmunohematología en el XXXI World Congress of the International Society of Hematology (ISH) que se realizó en Punta del Este en marzo de 2007 donde se desarrollaron temas como Tipificación extendida eritrocitaria en los donantes de sangre, Aloinmunización en la gestación, Inmunohematología plaquetaria, Reporte del Laboratorio de referencia en Inmunohematología del Servicio Nacional de Sangre, Hemólisis intravascular y la discusión de casos clínicos. Contamos con el invaluable aporte de Marcela Contreras de Chile, que estuvo trabajando durante muchos años en Londres siendo directora del North Blood Bank y co-autora del libro de Molissov "Blood Transfusión in Clinical Medicine".

El siglo XX marcó el nacimiento de la inmunohematología, primero a través del uso de anticuerpos policlonales obtenidos de animales o individuos inmunizados. Con el descubrimiento de la prueba de Coombs se comenzaron a diagnosticar una avalancha de anticuerpos incompletos en sujetos transfundidos o gestantes que constituyen mucho de los actuales sistemas de grupo sanguíneo. Casi de manera simultánea se determinó la genética, la inmunquímica y la diferente expresión según las razas. Se descubrieron las sustancias de los grupo sanguíneo y se conoció la fisiopatología de la enfermedad hemolítica perinatal. Luego, con el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas se pudieron caracterizar otras sustancias de grupo sanguíneo así como sus variantes y las proteínas de diferenciación celular.

El inicio del nuevo milenio muestra el desarrollo de la biología molecular, la terapia génica y la biotecnología en la Medicina Transfusional. La biología molecular principalmente en la inmunohematología y el diagnóstico de las enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión. La terapia génica para el tratamiento de enfermedades hereditarias como la hemofilia y la biotecnología para el desarrollo de factores recombinantes para el tratamiento de numerosas enfermedades hematológicas.

En 1953, James Dewey Watson biólogo y zoólogo estadounidense y Francis Crick biofí-

sico británico trabajaron juntos en la Universidad de Cambridge (1951-1953) y postularon la estructura de doble hélice del ADN basados en los trabajos de otro biofísico británico Maurice Wilkins recibiendo los tres el premio Nobel en 1962.

En 1968 Watson fue nombrado director del Laboratorio de Biología Cuantitativa de Cold Spring Harbor en New York. Escribió la historia del descubrimiento de la estructura del ADN (The Double Helix, 1968) y participó del proyecto Genoma Humano en los Institutos Nacionales de Salud. Cincuenta años después, en el 2003, un consorcio internacional formado por científicos de seis países, logró descifrar la secuencia completa del genoma humano o "libro de la vida" lo que abre innumerables puertas para el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades.

El proyecto genoma humano se había iniciado en 1990. Se calculó que se necesitarían varios millones de dólares y que culminaría en el 2005. Previamente, en 1988 se creó la Organización del Genoma Humano (HUGO).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue concebida por Kary Banks Mullis, doctorado en bioquímica en la Universidad de Berkeley, California (USA). Fue desarrollada por el mismo Mullis y su grupo de colaboradores dentro de Cetus Corporation y publicada por primera vez en 1987 (72). Mullis descubrió que es posible realizar la amplificación in vitro de un fragmento del ADN extraído de distintas muestras utilizando una enzima denominada ADN polimerasa en condiciones de temperatura, pH y concentración iónica adecuadas mediante un proceso cíclico que permite la amplificación exponencial de dicho fragmento de ADN. Las polimerasas fueron extraídas de microorganismos termofílicos por ello inicialmente la polimerasa se denominó Taq procedente de *Thermus aquaticus*. Por el descubrimiento de la PCR recibió el premio Nobel de Química en 1993 compartido con el canadiense Michael Smith.

La PCR convirtió en una rutina la investigación de la secuencia genética, permitiendo la lectura completa del genoma humano así como, la identificación del origen de las muestras de sangre, saliva o cabello a las que recurre masivamente por ejemplo, la ciencia forense. Proporcionó una herramienta de trabajo muy poderosa para áreas tan

diversas como la arqueología, biotecnología, microbiología, el diagnóstico de enfermedades genéticas, de infecciones bacterianas o virales, de paternidad, etc. El continuo desarrollo de las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico clínico está orientado a mejorar la sensibilidad y especificidad, al disminuir los coeficientes de variación intra e inter ensayo, los falsos positivos y lograr la estandarización y automatización.

Una de las primeras aplicaciones en la Medicina Transfusional fue su utilización para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas transmisibles por la sangre con el fin de disminuir los falsos positivos de las pruebas de tamizaje (mayor especificidad) y sobre todo aumentar la sensibilidad evitando los falsos negativos. De esta manera se ha disminuido considerablemente el período de ventana inmunológica que se produce cuando se determinan serológicamente los anticuerpos frente a un germen patógeno. Los Test de Ácidos Nucleicos (NAT, sigla en inglés) se comenzaron a aplicar con este fin a los donantes de sangre a partir de 1999 en USA, primero para el HIV y luego para Hepatitis C. Para reducir costos se trabaja primariamente con “mini-pooles” de muestras sanguíneas.

En tres años (marzo de 1999 a abril del 2002) un total de entre 37 a 40 millones de unidades de sangre fueron analizadas con NAT en mezclas de 16 a 24 muestras de donantes de sangre en USA y se encontraron 12 NAT positivas para HIV que eran no reactivas para el estudio de anticuerpos y 139 NAT positivas para HCV también negativas en el estudio de anticuerpos de tercera generación. Este trabajo, publicado el 19 de agosto del 2004 en el New England Journal of Medicine (73), muestra que 1 de 3,1 millones de donaciones estudiadas fue confirmada como positiva para HIV por NAT y negativas con el estudio de anticuerpos y 1 de 230.000 para HCV. No hubo diferencias significativas en la reactividad de las dos marcas de NAT utilizadas. A su vez de las 12 muestras HIV positivas por NAT dos fueron reactivas con la determinación del antígeno p24. Cuarenta y cinco muestras HCV NAT positivas tenían la enzima alaninotransferasa (ALT) elevada. El estudio no compara las nuestras HCV NAT positivas con la reactividad al antígeno core del HCV.

Por último, 6 millones de unidades de

sangre fueron analizadas por NAT para el virus NO desde junio a diciembre del 2003 en USA, encontrándose 818 reactivas las cuales fueron separadas del stock. Sin embargo, seis casos de transmisión del virus NO asociada a transfusión no fueron detectados por NAT en mezclas de 6 a 16 muestras (74).

Si bien con la aplicación de los test de ácidos nucleicos (NAT) al tamizaje de la sangre donada se ha disminuido a niveles casi excepcionales la transmisión del VIH por transfusión de hemocomponentes, ésta todavía existe. Recientemente se han publicado trabajos de transmisión del VIH por transfusión de sangre con estudios previos NAT no reactivos (75)(76).

En nuestro país aún no se ha implementado la PCR rutinariamente para el diagnóstico de agentes infecciosos en los donantes de sangre. Se utiliza como prueba confirmatoria o para el seguimiento del tratamiento de pacientes con infección por VIH o hepatitis C.

Otra aplicación del desarrollo de la biología molecular a la Medicina Transfusional es la determinación del genotipo fetal, por métodos no invasivos, principalmente para los sistemas Rh y Kell con el fin de determinar, por un lado, la posibilidad cierta de que se produzca EHP en las gestantes aloinmunizadas a estos sistemas de grupo sanguíneo y por otro, cuando el feto es RhD negativo en gestantes no aloinmunizadas evitar la inmunoprofilaxis antenatal. También la determinación de los HPA prenatal sería de utilidad para el diagnóstico de la trombocitopenia neonatal aloinmune (TNAI).

Lo y colaboradores, en 1997, fueron los primeros en demostrar que la determinación del antígeno RhD era posible a partir del ADN de las células fetales presentes en el plasma materno (77) (78).

El término quimera proviene de la mitología griega y definía a un animal con cabeza de león, cuerpo de cabra y cola de serpiente o dragón. Científicamente, el término quimerismo se refiere a la presencia de más de una línea celular genéticamente distinta en un único individuo como ocurre por ejemplo, en el trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas. El microquimerismo se define como la presencia de una población de células alogénicas menor del 5% lo cual puede ocurrir por: una transfusión materno-

fetal o feto materna, entre mellizos, por trasplantes o asociada a la transfusión de hemocomponentes (MAT). La primera observación de microquimerismo se realizó en el año 1945 en gestaciones gemelares del ganado bovino que generalmente comparten la circulación placentaria. Se conocía ya el hecho que un gemelar femenino que compartía el útero del animal con otro gemelar de sexo masculino presentaba anomalías en sus órganos reproductivos debido a la exposición del útero a hormonas masculinas. Estos gemelos tienen una concordancia completa a pesar de que en el ganado bovino son excepcionales los gemelos monocigotos. El genetista Ray Owen fue el primero en deducir que la concordancia de los grupos sanguíneos en estos animales se debía a que compartían células progenitoras hematopoyéticas en estado embrionario a través de anastomosis vasculares en la circulación placentaria (79).

En 1969, Mohr y colaboradores (80), reportan que seis pacientes que no reaccionaban a la tuberculina sí lo hacían cuando recibían transfusiones de sangre de individuos respondedores. Se postuló que los leucocitos del donante podrían ser los causantes de esta observación primaria aunque no se demostró.

Entre 1971 y 1973 Turner y Hutchinson revelan mediante estudios de cariotipo que las transfusiones materno-fetales en neonatos de sexo masculino, resulta en la persistencia de los leucocitos maternos por más de dos años en la circulación del hijo (81) (82).

Siguiendo la misma técnica, Schechter y colaboradores demostraron en 1977 que los leucocitos del donante permanecían en el receptor hasta 7 días después de la transfusión (83). Las técnicas de biología molecular han permitido avanzar en el estudio de MAT.

Aunque la PCR y otras técnicas de detección de ácidos nucleicos (NAT) tienen una extraordinaria sensibilidad, la detección de una mínima población celular (la del donante) con similares características a otra que está presente en grandes proporciones (la del receptor) ha supuesto un problema técnico para el estudio de MAT, lo que se ha resuelto con el desarrollo de diferentes estrategias de amplificación molecular.

Los primeros estudios de MAT aplicando biología molecular aparecieron en la década de 1990. En 1999, Lee y colaboradores

demostraron, mediante biología molecular, la persistencia de los leucocitos del receptor, durante más de seis meses, en pacientes que habían recibido traumatismos graves con riesgo vital y que habían sido transfundidos en comparación con aquellos pacientes transfundidos por otra patología (84). En un estudio prospectivo posterior, ya en el 2004, realizado exclusivamente en pacientes con traumatismos graves que precisaron transfusión, objetivaron la persistencia de MAT por más de dos años de la transfusión. Ese MAT implicaba por lo general las células de un único donante (85). Se observó además que la cifra de leucocitos del donante en el receptor se incrementaba con el tiempo cuando las sangres involucradas tenían menos de 14 días de extraídas y eran transfundidas dentro de las 48 horas posteriores al episodio hemorrágico con riesgo vital. En un trabajo publicado en el 2006, se determina que la leucoreducción por filtración no parece ser efectiva para prevenir el MAT (86). En agosto del 2008, un trabajo publicado por el mismo grupo de Utter y colaboradores (87) confirma la presencia de MAT décadas después del episodio transfusional por heridas de guerra en excombatientes de la segunda guerra mundial, Corea y Vietnam quizás influenciado por la inmunosupresión y/o inmunomodulación que se produce en el trauma agudo. No sabemos hasta el momento actual si el MAT en receptores inmunocompetentes es un fenómeno inocuo o puede tener relación con el desarrollo de posteriores enfermedades como injerto versus huésped, autoinmunes o tumorales (88). De forma interesante no se desarrolla MAT en pacientes inmunocomprometidos que reciben transfusión como es el caso de los pacientes infectados con HIV (89). De lo que no cabe duda es que el conocimiento de esta entidad influirá en la práctica transfusional. Las únicas medidas para evitar el MAT en el momento actual son la irradiación gamma de los hemocomponentes o los métodos de inactivación viral con psoralenos o riboflavina seguidos de irradiación ultravioleta.

También cuando no se puede establecer una compatibilidad serológica entre donante y receptor como prueba pretransfusional, generalmente producida por variantes antigénicas, se necesita de la biología molecular, con una prueba de ADN para seleccionar los donantes

de eritrocitos adecuados. Las técnicas diagnósticas de biología molecular se usan actualmente también para determinar los antígenos plaquetarios y leucocitarios específicos.

Antígenos Plaquetarios

Las plaquetas poseen en su membrana celular antígenos HLA-clase I así como algunos antígenos eritrocitarios (ABO, Lewis, I-i y P). Sin embargo, existen otros antígenos que se encuentran solamente en la membrana plaquetaria pero no en otras células de la sangre periférica denominándose por tal razón “específicos”.

Los aloantígenos plaquetarios específicos se definen como todas las proteínas aloantigénicas que se expresan en la membrana plaquetaria a excepción de aquellas codificadas por genes del sistema mayor de histocompatibilidad. Un aloantígeno es un antígeno presente en una parte de los individuos de una población, definidos o detectados por un suero humano inmune, pero ausente en el resto de la población.

Si bien el primer antígeno plaquetario específico fue descubierto en 1959, la primera nomenclatura aceptada para uso universal fue adoptada en 1990 por la International Society of Blood Transfusión (ISBT) y el International Committee for Standardization in Hematology (90). Los sistemas de antígenos plaquetarios específicos descritos hasta ese momento fueron denominados Human Platelet Antigen (HPA). Los sistemas fueron numerados en orden de acuerdo a la fecha de su publicación y los antígenos de cada sistema designados con letras del alfabeto de acuerdo a su frecuencia en la población.

Con la aplicación de técnicas de biología molecular una nueva nomenclatura ha sido propuesta en el año 2003 (91). Actualmente un aloantígeno plaquetario específico es denominado HPA cuando su base molecular ha sido definida. Para ello, se ha creado recientemente The Platelet Nomenclature Committee (PNC) a través de la colaboración internacional del ISBT Platelet Working Party y el International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Scientific Committee on Platelet Immunology. Este comité guardián de la nomenclatura HPA, recibe los trabajos de nuevos descubrimientos y a través de los laboratorios de referencia en serología,

bioquímica y biología molecular asociados realiza la captación del nuevo aloantígeno. Cuando el aloantígeno ha sido definido sólo serológicamente se le denomina por las dos o tres primeras letras del nombre del paciente donde se encontró por primera vez el aloanticuerpo. Esta abreviatura es seguida de la letra a o b dependiendo si el suero inmune determina la presencia del antígeno correspondiente en más o menos de 50% de los individuos de la población respectivamente.

El primer antígeno plaquetario específico fue descubierto por van Loghem y colaboradores en 1959 (92) cuando un suero aglutinaba algunas muestras de plaquetas pero no otras. Este antígeno fue denominado inicialmente Zw^a y luego su alelo Zw^b fue reconocido en 1963 (93). Este sistema se denomina a partir de 1990 como HPA-1. El antígeno HPA-1^a tiene una prevalencia del 98% en la población y el HPA-1b del 27%. Un anticuerpo anti- HPA-1^a fue descrito por primera vez por Shulman y colaboradores en 1961 (94). Los antígenos de este sistema se encuentran localizados sobre la glicoproteína IIIa (CD61) de la membrana plaquetaria que es a su vez el receptor del fibrinógeno. En los pacientes con trombostenia de Glanzmann tipo I, que carecen de este receptor, se producen alteraciones de la agregación plaquetaria y no se expresan los antígenos HPA-1 por lo cual estos pacientes se dice son $Zw(HPA-1)$ nulos (95).

El segundo sistema plaquetario bi-alélico, denominado inicialmente Ko y luego HPA-2 fue descubierto por van der Weerd en 1962 (96) y se encuentra sobre la GPIb alfa (CD42b).

El tercer sistema Bak o HPA-3 fue descrito por primera vez por von dem Borne en 1980 (97) y se encuentra situado en la GPIIb (CD41). Otro sistema bi-alélico fue descrito entre 1985 y 1986 (98)(99) Pen-Yuk o HPA-4 situado en la GPIIIa (CD 61) al igual que el HPA-1. El sistema HPA-5 fue descubierto por Kiefel en 1988 (100) y se aloja en la GPIb (CD49b). El HPA-15, el sexto sistema bi-alélico o Gov, corresponde al antígeno de diferenciación celular CD109.

Hasta el 2003, 24 aloantígenos plaquetarios específicos fueron definidos serológicamente, de los cuales doce se integraron en seis sistemas bi-alélicos como acabamos de ver. En los otros doce el antígeno opuesto no ha sido iden-

tificado. Se ha definido la base molecular de 22 de los 24 antígenos definidos serológicamente.

La detección de anticuerpos dirigidos contra los antígenos plaquetarios específicos (HPA) tienen significancia clínica en el diagnóstico y tratamiento de la trombocitopenia aloinmune neonatal (NAIT), el púrpura pos-transfusional y la refractariedad plaquetaria de causa inmune. Pearson y colaboradores caracterizaron la NAIT en 1964 (101). El mecanismo fisiopatológico se considera similar a la EHP por anti-D. Los aloanticuerpos maternos anti-HPA se unen a las plaquetas y los macrófagos del sistema retículo endotelial que tienen receptores Fc de la inmunoglobulina G las fagocitan principalmente en el bazo.

El macrófago reconoce el Fc de la inmunoglobulina y fagocita la célula que tiene adherida ya sea un eritrocito en la EHP o una plaqueta en la NAIT. Sin embargo, existen algunas diferencias entre ambas patologías. La NAIT se presenta clínicamente en la primera gestación en el 42% de los casos y en recién nacidos sanos que a las pocas horas de vida desarrollan una trombocitopenia con o sin síndrome hemorrágico cutáneo pero con riesgo de desarrollar hemorragia intracranéa entre el 7 y 22% de los casos. El 10% de las hemorragias intracranéas ocurren en el útero (102). El antígeno HPA-1^a es responsable aproximadamente del 80% de los casos de NAIT (103). Sin embargo, en un estudio reciente realizado sobre 9332 recién nacidos en Brasil el anticuerpo más frecuente de NAIT fue el anti-HPA-5 (104). Los anticuerpos responsables son todavía indetectables en un número significativo de casos. Recientemente, en algunas mujeres que habían tenido NAIT sin diagnóstico serológico evidente, el estudio retrospectivo de estas muestras han detectado anticuerpos contra el sistema Gov descrito por Kelton y colaboradores en 1990 (105).

Los antígenos del sistema ABO se expresan débilmente en las plaquetas del recién nacido pero, en algunos sujetos normales se expresan totalmente (Type II high expressers). Pueden ser causa de NAIT cuando la madre posee un alto título de anti-A o anti-B y el recién nacido es "high expressers" (106).

Una nueva estrategia no invasiva para determinar la presencia de los antígenos HPA a partir de ADN de las células fetales presentes en el plasma materno, similarmente a la

detección de los antígenos eritrocitarios, se encuentra en fase de estandarización.

Recientemente, hemos hecho una revisión sobre el diagnóstico y tratamiento de las trombocitopenias inmunes neonatales (107).

En 1952, se realizaron los primeros reportes de que algunos pacientes que recibían transfusiones de plaquetas a repetición tenían una sobrevida plaquetaria abreviada probablemente por la presencia de anticuerpos (108)(109). En 1976, se demuestra que la gran mayoría de los pacientes con refractariedad plaquetaria inmune presentan anticuerpos anti-HLA clase I (110). En 1987, se observa que el 19% de los pacientes que reciben plaquetas HLA compatibles desarrollan refractariedad por lo cual se sugiere la presencia de aloanticuerpos anti-antígenos plaquetarios específicos (111). La presencia de estos anticuerpos fue demostrada en pacientes refractarios en 1989 (112). En Uruguay, la incidencia clínica de refractariedad plaquetaria inmune es excepcional. No se realizan rutinariamente la búsqueda de anticuerpos HPA ni pruebas cruzadas pretransfusionales.

El púrpura postransfusional es una trombocitopenia severa que ocurre aproximadamente una semana después de la transfusión al igual que la reacción hemolítica retardada (RHR) para los eritrocitos. El primer ejemplo fue documentado en 1959 en un paciente que tenía un anticuerpo plaquetario anti-Zw^a (HPA-1^a) (92). En más de 200 casos documentados en 1991 por Shulman (113) solamente cinco eran hombres que habían recibido transfusiones de plaquetas varios años atrás. El resto eran mujeres que se habían inmunizado por gestaciones previas. En suma, el mecanismo fisiopatológico es similar a la RHR donde existe un antecedente inmunizante (transfusión o embarazo), luego ocurre un período de años donde la concentración del anticuerpo decae e inclusive es indetectable por las pruebas de diagnóstico habituales. Al recibir un segundo estímulo antigénico, se produce una respuesta inmune anamnésica con una rápida elevación de los anticuerpos en sangre mientras aún circulan los eritrocitos o las plaquetas transfundidas produciéndose una rápida destrucción celular de causa inmune. El tratamiento es con corticoides, plasmaféresis y/o inmunoglobulina intravenosa a altas dosis según la gravedad del cuadro clínico.

Antígenos granulocitarios específicos

Los primeros antígenos fueron identificados por Lalezari y Bernard en 1966 (114). Los antígenos NA1 y NA2 están presentes en las glucoproteínas FcRIIIb o moléculas receptoras de IgGFc. Las células que carecen de FcRIII no tienen antígenos NA (NA nulos). En la leucemia mieloide crónica y en los prematuros también se advierte una depresión de los antígenos NA. Las glucoproteínas FcRIII transportan otros antígenos granulocitarios específicos como los LAN y SH. Los antígenos NB1 no se vinculan con FcRIII.

La tipificación antigénica NA1, NA2 y SH puede realizarse en el ADN genómico por PCR (115). Los anticuerpos anti-NA1 y anti-NA2 son los más frecuentes. La presencia de aloanticuerpos anti-granulocitarios o anti-HLA, producidos generalmente por transfusiones o gestaciones, tanto en el donante como en el receptor, es responsable de varias reacciones transfusionales agudas como la neutropenia neonatal aloinmune, las reacciones febriles no hemolíticas (RFNH) y las reacciones pulmonares.

La posibilidad de que anticuerpos anti-leucocitarios fueran la causa de algunas de estas reacciones transfusionales se descubrió hace más de 50 años cuando se encontraron leucoaglutininas en el suero de pacientes que desarrollaban reacciones febriles a la transfusión. Pero, si estos pacientes eran transfundidos sin el "buffy coat" no presentaban reacciones adversas (116). Los anticuerpos en el receptor se unen a los leucocitos transfundidos y este complejo antígeno anticuerpo estimula en los monocitos la liberación de citoquinas con propiedades pirogénicas (117).

Una reacción pulmonar severa originalmente llamada edema pulmonar no cardiogénico o síndrome de distress respiratorio agudo ha sido asociada a la presencia de anticuerpos anti-leucocitarios en el plasma del donante. Las primeras descripciones clínicas de este síndrome fueron realizadas en el año 1951 por Barnard (118) y en 1957 por Brittingham (116).

En Uruguay, en 1982 junto con Humberto Correa publicamos en la Revista Argentina de Transfusión (119), el primer caso de síndrome respiratorio agudo del adulto posterior a la infusión de crioprecipitados en un paciente de 26 años, hemofílico severo del tipo A, que se atendía en el Hospital de Clínicas.

Un año después, en 1983, Popovsky y colaboradores (120) denominan al cuadro clínico y paraclínico como TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury) denominación que se mantiene hasta el momento actual.

En los años siguientes, numerosos trabajos demuestran la incidencia de TRALI con la mayoría de los hemocomponentes a excepción del pool de plasma tratado con solvente detergente dado que, al ser una mezcla de una gran cantidad de unidades de plasma, la concentración de los anticuerpos HLA, anti-leucocitarios específicos o antimonocitos se diluyen a niveles no significativos (121).

Por el contrario, en los pacientes hemofílicos tratados con concentrados de factores de la coagulación comerciales no se observa esta complicación pulmonar al igual que en otras patologías tratadas con hemoderivados pero con la excepción de la inmunoglobulina G intravenosa (122). Actualmente, el TRALI es la principal causa de muerte relacionada a la transfusión de hemocomponentes según reporta la FDA (123). Por ello, la mayoría de los centros de donación de sangre de USA e Inglaterra no utilizan el plasma de mujeres multíparas para transfusión por el riesgo de TRALI pero, lo usan para fraccionamiento industrial y la preparación de hemoderivados.

Good by agglutination?

El método clásico para definir antígenos y anticuerpos de los sistemas de grupos sanguíneos humanos es la hemaglutinación. Esta técnica es utilizada desde hace más de 100 años en la medicina transfusional. A partir del nuevo milenio, se ha desarrollado la biología molecular para la caracterización de los genes y la determinación de las bases moleculares de antígenos y fenotipos de grupo sanguíneo. Mediante el uso de PCR para amplificar las partes de ADN se pueden determinar los alelos que codifican los grupos sanguíneos.

Hasta el año 2002, se habían determinado los genes que codificaban 27 sistemas de grupo sanguíneo (124). Los detalles de estos alelos que han sido encontrados se pueden hallar en la base de datos www.bioc.aecom.yu.edu/bgmmt/index.htm. La determinación de los grupos sanguíneos por análisis del ADN tiene varias aplicaciones técnicas.

Ciertas condiciones médicas como anemia falciforme, talasemia, anemias hemolíticas

autoinmunes y anemias por aplasia medular requieren frecuentemente transfusiones eritrocitarias de forma crónica. En estas situaciones o cuando el paciente recibe una transfusión masiva, la presencia de eritrocitos del donante en la sangre del receptor puede dificultar la determinación del fenotipo de los glóbulos rojos por la técnica de aglutinación. Se ha demostrado que los ensayos con PCR no detectan el microquimerismo postransfusional y la determinación del grupo sanguíneo se puede realizar correctamente a través del ADN de la muestra de sangre obtenida en pacientes que reciben transfusiones crónicas o masivas (125). Similarmente, en aquellos que presentan una prueba de Coombs directa positiva se puede validar el grupo sanguíneo por el estudio del ADN mientras que la aglutinación necesita de técnicas de variada complejidad para remover las inmunoglobulinas unidas a los eritrocitos (126). En los donantes de sangre, el análisis del ADN se puede usar tanto para compatibilidad transfusional como para obtener eritrocitos para paneles de identificación de anticuerpos. También para determinar las variantes antigénicas de los sistemas de grupo sanguíneo y para el diagnóstico de grupos sanguíneos raros. En el seguimiento inmunohematológico de la gestación la determinación del antígeno RhD por aglutinación no indica zigocidad y los títulos del anticuerpo no son indicadores de afectación fetal. Mediante el estudio del ADN fetal en el suero materno se puede determinar la presencia o no del antígeno en el feto lo cual, como ya vimos, tiene dos consecuencias inmediatas: una en la gestante aloimmunizada para saber si el feto posee el antígeno correspondiente lo cual determina si el embarazo debe ser controlado como de alto riesgo o no y otra, en las gestantes RhD negativas si se determina que el feto es RhD negativo, como sucede en el 33% de los casos, no es necesario la inmunoprofilaxis antenatal. También se puede utilizar para determinar si el padre es hetero u homocigoto y para establecer paternidad en casos dudosos. El análisis de ADN fetal se puede realizar en aquellos sistemas de grupos sanguíneos donde la base molecular es conocida.

El análisis del ADN es también de utilidad para aclarar las discrepancias en el sistema ABO que se pueden producir por las técnicas

de aglutinación y especialmente para distinguir los fenotipos adquiridos de los heredados (127).

El conocimiento de las bases moleculares de los polimorfismos de los grupos sanguíneos (single nucleotide polymorphism, SNP), ha sido usado para desarrollar sistemas automatizados para demostrar la presencia de antígenos celulares y para la detección e identificación de anticuerpos..

Así, el "BLOODchip" permite determinar en un test más de 60 fenotipos de 9 sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios abarcando las variantes más representativas en los distintos grupos étnicos. Esta técnica se validó en un estudio multicéntrico europeo (128).

El chip de ADN facilita el suministro de hemocomponentes compatibles con el receptor evitando o reduciendo la aloimmunización frente a los antígenos de grupo sanguíneo. Se estima que la misma se puede evitar en el 80 y 90% de los casos (129).

Próximamente el Bloodchip permitirá la tipificación de antígenos plaquetarios en el mismo test aportando soluciones a la trombocitopenia neonatal aloimmune o a la refractariedad plaquetaria.

El chip de ADN minimiza los costos asociados a la repetición de los tests ya que ha de realizarse una sola vez en la vida tanto en el donante como en el receptor. Por ello, probablemente la compatibilidad transfusional en unos años se realice rutinariamente en una computadora y adiós aglutinación.

En un trabajo reciente, publicado para conmemorar el 50 aniversario de la revista Transfusion de la American Association of Blood Bank (AABB), George Garraty realiza una revisión de los avances logrados desde 1960 hasta 2009 en la inmunohematología y más precisamente en la reacción antígeno-anticuerpo (130).

La primera determinación de la vida media eritrocitaria medida con Cromo⁵¹ a principios de la década de 1950 sirvió de base para el estudio de la hemólisis producida por la reacción antígeno-anticuerpo (131).

El término inmunoglobulina comenzó a ser usado a mediados de la década de 1960.

En 1959 Porter publica la estructura de la molécula de IgG (132). Luego, en la década de 1970 se describen las distintas clases de Ig, las subclases así como las diferentes funcio-

nes de la estructura de la molécula (fracción Fc, pasaje placentario, unión al complemento, etc.) (133) (134).

A finales de 1960 y principios de 1970 se demuestra que los macrófagos y monocitos tienen receptores específicos para las moléculas de IgG, IgA y del sistema complemento (135)(136). En 1957 Dacie y colaboradores demuestran que fracciones del complemento pueden ser detectadas sobre los eritrocitos utilizando la prueba de la antiglobulina humana (137). A partir de 1960 la reacción antígeno-anticuerpo por aglutinación era detectada usando una suspensión salina de eritrocitos y/o en presencia de albúmina bovina al 20 o 30% como habían descrito Dunsford y Bowley en 1955 (138) y Case en 1959 (139).

A pesar de que la prueba de antiglobulina humana fue descrita como ya vimos en 1945 por Coombs, Mourant y Race su uso rutinario en Inglaterra se realizó a partir de 1950 pero, en USA recién luego de 1960. Después de un trabajo publicado en Transfusion en 1965 la prueba más utilizada para detectar anticuerpos antieritrocitarios fue la de antiglobulina utilizando suspensiones de glóbulos rojos en albúmina (140).

En 1964 aparecieron las primeras publicaciones que mostraban que los eritrocitos suspendidos en soluciones de baja concentración iónica (LISS) obtenían reacciones mucho más rápidas que cuando se usaba solución salina o albúmina (141) (142). Esta técnica es la más utilizada a nivel mundial en el momento actual. En 1978 Rosenfield y Kochwa desarrollan la tecnología de microplaca que servirá luego para el uso de equipos automatizados (143). A partir de 1990 se describe una nueva técnica que producirá una revolución en el análisis serológico de la reacción antígeno-anticuerpo. Nos referimos a la técnica de aglutinación en columnas de gel (68) que utiliza sueros con anticuerpos de origen humano, monoclonales, antiglobulina y solución LISS. Esta técnica que adquiere rápida popularidad, es utilizada por más del 90% de los laboratorios europeos en el año 2000 y por el 42% de los laboratorios de USA en el año 2004 (144). En Uruguay, la comenzamos a utilizar en los laboratorios de inmunohematología a partir de 1995.

Las técnicas inmunohematológicas automatizadas en el momento actual se basan en

las técnicas de gel, microplacas, tecnología magnética y citometría de flujo (145) (146).

Si bien la citometría de flujo es usada durante años en hematología el primer trabajo que aplica esta técnica a la inmunohematología fue publicado en 1980 cuando se mide la cantidad de eritrocitos unidos a IgG en un paciente con anemia hemolítica autoinmune producida por alfametildopa (147). Luego, se utiliza la citometría de flujo para cuantificar la hemorragia feto materna. En una reciente revisión se analizan 176 publicaciones entre 1980 y 2009 donde se utiliza la citometría de flujo en inmunología (148).

El uso de enzimas para potenciar la reacción antígeno anticuerpo fue descrito por primera vez en 1947 pero recién fue utilizada rutinariamente a partir de 1960 (130). Entre 1960 y 1970 solamente contábamos con un suero antiglobulina poliespecífico de conejo (suero de Coombs). El suero monoespecífico que determina separadamente la presencia de IgG o C3 del complemento se desarrolló a partir de 1980. El primer anticuerpo monoclonal para determinar grupos sanguíneos fue el anti-A publicado en 1978(149). Actualmente la mayoría de los sueros anti-A y anti-B utilizados mundialmente son monoclonales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Creite A. Versuche uber die Wirkung des serumiweissesnach injection in das blut. *Zeitschrift fur Rationelle Medicin* 1869;36:90-108.
2. Bernard C. Lecons sur les proprieté physiologiques et les alterations pathologiques des liquides de le organism. Paris, JB Bellière.1859;2:459-463.
3. Landois L. Die Transfusion des Blutes.1875, Leipzig.

4. Hughes-Jones NC, Gardner B. Historical Review. *Br J Haematol* 2002;119:889-893.
5. Shattock SG. Chromocyte clumping in acute pneumonia and certain other diseases. *J Path Bacteriol* 1900;6:303-314.
6. Landsteiner K. Agglutination phenomenon in normal human blood. *Wien Klin Wochenschr* 1901;14:1132-1134.
7. Von Dungern E, Hirsfeld L. Concerning the group-specific structures of the blood. *Z Immunitätsforsch Exp Ther* 1911;8:526-562.
8. Decastello A, Sturli A. Über die Iso-agglutine im Serum gesunder und kranker Menschen. *München Medizinische Wochenschrift*. 1902;49:1090-1095.
9. Giangrande PLF. The History of Blood Transfusion. *Br J Haematol* 2000;110:758-767.
10. Donath J, Lansteiner K. Über paroxysmale haemoglobinurie. *München Medizinische Wochenschrift* 1904;36:1590-1593.
11. Schwarz HP, Dorner F. Historical Review. *Br J Haematol* 2003;121:556-565.
12. Landsteiner K, Levine P. Further observations on individual differences of human blood. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1927;24:941.
13. Moss WL. Studies of isoagglutinins and isohemolysins. *John Hopkins Med J* 1910;21:63-69.
14. Levine P, Stetson R. An unusual case of intra-group agglutination. *JAMA* 1939;113:126.
15. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognised by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1940;43:223-224.
16. Wiener AS, Peters HR. Hemolytic reactions following transfusions of blood of the homologous group, with three cases in which the same agglutinin was responsible. *Ann Intern Med* 1940;13:2306.
17. Levine P, Katzin EM, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy; its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis. *JAMA* 1941;116:825-827.
18. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br J Exp Path* 1945;26:255.
19. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. In vivo iso-sensibilization of red cells in babies with haemolytic disease. *Lancet* 1946;ii:264.
20. Callender S, Race RR, Paykoc ZV. Hypersensitivity to transfused blood. *Br Med J* 1945;ii:83.
21. Genetet B, Mannoni P. Restantes sistemas de grupos eritrocitarios. En *La Transfusión*. Barcelona Ed. Toray 1980: 468.
22. Allen FH, Diamond LK, Niedziela B. A new group antigen. *Nature* 1951;167:482.
23. Layrisse M, Arends T, Sisco RD. Nuevo grupo sanguíneo encontrado en descendientes de indios. *Acta Med Venez* 1955;3:132.
24. Eaton RR, Morton JA, Pickles M, White KE. A new antibody, anti Yt, characterizing a blood group of high incidence. *Br J Haematol* 1956;2:333.
25. Mann JD, Cahan A, Gelb AG, Fisher N, Hamper J, Tippet P, Sanger R, Race RR. A sex Linked blood group. *Lancet* 1962;i:8.
26. Swanson J, Polesky HF, Tippet P, Sanger R. A new blood group antigen Do. *Nature* 1965;206:313.
27. Molthan L, Crawford MN, Tippet P. Enlargement of the Dombrock blood group system; the finding of anti-Do^b. *Vox Sang* 1973;24:382.
28. Heisto H, van der Hart M, Madsen G, Moes M, Noades J, Pickles MM, Racer RR, Sanger R, Swanson J. Three examples of a new red cell antibody, anti-Co^a. *Vox Sang* 1967;12:18.
29. O'Neill GJ, Yang SY, Tegoli J, DuPont B, Berger R. Chido and Rodgers blood groups are distinct antigens components of human complement C4. *Nature* 1978;373:668.
30. Tilley CA, Romans DG, Crookston MC. Localization of Chido and Rodgers determinants to the C4d fragment of human C4. *Nature* 1978;276:713.
31. Rosenfield RE, Habe GV, Kissmeyer-Nielsen F, Ja J, Sanger R, Race RR. Ge a very common red cell antigen. *Br J Haematol* 1960;6:344.
32. ISBT Working Party on Terminology of red cell surface antigens. Los Angeles Report. *Vox Sang* 1991;61:158-160.
33. Mollison PL, Engelfriet CP, Conteras M. ABO, Lewis, Ii and P groups in Blood Transfusion in Clinical Medicine. Ninth Edition. Blackwell Scientific Publications. London 1993:175.
34. Grubb R. Observations on the human group system Lewis. *Acta Path Microbiol Scand* 1951;28:51.
35. Sneath JS, Sneath PHA. Transformation of the Lewis groups of human red cells. *Nature* 1955;176:172.
36. Andresen PH. The blood group system L. A new blood group L2. A case of epistasy within the blood group. *Acta Path Microbiol Scand* 1948;25:728.
37. Decaro J. Enfermedad Hemolítica Perinatal. Montevideo. Ed Rimarco, 2003.
38. Le Masne, Vachée H, Mannessier L, Grula L, Rouland V, Lequien P. Severe form of neonatal hemolytic disease by anti-Vel allo-immunization. *Arch Fr Pediatr* 1992;49:899-901.
39. Sussman LN, Miller EB. Un nouveau facteur sanguin Vel. *Rev Hemat* 1952;7:368.
40. Stratton F. A new Rh allelomorph. *Nature* 1946;158:25-26.
41. Agre PC, Davies DM, Issit PD, Lamy BM, Schmidt PJ, Tracy M, Vengelen-Tyler V. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. *Transfusion* 1992;32:86-87.
42. Wiener AS, Unger IJ. Further observations on the blood factors RhA, RhB, RhC and RhD. *Transfusion* 1962;2:230-233.
43. Tippet P, Sanger R. Observations of subdivisions of the Rh antigen D. *Vox Sang* 1962;7:9-13.
44. Kolher G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-497.
45. Koskimies S. Human lymphoblastoid cell line producing specific antibody against Rh antigen D. *Scand J Immunol* 1980;11:73-77.
46. Boylston AW, Gardner B, Anderson RL, Hughes-Jones NC. Production of human IgM anti-D in tissue culture by EB virus transformed lymphocytes. *Scand J Immunol* 1980;12:355-358.
47. Mollison PL, Engelfriet CP, Conteras M. Immunology of red cells. Blood Transfusion in Clinical Medicine. Ninth Edition. Blackwell Scientific Publications, London 1993:108.

48. Feizi T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 1985;314:53-57.
49. Levine P, Bobbitt OB, Waller RK, Kuchmichel A. Isoimmunization by a new blood factor in tumor cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951;77:403-405.
50. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994;83:435.
51. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of action. *Am J Transplant* 2006;6:859-866.
52. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socié G, Muus P, Roth A, Szer J, Elebute MO, Nakamura R, Browne P, Risitand A, Hill A, Schrezenmeier H, Fu CL, Maciejewski J, Rollins S, Mojcik C, Rother R, Luzzatto L. The complement inhibitor Eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006;355:1233-1243.
53. Mieschner S, Spycher M, Amstutz H, de Haas M, Kleijer M, Kaws U, Radtke H, Hubsch A, Andresen I, Martin R, Bichler J. A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization : association of RhD-positive red blood cell clearance rate polymorphisms in the FcyRIIA and FcyRIIIA genes. *Blood* 2004;103:4028-4035.
54. Bichler J, Spycher M, Amstutz H, Andresen I, Gaede K, Mieschner S. Pharmacokinetics and safety of recombinant anti-RhD in healthy RhD-negative male volunteers. *Transfusion Medicine* 2004;14:165-171.
55. Kumpel BM. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sang* 2007;93:99-111.
56. Kumpel BM. New developments in the biological activity of anti-D monoclonal antibodies. *Vox Sang* 2007;2:75-77.
57. Cortey A, Brossard Y, Beliard R, Bourel D. Prévention de la allo-immunisation Rhésus-D foeto-maternelle. Perspectives. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006;35 (suppl 1):1S119-1S122.
58. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971;21:903-914.
59. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self- tolerance maintained by activated T cellsexpressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
60. Mattingly JA, Waksman B. Immunologic suppression after oral administration of antigen I. Specific suppressor cells formed in rats peyers patches after oral administration of sheeps erythrocytes and their systemic migration. *J Immunol* 1978;121:1878.
61. Hanson DG, Vaz NM, Mais LCS, Lynch JM. Inhibition of specific response by feeding protein antigens III evidence againts maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies. *J Immunol* 1979;123:2337-2343.
62. Barnes R, Duguid J, Roberts F, Risk JM, Johnson PM, Finn R, Hardy J, Napier JA, Clarke CA. Oral administration of erythrocyte membrane antigen does not supress anti-Rh(D) antibody response in humans. *Clin Exp Immunol* 1987;67:220-226.
63. Wagner E, Flegel W. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 2004;20:23-32.
64. Avent N, Reid M. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-387.
65. Chown B. On a search for Rhesus antibodies in very young fetuses. *Arch Dis Child* 1955;30:232-233.
66. Stott L, Barker RN, Urbaniak SJ. Identification of alloreactives epitopes on the Rhesus D protein. *Blood* 2000;96:4011-4019.
67. Hall A, Caims L, Almann D, Barker R, Urbaniak S. Immune responses and tolerance to the RhD blood group protein in HLA-transgenic mice. *Blood* 2005;105:2175-2179.
68. Lapierre Y, Rigal Y, Adam J. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 1990;30:109-113.
69. Pereira A, Silveira S, Hernandez C, Varela A, Gaggero M, Olivera P, Dilorenzi N, Gularte M, Larrosa V, Miller A, Decaro J . Erythrocyte antibodies in pregnant women. *Arch Med Int* 2007;XXIX Supl 1:S182 (abstract).
70. Recomendación para la Prevención Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Hemolítica Feto-Neonatal en la gestación y para la inmunoprofilaxis anti-D. Consenso 2005. *Arch Gin Obstet* 2005;43:170-175.
71. Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion* 2008;48:941-952.
72. Mullis KB, Faloona F. Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
73. Stramer S, Glynn S, Kleiman S, Strong M, Caglioti S, Wright DJ, Dodd R, Bush M. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleid acid-amplification testing. *N Engl J Med* 2004;351:760-768.
74. Update: West Nile virus screening of blood donations and transfusiom-associated transmission-United States, 2003. *MMWR* 2004;53 (13):281-284.
75. Delwart E, Kalmin N, Jones S, Ladd D, Tobler L, Tsni R, Bush M. First case of HIV transmission by RNA-screened blood donation. 768W session 101 poster session, Retrovirus Conference. February 24-28, 2002 Seattle-USA.
76. Phelps R, Robbins K, Liberti T, Machuca A, Leparc G, Chamberland M, Kalish M, Hewlett I, Folks T, Lee LM, Mc Kenna M. Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. *Transfusion* 2004;44:929-933.
77. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman Cw, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-487.
78. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Path FRC, Chamberlain PF, Poon P, Redman C, Wainscoat J. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734-1738.

79. Owen R. Immunogenetic consequences of vascular anastomosis between bovine twins. *Science* 1945;28:400-401.
80. Mohr J, Killebrew L, Muchmore H, Felton FG, Rhoades ER. Transfer of delayed hypersensitivity: the role of blood transfusion in humans. *JAMA* 1969;297:517-519.
81. Hutchinson DL, Turner JH, Schlesinger ER. Persistence of donor cells in neonates after fetal and exchange transfusion. *Am J Obstet Gynecol* 1971;109:281-284.
82. Turner JH, Hutchinson DL, Petricciani JC. Chimerism following fetal transfusion. Report of leukocyte hybridization and infant with acute lymphocytic leukaemia. *Scand J Haematol* 1973;10:358-366.
83. Schechter GP, Whang-Peng J, McFarland W. Circulation of donor lymphocytes after blood transfusion in man. *Blood* 1977;49:651-656.
84. Lee TH, Paglieroni T, Ohto H, Holland PV, Bush MP. Survival of donor leukocyte subpopulations in immunocompetent transfusion recipients: frequent long-term microchimerism in severe trauma patients. *Blood* 1999;93:3127-3139.
85. Utter GH, Owings JT, Lee TH, Paglieroni TG, Reed WF, Gosselin RC, Holland PV, Busch MP. Blood transfusion is associated with donor leukocyte microchimerism in trauma patients. *J Trauma* 2004;57:702-707.
86. Utter GH, Nathens AB, Lee TH, Reed WF, Owings JT, Nester TA, Bush MP. Leukoreduction of blood transfusion does not diminish transfusion-associated microchimerism in trauma patients. *Transfusion* 2006;46:1863-69.
87. Utter GH, Lee TH, Rivers RM, Montalvo L, Wen L, Chafets DM, Reed WF, Bush MP. Microchimerism decades after transfusion among combat-injured US veterans from Vietnam, Korean and World War II conflicts. *Transfusion* 2008;48:1609-1615.
88. Utter GH, Reed WF, Lee TH, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism. *Vox Sang* 2007;93:188-195.
89. Kruskall MS, Lee HT, Assman SF, Laycock M, Kalish LA, Lederman MM, Busch MP. Survival of transfused donor white cells in HIV-infected recipients. *Blood* 2001;98:272-279.
90. Von dem Borne AEG, Décarý F. ICSH/ISBT Working Party on Platelet Serology Nomenclature of Platelet-Specific Antigens. *Vox Sang* 1990;55:176.
91. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Keromaki R, de Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S. Nomenclature of human platelet antigen. *Vox Sang* 2003;85:240-245.
92. Van Loghem JJ, Dorfmeier H, van der Hart M. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang* 1959;4:161.
93. Van der Weerdt CM, Veenhoven von Riesz LE, Nijenhuis LE, van Loghem J. The Zw blood group system in platelets. *Vox Sang* 1963;8:513.
94. Shulman NR, Aster RH, Leitner A, Hiller MC. Immunoreactions involving platelets. *J Clin Invest* 1961;40:1597.
95. Van Leeuwen EF, von dem Borne AEG, von Riesz LE, Nijenhuis LE, Engelfriet CP. Absence of platelet specific alloantigen in Glanzmann thrombasthenia. *Blood* 1981;57:49-54.
96. Van der Weerdt CM, van der Wiel-Dorfmeier H, Engelfriet CP. A new platelet antigen. 8th Congress European Society Hematology, Vienna, Austria 1962.
97. Von dem Borne AEG, von Riesz E, Verheugt FWA, Ten Cate JW, Koppe JG, Engelfriet CP, Nijenhuis LE. Bak, a new platelet specific antigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1980;39:113-120.
98. Friedman JM, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura and congenital porencephaly in two siblings associated with a new maternal antiplatelet antibody. *Blood* 1985;65:1412-1415.
99. Shibata Y, Matsuda I, Miyaji T, Ischikawa M, Yu a new platelet antigen involved in two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1986;50:177-181.
100. Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Mueller-Eckhardt C. A new platelet specific alloantigen Br. Report on four cases with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1988;54:101-106.
101. Pearson HA, Shulman NR, Marder VJ, Cone TE Jr. Isoimmune neonatal thrombocytopenia purpura: clinical and therapeutic considerations. *Blood* 1964;23:154-177.
102. Bassler D, Greinacher A, Okascharoen C, Klenner A, Ditomasso J, Kiefel V, Chan A, Paes B. A systematic review and survey of the management of unexpected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2008;48:92-98.
103. Muñoz-Díaz E. Diagnostic evaluation of FNAIT. *Vox Sang* 2007;2:48-55.
104. Castro W, Kroll H, Origa A, Falconi MA, Marques SB, Marba ST, Passini R, Annichino-Bizacchi JM, Costa FF, Santoso S, Arruda VR. A prospective study on the prevalence and risk factors for neonatal thrombocytopenia and platelet alloimmunization among 9332 unselected Brazilian newborns. *Transfusion* 2007;47:59-66.
105. Kelton JG, Smith JW, Horsewood P, Humbert JR, Hayward CP, Warkentin TE. Gov a/b alloantigen system on human platelets. *Blood* 1990;75:2172-2176.
106. Curtis BR, Fick A, Lochowicz AJ, McFarlane JG, Ball RH, Peterson J, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with maternal fetal incompatibility for blood group B. *Transfusion* 2008;48:358-364.
107. Decaro J. Trombocitopenias inmunes neonatales. *Arch Med Int* 2008;XXX:109-111.
108. Sprague CC, Harrington WJ, Lange RD, Shapleigh JB. Platelet transfusions and the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *JAMA* 1952;150:1193.
109. Stefanini M, Dameshek W, Adelson E. Platelet VII. Shortened platelet survival time and development of platelet agglutinins following multiple platelet transfusions. *Proc Soc Exp Biol* 1952;80:230.
110. Schiffer CA, Lichtenfeld JL, Wiernik PH, Mardiney MR Jr, Joseph JM. Antibody response in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer* 1976;37:2177.

111. Schiffer CA. Management of patients refractory to platelet transfusion. An evaluation of methods of donor selection. *Prog Hemat* 1987;15:91.
112. Saji H, Maruya E, Fujii H, Maekawa T, Akiyama Y, Matsuda T, Hosoi T. New platelet antigen Sib involved in platelet transfusion refractoriness in Japanese man. *Vox Sang* 1989;56:283.
113. Shulman NR. Posttransfusion purpura: clinical features and the mechanism of platelet destruction. In *Clinical and Basic Science Aspects of Immunohematology*. Ed Sandra T Nance. American Association of Blood Bank Arlington, Virginia 1991.
114. Lalezari P, Bernard JE. An isologous antigen-antibody reaction with human neutrophils related to neonatal neutopenia. *J Clin Invest* 1966;45:1741-1750.
115. Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Transfusion* 1996;45:1741-1750.
116. Brittingham TE, Chaplin H Jr. Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets. *JAMA* 1957;165:819-825.
117. Dzik WH. Is the febrile response to transfusion due to donor or recipient cytokine. *Transfusion* 1992;32:594.
118. Barnard RD. Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *N Y State J Med* 1951;51:2399-2402.
119. Decaro J, Correa H. Síndrome de trastorno respiratorio agudo del adulto posterior a la infusión de crioprecipitado. *Rev Arg Transf* 1982;4:29-34.
120. Popovsky MA, Abel MD, Moore SB. Transfusion-related acute lung injury associated a passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:185-189.
121. Alter HJ, Klein HG. The hazards of blood transfusion in historical perspective. *Blood* 2008;112:2617-2626.
122. Rizk A, Gorson KC, Kenney L, Weinstein R. Transfusion related acute lung injury after infusion of IVIG. *Transfusion* 2001;41:264-268.
123. Center for Biologics Evaluation and Research. Fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion: annual summary for fiscal years 2005-2006. Washington, DC: Food and Drug Administration; 2008.
124. Logdberg L, Reid ME, Miller JL. Cloning and genetic characterization of blood group carrier molecules and antigens. *Transf Med Rev* 2002;16:1-10.
125. Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000;40:48-53.
126. Reid ME. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion* 2003;43:1748-1757.
127. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf, Hellberg A, Moulds M, Sareneva H, Chester A. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001;98:1585-1593.
128. Avent ND, Martinez A, Fiegel WA, Olsson ML, Scott ML, Nogués N, Pisaka M, Daniels G, van der School E, Muñoz-Díaz E, Madgett TE, Storry JR, Beiboer SH, Maaskant-van Wijk PA, von Zabern I, Jimenez E, Tejedor D, López M, Camacho E, Cheroute G, Hecker A, Jinoch P, Svobodova I, de Haas M. The BloodGen project: toward mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. *Transfusion* 2007;47:(1 Suppl) 40S-6S.
129. Quill E. Big goes genetic. *Science* 2008;319:1478-1479.
130. Garraty G. Advances in red cell immunology 1960 to 2009. *Transfusion* 2010;50:526-535.
131. Gray SJ, Sterling K. The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. *J Clin Invest* 1950;29:1604-1613.
132. Porter RR. The hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 1959;73:119-126.
133. Edelman GM. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 1973;180:830-840.
134. Natvig JB, Kunkel HG. Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants and idiotypes. *Adv Immunol* 1973;16:1-59.
135. Huber H, Fudenberg HH. Receptor sites of human monocytes for IgG. *Int Arch Allergy* 1968;34:18-31.
136. Griffin FM Jr, Bianco C, Silverstein SC. Characterization of the macrophage receptor for complement and demonstration of its functional independence from the receptor for the Fc portion of immunoglobulin G. *J Exp Med* 1975;141:1269-1277.
137. Dacie JV, Crookston JH, Christenson WN. Incomplete cold antibodies role of complement in sensitization to antiglobulin serum by potentially haemolytic antibodies. *Br J Haematol* 1957;3:77-87.
138. Dunsford I, Bowley CC. Techniques in blood grouping. Edinburgh, Oliver and Boyd Ed, 1955.
139. Case J. The albumin layering method for D typing. *Vox Sang* 1959;4:403-405.
140. Stroup M, MacLroy M. Evaluation of the albumin antiglobulin technique in antibody detection. *Transfusion* 1965;5:184-191.
141. Hughes-Jones NC, Polley MJ, Telford R, Gardner B, Kleinschmidt G. Optimal conditions for detecting blood group antibodies by the antiglobulin test. *Vox Sang* 1964;9:385-395.
142. Elliot M, Bossom W, Dupuy ME, Masouredis SP. Effect of ionic strength on the behavior of red cell isoantibodies. *Vox Sang* 1964;9:396-414.
143. Rosenfield RE, Kochwa S, Kaczera Z. Solid phase serology for the study of human erythrocytic antigen-antibody reactions. Proc XII Congress of ISH and XV Congress of ISBT. Paris, France 1978: 27-33.
144. Shulman IA, Maffei IM, Downes KA. North American pre transfusion practices, 2001-2004: results from the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program survey data, 2001-2004. *Arch Patol Lab Med* 2005;129:984-989.
145. Bouix O, Ferrera V, Delamaire M, Redesdorff JC, Roubinet F. Erythrocyte-magnetized technology: an original and innovative method for blood group serology. *Transfusion* 2008;48:1878-1885.

146. Roback JD, Barclay S, Hillyer CD. An automated format for accurate immunohematology testing by flow cytometry. *Transfusion* 2003;43:918-927.
147. Van der Meulen FW, de Bruin HG, Goosen PC, Bruynes EC, Joustra-Maas CJ, Telkamp HG, von dem Borne AE, Engelfriet CP. Quantitative aspects of the destruction of red cells sensitized with IgG1 autoantibodies: an application of flow cytometry. *Br J Haematol* 1980;46:47-56.
148. Arndt P, Garraty GA. A critical review of methods used for analysis of RBC-antigen-antibody reactions by flow cytometry (abstract). *Transfusion* 2008;48:199A.
149. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 1978;14:9-20.

Historia del Sistema de Histocompatibilidad (Human Leukocyte Antigens, HLA) y los Trasplantes de Médula Ósea

El sistema HLA está formado por un conjunto complejo de genes y sus productos moleculares. Está constituido por 224 genes aproximadamente (genes y pseudogenes) localizados en el brazo corto del cromosoma 6 dentro de la banda 6p21.3 que representa casi el 2,5% de la longitud total del cromosoma y donde abarca alrededor de 4 megabases. El mapa del sistema HLA se ha construido, en los últimos años, a partir de datos obtenidos con técnicas como la clonación y la secuenciación. Los genes HLA contribuyen al reconocimiento de lo propio y lo ajeno, las respuestas inmunológicas a los estímulos antigénicos y a la coordinación de la inmunidad celular y humoral. Estos genes determinan los antígenos del sistema HLA los cuales son muy inmunogénicos y se encuentran en varios tipos de células. Los antígenos de clase I se encuentran en las plaquetas y en la mayoría de las células nucleadas con algunas excepciones como las neuronas, el epitelio corneano, el trofoblasto y las células germinativas. En los glóbulos rojos maduros sólo quedan vestigios y ciertos alotipos se expresan más que otros. Estos polimorfismos de clase I fueron identificados como aloantígenos eritrocitarios Bennett-Goodspeed (Bg) Bg^a, Bg^b y Bg^o luego denominados HLA.B7, HLA B17 y HLA A28 (1).

Los antígenos de clase II se expresan en linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, epitelio intestinal, células hematopoyéticas iniciales y en algunas células endoteliales.

La descripción de los primeros antígenos del sistema HLA se inició en la década de 1950 cuando varios investigadores descubrieron anticuerpos leucoaglutinantes en el suero de pacientes inmunizados por transfusiones o embarazos. Estas leucoaglutininas revelaron una serie de antígenos polimórficos determinados genéticamente. Jean Dausset, nacido en Toulouse-Francia en octubre de 1916, describe en 1952 la leucoaglutinación y la tromboaglutinación como paso previo al reconocimiento del primer antígeno leucocitario denominado MAC (2), luego conocido como HLA.A2. Este descubrimiento daría inicio posteriormente a la descripción del sistema de histocompatibilidad por lo cual es galardonado Dausset con el Premio Nobel en Medicina en 1980 (www.nobelprize.org).

A principios de la década del 60 la comprobación del rechazo acelerado de los injertos cutáneos en receptores preinmunizados con leucocitos periféricos de donantes potenciales sugirió una asociación entre los anticuerpos leucoaglutinantes humanos y los trasplantes tisulares. En 1964 se desarrolla por Paul Terasaki la prueba de microlinfocitotoxicidad lo cual significó un gran avance en este campo y en 1965 Dausset siendo jefe del Departamento de Inmunología del Hospital Saint Louis de Paris describe el primer sistema de antígenos tisulares denominado Hu-1 luego conocido como HLA.

En 1967 comenzó la estandarización de la nomenclatura HLA a través de una serie

de talleres internacionales. A medida que se lograron más antisueros monoespecíficos y los conocimientos genéticos se acrecentaron, la nomenclatura de los antígenos HLA se amplió y sistematizó. Actualmente la estandarización de la nomenclatura de los genes HLA y alelos es llevada a cabo por el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para los factores del sistema HLA que fue constituido en 1984 (www.who.int).

A fines de la década de 1980 se introdujeron las técnicas basadas en el análisis del ADN que permitieron detectar los alelos determinantes de los antígenos HLA. El establecimiento de la secuencia de los ácidos nucleicos de genes que codifican las moléculas HLA modificó la clasificación que ahora se basa en las secuencias alélicas.

Los métodos de detección de antígenos HLA pueden dividirse en la actualidad en tres grupos: serológicos, celulares y de ADN.

En junio del 2002 se habían descrito 1531 alelos, sin embargo esta cifra ha variado considerablemente y en enero del 2005 había 1814 alelos estudiados por técnicas moleculares. En la página web del Anthony Nolan Research Institute en Londres, www.anthonynolan.org, se muestra como ha evolucionado el estudio y descripción de los antígenos (técnicas serológicas) y alelos (técnicas moleculares). Todos los alelos HLA reconocidos oficialmente y sus secuencias están disponibles para la comunidad científica a través de la base de datos IMGT/HLA www.ebi.ac.uk/imgt/hla.

Los antígenos y anticuerpos del sistema HLA juegan un papel destacado en la Medicina Transfusional, en el trasplante de órganos, tejidos y células y en el desarrollo de ciertas enfermedades en especial en aquellas de posible etiología autoinmune.

Dentro de la Medicina Transfusional, el sistema HLA influye en la aloinmunización y refractariedad plaquetaria, las reacciones febriles no hemolíticas (RFNH), pulmonares agudas y el injerto vs. huésped (1).

La tipificación HLA es un componente esencial del trasplante de órganos (riñón, páncreas, hígado, corazón y pulmones), de tejidos como médula ósea o células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica y cordón umbilical. La magnitud de la investigación y de la compatibilidad varía con el

tipo de trasplante a excepción del trasplante de córnea donde no se realiza.

El 12 de setiembre de 1957 Donnall Thomas realiza la primera infusión intravenosa de células alogénicas de médula ósea en seis pacientes con enfermedades malignas tratados previamente con irradiación y quimioterapia (3).

A finales la década de 1970, el grupo de Seattle, liderado por Thomas, realizó el primer trasplante alogénico no relacionado en un paciente con leucemia lo cual estimuló la formación en USA del National Marrow Donor Program que en la actualidad cuenta con más de 11 millones de donantes voluntarios registrados y tipificados para el sistema de histocompatibilidad (HLA) (4). En 1990 Thomas recibe el Premio Nobel de Medicina.

El trasplante con células progenitoras hematopoyéticas (CPH) se realiza en más de 500 centros a nivel mundial y en más de 50 países incluido Uruguay, tanto en pacientes adultos como pediátricos. Se utiliza como terapéutica tanto para enfermedades hematológicas, alteraciones congénitas o adquiridas de la médula ósea o para el tratamiento de tumores sólidos como el cáncer de mama, testículo, neuroblastoma, meduloblastoma, retinoblastoma, etc.

Tradicionalmente, las CPH eran obtenidas, para realizar trasplantes autólogos o alogénicos, por aspiración de la médula ósea primero y de sangre periférica después, mediante la estimulación previa de la médula ósea y su recolección posterior por aféresis utilizando separadores celulares.

A finales de la década de 1980 las células del cordón umbilical surgen como una fuente alternativa para la obtención de CPH.

El primer trasplante de donante relacionado humano, utilizando CPH alogénicas de cordón umbilical, fue realizado por Eliane Gluckman en el Hospital Saint Louis de Paris en 1988 en un niño de cinco años que padecía una anemia de Fanconi y que recibió CPH del cordón umbilical de su hermana recién nacida HLA idéntica (5).

Las CPH de cordón umbilical tienen algunas ventajas sobre las obtenidas de la médula ósea. No necesitan, como las células del adulto, una compatibilidad HLA total para que el trasplante se realice con éxito. Pueden ser obtenidas sin ningún riesgo para la madre y

el recién nacido. Anteriormente la placenta, el cordón umbilical y la sangre contenida en ellos eran un material de descarte (6)

Tienen menor riesgo de transmitir enfermedades infecciosas y se ha demostrado que causan menos enfermedad de injerto versus huésped la cual constituye una de las mayores complicaciones en los trasplantes alogénicos.

Uno de los obstáculos en los trasplantes de CPH alogénicas es la disponibilidad de donantes compatibles. Solo el 25% encuentran un donante no relacionado HLA compatible a través de los registros internacionales pero, en algunos grupos étnicos, solo es posible en un porcentaje menor al 10%.

Dado que, las células de cordón umbilical, pueden ser obtenidas sin ningún riesgo para la madre y el recién nacido, es más fácil obtener su consentimiento para integrar bancos de cordón públicos que para una lista de donantes voluntarios adultos.

El primer Banco de Células de Cordón Umbilical fue creado en 1991 por Pablo Rubinstein en el New York Blood Center. Actualmente integra un registro internacional (Netcord) con otros 25 bancos lo que proporciona un inventario de más de 150.000 cordones. De todos ellos, el banco de cordón de New York es el que tiene el mayor stock y ya ha aportado más de 1400 cordones para la realización de trasplantes alrededor del mundo.

El trasplante de CPH de donante haploidéntico es una alternativa en los casos que no se tienen donantes no relacionados ni sangre de CU. Cuando se trata de pacientes que no pueden esperar, esta técnica es una nueva opción.

De momento ha demostrado ser efectiva para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y parece ser también una opción válida en la leucemia linfocítica pediátrica.

Se están desarrollando ensayos también en neuroblastoma y rhabdomyosarcoma.

La técnica se conoce como trasplante haploidéntico ya que el donante, en general uno de los padres del paciente, comparte un haplotipo del sistema HLA, es decir, que comparte la mitad de los genes implicados.

Las ventajas de este método son la disponibilidad inmediata del donante y que el efecto injerto versus tumor se produce aún con una disparidad parcial en el sistema HLA. Las desventajas son las consecuencias inmunológicas

para cruzar la barrera del sistema HLA como ser GVHD, el rechazo del injerto o la reconstitución medular retrasada o incompleta.

En Uruguay, el primer trasplante autólogo de CPH de médula ósea fue realizado en 1985, en el Hospital Británico de Montevideo, por Roberto De Bellis.

Posteriormente un grupo de médicos liderados por De Bellis, en el año 1987, obtienen el Premio Nacional de Medicina otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay por los primeros trasplantes de médula ósea realizados (7).

El 3 de junio de 1994 se inaugura el Servicio de Hematología y Trasplante de Médula Ósea en el Hospital Maciel de Montevideo. Surge de un proyecto de cooperación internacional entre los gobiernos de Francia y Uruguay. Se comenzó a gestar en el año 1991 en París bajo la premisa que se instalara en una institución pública de acceso a toda la población sin distinciones. Se designó al Hospital Maciel bajo la dirección de Gustavo Bogliaccini como sede de este proyecto. Fue apoyado por el entonces embajador del Uruguay en Francia Diego Zorrilla y los científicos uruguayos Guillermo Dighiero del Instituto Pasteur de París y José Luis Pico del Instituto Gustave Roussy.

En febrero de 1995 comienza su programa de trasplantes realizando el primero autólogo a partir de células progenitoras hematopoyéticas cosechadas de sangre periférica por la técnica de hemaféresis. Fue el primer trasplante autólogo realizado por esta técnica en el país. Se recibió en ese momento la honorable visita del tenor español José Carreras quien brindaría su apoyo mediante la "Fundación José Carreras" dedicada a la lucha contra la leucemia y cuyo vicepresidente es Ciril Rozman quien realizó el primer trasplante alogénico en España (www.fundacionjosecarreras.blogspot.com).

En 1987, José Carreras afectado de leucemia, recibió un trasplante autólogo en Seattle-USA, realizado por el grupo de Thomas, en el cual se obtuvieron las células progenitoras hematopoyéticas por múltiples punciones de la médula ósea del propio paciente.

Desde noviembre de 1995, el Servicio de Hematología y Trasplante de Médula Ósea del Hospital Maciel, se incorpora al Fondo Nacional de Recursos (FNR) como Instituto de Me-

dicina Altamente Especializado (IMAE). En octubre de 1997 se comienza con el programa de trasplante alogénico de donante histocompatible idéntico emparentado.

El 20 de noviembre de 2000 se inaugura la nueva planta física en el marco de las Jornadas de “La Hematología del Siglo XXI”. En mayo de 2002 se firma un convenio de cooperación entre el Instituto Paoli Calmettes de Marsella-Francia y el Servicio de Hematología del Hospital Maciel.

En mayo de 2003 se comienza con el programa de trasplante alogénico de donante no emparentado bajo la habilitación del FNR y en coordinación con el INDT. Hasta la fecha es el único centro de trasplante de médula ósea habilitado para dicho fin.

Hasta agosto de 2009, el centro de TMO del Hospital Maciel ha realizado 307 trasplantes incluyendo las modalidades de trasplante con acondicionamiento reducido e infusión de linfocitos del donante, alogénico de donante emparentado y de donante no emparentado histocompatible.

Este año, el servicio de Hematología del Hospital Maciel cumple 15 años de actividad bajo la dirección de Enrique Bodega y de Raúl Gabús como subdirector.

Desde 1995, el FNR establece el financiamiento para los trasplantes de CPH. Actualmente cuatro centros de Medicina Altamente Especializada (IMAE), uno público (Hospital Maciel) y tres privados (Hospital Británico, Impasa y Asociación Española) realizan trasplante de CPH. En la Asociación Española funcionan dos unidades de trasplante de CPH, una de adultos y otra pediátrica.

En marzo del 2007 se realiza en Punta del Este y por primera vez en Uruguay, el XXXI World Congress of the International Society of Hematology (ISH) cuya Presidenta Martha Nese presenta los resultados de 10 años (1995-2005) de los trasplantes de CPH realizados en Uruguay en los cuatro centros (8), los cuales son referidos al Registro Internacional de Trasplantes de Médula Ósea (IBMTR)(www.ibmtr.org).

En 2008, el grupo de médicos hematoncólogos pediátricos y Medicina Transfusional de la Asociación Española publican los resultados sobre trasplante de CPH en pacientes pediátricos realizados durante un período de 10 años (1997-2007) (9).

En nuestro país, en el nuevo milenio, hemos realizado, en la Asociación Española, en dos niños, los dos primeros trasplantes con células progenitoras hematopoyéticas alogénicas de cordón umbilical de donantes no relacionados. El primero en el año 2001, en un receptor de seis meses de edad con un síndrome mielodisplásico al que se le infundió un cordón histocompatible enviado desde la Universidad de Denver, Colorado-USA y otro de 4 años, con una leucemia aguda linfoblástica, con un cordón enviado desde Francia.

El 23 de marzo de 2009, realizamos también el primer trasplante relacionado de células progenitoras hematopoyéticas cosechadas de un cordón umbilical en Uruguay en un niño de 7 años con mielodisplasia. Este trasplante fue producto de un trabajo multicéntrico dado que la cosecha del cordón umbilical se realizó en el Hospital Pereira Rossell, la criopreservación en nitrógeno líquido y el conteo de células CD34+ por citometría de flujo en el Hospital Maciel, la histocompatibilidad en el Instituto Nacional de Donación y Trasplante y el descongelado e infusión en la Unidad de Trasplante Pediátrica de la Asociación Española.

Los primeros trasplantes haploidénticos se realizan a partir del año 2005 en el Centro Hospitalario Pereira Rossell, en pacientes pediátricos, a través del Servicio de Hemoterapia, el Servicio Hematológico de este nosocomio y la Fundación Peluffo Giguens.

En el Uruguay la tipificación HLA para la realización de trasplantes, tanto en donantes como receptores, la realiza el laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del Banco Nacional de Órganos y Tejidos (BNOT) actualmente Instituto Nacional de Donación y Trasplante (INDT). La ley 14.005 del 17 de agosto de 1971 establece la normativa para el trasplante de órganos y el 24 de febrero de 1977 se promulga el decreto 86/977 que reglamenta la ley y crea el Banco Nacional de Órganos y Tejidos, determina sus objetivos, sus cometidos esenciales y la asistencia de una comisión honoraria asesora. Abre sus puertas en el Hospital de Clínicas el 17 de noviembre de 1978 como un emprendimiento conjunto del Poder Ejecutivo y la Universidad de la República. Su primer director fue Raúl Rodríguez Barrios hasta 1982. Desde 1982 a 1999 la dirección fue ejercida por Betty Bono.

Desde diciembre de 1999 asume la dirección Inés Álvarez (www.indt.edu.uy).

En 1946 se realiza en Uruguay el primer trasplante de córnea por Raúl Rodríguez Barrios y colaboradores. En 1951 se conforma el banco de venas por Carlos Ormaechea y colaboradores y en el año 1969 se realiza el primer trasplante renal intervivo en el Hospital de Clínicas por Uruguay Larre Borges, Pereyra Bonasso, Campalans, Dante Petrucci, Carlos Gómez Fosatti y colaboradores.

En 1978 se hacen homoinjertos de piel y en 1980 homoinjertos de amnios. El primer trasplante renal cadavérico fue realizado en 1981 por Laura Rodríguez Joanicó.

El crecimiento programado del trasplante cadavérico se proyectó con la creación del Fondo Nacional de Recursos (FNR) en 1979.

En 1996 se realizan homoinjertos valvulares por el equipo de José Nozar y trasplante cardíaco por el equipo de Luis Filgueira.

En 1998 se hacen los primeros trasplantes hepáticos por el equipo de Edgardo Torterolo.

En el 2002 el trasplante reno-pancreático en el Hospital de Clínicas por las cátedras de Nefrología, Cirugía B, Urología, Endocrinología y el BNOT.

También en el 2002 se realizan los primeros homoinjertos de arterias crioconservadas por la Sociedad Uruguaya de Cirugía Vascular.

En el 2003 se documenta la realización de los primeros trasplantes de CPH con donantes no emparentados en el Hospital Maciel y en la Asociación Española.

En el INDT se implementa un programa que tiene como objetivo principal el funcionamiento de un sistema nacional de registro, tipificación y búsqueda de donantes de CPH al que se denominó SINDOME (10).

El 15 de julio de 2003 se promulga la ley 17.668 donde se establecen las disposiciones legales que hacen referencia al marco jurídico de los trasplantes de órganos, tejidos y células. El Banco Nacional de Órganos y Tejidos a partir de esta ley adquiere la denominación de Instituto Nacional de Donación y Trasplante (INDT) de Células, Tejidos y Órganos. El decreto del Poder Ejecutivo 160/006 establece las normas de control, calidad y seguridad para el trasplante de células y tejidos humanos excluyéndose a la sangre y los productos sanguíneos (Ley 12.072 del 4 de diciembre de 1953 y decreto PE 385/00 del 26 de diciembre

del 2000) excepto las células progenitoras hematopoyéticas y los órganos humanos Ley 14.005 del 17 de agosto de 1971.

En agosto del 2006, el INDT crea un grupo de expertos en Bancos celulares y tisulares que integran Jorge Decaro como Director de la Cátedra de Medicina Transfusional y Andrew Miller como Director del Servicio Nacional de Sangre. En diciembre del mismo año se elaboran, por este grupo, las guías de inspección para los Bancos de Sangre de Cordón Umbilical.

Los técnicos transfusionistas y los médicos hemoterapeutas integran los equipos de trasplante de órganos sólidos (corazón, hígado, renal, etc) y desde su inicio en 1985 los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas (CPH).

La Medicina Transfusional participa en la evaluación del donante (compatibilidad inmunohematológica, enfermedades transmisibles y recuento de células CD 34+ en sangre), en la colecta de CPH de sangre periférica (SP), médula ósea (MO) o cordón umbilical (CU) y en la manipulación "in vitro del producto celular (control de calidad, extracción de eritrocitos y/o plasma, etc). La criopreservación se realiza mediante el descenso programado de la temperatura en una cámara de nitrógeno líquido (NL) utilizando Dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector. Se almacena el producto en un tanque de NL en fase gaseosa con control de temperatura (-165 centígrados).

Por último, las células se descongelan a 37 centígrados inmediatamente antes de su infusión al receptor lo cual se realiza por goteo intravenoso mediante el monitoreo de la frecuencia cardíaca, presión arterial, ECG y frecuencia respiratoria (11).

El diccionario de la Real Academia Española define la Criobiología como la aplicación de las bajas temperaturas a la conservación de materiales biológicos. En rigor, la disciplina científica en constante desarrollo reserva esta definición a la criopreservación. La criobiología se encarga de estudiar los efectos de las bajas temperaturas en las células, tejidos u órganos. Su principal finalidad es la criopreservación pero, abarca también el estudio de la adaptación a bajas temperaturas de microorganismos, plantas y animales, el empleo de gases criogénicos para la destrucción de tejidos (criocirugía) y otros procesos

de conservación como la liofilización (deshidratación por congelación).

La historia de la criobiología se remonta a la antigüedad. En el año 2500 AC se empleaban en Egipto las bajas temperaturas con fines medicinales. Además, el uso del frío era recomendado por Hipócrates para detener el sangrado y la hinchazón. Con el avance de la ciencia moderna Robert Boyle estudió el efecto de las bajas temperaturas en animales.

En 1949, un grupo de científicos dirigidos por Christopher Polge criopreservaron espermatozoides lo que desencadenó lo que hoy llamamos criopreservación (12). Como dato interesante, este descubrimiento original del valor de las sustancias crioprotectoras en la criopreservación de células se logró por accidente. Polge trabajando en el Reino Unido, complementó inadvertidamente una solución con glicerol, causando así la supervivencia inesperada de las células congeladas experimentalmente. Los crioprotectores son útiles porque reducen el punto de congelación, pueden prevenir la formación de hielo intracelular hasta muy bajas temperaturas y protegen a las células interactuando con las membranas a medida que estas cambian de un estado flexible a uno rígido.

El primer trabajo científico que documenta la transfusión de eritrocitos previamente congelados a -79 centígrados con glicerol fue realizado por Mollison y Sloviter en 1951 (13). Las primeras técnicas de separación celular usando centrifugas fueron introducidas por Cohn y se utilizaron para el agregado de glicerol a los eritrocitos así como para la remoción del crioprotector por sucesivos lavados previamente a la infusión (14). En 1963, Peter Mazur (15) presentó un modelo teórico que representaba eficazmente el comportamiento hídrico de las células durante la criopreservación. Este modelo inicial, cuya base experimental se desarrolló en células sanguíneas fue revisado posteriormente por Meryman en 1968 (16). Los pioneros en la congelación de embriones de mamíferos fueron Stanley Leibo, Peter Mazur y David Whittingham quienes pudieron preservar con éxito óvulos en nitrógeno líquido a -196 centígrados que luego descongelaron e implantaron en madres sustitutas. Esta técnica pionera se publicó por primera vez en la revista Science de octubre de 1972. El procedimiento incluía

la sincronización exacta, la congelación y la descongelación lenta, cuidadosamente controlada para asegurar la supervivencia de los embriones.

Durante el proceso de criopreservación los materiales biológicos son congelados a muy bajas temperaturas, entre menos 80 y menos 196 centígrados punto de ebullición del nitrógeno líquido, para disminuir las funciones vitales y poderlos mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo (años). Pero, para poder recuperar luego las funciones del material biológico debe practicarse un congelamiento controlado para evitar los daños provocados por el ataque físico de la membrana celular de los agudos cristales de hielo y los efectos tóxicos de las sustancias que se deben incorporar para evitarlos. El control del proceso de criopreservación se logra mediante el empleo de sustancias crioprotectoras (DMSO para plaquetas y CPH, glicerol para los eritrocitos) y un descenso programado computarizado de la temperatura en cámaras especiales. Sin el auxilio de esta técnica no tendrían posibilidades la reproducción asistida o la terapia con células madres.

La Medicina Transfusional interviene también en la terapia de sostén mediante el uso de hemocomponentes y hemoderivados principalmente en el período de aplasia de los pacientes transplantados. Los hemocomponentes celulares más utilizados son los concentrados de eritrocitos y de plaquetas. Éstos deben ser suministrados leucoreducidos (menos de 5×10^6 leucocitos residuales en el producto) con el fin de disminuir la incidencia de reacciones febriles no hemolíticas, la transmisión de virus como el CMV o HTLV I-II, de bacterias como la Yersinia Enterocolítica y la prevención de la aloinmunización plaquetaria. También deben ser irradiados con irradiación gamma (25Gy) para evitar la reacción de injerto vs. huésped tanto en transplantes autólogos como alogénicos.

La irradiación gamma fue descubierta por el químico francés Paul Villard en 1900 pero su aplicación a la irradiación de las células de la sangre no se desarrolló hasta 1959 cuando se hicieron los primeros experimentos en ratones y dos años después en humanos. En 1970, Graw y colaboradores (17) demuestran que la irradiación gamma de las células sanguíneas previo a la transfusión evita la reacción injer-

to versus huésped. La irradiación gamma actúa sobre el núcleo de las células, sobre los ácidos nucleicos, anulando la capacidad mitótica. Al irradiar la sangre esto ocurre sobre las células nucleadas, los leucocitos y en especial los linfocitos que son los responsables de la reacción de injerto versus huésped, sin afectar a los eritrocitos ni las plaquetas que son células sin núcleo.

En Uruguay existen, en el momento actual, dos irradiadores gamma (Gammacell 1000) para hemocomponentes uno en servicio de Hemoterapia del Hospital Pereira Rossell y otro en el servicio de Medicina Transfusional de la Asociación Española.

A principios de la década del 80, en nuestro país, en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas se realizaron las primeras transfusiones de granulocitos obtenidos por sedimentación con hidroxietilalmidón (HAES), hemaféresis o filtración mediante la estimulación previa del donante con dexametasona (18). Sin embargo, su uso clínico fue discontinuado por la aparición de nuevos antibióticos, por las reacciones adversas que producían, sobre todo pulmonares y por el empleo de factores de crecimiento recombinantes. Últimamente, en otros países, se ha retomado su uso en casos seleccionados dado que mediante la estimulación del donante con factor estimulante de colonia de granulocitos se obtienen concentraciones superiores (19). Deben ser irradiados pero no pueden ser leucoreducidos.

En los receptores de trasplantes alogénicos utilizamos en la Unidad de Trasplante de Adultos de la Asociación Española, la infusión de linfocitos obtenidos por hemaféresis del mismo donante del injerto, con el fin de aumentar el efecto injerto versus tumor. El control de calidad se realiza mediante el recuento de células CD3+ por citometría de flujo.

Por último, la Medicina Transfusional participa de la prevención y tratamiento de las reacciones adversas como la hemólisis, la hemorragia alveolar difusa, toxicidad del DMSO o la insuficiencia respiratoria aguda relacionada a transfusión (TRALI) entre otras.

El DMSO utilizado como crioprotector para las CPH es un producto secundario en la fabricación del papel a partir de la madera. Es liposoluble por lo cual atraviesa la piel, se metaboliza principalmente en el hígado, tiene

una vida media de 9 horas cuando se administra intravenoso y produce liberación de histamina. Previo a la infusión de las CPH se realiza medicación con hidrocortisona, antihistamínicos, antieméticos y buena hidratación inclusive diuréticos si son necesarios. En nuestra experiencia personal, que comenzó en el año 1997 con la creación de las unidades de trasplante de la Asociación Española, con más de 400 infusiones realizadas no se justificaría utilizar el lavado de células con máquinas especiales en un proceso costoso, que consume tiempo y con una recuperación celular del 85%. Las principales reacciones adversas observadas durante la infusión de CPH han sido náuseas y/o vómitos, cefaleas, calor y rubor, dolor abdominal, bradicardia, hipo o hipertensión, olor corporal y ambiental y/o sabor desagradable. La mayoría de ellas ceden disminuyendo la velocidad de infusión y/o con tratamiento sintomático.

Durante la criopreservación y descongelado aparece una hemólisis del producto que puede minimizarse disminuyendo la cantidad de eritrocitos contaminantes mediante técnicas de sedimentación con HAES al 6% o a través del pasaje en una máquina de separación celular. Los productos que se obtienen por hemaféresis de sangre periférica tienen menos glóbulos rojos que los de MO.

La hemorragia alveolar difusa (DAH) es una complicación pulmonar severa que se produce luego del trasplante con CPH, quimioterapia o en pacientes con enfermedades autoinmunes. La mortalidad excede el 50% de los pacientes que requieren ventilación mecánica (20). En un trabajo reciente, se muestra una respuesta favorable de la DAH en seis pacientes, con la administración de F VII activado recombinante (rFVIIa) directamente en el alvéolo a una dosis de 50 microgramos/Kg (21).

A pesar de que la infusión de CPH puede ser considerada una simple transfusión, debido a los cambios que se producen en el producto con la criopreservación y descongelado así como en el receptor del injerto, precauciones especiales, como las enumeradas anteriormente, deben ser tomadas antes, durante y después de su infusión.

TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA

El término original de “ingeniería tisular” nace en la década de 1980 pero luego, con el correr de los años, es suplantado por el de medicina regenerativa.

Se define como tal a una terapia médica innovadora que tiene como función reparar, reemplazar, reconstituir y regenerar células o tejidos, dañados o enfermos. Esto puede lograrse a través de terapia celular que la FDA define como la prevención, tratamiento, cura o mejoría de enfermedades o injurias en humanos mediante la administración de células autólogas, alogénicas o xenogénicas que pueden ser manipuladas o alteradas *ex vivo*.

En lugar de transplantar el órgano dañado, se pueden inyectar células madres que regeneran el daño tisular o que restablecen la función ya sea mediante células precursoras o manipuladas genéticamente. Así por ejemplo, el trasplante hepático cura la hemofilia pero científicamente a nadie se le ocurre realizarlo con este fin. Sin embargo, la infusión de células progenitoras endoteliales alogénicas normales en ratones hemofílicos tipo A repueblan los sinusoides hepáticos y restauran los niveles de factor VIII plasmático. El mecanismo por el cual estas células progenitoras se injertan, proliferan y restauran la función normal aún permanece desconocido (22).

En los últimos años, se han desarrollado varios tipos de terapia celular las cuales podemos dividir, según su finalidad, en inmunoterapia y en terapia regenerativa.

En la década de 1960, Mathé introduce el término “Inmunoterapia Adoptiva” en el trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) refiriéndose a la transferencia pasiva de leucocitos de un donante a un receptor inmunocomprometido (23).

En 1979, Weiden y colaboradores describen el efecto beneficioso que tiene la enfermedad de injerto versus huésped en disminuir la recaída de leucemia (24).

Horowitz en 1990 demuestra que el trasplante de CPH depleccionado de células T favorece la recaída de leucosis mieloide crónica (LMC) (25).

A partir de este momento uno de los objetivos del trasplante alogénico de CPH para enfermedades hematológicas es prevenir la reacción de injerto versus huésped sin afectar

la acción beneficiosa del efecto injerto versus leucemia. Ambos mecanismos son producidos por los linfocitos T del donante. Lo ideal entonces sería realizar el trasplante con CPH alogénicas deplecionadas de células T para evitar el injerto versus huésped y esperar que se produzca el quimerismo y la inmunotolerancia en el receptor. Luego, la inmunoterapia adoptiva mediante la infusión de linfocitos obtenidos del mismo donante de las CPH, se usaría para estimular la acción del injerto versus leucemia. Cuando la infusión de linfocitos del donante (DLI) se realiza días o semanas después de las CPH la reacción de injerto versus huésped que se produce puede ser fatal pero, si la DLI se realiza después de los dos meses de realizado el trasplante no se produce, por lo general, injerto versus huésped (26).

Los mejores resultados con DLI se obtienen en el tratamiento de las recaídas de LMC luego del trasplante. En la mayoría de los estudios, el 70 al 80% de los pacientes con recaída hematológica y citogenética tratados con DLI obtienen una remisión completa citogenética. La mayoría de las remisiones son durables, y los primeros pacientes tratados con DLI en 1988 aún se encuentran en remisión (26). En estadíos más avanzados de recaída los porcentajes de remisión son menores y ésta no es tan durable.

En el Uruguay, las primeras DLI mediante dosis progresivas de células CD3+ obtenidas por aféresis del mismo donante del trasplante y criopreservadas en nitrógeno líquido se realizaron después del año 1995 en las unidades de trasplantes de adultos del Hospital Maciel y la Asociación Española (27).

Recientemente, el Imatinib, un inhibidor selectivo de la tirosina-quinasa, ha revolucionado el tratamiento de la LMC por su alta eficiencia y baja toxicidad. Algunos investigadores recomiendan el uso de DLI e Imatinib como tratamiento sinérgico para la recaída de LMC luego del trasplante alogénico para producir una rápida y duradera remisión molecular (28)

Otro aspecto de la inmunoterapia adoptiva es la obtención de células dendríticas o células presentadoras de antígeno autólogas a partir de la cosecha de monocitos de sangre periférica por hemaféresis con el fin de producir vacunas antitumorales. La primera, fue reportada en pacientes con linfomas a células B en

1996 (29) basándose en los trabajos previos que las APC, dada su bajo porcentaje en sangre, podían obtenerse a partir de la diferenciación in vitro de los monocitos para su posterior uso clínico (30)(31). En una primera etapa, las células mononucleadas (CMN) autólogas son obtenidos del paciente por hemaféresis en un separador celular de flujo continuo, mediante un programa específico computarizado (Cobe-Spectra auto PBSC). Luego por un sistema de elutriación (Elutra-CariédienBCT) que separa las células por tamaño y densidad se obtiene un producto celular enriquecido en monocitos. Estas células, mediante un cocktail de citoquinas son diferenciadas in vitro a APC inmaduras y luego a APC maduras.

A las células dendríticas obtenidas se le adjuntan péptidos tumorales y son inyectadas al paciente con el fin de provocar una respuesta inmune antitumoral. Este tipo de inmunoterapia se ha utilizado en los últimos años para el tratamiento del cáncer de próstata, colon o melanoma (32) (33). Estas autovacunas han demostrado ser seguras, no tóxicas y con pocos efectos adversos. En el curso de Hemaféresis que realizamos en el XXXI World Congress of the International Society of Hematology (ISH) que se llevó a cabo por primera vez en Uruguay en marzo de 2007 en Punta del Este, invitamos a Gunnar Kvalheim del Departamento de Terapia Celular de la Universidad de Oslo en Noruega, para que dictara una conferencia precisamente sobre la producción de vacunas antitumorales con APC obtenidas por el sistema Elutra de sangre periférica. Kvalheim relató su experiencia en 23 pacientes con cáncer de próstata resistente a los andrógenos y en 28 con melanoma (34).

En Holanda, el primer trabajo con vacunas de APC se inició en 1998 para tratar pacientes con melanoma. Los resultados han sido publicados recientemente y confirman que las APC maduras, pero no las inmaduras, producen una potente respuesta antitumoral (35).

Una aplicación adicional de las CPH obtenidas de sangre periférica, médula ósea o de cordón umbilical es su utilización para la terapia celular y medicina regenerativa de tejidos no hematopoyéticos. El concepto de la plasticidad de la stem cell adulta para convertirse en progenitores de tejidos no hematopoyéticos ha generado un enorme interés científico en los últimos años. Estudios

preclínicos, realizados a comienzo del nuevo milenio, identificaron en la sangre de cordón umbilical (CU) a una población de células pluripotenciales CD45 negativas que pueden diferenciarse en osteoblastos, condroblastos, adipocitos, CPH y células neurales (astrocitos y neuronas) (36) (37). Estos estudios sustentan la hipótesis de que las células madres multipotenciales presentes en el CU tienen características similares a las células madres adultas obtenidas de la MO con capacidad de regenerar tejidos no hematopoyéticos. El CU es considerado actualmente una rica fuente de células madres hematopoyéticas. Estas células son menos maduras que otras células madres del adulto por lo cual tienen una mayor capacidad de proliferación en cultivos y pueden diferenciarse en células de una variedad de tejidos (plasticidad) (38). Células precursoras endoteliales (EPC) obtenidas a partir del cultivo de células CD34 de CU fueron expandidas in vitro para obtener una cantidad significativa para estudios clínicos. In vivo estas células proliferan, forman estructuras vasculares y mejoran la función del ventrículo izquierdo en modelos experimentales de infarto de miocardio. Las células obtenidas de CU migran hacia la zona infartada pero no al miocardio normal. Las células del injerto participan en neoangiogénesis e influyen de manera beneficiosa la remodelación del tejido lesionado (39). De manera similar, infartos de miocardio producidos en ratas por ligadura de la arteria coronaria confirman que la infusión de células CD34 de CU aumentan significativamente la función miocárdica comparado con la infusión de citoquinas en los animales de control (40).

La íntima asociación entre los precursores endoteliales (EPC) y las CPH ha llevado a la hipótesis de que derivan de un progenitor común el hemangioblasto (41). Teóricamente la sangre de CU tendría hemangioblastos dada la capacidad funcional de repoblar tejido hematopoyético y regenerar vasos sanguíneos (42). Sin embargo, hasta el momento actual, no se ha podido dilucidar exactamente cuál es el rol que juegan, en condiciones fisiológicas o patológicas, los EPC derivados de la MO versus los EPC circulantes y versus los EPC residentes en diversos tejidos.

En nuestro país hemos hecho en la Asociación Española, la infusión de células madres adultas autólogas obtenidas de la MO por

aspiración, en pacientes con cardiopatía isquémica severa e insuficiencia cardíaca en etapa dilatada. Todos los pacientes fueron revascularizados mediante cirugía sin circulación extracorpórea y a la mitad de ellos se les realizó inyecciones epicárdicas con células madres autólogas obtenidas por aspiración de MO en el mismo acto quirúrgico.

Los pacientes que recibieron células madres autólogas mejoraron la fracción de eyección ventricular (FEVI) y la conectina 43 determinada por inmunohistoquímica, sin aumento de fibroblastos (43). Este trabajo fue presentado en el XXXI World Congress of the ISH en marzo del 2007 en Punta del Este-Uruguay.

En otro estudio (44), implementado en el Hospital de Clínicas, se realizó la revascularización miocárdica biológica complementaria a la revascularización miocárdica quirúrgica convencional utilizando para ello células de la médula ósea autólogas para aumentar la densidad capilar en todo el espesor parietal ventricular izquierdo y restaurar la perfusión de los sistemas coronarios. Los resultados preliminares de la evaluación por SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) muestran un incremento de la perfusión del 10% en los pacientes que recibieron MO intramiocárdica. Fueron publicados en la Revista Médica del Uruguay del SMU en diciembre de 2008.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la cantidad y función de las células madres circulantes derivadas de la MO están disminuidas en pacientes añosos o con riesgo de enfermedad cardiovascular (ateroesclerosis, diabetes) (45) (46). El uso de células madres derivadas de CU puede ser una alternativa para la medicina regenerativa cardiovascular en esta población de pacientes enfermos con edad avanzada. Las células de CU se obtienen fácilmente, tienen un potencial intacto de regeneración y diferenciación, pueden expandirse ex vivo y pueden ser almacenadas para su uso en un futuro. En un trabajo científico publicado en la revista Stem Cells (47) se obtuvieron células progenitoras endoteliales CD133 (EPC) a partir de células mononucleadas de CU utilizando columnas con microesferas magnéticas (MACS) con anticuerpos anti-CD133. Siete días después de producir un infarto de miocardio artificial

en ratas mediante la ligadura de la coronaria izquierda, se inyectaron las células de CU por vía intravenosa. Un mes después del transplante se demostró la presencia de células humanas (por cromosomas sexuales o antígenos HLA) cerca de las paredes de los vasos o en el ventrículo izquierdo en 6 de los 9 animales tratados pero ninguna en el grupo control. A su vez, células madres mesenquimales (MSC) de CU fueron exitosamente diferenciadas a cardiomiocitos in vitro por lo cual el CU constituye una promisorio fuente de células para la terapia regenerativa cardiovascular (48). Actualmente, se está desarrollando un estudio multicéntrico, prospectivo, randomizado y doble ciego, Myocardial Stem Cell Administration after Acute Myocardial Infarction (MYSTAR), que compara la infusión temprana o tardía de CMN autólogas de médula ósea por vía intracoronaria o combinada (intracoronaria e intramiocárdica) en pacientes con infarto agudo de miocardio (49).

En Uruguay, la Facultad de Medicina en el año 2004 declara el área de la medicina regenerativa de interés institucional (Resolución del Consejo nro 57 del 01/09/2004). En el año 2006, el Poder Ejecutivo promulga el decreto 106/006 donde se establecen normas de control, calidad y seguridad para el transplante de células y tejidos humanos tomando como base científica la directiva 23 del Parlamento y Consejo Europeo de fecha 31/03/2004.

La normativa del citado decreto se aplica tanto a células hematopoyéticas de sangre periférica, de médula ósea, de cordón umbilical y a células troncales, embrionarias y/o adultas.

En la Facultad de Medicina existen grupos que tienen gran experiencia clínica en el transplante de MO ya que aplican este procedimiento en nuestro país desde hace varios años. Esta experiencia incluye todas las fases vinculadas a este procedimiento, desde la cosecha de CPH, ya sea por aspiración de MO o por hemaféresis, su procesamiento posterior, su criopreservación, su infusión y hasta el soporte postransplante. De igual modo existe experiencia en su cuantificación por diferentes métodos (citometría de flujo, cultivos) y en la caracterización molecular y celular de diferentes tejidos o células.

Con el objetivo de reunir toda esta experiencia nacional, en el año 2008, el Departamento Básico de Medicina, la Cátedra de

Histología, la Cátedra de Medicina Transfusional, el Instituto Nacional de Donación y Transplante (INDT) junto con otras cátedras y servicios proponen un proyecto para la creación de una Unidad de Terapia Celular (factoría) en el Hospital de Clínicas. Dicho proyecto fue aprobado en 2009 por la Comisión Intersectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, contando para su desarrollo con el asesoramiento internacional del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona por lo cual en noviembre de 2008 nos visita Joan García, Jefe de la Unidad de Terapia Celular de dicho centro catalán, dictando dos conferencias sobre terapia celular y medicina regenerativa una en el nuevo anfiteatro del piso 19 del Hospital de Clínicas y otra en Facultad de Medicina.

La avalancha de conocimientos científicos que se han producido en los últimos años, muchos de los cuales han trascendido por la prensa o Internet, ha hecho que la población general tenga ciertas expectativas presentes y futuras en la aplicación de esta terapia celular para la cura de enfermedades crónicas como la diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, tumorales, osteoarticulares, cardiovasculares, entre otras. No se debe perder de vista que los resultados son aún preliminares y falta un largo camino por recorrer.

Sin embargo, varias empresas a nivel mundial ofrecen a las gestantes la posibilidad de guardar la sangre del CU al nacer como una especie de seguro biológico para cuando el niño la necesite para un transplante de CPH o para terapia celular como cura de diversas enfermedades. Estas empresas cobran un monto determinado por obtener y congelar el CU así como una cuota por la conservación.

En el momento actual no existe certeza durante cuanto tiempo estas células de CU mantienen su viabilidad. Es difícil de estimar si la donación autóloga va a ser usada en el futuro. El riesgo que el niño necesite un transplante de CPH autólogo antes de los diez años está entre 1 en 200.000 a 1 en 10.000 (50). De acuerdo con estas estimaciones menos del 5% de los CU autólogos serían utilizados clínicamente lo cual ocurriría en 1 de cada 20.000 colectas (51).

El primer transplante autólogo de CU se realizó, en 1999, en el Hospital Albert Einstein de San Pablo, Brasil. Los padres de un

niño de cinco años afectado por leucemia decidieron, asesorados por los médicos tratantes, tener un segundo hijo con la esperanza de que fuera HLA idéntico para realizar un transplante de CPH a su hermano. Por tal razón, se guardaron las células del cordón umbilical. Pero, cuando ella, la donante tenía un año y dos meses desarrolló un neuroblastoma estadio IV. Se decidió entonces usar las células de CU para realizar un transplante de MO autólogo con buen resultado a los 14 meses postransplante (52).

En el 2007, se describe el primer caso de transplante autólogo de células de CU para el tratamiento de una niña de 3 años de edad que presentaba una leucemia aguda linfoblástica y que sus padres habían guardado el CU al nacer (53). La paciente se encontraba en remisión completa 20 meses después del transplante.

En un foro internacional sobre los usos de la sangre de CU desarrollado recientemente (54), en los países que intervinieron, ninguno de los bancos de cordón públicos guardan CU para uso autólogo. En la mayoría de los países participantes, a excepción de Holanda e Italia, uno o más bancos privados de CU operan para uso autólogo. En Italia los bancos privados de CU están prohibidos. Sin embargo, agentes internacionales de bancos privados actúan en Holanda e Italia realizando la cosecha y exportación de los CU.

En Turquía, los bancos privados de CU están regulados por ley y supervisados por el Ministerio de Salud. Están obligados a ofrecer el 25% de su stock para uso alogénico.

En Alemania, los bancos de sangre de CU autólogos no son recomendados por la autoridad sanitaria sin embargo éstos existen.

En otros países, los bancos autólogos reciben licencias y acreditaciones locales pero ninguno es supervisado por una autoridad externa o internacional.

Ninguno de los participantes de este foro internacional estuvo a favor de guardar CU autólogos para un transplante de CPH futuro y el conservar las células madres de CU para regenerar tejidos no hematopoyéticos fue considerada una decisión inmadura dado que hasta el momento actual no existe una información científica detallada y uniforme.

Sin embargo, todos los participantes, estuvieron de acuerdo en las donaciones dirigidas

de CU sobre todo para aquellos pacientes con enfermedades congénitas como por ejemplo, las hemoglobinopatías.

Otro inconveniente para fomentar el uso de sangre de CU autóloga es que la mayoría de las enfermedades que pueden ser tratadas en un futuro pueden ya existir como cambios premalignos en las células madres del CU (55). Existe evidencia de mutaciones del ADN de CU obtenidos de niños que luego desarrollan leucemia (56).

El Registro Internacional de la World Marrow Donor Association (WMDA) muestra un sucesivo aumento del uso de las células de CU para el trasplante no relacionado de CPH al igual que ocurrió a finales de la década del noventa con la obtención de CPH por hemaféresis de sangre periférica con respecto a la aspiración de MO (www.wmda.org) lo cual hace pensar, que en los próximos años, que el CU será la principal fuente de CPH.

Se han buscado otros tejidos para obtener stem cells adultas. Hasta hace poco tiempo, el tejido adiposo aspirado por liposucción era considerado material de descarte al igual que la placenta y el cordón umbilical. Actualmente, se considera al tejido adiposo como una fuente abundante de células madres adultas (57) que se comportan de manera similar a las obtenidas de médula ósea. El número de stem cells que pueden ser aisladas por unidad de volumen en el lipoaspirado es aproximadamente 10 veces mayor que el que se obtiene de MO (58). Por tanto, el tejido adiposo es una fuente accesible y renovable de células madres adultas. Varios ensayos clínicos se hallan en fase de investigación.

En la cátedra de Medicina Transfusional hemos comenzado, en el año 2007, con la utilización del gel plaquetario autólogo (GPA) como fuente de factores de crecimiento (FC) óseo en la cirugía maxilofacial (59). El GPA fue utilizado por primera vez por Whitman y colaboradores a fines de la década de 1990 como tratamiento complementario en la colocación de implantes (60). El término gel describe a un producto maleable, parecido a la gelatina, resultante de añadir calcio y trombina al plasma rico en plaquetas o al concentrado plaquetario donde el fibrinógeno se transforma en fibrina dando lugar a un gel similar a un pegamento. El fundamento de su utilización radica en la riqueza de FC que

difunden en el entorno ejerciendo acciones de proliferación, remodelación y regeneración tisular. Los FC son proteínas con un efecto reconocido en la formación de tejido nuevo que se unen a la superficie externa de las células mediante receptores transmembrana. Varios de los FC están almacenados en los gránulos alfa de las plaquetas y son liberados en respuesta a una variedad de estímulos (trombina, colágeno, ADP).

Actualmente se ha ampliado el uso del GPA a la cirugía ortopédica, las úlceras de piel y en la cirugía plástica o cosmética (61).

También, desde el año 2007 hemos comenzado a utilizar plasma autólogo en oftalmología, en pacientes con ojo seco en sustitución de lágrimas artificiales. El suero autólogo se usó por primera vez en pacientes con ojo seco por Fox y colaboradores en 1984 (62). Sin embargo, el relativo desconocimiento de su mecanismo de acción, a nivel de la superficie ocular, hizo que su utilización en la práctica clínica fuera muy reducida hasta 1999 en que se desarrollan los trabajos de Tsubota y colaboradores (63). En caso de sequedad ocular, la toxicidad sobre las células epiteliales está aumentada siendo común la presencia de trastornos epiteliales. Se ha recurrido a distintos procedimientos quirúrgicos para poder estimular la formación de lágrimas. Sin embargo se trata de técnicas quirúrgicas complejas con frecuentes complicaciones asociadas. También se ha usado el suero fetal bovino dado que de él se extraen numerosos FC para cultivos celulares in vitro o el suero extraído de cordón umbilical pero, ambos cuentan con la posibilidad de reacciones alérgicas y riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas (64). El plasma autólogo carece de estos riesgos, humidifica y aporta FC como el factor de crecimiento epitelial (EGF), factor beta transformante del crecimiento de fibroblastos (TGF-beta), vitamina A, fibronectina, albúmina, alfa2-macroglobulina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y neuropeptidos como la sustancia P y factor de crecimiento tipo insulina 1. Además, el plasma autólogo contiene inmunoglobulinas, lisozima y factores del complemento que le aportan cierto efecto bactericida y bacteriostático.

Los servicios de Medicina Transfusional que tienen experiencia en el trasplante de CPH juegan un importante rol en el desarrollo

de programas de terapia celular y medicina regenerativa. Inclusive algunas revistas científicas de Medicina Transfusional han agregado una sección para la terapia celular como Vox Sanguinis publicación oficial de la ISBT o Transfusion, de la American Association of Blood Bank (AABB). La AABB incluye en la edición 13 de "Standars of Blood Bank" la sección Q destinada a la terapia celular y en la edición 12 del "Technical Manual" un capítulo sobre esta nueva terapia. A su vez, publica un nuevo libro de la serie "Physicians Handbook" sobre terapia celular (www.aabb.org). A partir del congreso anual de la AABB que se desarrolló en 1994 la terapia celular se integró como una sección de la Medicina Transfusional al igual que en otros Congresos Internacionales como sucedió en Uruguay en el World Congress of the International Society of Hematology en marzo de 2007.

Hasta el año 2007, la AABB ha acreditado 105 servicios de terapia celular, en 43 estados y en cuatro países y 40 bancos de cordón umbilical en 15 ciudades de 6 países (www.aabb.org).

Varias sociedades científicas han agregado este ítem como la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) que a partir del año 2008 pasó a denominarse de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular (www.sets.es). También varios centros de transfusión adquieren esta denominación en el nuevo milenio como el Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña en Barcelona o el Servicio Nacional de Sangre francés (65). Los objetivos de los servicios de Medicina Transfusional son participar de la cosecha de células, su separación, su cultivo y expansión in vitro, la criopreservación, el control de calidad del producto así como la infusión del mismo. El desarrollo tecnológico de los servicios de Medicina Transfusional debe pensarse en base al rol clínico de las nuevas terapias celulares. Para ello es necesario, articular programas multidisciplinarios de expertos en varias áreas de diagnóstico (biología molecular, inmunología, patología) y de disciplinas clínicas como hematología, cardiología, cirugía cardíaca, cirugía vascular, traumatología, dermatología, ginecología entre otras. Por ello, pensamos que la "factoría" celular debía estar en el Hospital Universitario elaborándose el proyecto CSIC para tal fin. Los médicos hemoterapeutas debemos

tener la mente abierta junto a una activa participación en los programas multidisciplinarios de terapia celular y medicina regenerativa. Se deben conducir los servicios de Medicina Transfusional desde el punto de vista tecnológico y de recursos humanos hacia esos objetivos para el beneficio de los pacientes que se tratan en el Sistema Integrado de Salud.

BIBLIOGRAFÍA

1. Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB). 15 Ed. en español editado por la Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología, Buenos Aires- Argentina, 2007.
2. Dausset J. Iso-Leuco-Anticorps. *Acta Haemat* 1958;20:156.
3. Thomas ED, Lotche HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-496.
4. Appelbaum FR. Hematopoietic-Cell Transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007;357:1472-1475.
5. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Davergie A, Esperou H, Thierry D, Socié G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood for an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178.
6. Kurtzburg J. Umbilical-cord-stem-cell transplantation. En Neonatal Hematology. De Alarcón P y Werner E Ed Cambridge University Press, UK, 2005: 376.
7. De Bellis R, Nese M, Miller A, Di Landro J, Caneiro A, Estol D, Bermudez J, Bello H, Russi J, Quadrelli R, Vidal J, Tulle S, Staham J, Vila V, Perez Campos H. Introducción, adaptación y perspectivas del trasplante de médula ósea en Uruguay. Gran Premio Nacional de Medicina otorgado por la Academia Nacional de Medicina Edición 10, 1986.
8. Nese M. Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) in Uruguay. *Arch Med Int* 2007;XXIX Supl 1: S28-S34.

9. Dufort G, Castiglioni M, Pages C, Dabiezies A, Decaro J, Castillo L. Trasplante de progenitores hematopoyéticos en pediatría: 10 años de experiencia. *Arch Pediatr Urug* 2008;79:201-209.
10. Bengoechea M, Alvarez I, Hidalgo P, Cabrera A, Senatore D, Toledo R, Carreto E, Sosa M, Abileira D, Silva E. HLA-A,B,DR en receptores de trasplante de médula ósea y progenitores hamatopoyéticos (SINDOME). *Rev Med Urug* 2003;19:149-158.
11. Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitors cells. *Transfusion* 2004;44:907-916.
12. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164:666.
13. Mollison PL, Sloviter HA. Successfull transfusion of previously frozen red cells. *Lancet* 1951;ii:862.
14. Haynes LL, Tullis JL, Sproul MT, Wallasch S, Turville WC. Clinical use glycerolized frozen blood. *JAMA* 1960;173:1657-1663.
15. Mazur P. Kinetics of water loss from cells subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963;47:347-369.
16. Meryman HT. Modified model of the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature* 1968;218:333-336.
17. Graw RG, Buckner CD, Whang-Peng J, Kruger G, Buckner B, Berard C, Henderson E. Complications of bone marrow transplantation. Graft versus host disease resulting from chronic myelogenous leukaemia leucocyte transfusion. *Lancet* 1970;ii:338.
18. Decaro J, Alayon W, Novoa JE. Leucaferesis por centrifugación de flujo continuo y filtración en donantes normales. II Congreso Latinoamericano de Hemoterapia e Inmunohematología. Buenos Aires-Argentina, 1982.
19. Price Th, Raleigh A, Bowden RA, Boeckh M, Bux J, Nelson K, Lies C, Dale C. Phase I/II trial neutrophil transfusion from donor stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2000;95:3302-3309.
20. Huaranga AJ, Leyva FJ, Signes Costa J, Morice Rc, Read I, Darwish AA, Champlin RE. Brochoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary complications of bone marrow transplantation patients. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:975-980.
21. Heslet L, Nielsen J, Levi M, Sengelov H, Johansson P. Succesfull pulmonary administration of activated recombinant factor VII in diffuse alveolar hemorrhage. *Crit Care* 2006;10:1-6.
22. Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endotheliun and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest* 2008;118:935-945.
23. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965;25:1525-1530.
24. Weiden Pl, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. Anti-leukemic effects of graft versus host disease in human recipients of allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1979;300:1068-1070.
25. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldam Jm, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B. Graft versus leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555-562.
26. Kolb JH. Graft versus leukemia effects of transplantation and donors lymphocytes. *Blood* 2008;112:4371-4383.
27. Decaro J. 20 años de historia de la Hemaferesis en el Uruguay. *Gambro BCT Hispanoamérica* 2001;4:4-8.
28. Savani BN, Montero A, Kurlander R, Childs R, Hensel N, Barret AJ. Imatinib synergizes with donor lymphocyte infusion to achieved rapid molecular remission of CML relapsing after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:1009-1015.
29. Hsu FJ, Benike C, Fangnoni E, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52-58.
30. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83-93.
31. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cell is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-1118.
32. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schandendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate pulsed dendritics cells. *Nat Med* 1998;4:328-332.
33. Jonuleit H, Giesecke – Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Pagagnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. A comparison of two types of dendritic cells as adjuvants for the induction of melanoma specific T cell response in human following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001;93:243-251.
34. Kvalheim G. Obtaining monocytes for production of dendritic cells by Elutra System. *Arch Med Int* 2007;XXIX Supl 1:S112.
35. de Vries IJM, Punt CJA, Adema Gj, Fidgor CG. Potencial applications of dendritic cells. *Vox Sang* 2007;2:264-271.
36. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sotg RV, Fisher J, Rosebaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan A, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potencial. *J Exp Med* 2004;200:123-135.
37. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood* 2003;102:3483-3493.
38. Korbliing M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair- A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570-582.
39. Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Muller-Hilke B, Zhang L, Ladilov Y, Egger D, Steinhoff G. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res* 2005;66:45-54.

40. Hirata Y, Sata M, Motomura N, Takanashi M, Suematsu Y, Ono M, Takamoto S. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327_609-614.
41. Baron MH. Hemangioblasts in adults? *Blood* 2004;103:1-2.
42. Cogle CR, Wainman DA, Jorgensen ML, Guthrie SM, Mames RN, Scout EW. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood* 2004;103:133-135.
43. Paganini JJ, Brusich D, Fronzuti A, Paganini R, Abaz F, Martinez L, Decaro J, Patel A, Benetti F. Terapia celular para la insuficiencia cardíaca: estudio prospectivo y randomizado del trasplante autólogo de células madres adultas para la cardiopatía isquémica severa. *Arch Med Int* 2007;XXIX Supl 1:S22-S24.
44. Lorier G, Touriño C, Rodriguez I, Diaz L, Lujambio M, Mato S, Ferrando R, Sujánov A, Leal D, Quagliata A, Liguera L, Dayan V, Parma G, Nese M, Decaro J, Lorenzo A, Roca R. Revascularización miocárdica biológica complementaria a la revascularización miocárdica quirúrgica convencional. Comunicación preliminar de estudio prospectivo de casos y controles, randomizado y doble ciego. *Rev Med Urug* 2008;24:246-257.
45. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Krutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1449-1457.
46. Heiss C, Keymel S, Niesler U et al. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1441-1448.
47. Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R, Miller L, Zarin P, Castel D, Barbash I, Nagler A. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells* 2006;24:772-780.
48. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Teral M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant cardiomyogenic potencial of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007;25:2017-2024.
49. Nyolczas N, Gyongyosi M, Gilbert B, Dettke M, Graf S, Sochor H, Christ G, Edes I, Balogh L, Krause K, Jacquet K, Kuck K, Benedek I, Hintea J, Kiss R, Preda I, Kotevski V, Pejkov H, Dudek D, Heba G, Sylven C, Charwat S, Jacob R, Mavrer G, Lang I, Glogar D. Designed and rationale for the Myocardial Stem Cell Administration After Myocardial Infarction (MYSTAR) Study. *Am Heart J* 2007;153(2):212e1-212e7.
50. Kline RM. Whose blood is it anyway? *Sci Am* 2001;284:42-49.
51. Annas GJ. Waste and longing the legal status of placental-blood-banking. *N Engl J Med* 1999;340:1521-1524.
52. Ferreira E, Pasternak J, Bacal N, de Campos Guerra JC, Watanabe FM. Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:1041.
53. Hayani E, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D, Salvi S. First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia. *Pediatrics* 2007;119: 296-300.
54. International Forum: Cord blood banking. *Vox Sang* 2008;95:335-348.
55. Cairo MS, Kurtzberg J, Lubin B, Shearer W. Cord blood banking for potential future transplantation. *Pediatrics* 2007;119:165-170.
56. Rowley JD. Backtracking leukemia to birth. *Nat Med* 1998;4:150-151.
57. Schaffer A, Buchler C. Concise review: Adipose Tissue derived stromal cells-Basic and clinical implications for novel cell based therapies. *Stem Cell* 2007;25:818-827.
58. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause V, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005;33:1402-1416.
59. Rodriguez A, Silvera G, Goitino R. Utilización de gel de plaquetas autólogo en trasplante parcial de hueso maxilar inferior. A propósito de un caso. Primer Congreso uruguayo de Anatomía Patológica, Biología Celular y Molecular en trasplante. Primera Jornada Franco-Uruguay en trasplantes y Primera Jornada en Trasplantes del Mercosur. Hospital de Clínicas, Montevideo-Uruguay 12-14 de mayo de 2008.
60. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-1299.
61. Castrillo A. Gel plaquetario: que hay de cierto? Boletín de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) 2007;19:48-52.
62. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984;27:459-461.
63. Tsubota K, Goto E, Shimmura, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999;106:1984-1989.
64. Lopez-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J. Aplicaciones del suero autólogo en oftalmología. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007;82:9-20.
65. Reesink HW, Panzer S, Dettke M, Gabriel C, Lambertmont M, Deney SV, Sondag D, Dickmeiss E, Fisher-Nielsen A, Kortonen M, Krusius T, Ali A, Tiberghien P, Schrezenmeier M, Tonn T, Selfried E, Kwtter H, Politis C, Stavropoulou-Gioka A, Parada M, Flesland O, Nascimento F, Balint B, Marin P, Bart T, Chen FE, Pamphilon DH. New cellular therapies: Is there a role for transfusion services? *Vox Sang* 2009;97:77-90.

Historia de las Enfermedades Infecciosas Transmisibles por la Sangre

Sífilis

La historia de las enfermedades infecciosas transmisibles por la sangre comienza con la sífilis. Sin embargo, ésta es al igual que el SIDA una enfermedad principalmente de transmisión sexual que afectó, desde la época de Cristóbal Colón, a grandes personalidades sin respetar clases sociales o razas. Se dice que sufrieron la enfermedad “venérea” (por Venus, la diosa del amor) pintores como Vincent Van Gogh y Paul Gauguin, poetas como Baudelaire o músicos como Schubert, Liszt o Beethoven al cual le causó su sordera por toque neurológico del octavo par.

No se sabe si Colón la trajo a América o por el contrario la llevó del nuevo mundo al viejo continente.

Fue bautizada como “sífilis” en 1530 por una poesía del médico italiano Girolamo Fracastorius en la cual el pastor Syphilus fue castigado con la enfermedad por llevar una vida inmoral llena de vicios. La medicina le dio a la enfermedad el nombre latín “lúes” que significa epidemia.

El 3 de marzo de 1905, en la clínica La Charité de Berlín, el médico Erich Hoffmann y el zoólogo Fritz Schaudinn identifican el agente causante de la sífilis, el *Treponema pallidum* (era casi transparente y solo visible al microscopio mediante contraste de fase o fondo oscuro). Hasta 1909 la enfermedad era tratada con inyecciones o vapores de mercurio lo que llevó a los dichos populares “Por una hora con Venus, veinte años con Mercurio” o al de “Es peor el remedio que la enfermedad” dado por la toxicidad del mercurio y los efectos graves que tenía para la salud del paciente que inclusive podían llevarlo a la muerte (1).

Buscando la “bala mágica” es decir un medicamento inocuo para el organismo pero efectivo para destruir el agente de esta enfermedad, en 1909, el médico alemán Paul Ehrlich desarrolló un compuesto químico con arsénico denominado Salvarsan (arsfenamina o compuesto 606) que se convirtió en la primera quimioterapia para el tratamiento de la sífilis. En 1912, se produce el Neosalvarsan menos tóxico que el primero. El período arsenical se extiende desde 1910 hasta 1943. El médico alemán Gerhard Domagk describe las sulfamidas y en 1929 Alexander Fleming la Penicilina. Quienes descubrieron los fármacos, que cambiaron radicalmente la evolución de esta enfermedad, recibieron el premio Nobel, Ehrlich en 1908, Domagk en 1939 y Fleming en 1945 junto con el médico australiano Howard Florey y Ernest Chain, quienes continuaron los trabajos de Fleming y promovieron la fabricación y empleo masivo de la penicilina. Sin embargo, quienes descubrieron el agente causal hace más de 100 años no lograron igual reconocimiento.

En 1932 Domagk demostró la eficacia de las sulfamidas en infecciones producidas por estreptococos. En 1935 se publica el trabajo y se comercializa la sulfamidocrisoidina o más conocida por prontosil rubrum por su color. Luego de tres años de experimentación en animales Domagk utiliza la sulfamidocrisoidina en una infección en su propia hija, tratamiento que la libró de la amputación de un brazo. Pero, una de las noticias que más se difundió a través de la prensa internacional sobre el tratamiento de esta nueva droga fue su empleo en un hijo del presidente norteamericano Roosevelt durante su ingreso

a un hospital de Boston por una infección de amígdalas grave. El New York Times del 17 de diciembre de 1936 titulaba “Young Roosevelt saved by new drug”.

Desde la instauración de los prestigiosos Premios Nobel en 1901, se han producido situaciones polémicas tanto en la selección de los candidatos como en los actos de entrega oficial. El caso de las sulfamidas contribuyó a esta trastienda de los Nobel debido a que Gerhard Domagk a pesar de recibir esta distinción en 1939 no pudo recoger el premio porque Hitler impidió que él y otros galardonados de origen alemán recogieran sus distinciones como protesta a la concesión en 1935 del Nobel de la Paz a Carl von Ossietzky, líder pacifista alemán que por entonces se encontraba en un campo de concentración nazi acusado de traición y espionaje. Si bien ocho años más tarde Domagk pudo recoger el galardón no se le permitió recuperar el premio en metálico (2).

Cuando las sulfamidas se introducen en 1930, Mahoney y colaboradores del Venereal Disease Research Laboratory demuestran la eficacia de esta droga en el tratamiento de la gonorrea (3). Wallace y sus colegas de la clínica Mayo, publican en mayo de 1943, que la penicilina fue efectiva en el tratamiento de la gonorrea resistente al tratamiento con sulfas (4). Mahoney junto con Arnold, basados en este trabajo, comienzan a probar la penicilina con espiroquetas, primero in vitro sin obtener resultados y luego in vivo en ratas sifilíticas donde la penicilina resulta efectiva para tratar la sífilis. En junio de 1943, Mahoney, Arnold y Harris comienzan el estudio en humanos. Los resultados preliminares de cuatro pacientes se presentaron en el Meeting de la American Public Health Association en New York en octubre de ese año y se publicaron en diciembre (5). A estos cuatro pacientes se le administraron seis inyecciones intramusculares de penicilina durante 8 días.

En 1944, Pfizer abre la primera planta en Brooklyn New York, para producir penicilina a gran escala.

En 1906, el bacteriólogo alemán August Paul Wassermann introduce la primera prueba diagnóstica que permitió diagnosticar con mayor certeza la sospecha clínica. Pero, esta reacción daba muchos resultados falsos positivos y negativos. Luego se introduce la prue-

ba ideada por el médico americano Leon Kahn la cual produce menos resultados falsos positivos.

En 1960 aparece la Venereal Disease Research Laboratory o VDRL seguida de la reacción RPR carbón que es la que se utiliza en la actualidad como tamizaje en los donantes de sangre para detectar la infección por el *Treponema pallidum*. Es una prueba rápida en placa, de floculación con carbón activado que determina la presencia de anticuerpos reagínicos en suero o plasma. No es patognomónica de sífilis y como con todos los antígenos tipo cardiolipina pueden ocurrir resultados falsos positivos que pueden ser causados por anticuerpos antifosfolípidos, lupus u otras enfermedades autoinmunes e infecciones virales.

Como la RPR identifica anticuerpos no treponémicos un resultado positivo se debe confirmar por pruebas utilizan antígenos treponémicos como el FTA-adsorbido o la TPHA.

En el primer servicio de donantes de sangre creado por Percy Oliver en Londres en 1921, a cada donante voluntario se le realizaba una entrevista con un examen físico, la determinación del grupo sanguíneo ABO y la prueba para la sífilis antes de ingresar al panel de donantes (Primer Banco de Sangre vivo o Servicio de Donantes).

En Uruguay, en lo referente a la transmisión sanguínea de la sífilis, conocemos la cita bibliográfica de 1944 de Invernizzi y Yannicelli, que eran directores de la Central de Sangre y Plasma creada en 1942, sobre la “Exclusión de la sífilis y otras enfermedades infecciosas en los dadores de sangre” refiriéndose a dos pacientes así contaminados, en un hospital de Montevideo, por un dador profesional (6). En el Curso de Hemoterapia que organiza la Central de Sangre y Plasma de la Facultad de Medicina en 1947, Talice menciona esta cita y se refiere a la realización de exámenes de laboratorio sistemáticos a los donantes de sangre así como a la esterilización espontánea de la sangre in vitro. Se ha demostrado dice, que la sangre que se conserva en heladera a 4 grados más de cuatro días y el plasma más de dos días a -20 centígrados, no transmiten la sífilis.

Según datos aportados por el Servicio Nacional de Sangre, en el período comprendido entre 1994 y 2004 la prevalencia de los anticuerpos anticardiolipina en los donantes

de sangre es de 0,76% al principio y al final del período obteniéndose el valor más bajo en 1998 (0,57%) y el más alto en el 2001 (1,0%). Estos resultados son de pruebas de tamizaje sin tests confirmatorios aunque las unidades igual son descartadas.

A pesar de los siglos transcurridos desde que la sífilis hizo irrupción y los avances en su prevención, diagnóstico y tratamiento, la sífilis sigue tan campante, produciendo en nuestra época millones de casos en todo el mundo por transmisión sexual y congénita. Puede evitarse mediante precauciones higiénicas muy elementales, como el uso de preservativo, pero lamentablemente poco aplicadas.

La palabra preservativo tiene un sinónimo: el condón. Etimológicamente condón puede provenir de la palabra latina “condus” que significa receptáculo, aquel que recoge o preserva de algo o “condare” que significa proteger. Algunos se inclinan por la hipótesis de que la palabra deriva del médico Cockburn, otros dicen de Condom, médico del rey Carlos II de Inglaterra quien lo habría inventado ya que a su majestad le preocupaba enormemente la paternidad no deseada. Otros atribuyen el invento al coronel Cundum de la guardia real del mismo rey. A mediados de 1500, un anatomista Gabrielle Fallopio, preocupado por la sífilis, recomendó envolver el glande en tela de lino empapada en una solución antiséptica siendo este el primer preservativo artificial. Después, la fabricación de preservativos estuvo dominada por las tripas de cerdo, de ternera, de cordero o de borrego. Cuando se descubre el árbol del caucho y la vulcanización (agregar compuestos sulfurosos para mejorar su resistencia) por Goodyear en 1839, los preservativos se hicieron de látex.

Enfermedad de Chagas

Se cumplen 100 años desde que Carlos Chagas, un joven médico de Brasil, describe por primera vez una enfermedad infecciosa que se produce principalmente en las casas rurales de adobe y paja, a través de la picadura de un insecto hematófago del género *Triatoma* (vinchuca) que lo hace en la noche y en la cara por lo cual se le denominó “kissing Bug” o el beso del barbero. En 1909, Chagas identifica el agente en la sangre el cual es un protozoario al que denomina *Trypanosoma cruzi* en honor a Oswaldo Cruz que era su maestro.

Describe el ciclo de vida del parásito, como se transmite, los reservorios y establece las medidas preventivas. En 1911, diagnostica el primer caso congénito y establece la posibilidad que la enfermedad afecte el aparato digestivo (7).

La posibilidad de su transmisión sanguínea fue sugerida por Mazza en Argentina en 1936 (8) pero los primeros donantes de sangre infectados se encontraron en Brasil en 1949 (9) y los primeros casos de Chagas transfusional fueron publicados en 1952 (10). Al año siguiente se comienza a utilizar el violeta de genciana en la sangre constituyéndose en el primer método de inactivación de agentes patógenos transmitidos por la sangre (11). La tripanosomiasis americana es un problema de toda América Latina. En 1991 los países del Cono Sur seguidos luego por los del Área Andina con los auspicios y soporte de la OPS se plantean como objetivo eliminar la infección domiciliar por el *Triatoma infestans* y el completo control de la transmisión sanguínea mediante el tamizaje de todos los donantes de sangre en los próximos 10 años (12). En 1998 la Asamblea de la OMS establece como una de las principales prioridades el control de la enfermedad de Chagas (13).

En nuestro país, en el curso de Hemoterapia organizado por la Central de Sangre y Plasma de la Facultad de Medicina en 1947, Talice profesor de Parasitología y subdirector del Instituto de Higiene, dice “Más importante nos parece llamar la atención sobre la posible transmisión de otra hemoprotozoosis, la enfermedad de Chagas por la frecuencia continental y nacional de esta enfermedad que recién empieza a conocerse (10% de los niños infectados en la zona endémica del Uruguay). Creemos debe tenerse en cuenta en adelante la posibilidad del Chagas transfusional, tratando de evitarla mediante el estudio adecuado de los dadores y muy especialmente practicando en ellos, en forma sistemática como en la sífilis, la reacción de desviación del complemento de Guerreiro-Machado, la cual puede considerarse sensible y específica” (6). La prueba para detectar la enfermedad de Chagas se establece como obligatoria para ser realizada a todos los donantes de sangre a partir de 1985 (Decreto PE 193/85). Al revés que en la sífilis, el *Trypanosoma cruzi* permanece viable por lo menos 18 días a temperaturas

de 18 grados (14) y por más de 250 a temperatura ambiente (15). Congelado también es infectante por períodos prolongados (16).

El tamizaje universal de la sangre donada descendió dramáticamente el riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas en toda América Latina (17).

En Uruguay, la transmisión vectorial se ha detenido según lo declaró un grupo de expertos de la OPS/OMS en 1997 (18). No han aparecido nuevos casos agudos por transmisión vectorial según el Programa Nacional de Chagas del MSP. El primer caso agudo registrado de enfermedad de Chagas en nuestro país fue el descrito por Talice en Paysandú en abril de 1937 y el último registrado por transmisión vectorial en Tacuarembó en 1984 (19).

Existen aproximadamente 40.000 casos en etapa crónica de la enfermedad. La infección congénita es el único mecanismo de transmisión presente actualmente en Uruguay (20).

El riesgo de transmisión congénita es de aproximadamente el 4% lo que justificó el decreto del PE 4085/95 que establece la obligatoriedad de incluir la serología para Chagas dentro de los exámenes de control obstétrico para los 13 departamentos endémicos y la maternidad del Hospital Pereira Rossell en Montevideo.

Según datos aportados por el SNS, en el período 1994 a 2004, se registró una prevalencia de reacciones serológicas reactivas para la enfermedad de Chagas de 0,62% en 1994 y 0,3% en el 2004 que constituye el valor más bajo del período mientras que el valor máximo fue en el 2001 con 0,67%.

Otras medidas asociadas al tamizaje serológico disminuyen el riesgo transfusional de la enfermedad de Chagas. Una de ellas es la leucorreducción de los hemocomponentes celulares utilizando filtros específicos (21), lo cual ya se realiza hace varios años en nuestro país aunque no de forma universal.

A partir de 1980, los países del primer mundo sobre todo USA y Europa, han tomado conciencia que debido a los fenómenos migratorios de individuos de Centro y Sudamérica, se podía transmitir la enfermedad de Chagas por donación de sangre. En USA, se calculaba que en la década del 90 existían aproximadamente 100.000 personas infectadas (22).

Estos países de áreas no endémicas, toman como medidas preventivas excluir como do-

nantes a todas las personas que admitan haber nacido en países endémicos o haber nacido de padres que vivieron en áreas endémicas o que recibieron transfusiones de hemocomponentes en esos países. La otra alternativa es realizar la búsqueda de anticuerpos anti-tripanosoma en la sangre donada. En un estudio realizado en España, durante cinco años, la prevalencia fue de 0,9% de unidades reactivas (23).

En algunos países ya se están aplicando métodos de inactivación de patógenos como el azul de metileno con irradiación ultravioleta que se ha demostrado es efectivo para inactivar virus, bacterias y parásitos entre ellos el *Tripanosoma cruzi* (24). Emma Castro, en el Centro de Donación de Sangre de la Cruz Roja de Madrid ha publicado recientemente, en la revista *Transfusion* de marzo de 2007 la efectividad de otro método de inactivación usando psoralen y luz ultravioleta para inactivar el *Tripanosoma cruzi* de un pool de plaquetas obtenidas del buffy coat (25). En julio de 2007, tuvimos oportunidad de visitar dicho centro y observar la realización de la técnica de inactivación (Intercept Blood System) en el plasma y los concentrados plaquetarios.

Hepatitis

Después de la segunda guerra mundial aparecen un importante número de casos de ictericias luego de una transfusión. El cuadro clínico fue denominado inicialmente ictericia por suero homólogo. Pero, como la ictericia producida por la hepatitis puede faltar (hepatitis anictéricas) la mejor denominación era hepatitis postransfusional (HPT).

Se admite que el agente causal es un virus filtrable que pasa fácilmente a través de los filtros bacteriológicos (26). Recién en 1963, Baruch Blumberg (27) un genetista que trabajaba en los National Institutes of Health (NIH) de USA, descubre el virus de la hepatitis B en el suero de un aborigen australiano. Inicialmente denominado "red antigen", luego antígeno Australia (Au) y finalmente antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) como se conoce actualmente. De forma interesante el Au fue encontrado en el 0,1% de los donantes de sangre pero en el 10% de los pacientes con leucemia (28). En 1964, Blumberg se muda al Institute for Cancer Research en Philadelphia donde sigue estudiando la posible asociación del Au como mayor susceptibilidad a

desarrollar leucemia. Sin embargo, estudios posteriores demuestran que el antígeno es específico para el virus de la hepatitis B (29) y los pacientes con leucemia eran portadores del virus por ser politransfundidos e inmuno-deprimidos.

El descubrimiento de esta proteína de la envoltura del virus trajo como consecuencia el desarrollo posterior del primer reactivo de tamizaje para los donantes de sangre y de la vacuna que no sólo previene la infección sino el desarrollo del carcinoma hepatocelular asociado a la infección del virus de la hepatitis B (HBV). En 1971, Merck desarrolla una vacuna de subunidades del HBV hechas a partir de HBsAg purificado de la sangre de individuos infectados. En 1980, el Banco de Sangre de New York y Merck demuestran que la vacuna proporcionaba una protección superior al 90% y no tenía efectos secundarios adversos. A partir de 1981, la vacuna estuvo disponible para uso universal. Pero, la producción de esta vacuna en gran escala se vio obstaculizada por la necesidad de donantes infectados con HBV y por la posibilidad de que esa sangre estuviera contaminada con otros virus. De esta manera, Merck utiliza HBsAg recombinantes derivados de levadura en lugar de antígenos derivados del plasma sanguíneo. Esta vacuna recombinante fue la primera en su tipo para uso en humanos la cual fue autorizada por la FDA en 1986 tras nueve años de investigación.

Antes de 1970, la incidencia de HPT era superior al 30% en pacientes transfundidos por ejemplo en cirugía cardíaca (30) y principalmente por la sangre de donantes remunerados.

En 1970, los NIH Blood Bank simultáneamente adoptan la donación voluntaria y utilizan el primer test para el estudio de la hepatitis B en la sangre donada. La implementación de estas dos medidas tuvo un impacto inmediato en la reducción de HPT al 10%. En 1973 se introduce un reactivo de segunda generación ELISA con mayor sensibilidad que el primero lo que se traduce en una caída de la incidencia de la HPT al 6%. Luego, Feinstone, Kapikian and Purcell en los NIH descubren el virus de la hepatitis A (HAV) (31). Inmediatamente se estudian los sueros de los casos de HPT donde no se detectó el HBV. Sorpresivamente en ningún suero se detectó el HAV por lo cual debía existir otro virus de hepatitis no cono-

cido. Por ello a este 6% de HPT residuales se les denominó “no A no B”.

En 1980, para el diagnóstico y prevención de las HPT se asocian como marcadores serológicos la determinación del antígeno “core” del HBV y la enzima alaninoaminotransferasa pero tienen un efecto moderado sobre la prevalencia de la HPT que cae en 1989 al 4%. En ese año, Houghton y colaboradores (32), en la Chiron Corporation descubren el agente del la HPT noA noB y lo denominan virus C (HCV). Aparece el primer reactivo comercial que es utilizado en los donantes de sangre disminuyendo la incidencia de la HPT del 4 al 1,5% y con la introducción de la segunda generación de reactivos prácticamente la incidencia cae al 0,3%.

En Uruguay, la determinación rutinaria y obligatoria en los donantes de sangre para hepatitis B (HBsAg) ocurre a partir de 1985 (33), de la hepatitis C en 1995 (34) y del anticuerpo anti-core de HBV a partir del año 2001 (35).

Según datos aportados por el SNS la prevalencia del HBsAg por técnicas de tamizaje en los donantes de sangre en el período 1995-2005 fue de 0,48% en 1995 (valor máximo) y 0,3% en 2005 con un valor mínimo de 0,24% en los años 1998 y 1999.

El HCV en el mismo período tuvo una prevalencia de 0,46% en 1995 y de 0,40 en 2004 con un valor mínimo de 0,29 en 1999 y un máximo de 0,5% en 1996.

Los anticuerpos anti-core de HBV que se comenzaron a realizar obligatoriamente tuvieron una prevalencia de 1,9% en el primer año, 1,99% en 2002, 2,11% en 2003 y 1,9% en 2004.

Retrovirus

En 1981, se reporta una inusual incidencia de infecciones oportunistas (principalmente por *Pneumocystis carinii*) y de Sarcoma de Kaposi en pacientes homosexuales de la costa este (New York) y oeste (San Francisco, California) de USA y por ello, en un primer momento, se le denomina la “peste rosa”. Pero, este síndrome de inmunodeficiencia adquirida se propaga rápidamente y al año del primer caso, en 1982 existían 355 casos en USA en homosexuales pero también en usuarios de drogas intravenosas y haitianos (36).

El Centro de Control de Enfermedades de

USA, definió al Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida (SIDA) en 1982.

Se plantea la posible transmisión por transfusión cuando a finales de 1982 se observaron tres casos en pacientes con hemofilia A en donde el único factor de riesgo eran los concentrados comerciales de factor VIII que aparecieron en el mercado en la década de 1970 (37). Esta sospecha, se confirma al año siguiente, en 1983, cuando un niño multitransfundido desarrolla inmunodeficiencia e infecciones oportunistas y uno de los donantes de plaquetas del niño desarrolla SIDA 10 meses después de la donación (38). A falta de un agente identificado y por ende de un test de diagnóstico específico, los casos por transfusión siguieron ocurriendo.

Uno de los mayores desastres iatrogénicos de la historia de la medicina lo constituyó la infección de los pacientes hemofílicos que recibían factores de la coagulación comerciales preparados a partir de grandes mezclas de plasma humano. Con la infección de un único donante se contaminaba todo el lote por lo cual hubo un tremendo efecto de amplificación. En USA, en 1984, el 74% de los pacientes con hemofilia A y el 39% con hemofilia B estaban infectados con el HIV (39). El 90% de ellos se infectaron probablemente antes de 1981 en que se describe el primer caso. Además, en la mayoría de los países del primer mundo donde se utilizaban estos concentrados comerciales los pacientes con hemofilia se infectaron también con el virus de la hepatitis C en un alto porcentaje.

En 1983, Barré-Sinoussi y Montagnier (40) del Instituto Pasteur de París, aislaron una partícula viral de los ganglios linfáticos de un paciente al que denominaron LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). Pertenecía a la familia de los retrovirus de los cuales que ya se conocían dos tipos de virus linfotrópicos humanos (HTLV-I y HTLV-II) descritos unos pocos años antes por Robert Gallo en Bethesda, USA. Con el fin de confirmar el hallazgo los investigadores franceses envían a USA muestras de los virus aislados y fue allí, en 1984 donde se logró cultivar el virus denominándolo HTLV-III (41).

Dos años después, la OMS decidió utilizar una terminología única denominando al virus como de la inmunodeficiencia humana (HIV en inglés y VIH en español) sustituyendo al

LAV de la escuela francesa y el HTLV de los científicos americanos.

Por este descubrimiento los Dres Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier reciben el premio Nobel en 2008 junto con Harald zur Hausen del German Cancer Research de Heidelberg en Alemania por el descubrimiento de que el papiloma virus produce cáncer de cuello uterino. El equipo de Gallo, en 1984, desarrolla la primera prueba de detección de anticuerpos específicos contra el VIH lo cual permite detectar individuos infectados asintomáticos en los donantes de sangre. Desde 1985, esta prueba fue obligatoria en toda la sangre donada en USA. En Uruguay se realiza rutinariamente a partir de 1988 (42) para evitar la transmisión del VIH por transfusiones.

Desde la implementación del tamizaje serológico de los donantes de sangre en USA solo 49 casos de HIV asociado a transfusión fueron identificados probablemente debido al período de ventana inmunológica que se produce en las pruebas de anticuerpos. Por ello, a partir de 1990 se introducen los test de ácidos nucleicos (NAT).

En 1985, un nuevo retrovirus fue aislado por el mismo grupo de científicos del Instituto Pasteur de París, en pacientes con SIDA del oeste de África que tenían estudios serológicos repetidamente negativos para HIV. Este nuevo virus que tenía una morfología y biología similar al anterior, difería en algunos componentes antigénicos y fue denominado LAV-2, luego HIV-2 (43). En 1990, la FDA autoriza los reactivos de ELISA para HIV-2.

En Uruguay, los primeros reactivos de diagnóstico para HIV por ELISA llegaron a fines del año 1986, mediante donación, a la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas por parte del laboratorio Abbott. A partir de 1987 planeamos la realización de un estudio de vigilancia centinela. En 1991, comenzamos a usar, también en la Cátedra de Hemoterapia, los estudios serológicos de VIH-2 en poblaciones de riesgo. En la actualidad, existen reactivos mixtos que detectan ambos virus y algunas variantes descritas posteriormente como el HIV-0, tanto para los virus del SIDA como para los HTLV-I/II.

A principio del año 1987, recibimos en el Hospital de Clínicas, con enorme satisfacción, la visita de Guillermo Dighiero quien tenía una destacada actuación en el Instituto Pasteur

de París precisamente donde se habían descubierto los virus del SIDA. Durante su visita plantea a la Dirección del Hospital de Clínicas el nombramiento de un médico del hospital que esté trabajando en el tema para concurrir a un curso sobre SIDA que se desarrollará en París en el mes de junio de 1987. Con gran agrado, la Dirección del Hospital designa a Jorge Decaro. Concurrimos en el mes de junio al curso teórico-práctico que se realiza en la Facultad de Medicina de París. Dentro de lo teórico se trata la epidemiología e historia natural de la infección por HIV, la virología del HIV1 y el HIV2, la inmunología, la clínica (sistema respiratorio, digestivo, nervioso, hematología, bucal y siquiatría), SIDA en la gestación, donantes de sangre, serodiagnóstico, prevención de la infección, desinfección e higiene hospitalaria, formación del personal y la estrategia de lucha contra la infección.

Se dictan dos talleres prácticos, uno sobre el diagnóstico clínico y otro sobre el diagnóstico paraclínico (inmuno-virología, parasitología y micología).

A mi regreso a Uruguay, escribo el Manual para el personal de la salud sobre SIDA el cual recibe el Premio "El País" 1987 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Fue prologado por Hugo Villar Director del Hospital de Clínicas y se distribuyó de forma gratuita (44) (figura 9.1).

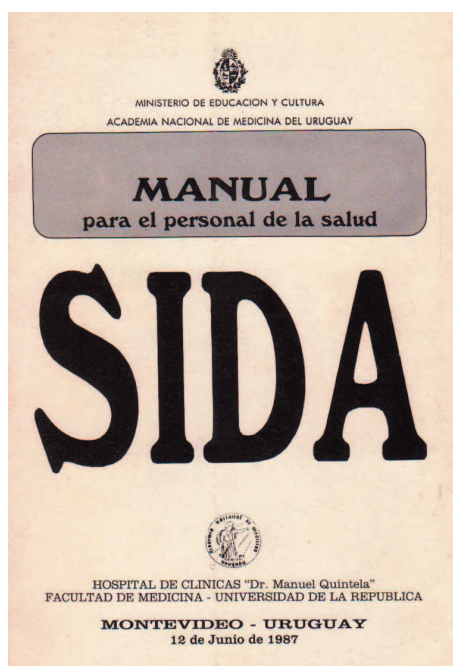


Figura 9.1 - Manual para el personal de la salud. SIDA. Premio "El País" 1987 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional.

El 29 de setiembre de 1987, el Poder Ejecutivo dispuso la creación de una Comisión Interministerial e Interinstitucional de Lucha contra la Infección VIH-SIDA. Para integrarla se nombraron como representantes del Hospital de Clínicas y Facultad de Medicina a Jorge Decaro, José Piquinela, Probo Pereyra y Héctor Purtcher.

El HTLV-I fue el primer retrovirus humano aislado en 1978 y publicado en 1980 por el equipo de Robert Gallo en USA (45). Este retrovirus ha sido asociado etiológicamente con un tipo de leucemia a células T (CD4+,CD25+), que afecta a adultos por lo general mayores de 40 años, con un cuadro clínico muy agresivo. Este tipo de leucemia es endémica en zonas de Japón, el Caribe, África e Italia. La mayoría de los enfermos tienen una elevada concentración de anticuerpos anti-HTLV pero, también en 1985 se detectaron estos anticuerpos en el 5 a 15% de la población general en zonas endémicas (46) (47).

Se acepta entonces que el HTLV-I es el agente etiológico de esta leucemia y que se desarrolla con un período de incubación prolongado de 15 a 20 años.

Pero, el HTLV-I también se asocia a enfermedades neuromusculares con un período de incubación más corto, meses o años, aún en zonas no endémicas como USA, Europa y Sudamérica (48) (49) (50).

En 1990, se publica en el New England Journal of Medicine (51), un caso de un paciente de 41 años que es sometido a un trasplante cardíaco en Francia. A los 8 meses del trasplante desarrolla una paraparesia espástica con anticuerpos anti-HTLV-I positivos. La muestra previa al trasplante era negativa para estos anticuerpos. Como el paciente carece de otros factores de riesgo para la infección por HTLV-I salvo las 69 unidades de hemocomponentes recibidos durante el trasplante, se decide estudiar a los 58 donantes de sangre implicados. Solo se pueden examinar serológicamente 36 pero uno de ellos, una mujer de 47 años originaria de Martinica, presenta anticuerpos anti-HTLV-I (52).

A partir de este caso, donde se demuestra la transmisión sanguínea del HTLV-I a través de donantes aparentemente normales, se decide en Francia el estudio rutinario de anticuerpos anti-HTLV-I a todos los donantes de sangre. Similar actitud se toma en USA, Canadá

y áreas endémicas. En Francia, la prevalencia de los anticuerpos anti-HTLV-I en donantes de sangre fue de 0,011% a principios de la década de 1990(53). En países de América Latina, donde no se realiza el estudio rutinario a los donantes de sangre, estudios pilotos muestran una prevalencia de 0,42% en Brasil, 0.33% en México y 0,55% en Chile.

A principios de la década de 1990, al igual que en Francia, realizamos en la Cátedra de Hemoterapia en el Hospital de Clínicas el diagnóstico serológico del primer caso de transmisión transfusional de HTLV-I en nuestro país y gracias a los reactivos de aglutinación de partículas de gelatina (Fujirebio-Serodia) de origen Japonés (figura 9.2), donados por el Laboratorio Bayer para la realización del estudio de vigilancia centinela. La paciente originaria de San José concurrió a un IMAE de Montevideo para realizarse una cirugía cardíaca donde recibió transfusiones de sangre. A los meses de la cirugía desarrolla una mielopatía difusa (paraparesia espástica) por lo cual es atendida por los neurólogos Salamano y Favat quienes enterados de que estábamos realizando el diagnóstico de HTLV-I en la Cátedra de Hemoterapia nos solicitan el estudio serológico de la paciente. Se detectan anticuerpos anti-HTLV-I en el suero de la misma y se envían las muestras al Laboratorio de la Dra Courucé en Paris para realizar el estudio confirmatorio. El Western Blot realizado muestra una positividad a todas las proteínas del virus HTLV-I con lo que se confirma la infección (figura 9.3). De manera similar al caso francés, se demuestra y se publica la transmisión transfusional en una paciente sin otros factores de riesgo para la infección por HTLV-I (54).

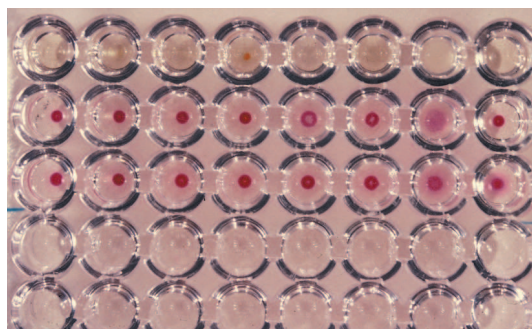


Figura 9.2 - Aglutinación de partículas de gelatina (Fujirebio-Serodia) utilizada en el Hospital de Clínicas, Cátedra de Medicina Transfusional a principio de la década de 1990 para el diagnóstico serológico de los virus linfotrópicos humanos (HTLV).

**CENTRE DE TRANSFUSION SANGUINE ET D'HEMOBIOLOGIE
PITIE-SALPETRIERE**

Laboratoire d'immunologie des marqueurs viraux
Dr C.Fretz - Dr A.Boudifa - G. Jourdan Tel : 45703378

Nom :
Prénom :
Sexe :
Date de naissance :
Service demandeur :

Date de prélèvement :
Date de réception : 5 Oct 94
N° de prélèvement : 5 763 624

Technique ELISA : Test Ortho Diagnostic Systems

R = HTL (hors limite) Positif

Technique Western Blot HTLV : Test Bioprim

p19	p24	p26	p28	p32	p36	gp46	p53	rgp21	rgp46-I	rgp46-II
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Résultat : Positif HTLV I.

LABORATOIRES SÉROLOGIQUES - R.I.A.
CENTRE DE TRANSFUSION SANGUINE
PITIE-SALPETRIERE
Rue de Cassette Infirmerie
Paris 13
47, Bd de l'Hôpital
75681 PARIS CEDEX 13

Figura 9.3 - Western Blot para HTLV realizado en el Centre de Transfusion Sanguine et D'Hémo-biologie Pitié-Salpêtrière de Paris-Francia, en octubre de 1994. El suero de la paciente, cuyo nombre ha sido ocultado en el resultado por razones éticas, mostró una reactividad intensa para todas las proteínas del virus confirmándose de esta manera el primer caso de transmisión por transfusión en el Uruguay del HTLV V cuya determinación fue obligatoria en los donantes de sangre recién a partir del año 2001.

En Uruguay, en un estudio piloto que publicamos en Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes en 1992, sobre 266 donantes de sangre estudiados 6 fueron reactivos por aglutinación de partículas de gelatina (APG) de los cuales 2 (0,75%) fueron confirmados por Western Blot y por radioinmunoprecipitación (RIPA) por Guillermo Muchinik del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Dr Mariano Castex" de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina (55).

La determinación rutinaria de HTLV a todos los donantes de sangre comienza de forma obligatoria en nuestro país a partir de la aplicación del Reglamento Técnico de Medicina Transfusional del MERCOSUR en el año 2001 (35).

En 1994, realizamos un trabajo titulado "Diagnóstico serológico de HTLV-I" que se incluye en la publicación de la Oficina del Libro sobre Retrovirus y Sistema Nervioso cuyos coordinadores fueron los Ronald Salamano y Juan Favat (56).

Estudio de vigilancia centinela sobre virosis transmitidas por transfusión de hemocomponentes

En las infecciones virales, que se transmiten por vía sanguínea y/o sexual, individuos aparentemente sanos, aún sin saber que están infectados, pueden diseminar las virosis en la población general. La vigilancia epidemiológica centinela es la recolección sistemática de datos sobre la incidencia, prevalencia y tendencias de la infección en poblaciones seleccionadas. Las encuestas serológicas de la población general pueden proporcionar información sobre la prevalencia y distribución de la infección en la población en un momento dado. Sin embargo, este tipo de encuestas requieren una cantidad enorme de personal y recursos para su planificación y ejecución.

Para observar el nivel y las tendencias de la infección en varios subgrupos y zonas geográficas, es más efectivo obtener información de grupos de población seleccionados de acuerdo al riesgo de infección. Los grupos de individuos de mayor riesgo de infección son aquellos cuyos estilos o condiciones de vida facilitan la transmisión. Los grupos de mayor riesgo de transmisión sanguínea incluyen los usuarios de drogas intravenosas, los pacientes politransfundidos o el personal de la salud expuestos al contacto rutinario o extenso con sangre. Los grupos de bajo riesgo son aquellos individuos que viven estilos o condiciones de vida no conducentes a la transmisión de la infección. Es importante identificar estos grupos pues el éxito del control depende de la medida en que se pueden reforzar y mantener los comportamientos de bajo riesgo. La vigilancia de estos grupos también es necesaria ya sea para confirmar que las tasas de transmisión no suben o para detectar cuándo ocurren los cambios y de qué magnitud son.

Por dichas razones, realizamos a partir del año 1987, en la Cátedra de Hemoterapia en el Hospital de Clínicas un estudio de seroprevalencia de los retrovirus (HIV1-2 y HTLV-I/II) y del HCV en donantes de sangre y en grupos con mayor riesgo de adquirir estas infecciones víricas transmisibles por vía sanguínea. Mediante este estudio se pudo afirmar que la infección por HTLV estaba presente en Uruguay aunque con una prevalencia baja (0,36%) y por el momento limitada a grupos de riesgo. Tres de los 833 individuos estudiados pre-

sentaron anticuerpos anti-HTLV por APG y confirmados en el Instituto Mariano Castex de Buenos Aires. En los tres casos, existía otra infección transmisible por vía sexual o sanguínea (sífilis, hepatitis B o HIV).

Los anticuerpos anti-HIV se encontraron en 15 (0,044%) de los 33.791 donantes estudiados hasta el año 1992 con una alarmante tendencia alcista 2 (0,028%) en 1987 y 7 (0,096%) en 1992. Los estudios confirmatorios fueron realizados por WB en el laboratorio de referencia en Virología del MSP.

A su vez, 8 (9%) de los 87 pacientes con hemofilia A o B severa politransfundidos presentan anticuerpos anti-VIH. Una enorme diferencia en la prevalencia de la infección con los pacientes hemofílicos, como ya vimos, tratados en los países del primer mundo con factores de coagulación comerciales. Por razones de costo y disponibilidad de los factores comerciales los hemofílicos en nuestro país se siguieron transfundiendo con crioprecipitados o plasma de una población local de donantes de sangre con una baja prevalencia de infección.

Por el contrario, no se encontraron individuos infectados por el HIV-2.

Para el virus de la hepatitis C que recién se había descubierto en 1989 se presentó una prevalencia en el Uruguay del 5% en los pacientes en hemodiálisis crónica y del 45% en los pacientes hemofílicos politransfundidos.

Estos hallazgos, demuestran la necesidad de introducir la determinación de anticuerpos para HCV en los donantes de sangre lo cual se cumple en forma obligatoria a partir de 1995 (34).

El trabajo de vigilancia centinela realizado en la Cátedra de Hemoterapia por Jorge Decaro Estela Lavalle y Lilián García recibió el segundo premio del Gran Premio Nacional de Medicina del año 1991 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay (57).

En los tres primeros años en que se determinan los anticuerpos anti-HCV en los donantes de sangre en Uruguay la prevalencia fue de 0,46% en 1995, 0,50% en 1996 y 0,49% en 1997 para un total de unidades extraídas de 109.973, 116.127 y 115.490 respectivamente según datos informados por el Servicio Nacional de Sangre (SNS) (58).

A partir del año 2001, con la aplicación del Reglamento Técnico de Medicina Trans-

fusional, decreto PE 385/000, se comienza a realizar la determinación obligatoria de los anticuerpos anti-core del HBV y anti-HTLV I/II en los donantes de sangre los cuales se agregan a los que ya se venían realizando (sífilis, Chagas, HBsAg, HVC, HIV 1-2) sumando un total de siete determinaciones obligatorias.

Según la estadística nacional anual del SNS los anticuerpos anti-core tienen una prevalencia en los donantes de sangre de 1,9% en 2001, 1,9% en 2002, 2,1% en 2003 y de 1,9% en el 2004 mientras que los anti-HTLV muestran una prevalencia de 0,23%, 0,26%, 0,21% y 0,20% respectivamente.

Si bien la aplicación de las pruebas de tamizaje serológico de estos agentes en la sangre donada ha disminuido sensiblemente la transmisión de estas infecciones siempre queda un riesgo residual atribuible a las donaciones efectuadas en el período de ventana inmunológica y a los errores técnicos y administrativos que se puedan producir en todo el proceso donante-producto-receptor.

Cuando se utilizan tests de tercera generación para detectar anticuerpos anti-VIH en la sangre donada el período ventana es de 22 días. Con test de cuarta generación (combos) que determinan anticuerpos y el antígeno p24 del virus en forma simultánea, para las variantes 0 y M, el período ventana es de 16 días. Algunos Bancos de sangre de nuestro país, en los últimos años, utilizan estos test combos como diagnóstico del VIH. Con la aplicación de los test de ácidos nucleicos el período ventana se reduciría a 11 días (59). Si bien con la aplicación de los test de ácidos nucleicos (NAT) al tamizaje de la sangre donada se ha disminuido a niveles casi excepcionales la transmisión del VIH por transfusión de hemocomponentes, ésta todavía existe. Recientemente se han publicado trabajos de transmisión del VIH por transfusión de sangre con estudios previos NAT no reactivos (60)(61).

En el caso del virus de la hepatitis C (HCV) utilizando test de detección de anticuerpos de tercera generación el período ventana es bastante prolongado, de 70 días. Con la realización de los NAT se disminuiría a 12 días (59). Al igual que en el HIV, se están utilizando reactivos combos (detección de antígeno y anticuerpo) para HCV por enzimo-inmunoanálisis (ELISA) que reduciría el período ventana a niveles casi similares (26

días) a los NAT. Tienen como ventaja que es una técnica menos costosa, más fácil de realizar y en menos tiempo que los ensayos para HCV RNA. Es una buena opción para identificar precozmente una infección activa por HCV en aquellos lugares donde la tecnología de los NAT no se encuentra disponible como método de tamizaje para la sangre donada (62) (63) y a menor costo (64).

A pesar de que las técnicas de tamizaje de la sangre cada vez son más automatizadas, computarizadas y con protocolos estrictos, el hombre participa desde la identificación de la muestra hasta la exclusión del hemocomponente del stock. Por ello, el error humano, técnico y/o administrativo, puede estar presente e influir en la transmisión de agentes infecciosos. Para reducirlo se utiliza un algoritmo diagnóstico desde 1997.

El objetivo es que la muestra de sangre del tubo que estamos analizando con un resultado reactivo corresponda a la bolsa que se está eliminando del stock y en segundo lugar, que ese tubo corresponda fehacientemente al donante al cual le vamos a informar el resultado y realizar consejería.

En nuestro país, según datos aportados por el SNS, entre los años 1988 y 2002, se infectaron con VIH por transfusión de hemocomponentes 6 pacientes (1 cada 30 meses) de los cuales, 2 fueron por el período ventana y los restantes 4 pacientes por tres errores humanos. Se identifica un caso como probable cuando se produce una seroconversión en el receptor relacionada con una transfusión. Se confirma la transmisión sanguínea por transfusión cuando se identifica como infectada la o las unidades de hemocomponentes o la muestra de seroteca del donante existiendo una correspondencia entre genotipo del germen entre el donante y receptor. Para que este proceso de confirmación se cumpla adecuadamente deben existir un sistema de trazabilidad y de hemovigilancia. Se entiende por trazabilidad un sistema de registro de información que permita asegurar poder identificar cada componente en todo el proceso desde el donante al receptor(descendente) y viceversa, desde el receptor al donante (ascendente). La hemovigilancia es un sistema de búsqueda activa y prospectiva de las complicaciones de la transfusión de hemocomponentes (morbimortalidad). Para ello, es necesario que los

incidentes transfusionales sean identificados, investigados, diagnosticados, notificados y analizados de manera sistemática. El análisis de los datos aportados por la hemovigilancia permite tomar medidas preventivas, limitar el daño y responder rápidamente ante riesgos emergentes (65).

Nuestro país no tiene implementado un sistema de hemovigilancia por lo cual la incidencia de la transmisión transfusional de las enfermedades infecciosas es prácticamente anecdótica.

Los primeros países en establecer un sistema de hemovigilancia fueron Francia (66) y el Reino Unido (67). El término "hemovigilance" fue creado en Francia cuando a partir del año 1994 el reporte de todas las reacciones transfusionales fue obligatorio. En 1996, se implementó en el Reino Unido un sistema para registrar reacciones clínicamente severas producidas por transfusión (Serious Hazards Of Transfusion, SHOT).

En noviembre del año 2001 se establecen las recomendaciones de consenso para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con Hepatitis por el virus C en las cuales intervienen el MSP, el CASMU, el Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación Española y varias Sociedades Científicas relacionadas a esta infección, entre ellas, la Sociedad de Hemoterapia e Inmunohematología del Uruguay.

Basándose en estas pautas, pacientes hemofílicos con hepatitis C que se atienden en la Cátedra de Hemoterapia son tratados con Ribavirina e interferón alfa pegilado por el FNR.

Se ha encontrado una diversidad genética y evolutiva del HCV en la región de Latinoamérica. El genotipo 1 es el de mayor prevalencia en las zonas del Caribe, América Central y América del Sur (68). Un análisis filogenético de la región 5'NCR de cepas pertenecientes al genotipo 1 del HCV aisladas en Uruguay revelaron la existencia de un linaje genético diferente a los subtipos 1a y 1b e indicaron una diversificación del HCV (69). En el año, 2008 Lilia López, ex -asistente grado 2 de la Cátedra de Hemoterapia y Jefa del Banco de Sangre del SNS culmina su tesis de maestría (PROINBIO) sobre la variabilidad genética del HCV y evolución clínica en pacientes hemofílicos en Uruguay.

Se estudian 30 pacientes hemofílicos in-

fectados por HCV. Uno de los objetivos del trabajo fue el estudio genético de las estirpes de HCV, conocer el genotipo viral y su variabilidad genética en este tipo de pacientes. Los estudios de biología molecular fueron realizados en el Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de Ciencias bajo responsabilidad y dirección de Juan Cristina, jefe del Laboratorio de Virología de dicho centro. De los 30 pacientes, 27 amplificaron la región 5'NCR lo que demuestra que se trata de individuos virémicos y por tanto susceptibles a lesión hepática. En 18 pacientes se encontraron cuatro estirpes que pertenecían al genotipo 3 (22%) las que están situadas en un mismo cluster, una única estirpe del genotipo 2 (5,55%) la cual se demuestra en un cluster diferente y 13 estirpes del genotipo 1 (72%). Dentro del genotipo 1 existen dos estirpes subtipos 1a (11%), 4 subtipo 1b (22 %) y 7 (39%) estirpes dentro del genotipo 1 que no están asignadas a ninguno de los subtipos mayoritarios (ni 1a ni 1b) los cuales ya habían sido documentados en Uruguay en un estudio anterior (69).

La existencia de estas estirpes seguramente tienen importancia desde el punto de vista del tratamiento dado que los diferentes genotipos responden de distinta manera al tratamiento con ribavirina e interferón alfa pegilado que se está utilizando actualmente en los pacientes con infección HCV crónica (70).

Uno de los aspectos positivos de estas infecciones descubiertas a partir de 1980 (HTLV, HIV y HCV) ha sido el desarrollo y aplicación de técnicas de transfusión autóloga.

En 1921, se describe el uso de transfusión autóloga en un paciente con un tumor cerebral que tenía un grupo sanguíneo inusual y "no tenía dinero para pagar donantes" (71). En 1962, se publica la realización exitosa de la autotransfusión de 78 unidades obtenidas de 53 pacientes en un plazo mayor de 9 días antes de la cirugía (método de predepósito) (72).

En 1980, aproximadamente el 0,14% de los eritrocitos transfundidos en USA eran autólogos pero aumentaron rápidamente a 0,9% en 1985, 1,5% en 1986 y 3,6% en 1987 (73). El número de personas que donaban sangre autóloga aumentó un 91% entre 1980 y 1987 en plena pandemia de HIV.

En 1985, se desarrollaron también sistemas eficientes de recolección de sangre autó-

loga del campo quirúrgico (74). Se reporta un aumento del 15.6% del número de pacientes que utilizan esta técnica entre 1985 y 1986 y un 33% de incremento adicional entre 1986 y 1987 realizándose más de 200.000 procedimientos de este tipo en 1987 en USA (73). Las técnicas de transfusión autóloga se aplicaron también a los pacientes Testigos de Jehová que solo aceptan la hemodilución normovolémica en sala de operaciones o la recuperación de la sangre autóloga del campo quirúrgico pero no el método de predepósito. En Uruguay, se realizan las tres técnicas mencionadas de transfusión autóloga en un porcentaje de entre el 2 y 3% según las estadísticas del SNS.

Otro de los métodos que se incrementó rápidamente en la década de 1980 fue la obtención de concentrado de plaquetas por hemaféresis a partir de un circuito extracorpóreo en un donante único con una concentración de plaquetas similar a la alcanzada por seis a diez unidades de plaquetas de donante múltiple. Esta técnica reducía sensiblemente el número de donantes a los que se exponía una persona multitransfundida con plaquetas, como los pacientes hematoncológicos. Como el donante de aféresis puede volver a donar después de las 72 horas y varias veces en el año, un mismo donante puede utilizarse para un mismo paciente. En USA, en la década del 80, el 35% de las plaquetas transfundidas eran obtenidas de donante único por aféresis (75). En Uruguay, realizamos en la Cátedra de Hemoterapia la primera colecta de plaquetas por hemaféresis en noviembre de 1981 con un separador celular de flujo continuo.

Otro de los temas que se revisaron en plena pandemia de HIV en la década del 80 fueron los criterios clínicos y paraclínicos para el uso racional de hemocomponentes. Con este objetivo los Institutos Nacionales de Salud de USA (NIH) establecen la primera conferencia de consenso sobre el uso del plasma fresco en setiembre de 1984 (76). En la segunda conferencia, realizada en octubre de 1986 se establece el consenso sobre la transfusión de plaquetas (77) y en junio 1988, la tercera sobre la transfusión de eritrocitos en el perioperatorio (78).

En Uruguay, en 1980 el SNS publica el Manual de Normas Técnico Administrativas de los Bancos de Sangre incluyendo en

su capítulo 5 la transfusión autóloga y en el capítulo 7 la hemaféresis (79). En 1989, también el SNS publica una guía sobre “El uso de la sangre humana y sus componentes” (80). Con el objetivo de crear pautas para el uso racional de la sangre, hemocomponentes y hemoderivados, para que el médico general o el especialista puedan basarse antes de realizar una indicación y con el fin de realizar una hemoterapia racional, específica y personalizada valorizando a la Medicina Transfusional como una disciplina clínica, decidimos publicar en 1997 el “Manual de Medicina Transfusional”. A este trabajo, se le otorgó el Premio “El País” por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay con lo cual se logró su publicación en 1998 y su distribución en forma gratuita (81) (figura 9.4).

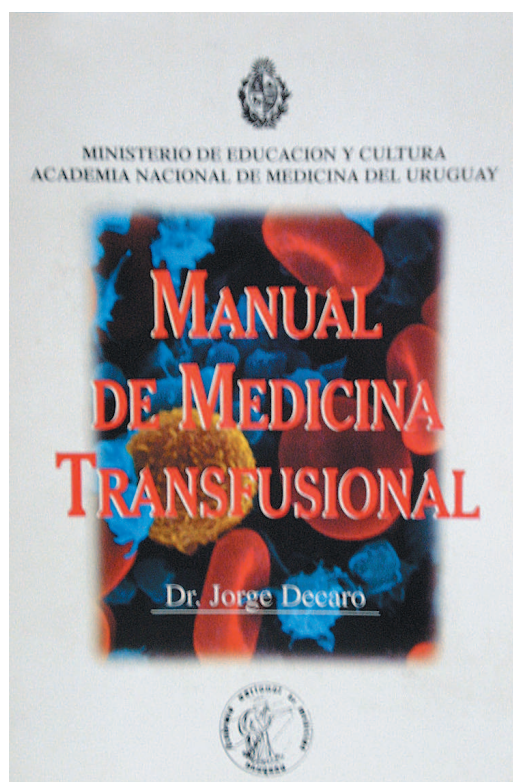


Figura 9.4 - Manual de Medicina Transfusional. Premio “El País” 1997 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay.

En 2007, las Cátedras de Anestesiología y de Hemoterapia de la Facultad de Medicina publican “Medicina Transfusional en el perioperatorio: pautas clínicas de indicaciones de hemocomponentes y hemoderivados” (82), luego de haber realizado previamente dos talleres multidisciplinarios de consenso.

La sangre es un vehículo natural de agentes infecciosos que tienen una diferente distribución mundial. Hay algunos de estos agentes patógenos que se presentan en unos países como endémicos pero, por el contrario, no se manifiestan en otros. Si bien el movimiento de hemocomponentes de un país a otro no es lo habitual, la migración de personas o animales así como el aumento de frecuencia de los viajes hacen que los agentes infecciosos traspasen fronteras. En nuestro país no existe el reservorio para que se transmita la malaria pero personas que viajan a zonas endémicas tienen riesgo de infectarse y si lo hacen, cuando regresan pueden transmitirla al donar sangre. Este es un ejemplo típico de una infección importada cuyo vehículo para traspasar fronteras es el hombre. Por el contrario, en países de América Central y Sudamérica la enfermedad de Chagas tiene una alta prevalencia y la migración de personas hacia países del primer mundo donde carecen de esta patología y por ende, no se realiza su investigación en la sangre donada, hace que el *Tripanosoma cruzi* pueda transmitirse de un individuo a otro. Para nosotros, éste es un ejemplo de una infección exportada cuyo vehículo también es el ser humano.

El virus del Nilo occidental (NO) que fue descubierto en una mujer de Uganda en 1937 produjo en las Américas la primera epidemia registrada de encefalitis vírica en el área metropolitana de New York al final del verano de 1999. Si bien no se ha determinado como el virus del NO se introdujo en el continente americano se sospecha que las aves migratorias fueron los principales huéspedes introductorios de la infección viral. Los primeros casos de transmisión de este virus por transfusión de hemocomponentes en Estados Unidos de Norteamérica (USA) se publicaron en el año 2003 (83) (84).

A su vez, un mismo agente infeccioso, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede presentar variantes genéticas que pueden afectar la seguridad de la sangre donada ya que algunos test diagnósticos pueden detectar una variante pero no la otra. La variante 0 del VIH es común en países del centro y oeste de África pero rara en USA donde predomina la variante M.

Como expresamos anteriormente, el movimiento internacional de agentes infecciosos y sus variantes puede afectar la seguridad

sanguínea a nivel mundial. Esta es una de las razones por la cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece un programa global de seguridad sanguínea con el fin de uniformizar las políticas sanitarias en los distintos países y evitar la transmisión de agentes infecciosos por la sangre donada.

Actualmente, los agentes infecciosos que se pueden transmitir por la transfusión de hemocomponentes los podemos dividir para su estudio en tres categorías. En la primera se agrupan aquellos agentes a los que se les realiza, de forma obligatoria, un diagnóstico serológico en la sangre donada. Esto puede variar de un país a otro así como también los test utilizados para tal fin. En nuestro país, se realiza el diagnóstico serológico para sífilis, Chagas, VIH 1-2, HTLV I-II, hepatitis B (antígeno Australia y anticuerpos anti-core) y hepatitis C. La segunda categoría agrupa a patógenos conocidos a los cuales no se le realiza el diagnóstico serológico de rutina pero se puede realizar en situaciones especiales como el CMV para pacientes inmunodeprimidos o el parvovirus B19 para receptores con aplasia medular o neonatos. También en esta categoría estarían las especies de *Plasmodium* que transmiten la malaria en los seres humanos. En la tercera categoría se agrupan los patógenos denominados emergentes como el virus NO, el coronavirus que produce un síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y la variante (prion) de la Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) que puede producir, en el hombre, una enfermedad neurológica fatal (85).

Sin embargo, debemos distinguir entre agentes emergentes y problemas emergentes.

La enfermedad de Chagas transmitida por un conocido y antiguo agente patógeno causa un problema emergente en USA por el aumento de los inmigrantes de países con alta prevalencia del mismo. Por el contrario, el virus del Nilo occidental, también conocido desde hace años, representaba un distante y mínimo riesgo transfusional hasta que el cambio de ciertas condiciones ambientales hacen que se produzca la infección de una vasta población como ocurrió en la ciudad de New York en 1999. Éste es el caso de un virus ya detectado que re-emerge en la población humana. El coronavirus que produce el SARS es un caso típico de un virus emergente, es decir que es detectado por primera vez cuando produce la

enfermedad en los seres humanos. Los virus de la familia flavivirus (GBV-C/HGV) y circovirus (TTV) recientemente descubiertos, posibles agentes de transmisión de la hepatitis G, son considerados sub-emergentes desde el punto de vista del riesgo transfusional dado que no existen aún trabajos científicos que puedan probarlo (86).

Para la detección de estas nuevas infecciones deben existir mecanismos epidemiológicos y técnicos que eviten su rápida propagación a los seres humanos. Mientras que en la década del 80 se tardó años en identificar el VIH, en la reciente epidemia del SARS se demoró aproximadamente 1 mes en detectar el agente viral que la producía.

Cuando un nuevo agente infeccioso es detectado epidemiológicamente debe plantearse la posibilidad de su transmisión sanguínea por lo cual se hace necesario tomar medidas preventivas de emergencia en las zonas epidémicas mientras se investiga el agente patógeno y se puedan desarrollar tests de diagnóstico. Así, durante la epidemia del SARS, en China se establecieron nuevas preguntas en el cuestionario de los donantes de sangre referidas al síndrome respiratorio, se controló la temperatura corporal en el examen físico y todos los donantes debían notificar al Banco de Sangre la aparición de posibles síntomas relacionados al SARS en las dos semanas siguientes de efectuada la donación. Hasta el momento actual, no se ha confirmado ningún caso de SARS transmitido por transfusión de sangre (87). Recientemente han aparecido casos en Europa, en países como Francia y España, de la fiebre de Chikungunya que es una enfermedad transmitida a humanos por la picadura de un mosquito infectado del género *Aedes*. El nombre significa en suajili "enfermedad del hombre encorvado" ya que provoca además de fiebre, fuertes dolores articulares que llevan a adoptar esa postura. El arbovirus causante fue aislado por primera vez en Tanzania en 1953. Desde entonces aparece en países del oeste y centro de África y en varias zonas de Asia. En el año 2005, se extendió a las islas del océano Índico (Comores, Mauricio, Mayotte, Reunión, Seychelles y Madagascar) por ello se han descrito los primeros casos en Europa debido a la alta frecuencia de viajes hacia estas zonas endémicas.

Teóricamente, el virus puede ser transmitido

por transfusión de hemocomponentes y trasplante de órganos y tejidos. Si bien hasta hoy no se ha documentado ningún caso secundario a transfusión sí se ha referido infección por exposición a sangre. Por tal motivo, las personas provenientes de las zonas donde existe el virus, principalmente de las islas del océano Índico, pues el resto es excluido por malaria, deben ser rechazadas como donantes por un mes desde su regreso y si han presentado un cuadro viral durante el viaje deben ser excluidos durante seis meses. En las islas Reunión ya se han diagnosticado los primeros casos de transmisión vertical materno-fetal del virus Chikungunya con una morbilidad alta (88).

En el Uruguay no existe hasta el momento actual ningún caso clínico confirmado de Dengue. Sin embargo existen casos diagnosticados en países cercanos como Argentina, Brasil y Paraguay. En Singapur país en zona endémica de Dengue se ha publicado un caso de fiebre hemorrágica transmitido por transfusión (89) y otro en Hong Kong país no endémico (90).

Según la OMS, a nivel mundial, 75 millones de unidades de sangre son donadas anualmente. El 40% (30 millones) es extraída en países en vías de desarrollo de las cuales, solo el 57% son analizadas para enfermedades transmisibles por la sangre (91). Como la mayoría de la población mundial vive en países con índice de desarrollo humano (IDH) medio o bajo esto determina que el 80% de la población mundial tenga acceso a sólo el 20% de la reserva mundial de sangre segura y tamizada. Esta es otra de las razones, quizá la más importante, por la cual la OMS estableció un programa global de seguridad sanguínea. En un estudio publicado en el año 2004 también por la OMS en 178 países se encontró que, 20 de ellos no realizaban en el 100% pruebas diagnósticas para HIV, 24 no realizaban regularmente test para hepatitis B, 37 ignoraban el diagnóstico serológico de la hepatitis C y 34 no realizaban el estudio para la sífilis (92).

En Uruguay, según datos aportados por el SNS, se realiza el tamizaje serológico del 100 % de la sangre donada para VIH 1-2, HTLV I-II, hepatitis B y C, Sífilis y Chagas de acuerdo a las pruebas de tamizaje obligatorias establecidas por el Reglamento Técnico de Medicina Transfusional del MERCOSUR (35). El promedio de las donaciones de sangre

es de aproximadamente 100.000 por año en todo el país.

Una historia reciente

Cada día nuevas técnicas de diagnóstico aparecen pero también nuevos agentes patógenos son reconocidos y el riesgo potencial de transmisión por la sangre aumenta. Con cada nuevo agente patógeno identificado un nuevo test diagnóstico debe ser desarrollado, aprobado, manufacturado e implementado. En esa loca carrera aumentamos sensiblemente los costos sin poder alcanzar hasta el momento hemocomponentes con riesgo cero y de uso universal.

Por ello, la investigación científica se ha volcado, en los últimos años, hacia el otro extremo: la eliminación o inactivación de los agentes patógenos (virus, bacterias y parásitos) de los componentes o derivados sanguíneos con el fin de obtener productos estériles o con riesgo cero, sin alterar la función y sin producir efectos adversos en el receptor.

Las técnicas de inactivación o eliminación de agentes infecciosos más reportadas hasta el momento usan un tratamiento térmico (calor seco, vapor caliente, pasteurización), por irradiación (ultravioleta, gamma), por remoción (ultrafiltración, nanofiltración) o químico (solvente-detergente, azul de metileno, psoralen, riboflavina).

Desde hace años se están utilizando alguno de estos métodos, o la combinación de ellos, para evitar la transmisión de agentes patógenos en hemoderivados. La albúmina humana sufre un proceso de pasteurización es decir, un calentamiento a 60 grados por 10 horas, siendo éste uno de los procedimientos más antiguos. En 1940, Edwin Cohn realiza el fraccionamiento del plasma por etanol y la obtención de la albúmina que se encontraba en la fracción V. El 7 de diciembre de 1941 los japoneses invaden Pearl Harbour en Hawaii y se usan inmediatamente las reservas de albúmina para el tratamiento del shock producido por las heridas de guerra. Desde ese entonces no se han reportado casos de transmisión de enfermedades infecciosas por la administración de albúmina humana.

En la década del 80 la catástrofe producida por el SIDA por los concentrados de los factores de la coagulación contaminados obliga a la investigación sobre métodos de inactiva-

ción de patógenos. En 1985 el HIV es inactivado por calor y en 1987 aparecen los primeros concentrados de virus inactivados por esta técnica ya sea por calor seco o húmedo (vapor). Luego, se agrega un método químico mediante el uso un solvente-detergente y por último, un método físico la nanofiltración.

La inmunoglobulina anti-D SDF de uso intravenoso e intramuscular, recientemente incorporada en nuestro país, está doblemente inactivada, con solvente detergente (SD) que elimina los virus con cubierta lipídica (VIH, HBV, HCV) y por nanofiltración (F) para virus sin cubierta lipídica (parvovirus B19, HAV). Pero, en este campo, el de los hemoderivados, la biotecnología se ha desarrollado rápidamente obteniendo productos recombinantes, sin riesgo de transmisión de infecciones. Así, existen factores recombinantes para la estimulación de la hematopoyesis, concentrados de factores de la coagulación, anticoagulantes e inmunoglobulina anti-D entre otros.

En los hemocomponentes en cambio, donde la biotecnología no ha podido producir sustitutos de los elementos celulares, se han desarrollado en los últimos años técnicas de inactivación de patógenos con resultados muy satisfactorios. Para algunos, esta historia no tiene más de 10 años por lo cual podemos afirmar que es del nuevo milenio, para otros en cambio, como los países de América del Sur aún no ha comenzado.

La mayoría de estos métodos utilizan compuestos, como el psoralen, azul de metileno o riboflavina, que tienen gran afinidad con los ácidos nucleicos provocando un daño permanente e irreversible en las bacterias, virus y parásitos mediante el agregado, por lo general, de irradiación ultravioleta (93). Las células que carecen de núcleo como las plaquetas y los glóbulos rojos no son afectadas por este sistema. Sin embargo, esta tecnología no puede usarse para las infusiones de células progenitoras hematopoyéticas (stem cells), de linfocitos y/o granulocitos por ser células nucleadas. La aplicación de esta técnica además, haría innecesaria la irradiación gamma de los hemocomponentes celulares para evitar la reacción de injerto versus huésped como se realiza hasta el momento actual (94).

Por lo menos cuatro firmas comerciales, han desarrollado procedimientos para inacti-

var patógenos en los hemocomponentes. Baxter Healthcare Corporation (Chicago, Illinois) y Cerus Corporation (Concord, California) han ideado un sistema de inactivación de patógenos denominado Intercept Blood System que consiste en el agregado de psoralen sintético S59 para los concentrados de plaquetas y plasma, mientras que utiliza el psoralen S303 para los concentrados de glóbulos rojos, con una irradiación de luz ultravioleta durante no más de 10 minutos. Esta tecnología fue primeramente desarrollada en concentrados plaquetarios a los que se les agregó altos niveles de patógenos previamente a la inactivación fotoquímica. El comportamiento in vivo de los concentrados inactivados fue evaluado en un modelo animal (95). Un reciente estudio toxicológico fue desarrollado para determinar la seguridad de esta nueva tecnología que usa psoralen y luz ultravioleta (96).

El 15 de marzo del 2003, la revista *Blood* de la American Society of Hematology publica los resultados del trabajo denominado euro SPRITE, un trabajo europeo multicéntrico, clínico fase III, realizado para confirmar la eficacia terapéutica y de seguridad del sistema Intercept en los concentrados plaquetarios obtenidos de buffy coat y transfundidos en pool (97). Concentrados de plaquetas convencionales tratados con el sistema Intercept fueron suministrados a 103 pacientes con trombocitopenia por cáncer o trasplante de células madres hematopoyéticas pertenecientes a centros asistenciales del Reino Unido, Francia, Holanda y Suecia. Los resultados mostraron que los concentrados plaquetarios a los que se les realizó esta tecnología de inactivación de patógenos, establecida para aumentar la seguridad sanguínea, no sufrieron alteraciones de la función in vivo, sin producir además, aumento de reacciones adversas en el receptor. Esto fue el factor determinante para que el sistema Intercept fuera aprobado para su uso clínico en Europa a partir del año 2003. En julio de 2007, tuvimos oportunidad de observar esta nueva tecnología precisamente en el servicio de Donación de Sangre de la Cruz Roja de Madrid que dirige Emma Castro Izaguirre (www.donarsangre.org).

Se ha demostrado, que esta tecnología inactiva patógenos que contengan ARN o ADN (inhibe la replicación) como por ejemplo: virus con cubierta lipídica (el HIV 1-2,

HBV, HCV, CMV y HTLV) o sin ella (Parvovirus B19), bacterias gram negativas (*Yersinia enterocolitica*, *E. coli*) o gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *aureus* o el *Bacillus cereus*), protozoarios (*Tripanosoma cruzi*), *Treponema pallidum* y patógenos emergentes como el virus del NO y el coronavirus del SARS. La mayoría de estos trabajos fueron presentados en el congreso de la American Association of Blood Bank (AABB) en noviembre del 2003 y en el de la American Association of Hematology (ASH) en diciembre del 2003, ambos realizados en San Diego-California.

En otro trabajo reciente se evaluó también esta tecnología en las plaquetas obtenidas por aféresis no mostrando el procedimiento de inactivación la alteración de la función plaquetaria in vitro (98). El sistema Intercept ha demostrado también ser efectivo para inactivar los leucocitos contaminantes de los concentrados plaquetarios (inhibición de la replicación y de la síntesis de citoquinas) lo cual puede utilizarse para prevenir la reacción de injerto versus huésped que hasta ahora era suprimida por la irradiación gamma (99). Antes de aplicar esta técnica a la inactivación de patógenos se usó el 8-methoxypsoralen con luz ultravioleta (PUVA) en el tratamiento de la psoriasis y como terapia ex vivo del linfoma cutáneo a células T o síndrome de Sézary. El psoralen puede provocar reacciones alérgicas en algunas personas y eritema en los neonatos que están bajo tratamiento de fototerapia. En un trabajo prospectivo y multicéntrico europeo se evaluó la seguridad de 5106 transfusiones de plaquetas inactivadas por Intercept Blood System demostrándose que en el 99.2% de las transfusiones se presentaron sin reacciones adversas relacionadas a esta tecnología (100).

Otra empresa Gambro BCT (actualmente Caridien) conjuntamente con Navigant Biotechnologies han desarrollado también una tecnología de reducción de patógenos (PRT) de los hemocomponentes basados en el mismo principio pero utilizando riboflavina (vitamina B2) y luz ultravioleta en lugar de psoralen, para el tratamiento de los concentrados plaquetarios (101). Este sistema puede aplicarse para la inactivación de patógenos en plasma, concentrados de plaquetas y glóbulos rojos.

Se utiliza también el azul de metileno junto a la luz ultravioleta (Maco-Pharma Maco-Tro-

nic System) para la inactivación de patógenos en el plasma humano (102) (103).

Si bien con esta técnica no se alteraría la función de los factores de la coagulación existiría un pequeño descenso en la concentración de los mismos.

El cuarto sistema de inactivación de patógenos desarrollado utiliza el agente químico Inactine PEN110 que se adhiere por uniones electrostáticas a las moléculas de los ácidos nucleicos. Luego de la leucoreducción de los concentrados de eritrocitos o de la sangre total se adiciona PEN110 durante 24 horas a temperatura ambiente (23 centígrados) y el plasma junto con las proteínas plasmáticas se remueven mediante un proceso automático de lavado (104).

En marzo del 2007 se realiza, en Ontario-Canadá, una conferencia de consenso sobre todos los procedimientos de inactivación de patógenos y cuyas conclusiones y revisiones han sido publicadas en enero de 2008 (105). Basados en este desarrollo tecnológico la Cátedra de Medicina Transfusional ha elevado a la Dirección del Hospital de Clínicas un proyecto para implementar la inactivación de patógenos de los hemocomponentes en Uruguay.

Por último, dos trabajos para evaluar el costo beneficio de la técnica de inactivación de patógenos fueron realizados: uno en España (106) y otro en USA (107). En ambos se llega a la conclusión que el costo-efectividad del sistema Intercept es similar al generado por otras intervenciones en seguridad transfusional como los tests de ácidos nucleicos (NAT).

Sin embargo, esta tecnología de inactivación de hemocomponentes tiene como ventajas frente a los NAT que no existe período ventana, que se cubre un amplio espectro de gérmenes patógenos inclusive aquellos emergentes como el virus NO y el coronavirus (SARS) y se eliminaría la necesidad de aplicar irradiación gamma a los hemocomponentes celulares para evitar el efecto injerto versus huésped.

Si bien pensamos que con el desarrollo de esta tecnología, en un futuro cercano lleguemos a tener riesgo cero para la transmisión de enfermedades infecciosas por la sangre, la gran pregunta es si estas técnicas alcanzarán a todos los receptores de transfusiones del planeta Tierra cuando en la actualidad, como

vimos, el 80% de la población mundial tiene acceso solamente al 20% de la reserva mundial de sangre tamizada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Turnes A. La sífilis en la medicina. Una aproximación a su historia. www.smu.org.uy/dpmc/hmed/historia/articulos/sifilis.pdf, 23/9/2009.
2. Raju TN. The Nobel Chronides:1939-Gerhard Domagk. *Lancet* 1999;355:681.
3. Mahoney JF, Van Slyke CJ, Thayer JD. Sulfanilamide therapy in hospitalized gonorrhea. *Am J Shyph Gonorrhea Vener Dis*1938;22:691-698.
4. Wallace EH, Cook EN, Thompson L. Use of penicillin in sulfonamide resistant gonorrheal infections. *JAMA* 1943;122:289-292.
5. Mahoney TF, Arnold RC, Harris AD. Penicillin treatment of early shyphilis: A preliminary report. *Am J Public Health* 1943;33:1387-1391.
6. Tállice RV. Enfermedades parasitarias y transfusión de sangre. En Curso de Hemoterapia. Facultad de Medicina. Ed Rosgal Montevideo-Uruguay, 1947:135-144.
7. Wendel S. One century ago, Carlos Chagas. *Transfusion Today*. www.isbt-web.org número 6, marzo 2009. 24/02/2010.
8. Mazza S, Montana A, Benitez C, Juzin E. Transmisión de Schizotrypanum cruzi al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. Publicación de la MEPRA 1936;28:42-46.
9. Pellerino J. Transmissao da doenca de Chagas pela transfusao de sangue. Primeiras comprovacoes serologicas em doadores e candidatos a doadores de sangue. *Rev Bras Med* 1949;6:397-301.
10. Freitas JLP, Bancalana A, Amato Neto V, Sonntag R, Barreto JG. Primeiras verificacoes de transmissao accidental da molestia de Chagas ao homen por transfusao de sangue. *Rev Paul Med* 1952;40:36-40.
11. Nussenzweig V, Sonntag R, Biancalana A. Acao de corantes tri-fenil-metánicos sobre o trypanosoma cruzi in vitro. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissao da molestia de Chagas por transfusao de sangue. *O Hospital* 1953;44:731-744.
12. Panamerican Health Organization I Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la eliminación del T. infestans y la interrupción de la Transmisión de la Tripanosomiasis Americana Transfusional, OPS 1992.

13. World Health Assembly 1998, resolution WHA 51.14, Geneve 1998.
14. Sullivan TS. Viability of trypanosoma cruzi in citrated blood stored at room temperature. *J Parasitol* 1944;30:200.
15. Weinman D, MacAlister J. Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence. *Am J Hyg* 1947;45:102-121.
16. Filardi LS, Brener Z. Cryopreservation of trypanosoma cruzi bloodstream forms. *J Protozool* 1975;22:398-401.
17. Wendel S. Transfusion transmitted American and African Trypanosomiasis (Chagas disease and sleeping sickness): neglected or reality? *Vox Sang* 2006;1:140-151.
18. Organización Panamericana de la Salud. Interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Uruguay. *Bol Epidemiol OPS* 1998;19:10.
19. Franca ME. Formas agudas de la enfermedad de Chagas en el Uruguay. *Rev Med Urug* 1986;2:143-148.
20. Rosa R, Basmadjian Y, Gonzalez Murguiondo M, Gonzalez M, Salvatella R. Actualización clínico epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. *Rev Med Urug* 2001;17:125-132.
21. Moraes Souza H, Bordin JO, Bardossy L, MacPherson DW, Blajchman MA. Prevention of transfusion associated Chagas disease: efficacy of white cell reduction filters in removing trypanosoma cruzi from infected blood. *Transfusion* 1995;35:723-726.
22. Kirchhoff LV. American trypanosomiasis (Chagas disease) a tropical disease now in the United States. *N Engl J Med* 1993;329:639-644.
23. Castro E. Chagas and other protozoan diseases. Boletín de la Sociedad Española de Transfusión sanguínea (SETS) 2007;19:17-21.
24. Allain JP. 10 years of pathogen reduction / inactivation. *Transfusion Today* nro 6, june 2009. www.isbt-web.org. 24/02/2010
25. Castro E, Girones N, Bueno JL, Carrion J, Lin L, Fresno M. The efficacy of photochemical treatment with amotosalen HCI and ultraviolet A (Intercept) for inactivation of trypanosoma cruzi in a pooled buffy coat platelets. *Transfusion* 2007;47:434-441.
26. Invernizzi DW. Hepatitis consecutiva a la administración de sangre, suero o plasma humanos. En Curso de Hemoterapia Facultad de Medicina Ed. Rosgal Montevideo-Uruguay, 1947:145-157.
27. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia serum. *JAMA* 1965;191:541-546.
28. Alter HJ, Klein HG. The hazards of blood transfusion in historical perspective. *Blood* 2008;112:2617-2626.
29. Prince AM, Hargrove RL, Szmunes W, Cherubin CE, Fontana VJ, Jeffries GH. Immunologic distinction between infectious and serum hepatitis. *N Engl J Med* 1970;282:987-991.
30. Walsh JH, Purcell RH, Morrow AG, Chanoc K, Schmidt PJ. Post-transfusion hepatitis after open heart operations: incidence after the administration of blood from commercial and volunteer donors populations. *JAMA* 1970;211:261-265.
31. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 1973;182:1026-1028.
32. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from blood borne non-A non-B hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.
33. Establécese la obligatoriedad de realizar la investigación del estado de portador de los agentes de la Enfermedad de Chagas y de la Hepatitis B en todo donante de sangre. Decreto PE 259/85. Montevideo. Diario Oficial 2 de julio de 1985. Ed. IMPO.
34. Establécese la obligatoriedad para la investigación del virus de la hepatitis C a toda unidad de sangre extraída con fines transfusionales. Decreto PE 31/995. Montevideo. Diario Oficial 18 de enero de 1995. Ed IMPO.
35. Reglamento Técnico MERCOSUR de Medicina Transfusional. Decreto PE 385/000. Montevideo. Diario Oficial 9 de enero de 2001. Ed. IMPO.
36. Centers for Disease Control. Update on Kaposi sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons. United States. *MMWR* 1982;31:294-301.
37. Centers for Disease Control. Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR* 1982;31:365-367.
38. Ammann AJ, Cowan MJ, Wara DW, Weinrub P, Dritz S, Goldman H, Perkins HA. Acquired immunodeficiency in an infant: possible transmission by means of blood products. *Lancet* 1983;1:956-958.
39. Jason J, McDougal JS, Holman RC, Stein SF, Lawrence DN, Nicholson JK, Dixon G, Doxey M, Evatt BL. Human T lymphotropic retrovirus type III/lymphadenopathy associated virus antibody association with hemophiliacs immune status and blood component usage. *JAMA* 1985;252:3409-3415.
40. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Guest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868.
41. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Allo RC. Detection isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre AIDS. *Science* 1984;224:497.
42. Se establece la obligatoriedad del control de sangre a utilizar en todo el país a efectos de detectar portadores del virus del SIDA. Decreto PE 233/988. Montevideo. Diario Oficial 17 de marzo de 1988. Ed. IMPO.
43. Clavel F, Guetara D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C. Isolation of new human retrovirus from west African patients. *Science* 1986;233:243.
44. Decaro J. Manual para el personal de la salud. SIDA. Premio "El País" 1987 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed. De la Plaza, Montevideo-Uruguay. Agosto de 1989.
45. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:415.

46. Clarck J, Saxinger C, Gibbs WN, Loffers W, Lagranade L, Dececlaer K, Ensroth A, Robert-Guroff M, Gallo RC, Blattner WD. Seroepidemiologic studies of human T cell leukemia/lymphoma virus type I in Jamaica. *Int J Cancer* 1985;36:37-41.
47. Tajima K, Kuroishi T. Estimation of rate of incidence of ATL among HTLV-I carriers in Kyushu Japan. *Jpn J Clin Oncol* 1985;15:423.
48. Bhagavati S, Ehrlich G, Kula R,Knok S, Sninsky J, Udani V, Poiesz BJ. Detection of human T cell lymphoma/leukemia virus type I DNA and antigen in spinal fluid and blood of a patients with chronic progressive myelopathy. *N Engl J Med* 1988;318:1141.
49. Tosswill JHC. HTLV-I in neurology. *Ann Neurol* 1988;23:5.
50. Tosswill JHC, Parry JV. HTLV-I en pacientes ingleses. *Lancet* 1989;2:238.
51. Gout O, Baulas M, Gessain A, Semah F, Saal F, Peries J, Cabrol C, Foucault-Fretz C, Laplane D, Sigaux F. Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection acquired by transfusion during cardiac trnasplantation. *N Engl J Med* 1990;322:383.
52. Fretz C, Jaulmes D, Nicod A, Jourdan G, Gout O, Gessain A, Jullien AM, Gluckman JC, de Thé G, Fournel JJ. Enquete a propos de une contamination transfusionelle par le virus HTLV-I. *Rev Fr Transfus Hemobiol* 1991;34:185.
53. Lemaire JM, Coste J, Barin F, Couroucé AM, Baudelot J, Chamaret S, Elghouzzi M, Gueguen M, Janot C, Maniez M, Mesnier F, Mouillot L, Noel L, North ML, Rouzioux C, Smilovici W. Etude epidemiologique des anticorps anti-HTLV-I/II chez les donneurs de sang en France Metropolitaine. *Rev Fr Transfus Hemobiol* 1991;34:21.
54. Favat J. Primer caso clínico de infección por HTLV-I descrito en el Uruguay. *Neurociencias* 2003; 5:13-14.
55. Muchinik G, Bouzas MB, Zapioli I, Decaro J, Gracia L, Gallo D, Hanson CV. HTLV-I and HTLV-II infection in Uruguay. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5:743-744.
56. Decaro J. Diagnóstico serológico de HTLV-I. En *Retrovirus y sistema nervioso*. Salamano R y Favat J Ed Oficina del Libro AEM/Montevideo-Uruguay, 1994.
57. Decaro J, Lavalle E, García L, Lacordelle F, Bethencur I, Vivero E, Ambrosoni P, Schwedt E, Mazzuchi N. Vigilancia centinela de virosis transmitidas por la sangre: retrovirus y hepatitis C. Segundo Premio del Premio Nacional de Medicina 1992 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay.
58. La transfusión de sangre en el Uruguay. Informe 1997. Servicio Nacional de Sangre-MSP-ASSE. Ed. Imprex .Montevideo-Uruguay, 1998.
59. Commitee Report. Nucleid acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infections diseases. *Transfusion* 2000;40(2):143-159.
60. Delwart E, Kalmin N, Jones S. First case of HIV transmission by RNA-screened blood donation. 768W session 101 poster session, Retrovirus Conference. February 24-28,2002 Seattle-USA.
61. Phelps R, Robbins K, Liberti T, Machuca A, Lepar G, Chamberland M, Kalish M, Hewlett I, Folks T, Lee L, MacKenna M. Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. *Transfusion* 2004;44:929-933.
62. Raker C, Tabor E, Okayama A. HCV core antigen as an alternative to NAT to detect HCV viremia. *Transfusion* 2004;44:307-308.
63. Laperche S, Le Marrec N, Simon N, Bouchardeau F, Defer C, Maniez M, Lavayer T, Zappitelli JP, Lefrere JJ. A new core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. *Transfusion* 2003;43:958-962.
64. Laperche S. Antigen-antibody combination assays for blood donor screening : weighing the advantages and costs. *Transfusion* 2008;48:576-579.
65. Manual Técnico de Hemovigilancia. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria –Ministerio da Saude. Segunda Versao. Brasilia 2002, Brasil.
66. Debeir J, Noel L, Aullen JP. The French Haemovigilance System. *Vox Sang* 1999;77:77-81.
67. Williamson LN,Heptonstall J, Soldan K. A SHOT in the arm for safer blood transfusion. *Br Med J* 1996;313(7067):1221-1222.
68. Cristina J. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus in the Latin American region. *J Clin Virol* 2005;34(supl 2):S1-S7.
69. Colina R, Azambuja C, Uriarte, Mogdasy C, Cristina J. Evidence of increasing diversification of hepatitis C viruses. *J Gen Virol* 1999;80:1377-1382.
70. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman F, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982.
71. Grant FC. Autotransfusion. *Ann Surg* 1921;74:253-254.
72. Milles G, Langston H, Dalessandro W. Experiences with autotransfusions. *Surg Gynecol Obstet* 1962;115:689.694.
73. American Association of Blood Bank Annual Report 1983-1989. AABB, Arlington-Virginia,USA. www.aabb.org.24/02/2010.
74. Popovsky Ma, Devine Pa, Tawell HF. Intraoperative autologous transfusion. *Mayo Clin Proc* 1985;60:125-134.
75. Cumming PD, Schorr JB, Wallace EL. Annual Blood facts, United States totals-1986/1987, American Red Cross, Washington, DC 1987 (document number B3287-82).
76. Office of Medical Applications of Research. National Institute of Health, Consensus Conference: Fresh frozen plasma: indications and risk. *JAMA* 1985;253:551-553.
77. Consensus Conference on Platelet Transfusion Therapy: National Institute of Health. *JAMA* 1987;257:1777-1780.
78. Consensus Conference on red blood cell transfusion: perioperative red blood cell transfusion. *JAMA* 1988;260:2700-2703.
79. Manual de normas técnico administrativas de los bancos de sangre. Servicio Nacional de Sangre 1980, año V número 6, MSP Ed. Marte, Montevideo-Uruguay, 1980.

80. Guía para el uso de sangre humana y sus componentes. Servicio Nacional de Sangre 1989, año 11 número 3, MSP Ed Marte, Montevideo-Uruguay, 1989.
81. Decaro J. Manual de Medicina Transfusional. Premio "El País" 1998 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed. de la Plaza, Montevideo-Uruguay, 1999.
82. Medicina Transfusional en el perioperatorio: pautas clínicas de indicaciones de hemocomponentes y hemoderivados. Cátedras de Anestesiología y Medicina Transfusional, UDELAR-Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas. Jornadas de Educación Médica Continua junio 2006 y abril 2007. *Biomedicina* 2007;3:209-226.
83. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page P, Stramer S, Stobierski M, Signs K, Newman B, Kapoor H, Goodman J, Chamberland M. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med* 2003;349:12361245.
84. Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, Lanciotti RS, Hand S, Currier M, Chamberland M, Petersen LR, Maffin AA. West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion* 2003;43:1018.
85. Knight R. Prion Disease. *Vox Sang* 2004;87 (suppl 1):S104-S106.
86. Alter HJ. Emerging, re-emerging and submerging infections threats to blood supply. *Vox Sang* 2004;87:56-61.
87. Shan H, Zhang P. Viral attacks on the blood supply: the impact of severe acute respiratory syndrome in Beijing. *Transfusion* 2004;44:467-469.
88. Ramful D, Carbonnier M, Pasquet M, Bouhmani B, Ghazouni J, Noomahoned T, Beullier G, Attali T, Samperiz S, Fourmaintraux A, Alessandri JL. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:811-815.
89. Tambyah PA, Koay E, Poon M, Lin R, Ong B. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med* 2008;359:1526-1527.
90. Chuang VW, Wong TY, Leung YH, Ma ES, Law YL, Tsang OT, Chang KM, Que TI, Yung RW, Liu SH. Review of the dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med J*. 2008;14:170-177.
91. Blood Safety and Clinical Technology. 2000-2003 Strategy. WHO Geneva.
92. Zarocostas J. Blood donations must be safer in poor nations, says WHO. *Lancet* 2004;363:2060.
93. Regan F, Taylor C. Blood transfusion Medicine. *Br Med J* 2002;325:143-147.
94. Luban NL. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by inactivation of T cells in platelet components. *Semin Hematol* 2001;38 (suppl 11):34-45.
95. Lin L, Cook DN, Wieseahn GP, Alfonso R, Cimino GD, Corten L, Damonte PB, Dikeman R, Dupuis K, Fang Ym, Hanson CV, Hearst JE, Lin CY, Londe HF, Metchette K, Nerio AT, Pu JJ, Redues AA, Rheinschmidt M, Tessman J, Isaacs ST, Wollowitz S, Corash L. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psolaren and long-wave length ultraviolet light. *Transfusion* 1997;37(4): 423-435.
96. Ciaravino V, Mc Cullough T, Cimino G. The role of toxicology assessment in transfusion medicine. *Transfusion* 2003;43:1481-1492.
97. Van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Kluter H, Vermeij H, Kappers-Klunne M, de Greef G, Lafret M, Lioure B, Davis K, Marblie S, Maxaudou V, Flamen J, Coulan M, Lin L, Metzger P, Buchholz D, Corash L. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. The euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101(6):2426-2433.
98. Janetzko K, Lin L, Eichler H, Mayaudou V, Flament J, Kluter H. Implementation of the Intercept Blood System for platelets into routine blood bank manufacturing procedures: evaluation of apheresis platelet. *Vox Sang* 2004;86(4):239-245.
99. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SA, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using Riboflavin and light. *Transfusion* 2004;44(6):877-885.
100. Osselaer JC, Messe N, Herving T, Bueno J, Castro E, Espinosa A, Accorsi P, Junge K, Jacquet M, Flament J, Corash L. A prospective observational cohort safety study of 5106 platelet transfusions with components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2008;48:1061-1071.
101. Corbin F 3rd. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using Riboflavin as a photosensitizer. *Int J Hematol* 2002;76(suppl 2):253-257.
102. Williamson L, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: What is the contribution to blood safety? *Transfusion* 2003;43:1322-1329.
103. Hornsey VS, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse CV. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco-Pharma Maco-Tronic System. *Transfus Med* 2001;11(1):31-36.
104. Zavizion B, Purmal A, Chapman J, Alford B. Inactivation of mycoplasma species in blood by Inactine PEN110 process. *Transfusion* 2004;44:286-293.
105. Weibert K, Cserti C, Hannon J, Lin Y, Pavenski K, Pendergrast JM, Blajchman MA. Proceedings of a Consensus Conference: Pathogen Inactivation Making Decisions About New Technologies. *Transfus Med Rev* 2008;22:1-34.
106. Álvarez-Larran A, Del Río J, Ramírez C, Albo C, Peña F, Campos A. Coste efectividad de las transfusiones de componentes plaquetarios preparados con tratamiento de inactivación de patógenos en España. *Rev Esp Econ Salud* 2003;2 (3):166-175.
107. Bell CE, Botteman MF, Gao X, Weissfeld JL, Postma MJ, Pashos CL, Triulbi D, Staginnus U. Cost-effectiveness of transfusion of platelet components prepared with pathogen inactivation treatment in the United States. *Clin Ther* 2003;25(9):2464-2486.

Historia de la Coagulación de la Sangre

Hipócrates, Aristóteles y Galeno describían que cuando la sangre fresca fluía del cuerpo coagulaba en unos pocos minutos. Sin embargo, no asociaron la coagulación con la hemostasis. Establecieron la teoría del contacto con el aire y del enfriamiento. Los antiguos filósofos y médicos griegos pensaban que la solidificación de la sangre se producía por enfriamiento. Galeno sostenía que la sangre que se aleja del corazón perdía el calor innato y al enfriarse se hacía espesa y se coagulaba, como la transformación del agua en hielo. Este concepto no sufrió cambios por más de quince siglos. William Harvey, en su obra “De Motu Cordis”, publicada en el año 1628, aún sostenía el concepto aristotélico, basándose en la teoría del enfriamiento (1).

El inglés William Hewson rebatió la teoría del enfriamiento en la segunda mitad del siglo XVIII, pues observó que ocurre coagulación bajo condiciones variables de temperatura. Demostró que la sangre recién extraída se coagula a mayor velocidad y que ésta no se coagula por enfriamiento, sino por calor. En contra de la teoría de Galeno encontró que el frío retrasaba o impedía la coagulación. Además, podía ocurrir sin la presencia de eritrocitos concluyendo que es una propiedad exclusiva del plasma (2).

Con la teoría de la circulación sanguínea descrita por Harvey en 1628, los fisiólogos de la época atribuían al movimiento de la circulación sanguínea varias propiedades como por ejemplo, mantener a la sangre en su estado líquido (luego fluido). Por el contrario, la cesación del movimiento producía la coagulación. Este concepto fue mantenido por Marcelo Malphigi, quien estudiando los coágulos cadavéricos mediante lavados eliminó los eritrocitos y descubrió la fibrina. Él pensa-

ba que la red de fibras está compuesta por la aglutinación de filamentos más pequeños que viajan en el torrente circulatorio, separadas entre sí gracias a la fuerza del corazón, y que al cesar el movimiento de la sangre, ocurría la agregación de sus partes con la consiguiente coagulación (3). Cuando cesa la circulación decía, la sangre tiene la consistencia del barro similar al que muestran los quesos y requesones cuando su sustancia está cuajada.

Por su parte Harvey pensaba que la sangre contenía una fuerza que la mantenía en su estado líquido y que al extraerla de los vasos ésta se perdía (teoría de la fuerza vital).

En el siglo XVII aún se discutía si la coagulación sólo se producía con la muerte o si podía ocurrir en el interior de los vasos como un evento durante la vida. En el año 1731, el cirujano francés Jean Louis Petit describió, luego de una cirugía de amputación de un brazo, que se formaban coágulos en arterias lesionadas que detenían la hemorragia y no sólo como consecuencia del enfriamiento corporal que sigue a la muerte (4).

Fue la primera vez que la coagulación sanguínea fue relacionada con la hemostasis recién dos milenios después de las observaciones de Hipócrates, Aristóteles y Galeno.

A su vez, la hemorragia como enfermedad no fue reconocida hasta que también en el siglo XVIII, en el año 1734 Paul Werlhof, médico de la corte inglesa de Jorge II, describe el púrpura (5). En el siglo siguiente, ya conociendo la fibrina descrita por Malphigi y la idea de Hewson que la coagulación era una propiedad del plasma, Schmidt describe la sustancia procoagulante el fermento de la fibrina (luego trombina) desarrollando el concepto de las reacciones enzimáticas de la coagulación. Más tarde, Cornelius Pekelhearing descubre

su precursor la protrombina. Entre 1877 y 1879, Olav Hammerstein aísla por primera vez el fibrinógeno y establece que la cantidad de fibrina generada así como la velocidad de la coagulación varían con la cantidad de calcio presente. En 1899, Hammerstein observó que el fibrinógeno no coagula al agregarle calcio sino cuando éste se mezcla con trombina (6).

Casi 150 años después, en el año 1943, Dees describe la técnica de la coagulopielolitotomía que consiste en la inyección de fibrinógeno, trombina y calcio en la pelvis renal para formar un coágulo firme que rellene completamente las cavidades renales quedando incorporados en la malla de fibrina todos los cálculos presentes (7). A través de pielotomía se realiza el “fórceps” del coágulo con los cálculos renales en su interior. La técnica permite extraer cálculos renales múltiples y pequeños de forma más fácil, rápida y menos traumática para el riñón.

Conjuntamente con el urólogo Delger, utilizamos esta tecnología en nuestro país a principios de la década de 1980 y los resultados fueron publicados en la Revista Argentina de Transfusión (8).

En el año 1905 Paul Morawitz logró integrar los conocimientos de los cuatro factores descubiertos hasta ese momento (fibrinógeno, protrombina, calcio y factor de los tejidos) en una teoría donde la coagulación ocurre en dos etapas enzimáticas. La primera era la conversión de la protrombina en trombina mediante la acción de la trombokinasa (factor tisular) y calcio. En la segunda, se producía la transformación del fibrinógeno en fibrina mediante la acción de la trombina (9).

William Henry Howell estudió el factor tisular, al que dio el nombre de tromboplastina, término que se ha empleado hasta la actualidad (10). Jean MacLean estudiante de medicina y discípulo de Howell descubrió en 1916 un anticoagulante, al que luego Howell en 1918 llamó heparina por provenir de extractos de hígado (11).

En 1939, Brinkhous y colaboradores encuentran que la heparina actúa sólo en presencia de una proteína plasmática ahora conocida como cofactor de la heparina o antitrombina III (12). Se le atribuye al bioquímico sueco Erick Jorpes, del Instituto Karolinska de Estocolmo, la identificación de la estructura química de la heparina (13).

En 1939 Jorpes publica la primera edición de su monografía sobre “La heparina en el tratamiento de la trombosis”. Luego del descubrimiento del dicumarol como anticoagulante publica la segunda edición en 1946 que se encuentra en la biblioteca de la Cátedra de Medicina Transfusional (Jorpes JE. Heparin in the treatment of thrombosis, second edition, Oxford Medical Publications, Londres-UK).

Howell modifica el concepto sobre la coagulación y en su tratado de fisiología de 1919 sostiene que la heparina es una anti-trombina que viaja en el plasma unida a la protrombina para impedir la coagulación y que la tromboplastina separa esta unión, liberando a la protrombina para que, mediante la acción del calcio, se convierta a trombina (14).

A mediados de la década de 1930 Armand Quick, desarrolló un método de laboratorio para reproducir la teoría de la coagulación de Morawitz. La prueba consistía en añadir extractos de tejidos al plasma en presencia de calcio para convertir la protrombina en trombina y esta última transformar el fibrinógeno en fibrina.

El trabajo de Quick fue rechazado ocho veces por las revistas más influyentes antes de ser publicado en el año 1936, debido a que se fundamentaba en la teoría de Morawitz y no coincidía con la teoría de Howell (15). Como sólo se conocían cuatro factores, se pensaba que el proceso se iniciaba al activar la protrombina, lo que explica el nombre con el que se conoce hasta la actualidad esta prueba de la coagulación (tiempo de protrombina, TP).

Quick observó que existían algunas discrepancias con los resultados del TP. Cuando la técnica era realizada horas después de haber sido extraída la muestra, el tiempo de coagulación se prolongaba y si se realizaba inmediatamente éste se acortaba. Además, comprobó que si se agregaba plasma tratado con cumarínicos el tiempo se prolongaba.

En el año 1947 Quick, postuló la existencia de otros dos factores, el factor V que acelera la coagulación (cofactor) y que se destruye con el almacenamiento (lábil), y un factor VI o factor estable (16). Este último posteriormente fue eliminado de la lista de los factores de la coagulación ya que era una variante del factor V.

Casi de forma simultánea, Paul Owren, en Noruega, también descubrió el factor V (17).

En el año 1949 André de Vries (18) propuso la existencia de un factor que mejora la conversión de la protrombina en el suero, éste fue descrito en forma independiente en el mismo año por Benjamín Alexander y por el mismo Owren en el año 1950 (19). El nuevo factor se denominó convertina y proconvertina a su precursor y le correspondió el número VII.

La primer referencia vinculada con la hemofilia es probablemente la que se encuentra en el Talmud y en los textos hebreos del siglo II DC, donde se fija la norma de no circundar a los niños cuando otros hijos de la misma madre hubieran fallecido por hemorragia a raíz de la circuncisión. Maimónides establece que si un niño muere después de la circuncisión y al segundo hijo le pasa lo mismo, aunque sea de diferente padre, el tercero no debe ser circuncidado. Este médico, líder del judaísmo medieval, nacido en Córdoba en el sur de España en el año 1135, establece claramente que la enfermedad hemorrágica es transmitida por la madre a sus hijos varones independientemente de su o sus padres.

La comunidad israelita-sefaradí del Uruguay declaró el año 2004 como el año de Maimónides conmemorando el 800 aniversario de su muerte el 13 de diciembre de 1204 (www.smu.org.uy). Antonio Turnes escribe un libro “Maimónides, el sabio sefaradí”, publicado por la Editorial Granada, donde describe el legado científico, filosófico y teológico de este sabio médico judío-español.

John Conrad Otto, un médico de Filadelfia en USA, en 1803 realiza la primera descripción del cuadro clínico de la hemofilia y la precisión de su carácter hereditario. Describe una familia de apellidos Smith-Shepard cuyo linaje comienza en Plymouth en 1730 (20). Los hombres miembros de esta familia sangran ante mínimos traumatismos y a veces son causa de muerte. Sin embargo, no todos los varones son enfermos. A pesar de que las mujeres no tienen hemorragias pueden transmitir la coagulopatía a sus hijos varones. Luego, Otto analiza otras familias de similares características que le son enviadas para su estudio por colegas.

El nombre hemofilia (“love of blood”), término apropiado o no para describir esta enfermedad, fue aplicado por primera vez por Hopff de la Universidad de Zurich, en el año 1828 (21). Sin embargo, Brinkhous expresa,

en su revisión de la historia de esta coagulopatía, que la palabra hemofilia es anterior dado que en el museo de arte de Viena se encuentra la obra de 1570 “La guérison de l’hémophilique” (22). Muchas veces se conoce a la hemofilia como la “enfermedad real” dado que la padecieron diversos miembros de las familias reales europeas.

La más famosa portadora de hemofilia de la historia fue Victoria, reina de Inglaterra y abuela de la mayoría de la realeza europea (21). La reina que asume el trono a los 12 años se entera que es portadora de la enfermedad a los 22 años, en 1853, con el nacimiento de su octavo hijo, el cuarto varón Leopold que era hemofílico y falleció de una hemorragia cerebral a los treinta y un años tras una caída en la ciudad de Cannes en Francia.

Antes de tener el octavo hijo, la reina decidió que no pasaría por el sufrimiento de los siete partos previos y solicitó que se le administrara anestesia, una verdadera novedad en la época. La experiencia fue ampliamente satisfactoria y Victoria bendijo la droga, a su médico y a la Providencia por traer al mundo a Leopold sin dolor.

Dos de las cuatro hijas de Victoria, Alicia y Beatriz, eran portadoras de esta enfermedad, aunque no lo supieron hasta dar a luz. Un nieto Frederick, falleció a los dos años; otro falleció tras una cirugía y cuatro bisnietos de las familias reales inglesa, española, alemana y rusa murieron prematuramente. Una de las nietas de la reina de Inglaterra, Alexandra (hija de Alicia) se casó con el zar ruso Nicolás II, tuvieron a Alexis Nicolaievich en 1904, también con hemofilia, lo cual probablemente contribuyó a la caída de un imperio. A Alexandra, mujer muy emotiva y religiosa, le angustiaba ser incapaz de aliviar los sufrimientos de su hijo tras una hemorragia interna que duró once días. Tal era su desesperación que recurrió a un monje, Grigory Rasputín, con fama de místico y curandero. Él narraba historias al niño, tranquilizándolo hipnóticamente y acortaba sus hemorragias. La opinión de Alexandra era que Dios había enviado a su familia a un salvador. El dominio de Rasputín luego fue tal que Alexandra presionó a Nicolás para nombrarlo ministro. Esta designación fue desastrosa, llevando al colapso económico a la nación. Finalmente, al concluir el año 1916 y viendo que su gobier-

no se derrumbaba, un grupo de aristócratas asesinó a Rasputín. Tres meses más tarde, el zar abandonó el trono. Un año y tres meses después, los bolcheviques lo asesinaron junto a toda su familia.

La hija menor de la reina Victoria, Beatriz se casó con Enrique de Battenberg. De sus tres hijos varones uno fue sano y los otros dos murieron de hemofilia, Mauricio en 1914 y Leopoldo en 1922. La única hija mujer Victoria Eugenia de Battemberg fue reina de España por su matrimonio con Alfonso XIII y tuvieron seis hijos, dos mujeres y cuatro varones. El primer hijo Alfonso fue circuncidado siguiendo una costumbre de la corte española y la dificultad para detener el sangrado fue el primer signo de hemofilia. Gonzalo también fue hemofílico y ambos fallecieron por lesiones leves en accidentes automovilísticos. Los otros dos hijos varones, Jaime y Juan de Borbón y Battenberg no tuvieron la enfermedad. Juan fue el padre de don Juan Carlos el actual Rey de España.

Un dato interesante de esta historia es que el médico obstetra que asistió a la reina de España en su último parto Sebastián Recasens y Girol obtuvo un doctorado "Honoris Causis" por la Universidad de la República Oriental del Uruguay.

La hemofilia se hereda ligada al sexo, el gen se encuentra en el cromosoma X. Como los varones tienen un cromosoma X, si este gen se encuentra alterado se manifestará clínicamente la enfermedad. En el caso de las mujeres, a pesar de tener un cromosoma X alterado, el otro por lo general compensa la producción del factor de la coagulación y la enfermedad no se manifiesta clínicamente. Se dice entonces que las mujeres portan la enfermedad y la transmiten pero no la sufren. En el Uruguay, el primer estudio de mujeres portadoras de hemofilia lo realizamos en la Cátedra de Hemoterapia. Los resultados del trabajo "Asesoramiento genético: determinación de portadoras de hemofilia A" fue presentado en el Segundo Congreso Latinoamericano de Hemoterapia e Inmunohematología que se realizó en Buenos Aires en noviembre de 1982 y en el XV Congreso de la Federación Mundial de Hemofilia que se desarrolló en Estocolmo-Suecia en junio de 1983.

Sin embargo, cuando se casa una mujer portadora con un hombre hemofílico sus hijas

mujeres tienen probabilidad de presentar los dos cromosomas X alterados y sufrir la enfermedad. Por ello es que no se recomienda la co-sanguinidad en familias de hemofílicos.

La madre de Victoria era Victoria de Sajonia Coburgo Gotha y esa familia nunca había presentado hemofilia. El padre de Victoria era Eduardo de Hannover que era una familia de linaje con "pedigree" conocido donde tampoco existía ningún antecedente de hemofilia. Además, la única forma que el padre transmita el cromosoma X alterado es que él sea hemofílico y Eduardo no lo era. Actualmente, el apellido de la familia real es Windsor ya que durante la primera guerra mundial se optó por cambiarlo para evitar un apellido alemán que no era grato a los ingleses.

La explicación de la aparición súbita de la hemofilia en el octavo hijo de Victoria se debería entonces a una mutación genética. Sin embargo, un rumor establece que Victoria podría ser hija bastarda de un amante hemofílico de su madre. De haberse conocido esto y demostrado en su época, seguramente Isabel II no sería hoy la reina de Inglaterra ni Juan Carlos de Borbón el rey de España. Ésta es una de las pruebas de que el "sexo puede cambiar la historia" en el libro publicado por José Enrique Pons.

Actualmente, las mutaciones genéticas en la hemofilia son determinadas por biología molecular y una vez caracterizadas son ingresadas a bases de datos mundiales. Las de hemofilia A en HAMSTeRS (Hemophilia A Mutation, Structure, Test, Resource Site) www.euro-pium.csc.mrc.ac.uk y las de hemofilia B en www.umds.ac.uk/molgen.

Algunas mutaciones producen niveles de factores de la coagulación extremadamente bajos por lo cual mujeres pueden tener manifestaciones hemorrágicas. Lo más frecuente es que presenten hematomas fáciles, períodos menstruales prolongados e intensos (menorragias) o sangrados ante extracciones dentarias o cirugías. En el año 2008, se estudió en la Cátedra de Medicina Transfusional una familia de San Gregorio de Polanco donde algunas mujeres sufrían menorragias y hematomas fáciles en las cuales se encontró que eran portadoras de hemofilia B con niveles bajos de factor IX. La biología molecular utilizando la técnica de PCR demostró la presencia de una mutación c.835G-A asociada al cambio mis-

sense p.233 Ala-Thr. Los resultados fueron presentados por Gabriela Rivas, asistente de la Cátedra, en la VIII Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional, III Taller Internacional de Hemofilia y VI Congreso Cubano de Hematología en mayo del 2009 en la Habana, Cuba.

En 1936, Patek y Stetson (23) descubren que al agregar plasma normal al plasma de un paciente con hemofilia se corregía el tiempo de coagulación y sugirieron que en plasma normal existe una fracción que estaba ausente en la hemofilia. Al año siguiente, Patek y Taylor (24) caracterizaron este factor plasmático y lo denominaron globulina anti-hemofílica (AHG). La deficiencia del factor VIII es ahora denominada Hemofilia A.

En el año 1947, en Buenos Aires, Alfredo Pavlosky, postuló la existencia de dos tipos de hemofilia basado en que el tiempo de coagulación de un paciente con hemofilia se abreviaba al agregar sangre de otro hemofílico (25), y que la transfusión de plasma de ciertos pacientes con hemofilia también abreviaba el tiempo de coagulación de otro hemofílico.

Rosemary Biggs, Stuart Douglas y Robert Macfarlane comunicaron haber encontrado varios enfermos con una anomalía de la coagulación diferente de la hemofilia clásica, a la que llamaron enfermedad de Christmas (26) por el apellido de un niño que la padecía Stephen Christmas. A este factor se le denominó factor de Christmas y posteriormente correspondió al número IX. A los pacientes con su déficit en 1952 se los denominó hemofílicos B.

Stephen Christmas había nacido el 12 de febrero de 1947 y cuando su historia fue publicada tenía cinco años. Stephen y su hermano mayor Robin eran hijos de padres británicos. Luego de la segunda guerra mundial la familia emigra a Toronto en Canadá y a la edad de dos años se le diagnostica la hemofilia en el Hospital Sick Children. No tenía antecedentes familiares de sangrados y su tendencia hemorrágica se notó a los 20 meses de edad. En 1952 la familia retorna a Londres para visitar a sus familiares y durante esta estadía consulta en un hospital de donde envían una muestra de sangre a Bigg y MacFarlane en Oxford. Stephen fue el único miembro de la familia que no renunció a su ciudadanía británica para hacerse canadiense. Tenía pasión por la fotografía y estudió en el Ryerson Institute of

Technology de Toronto. Estuvo empleado por varios años como fotógrafo del Hospital de Sick Children de Toronto y también trabajó como taxista. Luego fue un activo luchador de la Canadian Haemophilia Society (CHS). Su nombre reaparece en la literatura médica en 1992 cuando se estudia su genotipo y se reporta por Taylor una nueva mutación (cisterna 206 serina) (27). El siguiente año, a la edad de 46, fallece por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida cuya infección contrajo por la infusión de hemoderivados, justo "before Christmas" el 20 de diciembre (28).

Luego de la descripción de la enfermedad de Christmas, Bigg y MacFarlane de Oxford, publican la primera edición del libro "Human Blood Coagulation and its Disorders" (29).

En el año 1953, Robert Rosenthal y colaboradores (30) describieron una tercera clase de hemofilia, que a diferencia de las anteriores, afectaba a dos mujeres y a un varón de una familia. Atribuyeron a esta enfermedad el déficit de un factor al que llamaron antecedente tromboplastínico del plasma y la nombraron a la enfermedad Hemofilia C. Varios años después a este factor se le asignó el número XI y se le quitó la denominación de hemofilia por no ser de herencia ligada al sexo y tener un cuadro clínico diferente con poca tendencia al sangrado.

En 1840, el cirujano Samuel Lane, describe en la revista The Lancet que el control de una hemorragia postoperatoria en un niño que padecía hemofilia A severa se realizó con la transfusión de sangre fresca. Hasta 1950 los pacientes hemofílicos se trataban con sangre total "fresca". Birch en 1937 (31), en un estudio realizado en 98 pacientes con hemofilia, encuentra que 6 pacientes han sobrevivido hasta los 40 años y que 82 han fallecido durante la niñez o adolescencia por accidentes triviales o cirugía menor.

Luego, aparece el plasma fresco como opción terapéutica y en la década de 1960, el crioprecipitado presentado Judith Pool para el tratamiento de la hemofilia A (32). En esta era, que podemos llamar de los hemocomponentes en el tratamiento de la hemofilia, nos enfrentábamos a complicaciones que hoy, en la era de los hemoderivados y factores recombinantes no se presentan. Los pacientes con hemofilia B por ejemplo sólo se trataban con plasma por lo cual ante una cirugía, para alcanzar niveles

hemostáticos, debíamos manejar el volumen administrando diuréticos. En la hemofilia A, con el uso de crioprecipitados de menor volumen se presentaban a veces reacciones pulmonares severas como el síndrome de trastorno respiratorio agudo que publicamos con Humberto Correa en 1982 (33).

En la década de 1970, comienza la era de los hemoderivados con la aparición de los primeros concentrados comerciales de factores de la coagulación liofilizados. Con ellos se inicia el sueño de la familia de pacientes hemofílicos dado que los concentrados no sólo mejoran el tratamiento sino también la calidad de vida. Comienza por ejemplo el tratamiento domiciliario con factor. Sin embargo, en la década de 1980 este sueño se ve truncado por uno de los mayores desastres iatrogénicos de la historia de la medicina en la que muchos pacientes hemofílicos se infectaron con el HIV y el virus de la hepatitis C por la infusión de estos concentrados de origen plasmático. Dado que se preparaban a partir de la mezcla de plasma de un gran número de donantes, la existencia de uno de ellos con infección contaminaba todo el lote produciendo un gran efecto amplificador. Así, a nivel mundial, entre el 70 y 90% de los pacientes que recibieron factores de la coagulación liofilizados se infectaron por estos dos virus. Pero, en los países donde por razones de disponibilidad o económicas no se utilizaron estos hemoderivados, la incidencia de la infección por estos dos virus fue mucho menor. En Uruguay, por ejemplo, donde los pacientes hemofílicos en la década de 1980 se siguieron tratando con plasma y crioprecipitados a partir de donantes locales unitarios, en un estudio de vigilancia centinela que realizamos entre 1988 y 1992, en la Cátedra de Hemoterapia, encontramos 8 (9%) de 87 pacientes estudiados infectados por HIV y 24 (45%) de 53 eran RIBA positivos para HVC (34). La determinación serológica obligatoria y rutinaria de los donantes de sangre para HIV en Uruguay se realizó a partir del año 1988 (Decreto PE 233/988) y desde 1995 para HCV (Decreto PE 31/995).

Actualmente, varios de estos pacientes infectados por HCV, antes del año 1995, están siendo tratados en la Cátedra de Medicina Transfusional con interferón alfa pegilado y ribavirina según el protocolo del Fondo Nacional de Recursos.

En 1984, aparece el primer hemoderivado virus inactivado por calor y luego se desarrollan las técnicas de solvente-detergente para los virus de cubierta lipídica (HIV, HCV, HBV) y la nanofiltración para los virus desnudos como el parvovirus B19 y hepatitis A (35). Los concentrados que se utilizan actualmente, virus inactivados, han demostrado ser seguros.

También en 1984, se caracterizó y clonó la estructura del gen del factor VIII (36) lo que permitió que en la década de 1990 se desarrollara el primer factor recombinante de uso comercial (37). En el nuevo milenio, aparecieron los factores recombinantes de segunda y tercera generación habilitados para su aplicación clínica (38) y los pegilados (para aumentar la vida media) aún en fase de experimentación. En los comienzos del siglo XXI también se demostraron los beneficios de los protocolos de profilaxis frente al tratamiento de los episodios hemorrágicos sobre todo la profilaxis primaria en niños (40). En el año 2008 la FDA aprueba los factores de la coagulación recombinantes para ser usados en los protocolos de profilaxis.

Podemos afirmar que en el momento actual, contamos con los factores de la coagulación más seguros desde el punto de vista de la transmisión de patógenos los cuales han sido agregados a la lista de medicamentos esenciales de la OMS, en su última edición de marzo del 2007. Pero, ante esta situación del desarrollo científico, existe una paradoja en el tratamiento actual de la hemofilia es decir, una aparente contradicción. Pues bien, en el siglo de la biotecnología en el que se dispone de los mejores tratamientos de la enfermedad, la Federación Mundial de Hemofilia (WFH, www.wfh.org) establece que el 70% de los pacientes no están diagnosticados y el 75% no está tratado. Pensamos que, el objetivo fundamental en los próximos años será entonces lograr la “socialización” del tratamiento de la hemofilia.

Importantes avances se han hecho en los últimos años desde el punto de vista genético y de la terapia celular. Mediante diagnóstico genético pre-implantacional (DGP) se han obtenido embriones libres de hemofilia. En el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla ya se han realizado algunos casos según lo comentado por Ramiro José Núñez de la Unidad de Hemofilia de ese hospital quien nos visitó

científicamente en abril de 2009 en las Jornada de “Retos clínicos y nuevas oportunidades en el tratamiento de la Hemofilia” que se realizó en Montevideo. El trasplante hepático cura la hemofilia, pero en lugar de trasplantar el órgano se está utilizando la terapia celular. En un estudio realizado en un modelo animal la infusión de células progenitoras endoteliales a ratones hemofílicos proliferan en el endotelio de los sinusoides hepáticos y producen niveles adecuados de factor VIII (41).

Todos estos adelantos, quizás en un futuro no muy lejano, nos pueden llevar a afirmar que la hemofilia ocurrió “desde los genes reales hasta la terapia génica”.

En el año 1926, Eric von Willebrand en Finlandia describió un trastorno hemorrágico en 23 de 66 miembros de una familia en las Islas Aland (42). Se encontraban afectados ambos sexos, el tiempo de hemorragia o de sangría se mostraba alargado, con un recuento plaquetario normal y un tiempo de coagulación con una retracción del coágulo normal.

Von Willebrand distinguió estas características, reconoció una base genética y llamó al trastorno “seudohemofilia hereditaria” ya que los pacientes no presentaban hemartrosis o sangrados profundos como en la hemofilia ni tampoco un alargamiento en el tiempo de coagulación. Identificó en forma incorrecta un patrón de herencia dominante ligada al cromosoma X. Una de las pacientes afectadas era Hjördis, que en el momento del diagnóstico tenía cinco años y falleció a los trece después de su cuarto período menstrual por menorragias. Cuatro de las hermanas de Hjördis habían muerto entre los 2 a 4 años y también se habían producido muertes en el período neonatal.

En 1928, George Minot de Boston, describió cinco casos clínicos en que los tiempos de sangría estaban prolongados pero contrariamente a lo descrito por von Willebrand el tiempo de fragilidad capilar dio negativo. Al continuar la investigación se le asignó a esta enfermedad el nombre de “hemofilia vascular” porque se pensaba que era un desorden de los vasos sanguíneos (43).

En la década de 1950 se descubrió que la hemofilia estaba ligada al sexo por lo que afectaba sólo a los hombres. Se conoció una nueva diferencia entre ambas enfermedades ya que von Willebrand había encontrado el

padecimiento hemorrágico predominaba en mujeres. En esta década quedó demostrado que lo descrito por von Willebrand estaba generalmente relacionado con un descenso del FVIII en sangre pero, los científicos se percataron que los miembros de una misma familia de hemofílicos tenían niveles igualmente bajos de FVIII mientras que en las familias con enfermedad de von Willebrand (EvW) los valores variaban. En esta época, comenzó a utilizarse la infusión de plasma para tratar estas patologías. Se realizó una transfusión de plasma de un paciente con hemofilia a uno con EvW provocando un lento aumento del FVIII, que se mantenía unos días para luego decaer. Por el contrario, al transfundir plasma a la inversa de EvW a hemofílico los valores del FVIII permanecían iguales. Así, se descubrió que en los casos de EvW se encontraba la deficiencia de un nuevo factor plasmático que podía ser corregida con la infusión de plasma hemofílico o normal (44).

En la década de 1960, se estableció que un antibiótico, la ristocetina, estimulaba la agregación plaquetaria en personas normales y con hemofilia pero no en la EvW.

Si se agregaba plasma pobre en plaquetas de una persona normal o hemofílica a un plasma rico en plaquetas de un paciente con EvW el antibiótico agregaba las plaquetas. Se demostró que el defecto en la funcionalidad plaquetaria no se debía a una alteración de esta célula sino a un factor externo (www.vwd-diagnostico.blogspot.com/2008/08).

Cuando se inyectaba FVIII semipurificado a un grupo de conejos, estos producían anticuerpos que reconocían una sustancia presente en las personas con hemofilia. Esta sustancia fue llamada antígeno del factor VIII (FVIII.R. Ag). Posteriormente se descubrió que se trataba de dos factores diferentes, el FVIII y el FvW que podían disociarse. Finalmente, en 1985 el FvW fue clonado, secuenciado por primera vez y se pudo estudiar la relación entre su estructura y función.

El FvW es codificado por un gen del brazo corto del cromosoma 12 (45) y se expresa exclusivamente en dos tipos de células el endotelio vascular y los megacariocitos donde se sintetiza la glicoproteína multimérica. Se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas (46). El FvW es libe-

rado a la sangre por estímulos fisiológicos y farmacológicos incluyendo los cambios en la fuerza del flujo sanguíneo, la trombina y la desmopresina.

En 1977 Pier Mannucci de Milán, demuestra que la desmopresina (DDAVP) puede aumentar tanto los niveles de factor VIII como de factor von Willebrand en algunas modalidades de hemofilia y enfermedad de von Willebrand (47).

El FvW tiene tres funciones principales. En primer lugar es la molécula adhesiva más potente del organismo. Cuando se produce una lesión del endotelio, une a las plaquetas a través de su receptor GPIb/IX al colágeno del subendotelio vascular. Facilita la agregación plaquetaria y por último, se une al FVIII protegiéndolo de su degradación por la proteína C (48).

La EvW ha sido dividida en dos grandes categorías que reflejan su fisiopatología: variantes cuantitativas y cualitativas. Los tipo 1 y 3 son variantes cuantitativas y se refieren a la disminución parcial o total del FvW. El tipo 2 son variantes cualitativas. Según la última clasificación revisada en 2006 por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis (ISTH), subdivide al tipo 2 en cuatro variantes: 2A, 2B, 2M y 2N o Normandy de acuerdo a específicos detalles del fenotipo.

El tipo 1 es el más frecuente. Gill y colaboradores en 1987 encontraron que el 77% de los pacientes del tipo 1 tenían el grupo sanguíneo 0 que es mayor que la prevalencia de dicho grupo sanguíneo en la población (49).

El tratamiento de la EvW comenzó en la década de 1950 administrando plasma, después de 1965 con crioprecipitado, luego con concentrados de FVIII de pureza intermedia que contienen aproximadamente la mitad de unidades de FvW con respecto a los niveles de FVIII en el mismo producto.

Actualmente, el tratamiento puede dividirse en dos tipos. Primero, terapias coadyuvantes para producir un efecto hemostático indirecto. Por ejemplo, en las mujeres con menorragias el uso de estrógenos y antifibrinolíticos como el ácido tranexámico (transamina) que fue descubierto por Dubber y colaboradores en 1965. Agentes hemostáticos tópicos como el gel de fibrina en extracciones dentarias. Segundo, terapias directas que elevan el FvW en sangre como la desmopresina

parenteral o nasal y la infusión intravenosa de concentrados FVIII/FvW de origen plasmático dado que hasta el momento no existen factores recombinantes. Los factores VIII recombinantes carecen de actividad de FvW.

En el año 2008, se ha introducido comercialmente en Uruguay un concentrado de FvW/FVIII de origen plasmático doblemente inactivado (calor y solvente detergente), de alta pureza con 450UI de FVIII y 400UI de FvW.

En un futuro se plantean avances terapéuticos adicionales como el uso de interleuquina 11 como complemento de la administración de desmopresina y el FvW recombinante.

El factor X fue descubierto por el estudio de dos pacientes con una tendencia hemorrágica congénita. La paciente Audrey Prower de 22 años de edad consultó en el University College Hospital de Londres en 1956 para ser investigada por su tendencia hemorrágica previo a una extracción dentaria. Ella tenía una historia anterior de dos sangrados importantes luego de dos extracciones dentarias en 1939 y 1945 y una hemorragia profusa luego de una amigdalectomía a la edad de 8 años que requirió transfusiones de sangre. Su hermano murió luego de una amigdalectomía por hemorragia a los 5 años. Ella tenía menorragias pero no relata hematomas fáciles ni sangrados importantes cuando se cortaba o golpeaba. En esta ocasión, luego de la extracción dentaria, tuvo sangrados intermitentes durante 8 días que fueron tratados con la aplicación de fibrina y trombina local. No fueron necesarias transfusiones (50) (51).

Al mismo tiempo, en 1957, Cecil Hougie y colaboradores (52) de Chapel Hill de Carolina del Norte en USA describen un paciente, Rufus Stuart de 36 años que presentaba epistaxis recurrentes, hematomas fáciles y ocasionalmente hemartrosis. En diciembre de 1955 presentó una particular hemartrosis severa de la cadera derecha que resultó en anemia y debió ser transfundido con una unidad de "sangre fresca". El árbol genealógico fue estudiado en detalle (164 miembros de la familia) llegándose a la conclusión de una herencia autosómica recesiva.

Frecuentemente Stuart vendía su plasma a las compañías comerciales que lo utilizaban para producir reactivos de diagnóstico. Siendo un fumador de larga data desarrolla un carcinoma de pulmón el cual es resecado quirúrgi-

camente pero lamentablemente lo conduce a la muerte el 16 de enero de 1989 a la edad de 70 años.

El plasma de ambos pacientes reaccionaban igual en el laboratorio y la deficiencia del nuevo factor se denominó inicialmente Stuart-Prower y luego factor X. Tanto el déficit de factor IX (Christmas) y del factor X (Stuart-Prower) fueron detectados por su tendencia hemorrágica.

En el año 1955, Oscar Ratnoff de Case Western Reserve University en Cleveland, USA comunicó un defecto en la coagulación de un paciente de profesión ferrocarrilero llamado John Hageman quien presentaba un tiempo de coagulación anormal pero sin tendencia al sangrado (53). El paciente de 37 años ingresó al hospital en julio de 1953 para una cirugía de corrección de su obstrucción pilórica secundaria a una úlcera duodenal diagnosticada en 1943. No tenía historia de sangrados previos a pesar de una amigdalectomía a los 6 años y una extracción dentaria a la edad de 36. La operación de gastrectomía parcial con gastroyeyunostomía fue realizada con la administración de 3500 ml de sangre fresca durante y después del procedimiento. El sangrado operatorio no fue excesivo y el postoperatorio se desarrolló sin complicaciones. El estudio del defecto in vitro de la coagulación, que corregía con plasma normal al igual que la mayoría de los factores descubiertos anteriormente, llevó a describir un nuevo factor al que se le denominó con el nombre del paciente, y después se le asignó el número XII. A la edad de 52 años Hageman fallece inesperadamente. En abril de 1968, sufre una fractura de la hemipelvis izquierda por la cual es admitido en el hospital. Estando internado, el día 12 desarrolla un cuadro súbito de insuficiencia respiratoria aguda con hipotensión y fallece. La autopsia revela que la causa de muerte fue, paradójicamente, un tromboembolismo pulmonar masivo (54).

En 1963 al factor estabilizador de la fibrina, que había sido descrito por Robbins y Laki en el año 1944 y 1951 respectivamente, se lo denominó factor XIII (55)(56).

En 1954 Irving Wright, profesor de Medicina Interna en Cornell University, durante una conferencia de trombosis propone la creación de una nomenclatura general para denominar los factores de la coagulación, dado que

se habían descrito tantos factores con nombres y propiedades diferentes que creaban confusión. En este mismo año se estableció el Comité Internacional para Nomenclatura de los Factores de la Coagulación (International Committee for the Nomenclature of Blood Clotting Factors) bajo la presidencia del propio Wright y contó con 23 miembros entre los que sobresalen Kenneth Brickhous, Robert Mac Farlane, Paul Owren, Alfredo Pavlosky, Armand Quick, Oscar Ratnoff, Walter Seegers, Jean Pierre Soulier y Marc Verstraete. En Oxford, en el año 1955, ocurrió la primera reunión y luego de tres años de deliberaciones, se denominaron con números romanos los factores del I al IX, los que fueron aprobados en Roma en el año 1958. Previamente el primer investigador en numerar al factor descubierto con números romanos fue Paul Owren en 1947 con el factor V.

En 1959, en la reunión de Montreal se le asignó al factor Stuart-Prower en número X.

En 1963, en Alemania se agregaron los factores XI y XII de acuerdo a la secuencia histórica de su descubrimiento y por último en 1963 en la reunión de Escocia se agregó el FXIII.

En 1964 el comité comienza a funcionar como International Committee on Haemostasis and Thrombosis (ICHT) el cual promueve la fundación de la actual Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis (International Society of Thrombosis and Haemostasis, ISTH) a partir de 1969 (www.isth.org). La ISTH a diferencia del ICHT que solo se ocupaba de la coagulación y enfermedades hemorrágicas agranda su temática a los trastornos plaquetarios, trombosis, fibrinólisis, trombolisis y enfermedades tromboembólicas.

Las publicaciones se realizan en la revista oficial de la ISTH, Journal of Thrombosis and Haemostasis (JTH). El primer presidente de la ISTH fue el Fritz Koller de Suiza quien junto con De Vries y Alexander identifican el factor VII de la coagulación.

A pesar de que luego de 1963 no se designaron más factores con números romanos, otras importantes proteínas que intervienen en la coagulación fueron descubiertas como el factor Fletcher por Hathaway en 1965 (57) y el factor Fitzgerald por Saito y colaboradores en 1975 (58). Estos factores, que llevan los nombres de los pacientes en los cuales

fueron descubiertos, al igual que Hageman sin tendencia al sangrado pero con un excesivo tiempo de tromboplastina parcial, fueron clasificados junto con el FXII como factores de “contacto” mostrando una interesante interrelación entre el sistema inflamatorio y el de coagulación.

Estudios posteriores describen que el factor Fletcher es idéntico a la prekalicreína plasmática y el Fitzgerald al kininógeno de alto peso molecular el cual actúa como co-factor de la activación de los factores XII y XI.

En el año 1964 dos grupos de investigadores casi en forma simultánea, concibieron, una serie de reacciones enzimáticas secuenciales, en las que el producto de una activa a la siguiente y fue comparada con una reacción en cascada. Este término aún es utilizado en la comunidad científica. El concepto de cascada de la coagulación se debe a Robert MacFarlane de Oxford en Inglaterra quien la publica en la revista Nature (59) y a Oscar Ratnoff en colaboración con Earl Davie de USA quienes publican en la revista Science (60) el concepto de “waterfall” en el mismo año.

Dicho modelo establecía que la coagulación se inicia de dos maneras. Una por activación del factor de contacto (XII), a lo que se denominó vía intrínseca y, otra a través del factor VII y el factor tisular, a la que se denominó vía extrínseca. Ambas vías producen la activación del factor X para generar la fibrina, a la que se llamó vía final común. En el terreno clínico, pudieron identificarse posteriormente diferentes enfermedades hemorrágicas al descubrir deficiencias de los factores de la coagulación, tanto hereditarias como adquiridas.

En 1913, Lee y White describieron el tiempo de coagulación de la sangre total (61) y en 1914 Howell el tiempo de coagulación del plasma o de recalcificación (19). Sin embargo, los test de coagulación que fundamentaban la teoría en cascada fueron principalmente el tiempo de protrombina descrito por Quick en 1930 que estudiaba los factores de la vía extrínseca y el tiempo de tromboplastina parcial (PTT) descrito en 1953 por Landgdel, Wagner y Brinkhous (62) de la Universidad de Carolina del Norte en USA, que analiza los factores de la vía intrínseca. En 1961, Proctor y Rapaport (63) describen el tiempo de tromboplastina parcial activado con kaolín (KPTT). En 1966, Hattersley (64) desarro-

lla el tiempo de coagulación activado (TCA) realizado a 37 grados. El TCA con celite, fue utilizado luego para medir la anticoagulación lograda por la heparina en los circuitos de circulación extracorpórea, como en la cirugía cardíaca, y su neutralización posterior con protamina. Nosotros lo usamos a principio de la década de 1980 para controlar la anticoagulación por heparina en las leucaféresis por filtración donde se realizaba un circuito de circulación extracorpórea y al final del procedimiento se neutralizaba la anticoagulación del donante con protamina (65).

La tromboelastografía (TEG) es una vieja técnica (1948) que mide las propiedades visco-elásticas que participan en la formación del coágulo (66). Actualmente, se ha desarrollado la tromboelastometría rotacional (ROTEM) que mide propiedades viscoelásticas de la sangre anticoagulada o no, luego de la inducción de la coagulación, lo cual intenta reproducir las propiedades reológicas que ocurren in vivo. Ofrece información útil sobre todos los estados de formación del trombo y de la coagulación. Mide el tiempo de formación del coágulo, su estabilidad, firmeza midiendo la interacción de las plaquetas y la polimerización de la fibrina así como la disolución del coágulo (hemostasis primaria, secundaria y fibrinólisis) (67).

La interpretación de los resultados en tiempo real, en las unidades de emergencia, cuidados intensivos o centro quirúrgico (“Point of Care”), es fácil cuando se utilizan métodos estandarizados dado que los resultados de ROTEM se expresan gráficamente y en números con variaciones leves o intensas de los valores normales. La hipotermia inadvertida en los pacientes quirúrgicos puede incrementar el sangrado. Las mediciones de ROTEM pueden ser ajustadas a la temperatura del paciente entre 22 y 42 centígrados (67).

La obtención de resultados en tiempo real es de particular importancia en cirugías como la del trasplante hepático y cardíaca tanto para el pre, intra y postoperatorio (68).

En la década de 1980 se cuestionó el modelo de la coagulación “en cascada” basado en las vías extrínseca, intrínseca y común. Éste no era suficiente para explicar la hemorragia grave que ocurre en los pacientes hemofílicos de manera que la vía intrínseca perdió importancia. Se corroboró que el principal mecanis-

mo que inicia la coagulación es el complejo del factor tisular unido a fosfolípidos y al factor VII activado. A este mecanismo se le denominó vía del factor tisular o vía primaria y a la activación por contacto se le denominó vía accesoria.

El concepto que la respuesta del organismo para mantener la homeostasis del sistema vascular se debía principalmente a procesos que ocurrían en los sistemas biológicos del contenido (sangre) mientras que el continente se presentaba como una selectiva pero estática barrera fisiológica ha caído en desuso desde ya hace varios años. La respuesta del organismo frente a una variedad de procesos fisiopatológicos incluye interacciones celulares del continente (endoteliales), del contenido (eritrocitos, plaquetas, leucocitos y células progenitoras circulantes) así como de factores solubles celulares o plasmáticos.

La hemostasis es un mecanismo fisiológico complejo que trata de evitar el sangrado. En él intervienen las células de la sangre, la pared vascular y proteínas plasmáticas. La fluidez de la sangre es mantenida por un equilibrio entre los factores procoagulantes por un lado y los inhibidores fisiológicos y el sistema fibrinolítico por otro.

Hasta hace algunos años, el modelo humoral de la coagulación se relacionaba con la presencia de niveles plasmáticos adecuados de factores proteicos (serinoproteasas) existiendo una relación directa entre la intensidad del descenso del factor plasmático y el riesgo de hemorragia como ocurre en las hemofilias por ejemplo.

En la década de 1990, Dougald Monroe y Maureane Hoffman desarrollan un nuevo modelo celular de la hemostasis donde las células de la sangre y del endotelio regulan el proceso de la coagulación en tres fases: iniciación, amplificación y propagación (69).

Este nuevo modelo rompe el paradigma anterior y establece que la coagulación es iniciada por la interacción del complejo Factor VII activado y Factor tisular con las superficies celulares. Para que este proceso se cumpla adecuadamente se necesitan por lo menos de dos tipos de células: las plaquetas y células que contienen factor tisular (FT) como la célula endotelial y los monocitos circulantes.

Desde la descripción del sistema circulatorio por William Harvey en 1628 y los estu-

dios posteriores por Malpighi se establece una separación física entre sangre y tejidos. En el siglo XIX, von Recklinghausen establece que los vasos sanguíneos no deben ser denominados simplemente túneles pues están limitados por células al igual que otros tejidos. Los estudios realizados por Starling en 1896 sobre el intercambio capilar sirven para corroborar la teoría de que el endotelio es una selectiva pero estática barrera física. Después, Heidenhahn describe al endotelio como un sistema celular secretorio activo.

Los estudios de microscopía electrónica de la pared vascular realizados por Palade en 1953 y los fisiológicos por Gowan en 1959 describen la interacción entre los linfocitos y el endotelio en las vénulas postcapilares (70). Luego, se desarrollan numerosos trabajos que demuestran las distintas funciones del endotelio: síntesis, secreción, almacenamiento, metabolismo, inmunológicas entre otras.

El endotelio es considerado en la actualidad como un órgano extendido que regula el tono vasomotor, el tráfico de células y nutrientes, mantiene la fluidez de la sangre, mantiene el balance entre mecanismos pro y antiinflamatorios, regula la respuesta inmune, sintetiza factores de crecimiento, participa de la generación de nuevos vasos y programa la muerte celular. Interpreta cambios en la composición de la sangre y de las fuerzas mecánicas recibiendo además información de las células y de la matriz extracelular. Para la regulación del tono vascular produce óxido nítrico (NO) y prostaglandina (PGI₂) que son vasodiladores o tromboxano A₂, endotelina-1 (ET-1) o angiotensina II (AT-II) que por el contrario crean vasoconstricción. Como elementos procoagulantes libera factor von Willebrand (FvW), factor tisular (FT), cofactores V y VIII e inhibidores de la fibrinólisis PAI-1 y PAI-2 (plasminogen activator inhibitor). Como factores antitrombóticos activa tres sistemas inhibidores de la coagulación, la antitrombina III (AT-III), trombomodulina –proteína C y el inhibidor del FT (TFPI) activando a su vez el sistema fibrinolítico a través del activador tisular del plasminógeno (t-PA).

El óxido nítrico es uno de los últimos factores descubiertos producido por la célula endotelial, que actúa a distancia sobre dos células, la plaqueta y la del músculo liso de la pared vascular produciendo antiagregación y

vasodilatación respectivamente. Esta historia merece ser contada dado que es el primer gas descrito que actúa como molécula mensajera.

El NO fue descubierto por Joseph Priestley en 1772 dos años después que el oxígeno. Por más de 200 años fue considerado un gas tóxico (71). A partir de la década de 1980 este concepto cambia radicalmente por varios descubrimientos que revelan el papel biológico de este gas.

Primero, Furchgott y Zawadzki (72) demuestran que las células endoteliales liberan una sustancia que es responsable de la relajación del músculo liso de la pared vascular al que denominan endothelium derived relaxing factor (EDRF) o factor relajante derivado del endotelio. En 1987, Palmer, Ferrige y Moncada (73) sugieren que el EDRF es el NO que se produce por oxidación de la L-arginina. En 1992, Malinski (74) finalmente demuestra esta sugerencia al medir in situ el NO de una célula endotelial. Luego, Ferid Murad (75) establece la activación enzimática que produce el NO en la célula del músculo liso para la relajación demostrando que el NO es una molécula mensajera producida por la célula endotelial. Furchgott, Murad e Ignaro reciben en 1998 el premio Nobel en Fisiología y Medicina por sus trabajos que descubrieron el papel biológico del NO.

Louis Ignaro, que es profesor del Departamento de Farmacología de la UCLA School of Medicine, fue reconocido por sus trabajos del NO como molécula de señalización en el sistema cardiovascular. Ignaro ha visitado dos veces Uruguay. En la última, en 2007 tuvimos oportunidad de conocerlo al dictar una conferencia "Nitric oxide and endothelial cell function: past, present and future" en el Instituto Pasteur de Montevideo.

Otro aspecto interesante de esta historia es que con estos trabajos se puede explicar la acción vasodilatadora e hipotensora de la nitroglicerina que fue utilizada por más de 100 años como droga para el tratamiento de la insuficiencia coronaria. La nitroglicerina es metabolizada en el organismo liberando NO que produce vasodilatación mejorando el flujo sanguíneo aún en las arterias con aterosclerosis.

Alfred Nobel (1833-1896) químico sueco nacido en Estocolmo, tras recibir una educación académica en San Petersburgo (Rusia) y

en USA, donde estudió ingeniería mecánica, regresó a San Petersburgo a trabajar con su padre elaborando minas, torpedos y otros explosivos. En una fábrica de Heleneborg en Suecia trató de desarrollar un método seguro para manipular la nitroglicerina después que una explosión en 1864 matara a su hermano pequeño y a cuatro personas. En 1867, Nobel consigue su objetivo para reducir la volatilidad de la nitroglicerina, hacerla menos peligrosa y más manejable. La mezcla con un material poroso absorbente produciendo la dinamita. Cuando murió dirigía fábricas para la elaboración de explosivos en diversas partes del mundo. En su testamento legó la mayor parte de su fortuna para crear una fundación que estableciera premios anuales por los méritos realizados en Física, Química, Medicina y Fisiología, Literatura y Paz Mundial. El premio de Economía se concedió a partir de 1969.

La nitroglicerina fue sintetizada por primera vez por Sobrero en 1846. En 1857, Brunton de Edimburgo suministró nitrito de amilo mediante inhalación y notó que el dolor de origen anginoso se aliviaba en el transcurso de 30 a 60 segundos. William Murrell concluyó en 1879 que el efecto de la nitroglicerina imitaba al nitrito de amilo y estableció el uso de la nitroglicerina por vía sublingual para el alivio del ataque anginoso agudo y como profiláctico antes de hacer esfuerzos. Uno de los primeros pacientes en usar la nitroglicerina sublingual fue Alfred Nobel para el tratamiento de su angina pectoris.

Si bien la célula endotelial es la gran productora de NO, el principal reservorio es el eritrocito por lo cual fue denominado el tercer gas dado que, el glóbulo rojo transporta además oxígeno y dióxido de carbono. Cuando la célula endotelial libera NO éste es captado por el eritrocito a través de una molécula transportadora de membrana (banda 3) y se une a la hemoglobina (76). En los tejidos, en un entorno hipóxico, es liberado por el eritrocito al igual que el oxígeno, produciendo vasodilatación y antiagregación plaquetaria, condiciones que mejoran el flujo sanguíneo. Por el contrario, en la hemólisis intravascular el NO liberado a la sangre rápidamente es metabolizado a nitrato que es inactivo. A su vez, del eritrocito se libera una arginasa que actuando sobre la L-arginasa produce ornitina disminuyendo la producción de NO (77). Esto explicaría la

necrosis tubular aguda que se observa en la hemólisis intravascular por vasoconstricción, isquemia y agregación plaquetaria así como el dolor y las microtrombosis de las crisis hemolíticas en la anemia falciforme (78).

En base a la nueva teoría celular de la coagulación se ha empleado el FVII recombinante activado (rFVIIa) en el manejo de situaciones clínicas que condicionan el sangrado microvascular severo. El rFVIIa es un análogo sintético de del FVII plasmático con una estructura y actividad similar. Se obtiene por ingeniería genética y se desarrolló en la década de 1980 en Dinamarca. Fue aprobado para su uso clínico en Europa en 1996 y por la FDA en 1999. Inicialmente se utilizó para el manejo de pacientes hemofílicos con inhibidores de los factores VIII y IX y en los enfermos con deficiencia congénita de FVII. En el Hospital de Clínicas, hemos utilizado el rFVIIa para tratar a un paciente con deficiencia de FVII previo a un acto quirúrgico que se desarrolló sin sangrados. El trabajo fue presentado en el XXVIII Congreso Internacional de la Federación Mundial de Hemofilia (WFH) en Estambul-Turquía, en junio del 2008. En el Hospital Pereira Rossell, se utilizó el rFVIIa para el tratamiento con éxito de un niño, de 8 años de edad, con una hemofilia A y un inhibidor del FVIII, que tuvo un hematoma renal y del músculo psoas luego de un traumatismo. El trabajo, se presentó en el XXXI Congreso Mundial de la Sociedad Internacional de Hematología que se desarrolló en Punta del Este-Uruguay en marzo del 2007.

El rFVIIa tiene dos acciones fundamentales a nivel de la hemostasis. Una, que es FT dependiente, actúa en la fase de iniciación del nuevo modelo celular formando un complejo FT-FVIIa que produce pequeñas cantidades de trombina a nivel del sitio de lesión vascular. Esta trombina formada a su vez activa plaquetas y factores de la coagulación que intervendrán en las siguientes fases de amplificación y propagación de la hemostasis.

La otra, mucho más importante desde el punto de vista clínico, es FT independiente dado que el rFVIIa actuaría directamente sobre la superficie plaquetaria activando el FX y produciendo rápidamente grandes cantidades de trombina que convierte el fibrinógeno en fibrina. Esta acción de bypass del sistema hemostático, actuando directamente sobre la

producción final del fibrinógeno en fibrina sin la necesidad de los FVIII y FIX, explicaría su acción terapéutica en los pacientes hemofílicos con inhibidor. Las dos limitantes para que esta función no FT dependiente se cumpla adecuadamente serían la presencia de un recuento plaquetario no menor de 50.000/mm³ y un fibrinógeno no menor a 50 mg%. (79).

Actualmente, por esta acción, el uso del rFVIIa se ha extendido para el tratamiento de trombocitopatías y trombocitopenias. En la trombostenia de Glanzman, una rara trombocitopenia congénita caracterizada por una alteración cuanti o cualitativa del receptor GPIIb/IIIa que se traduce en alteraciones de la agregación plaquetaria, el rFVIIa ha demostrado ser efectivo y seguro para detener sangrados y para actos quirúrgicos (80).

También se ha descrito su acción beneficiosa en el síndrome de Bernard-Soulier (81), alteración de la adhesividad plaquetaria por defecto o ausencia de GPIb, en la enfermedad del pool de depósito (82) así como en trombocitopatías adquiridas como la uremia (83).

Con respecto a los pacientes trombocitopénicos el rFVIIa parece ser efectivo en la detención de sangrados incontrolables en el 78% de los pacientes hematológicos tratados con una dosis media de 90 mcg/Kg (84).

La hemorragia alveolar difusa (DAH) es una grave complicación en aquellos pacientes que reciben un trasplante de CPH, la cual requiere, por lo general, el ingreso de los mismos a una unidad de cuidados intensivos. La mortalidad excede el 50% de los pacientes que requieren ventilación mecánica. En un trabajo reciente, se muestra una respuesta favorable de la DAH en seis pacientes tratados con la administración de rFVIIa directamente en el alvéolo a una dosis de 50 mcg/Kg (85). La administración local del rFVIIa, inclusive a una dosis menor, tendría un efecto hemostático más efectivo que la administración de una mayor dosis intravenosa de 90 a 120 mcg en este tipo de pacientes.

También, el rFVIIa ha mostrado efecto terapéutico beneficioso, asociado a la terapia con hemocomponentes, para tratar las hemorragias masivas de causa obstétrica (86) o hemorragias luego de cirugías cardíacas (87) o trauma (88).

¿Estamos frente al agente hemostático universal?

En los últimos años, ha habido un crecimiento exponencial de trabajos científicos, de casos o series de casos, que muestran el uso terapéutico de este factor en una gran variedad de causas hemorrágicas aunque son menos los trabajos randomizados controlados con placebo. Tiene como ventajas que, al ser recombinante no tiene riesgos de transmitir infecciones y al estar activado actúa rápidamente sobre el sistema hemostático. La corta vida media del FVII infundido de 2 a 3 horas, las probables complicaciones tromboembólicas en los pacientes de riesgo, así como su alto costo actuarían como desventajas. Sin embargo, cuando se usan dosis únicas o una segunda repetida a los 20-30 minutos para tratar sangrados incontrolables obstétricos, quirúrgicos o traumáticos así como su uso local en la DAH, el costo riesgo-beneficio estaría a favor del rFVIIa al reducir el número de hemocomponentes, detener el sangrado y mejorar la evolución del paciente.

En el año 1937 surgió el concepto de trombofilia en contraposición al cada vez más amplio concepto de hemofilia. Fue introducido en la medicina por primera vez por Nygaard y Brown (89), para definir la patología caracterizada por trombosis arteriales y/o venosas con tendencia a la recurrencia. Estos autores propusieron que la trombofilia se debía a la hipercoagulabilidad del plasma.

En 1666, Marcelo Malpighi (90) describe "polyps" en el corazón y su aspecto similar a los coágulos que se producen in vitro y produciendo lavados para extraer los eritrocitos descubre la fibrina.

Inclusive antes, en 1507 Benivieni describe la muerte de un paciente con un gran "tubercle" en el ventrículo izquierdo (91). En el año 1731 el cirujano francés Jean Louis Petit mencionó la existencia de coágulos intravasculares luego de una cirugía. En 1817, James Stewart (92) describía "polypy" en ambos ventrículos de un hombre que había fallecido a la edad de 30 años. En 1823, Laënnec (93), que en 1816 había inventado el estetoscopio, distingue los coágulos pre y post mortem del corazón. John Hunter (94), activo cirujano de la Armada británica, fue el primero en describir la inflamación de la pared de las venas, flebitis y su asociación con trombosis. En 1793, Hunter pensaba que la inflamación podía ser aliviada con sangrías.

Cruveilhier (95) en 1862 agrega la congestión de los tejidos y el éstasis capilar como causa de trombosis. Rudolph Virchow nacido en 1821 en Prusia, hoy Polonia, obtuvo su título de médico en 1843 en el Instituto de Medicina de Berlín en Alemania. A mediados del siglo XIX, en 1856, trabajando en el hospital Charité de Berlín, introduce la idea de que las alteraciones en la composición de la sangre son una causa de trombosis y agrega el concepto de tromboembolismo pulmonar dado que al realizar la autopsia de un hombre joven encuentra coágulos en la vena crural derecha y en la arteria pulmonar (96). En agosto de 1845 Virchow había realizado 76 autopsias. En 18 de ellas encontró trombos venosos y en 11 émbolos pulmonares. Así creó la famosa tríada de causas de trombosis que aún sigue vigente: éstasis, lesión vascular y alteraciones en la composición de la sangre que conducen a hipercoagulabilidad. Demuestra además que la inflamación y la infección ocurren después que el trombo se ha formado y no antes como sugería Cruveilhier.

Virchow fallece en el año 1902 a la edad de 81 años y la mención a su famosa tríada no aparece en ningún libro o artículo científico hasta después de 1950 es decir 100 años después de sus trabajos en trombosis.

Max Schultze en 1874 describe el tercer elemento celular de la sangre como esférulas (spherules) y frecuentemente ocurren formaciones granulares que parecen ser el comienzo de la coagulación. Schultze funda la revista *Archiv für mikroskopische Anatomie* donde publica su trabajo (97) la cual ha sobrevivido y prosperado y actualmente lleva el título de *Cell and Tissue Research*.

Hayem también reconoce la existencia de estas células pero piensa erróneamente que contienen hemoglobina y son precursores de los eritrocitos por lo cual las denomina hematoblastos (98).

En 1882, Giulio Bizzorero (99) nacido en Varese en la región de Lombardía en Italia, quien trabajó con Virchow en Berlín, descubre la relación de las plaquetas con la trombosis. En su monografía, claramente reconoce estas células pequeñas separándolas de los "blood corpuscles" descritos por el holandés Leeuwenhoek en 1674 cuando construye su primitivo microscopio y de los leucocitos descritos por William Hewson. Sugiere, por primera

vez, que a estas células se le debe denominar “plattchen” y le asigna su función hemostática.

Determina además el mecanismo de la formación del trombo blanco. Concluye que “the elements of a third kind” consisten de tres constituyentes: una parte granular, una transparente y otra invisible que induce la coagulación. No contienen núcleo ni hemoglobina como sostenía Hayem.

En 1854, Karl Rokitsansky (100) describe el proceso aterosclerótico como responsable de la formación del trombo de fibrina y otros componentes de la sangre en las paredes arteriales.

En 1865, Armand Trousseau (101) determina que la tromboflebitis (phlegmasia alba dolens) refleja la presencia de un carcinoma visceral o gástrico. Irónicamente, Trousseau desarrolla tromboflebitis en su pierna izquierda en enero de 1867 y reconoce el pronóstico de su enfermedad que lo lleva a la muerte en junio del mismo año.

En 1965, Egeberg (102) describe la primera familia con factor de riesgo genético que determina la hipercoagulabilidad: la deficiencia de AT III. Sin embargo, esta deficiencia sólo explica un pequeño porcentaje de las trombosis venosas sin factores de riesgo adquiridos dado que solo aparece en el 0,1% de los pacientes con primer episodio trombótico.

En la década de 1980, Griffin y colaboradores (103) y Comp y Esmon (104) descubren respectivamente las deficiencias genéticas de los otros anticoagulantes naturales, las proteínas C y S estando presentes en el 0,5% de los pacientes con primer episodio trombótico. En 1993, Dahlback y colaboradores (105) demostraron la asociación entre la resistencia heredada a la proteína C activada y el desarrollo de trombosis venosa. La base genética fue descubierta por Rogier Bertina y colaboradores (106) en Leiden en 1994, demostrando una mutación puntual del gen que codifica el FV de la coagulación. La proteína C normalmente metaboliza e inactiva los cofactores y factores lábiles de la coagulación (FV y FVIII). La mutación genética produce un cambio en la secuencia de aminoácidos del FV (arginina por glutamina en la posición 506) que es uno de los sitios de clivaje de la proteína C (FV Leiden).

Posteriormente en 1996, también el grupo de Bertina (107) identifica una nueva mutación que determina una ganancia de función

en el gen de protrombina que se asocia a hipercoagulabilidad y trombosis (PT G20210A).

Los anticuerpos antifosfolípidos (AFL) fueron detectados por primera vez en pacientes con sífilis a partir de la reacción de Wassermann en 1906. En la década de 1950 se publicaron los primeros casos de pacientes con lupus eritematoso sistémico que presentaban un inhibidor que prolongaba los ensayos de coagulación dependientes de fosfolípidos (108).

En las décadas de 1960 y 1970 algunos estudios hallaban la asociación de los AFL con trombosis y pérdidas fetales. Sin embargo, recién en 1980 esta asociación fue considerada relevante y se propuso el término Síndrome Antifosfolipídico (SAF) para definir a los individuos que presentan AFL en asociación con complicaciones clínicas de trombosis venosa, arterial, pérdidas fetales recurrentes y/o trombocitopenia (108).

Luego, se describen otras trombofilias genéticas como el aumento de la lipoproteína a Lp(a) que al tener un parecido estructural con el plasminógeno le permite competir con él disminuyendo la fibrinólisis (109) y la variante termolábil C677T metilentetrahidrofolatoreductasa (MTHFR) que, sobre todo en su forma homocigota, produce niveles aumentados de homocisteinemia la cual tiene una acción tóxica sobre el endotelio arterial favoreciendo la trombosis (109).

Recientemente se ha descrito un factor que se encuentra en los gránulos densos plaquetarios, el polifosfato. Promueve la coagulación acelerando la activación del factor V y cesa la función de una proteína anticoagulante natural, el inhibidor del factor tisular (TFPI). El polifosfato es degradado por las fosfatasas de la sangre (110).

Anticoagulantes de uso clínico

Durante muchos años se pensó que una gran cantidad de enfermedades provenían de la “mala sangre” y por tanto la cura eficaz era realizar sangrías. Como ya vimos, la lanceta fue utilizada a diestra y siniestra. Sin embargo, en otros muchos casos se utilizaba una bomba extractora biológica: la sanguijuela. Ya en el siglo II AC, el médico y botánico griego Nicandro de Colofón recogía en su poema Theriaca la primera referencia al uso terapéutico de la sanguijuela. Theriaca es un poema

de unos tres mil versos sobre los tóxicos de origen animal y su tratamiento. Por ello, durante mucho tiempo theriaca fue sinónimo de antídoto. Las sanguijuelas, son anélidos que se utilizaron durante gran cantidad de años para tratar numerosos trastornos desde dolores de cabeza (se aplicaban en la sien), la obesidad e incluso algunos tumores. De hecho, durante los siglos XVIII y XIX el *Hirudo medicinalis*, la especie utilizada por los médicos, llegó a estar en peligro de extinción. Uno de los facultativos que las usaron en ese período fue el obstetra inglés James Blundell quien se considera realizó la primera transfusión con sangre humana (111). Pero, estos bichitos han sido famosos porque contienen en su saliva un compuesto anticoagulante, la hirudina, un inhibidor selectivo de la trombina. Esta sustancia detiene la formación del coágulo con el fin de que el animal se alimente durante más tiempo sin que se coagule la sangre de su víctima. Así, durante la Edad Media, los peregrinos que recorrían el camino de Santiago solían hacer altos en su caminata para tomar baños de agua con sanguijuelas. De esta manera aliviaban los edemas pero ellos pensaban que era por el reposo. No sabían que estaban haciendo profilaxis de la enfermedad tromboembólica. En el siglo XXI las sanguijuelas han vuelto a sus andanzas. En el 2003, el número de marzo de la revista *International Journal of Clinical Practice* (112) se publica un trabajo titulado “El retorno de la sanguijuela” y en *Annals of Internal Medicine* de noviembre del mismo año un grupo de médicos alemanes establece que el tratamiento con *Hirudi medicinalis* tiene un efecto antiinflamatorio superior que el uso de diclofenac tópico (113).

En los hospitales de USA las sanguijuelas se comenzaron a utilizar a partir de 1976 pero la FDA aprueba su uso en el año 2004 como animales acuáticos para ser utilizados como productos sanitarios.

Donde ha tenido más éxito en el uso de las sanguijuelas es en cirugía. Se usan habitualmente para tratar complicaciones vasculares de ciertos implantes (dedos u orejas) y en cirugía maxilofacial de aquellos pacientes que al realizarles un colgajo sufren congestión venosa. Para esta complicación que se produce en el 20% de las cirugías de reconstrucción facial no hay ningún fármaco que la solucione. La sanguijuela primero absorbe la sangre

acumulada en el colgajo aliviando la compresión y la hirudina que queda en la mordedura impide que se coagule de manera que el injerto sigue des congestionándose (114).

En 1957, Markwardt (115) denomina a la sustancia anticoagulante de la sanguijuela hirudina y en 1985 se establece la bioquímica del compuesto, un polipéptido que contiene 65 aminoácidos.

A mediados de la década de 1980 se desarrollaron sustancias anticoagulantes similares a la hirudina (hirudinas recombinantes) como alternativas a la heparina. Son una antitrombina tan potente que tienen mayor riesgo de sangrado que la heparina. Se utilizan cuando los pacientes no pueden recibir el tratamiento anticoagulante clásico por reacciones adversas. No requiere de la presencia de AT III para su acción y ésta no es inhibida por el factor plaquetario 4 (116).

El descubrimiento de la heparina, el primer anticoagulante de uso clínico, es asignado universalmente a Jay McLean en 1916. Era discípulo de William Henry Howell en el Johns Hopkins Medical School en Baltimore, USA. Irónicamente, Mc Lean estaba trabajando en una investigación con extractos de hígado y corazón de perros para purificar sustancias procoagulantes (cefalinas). Describe su hallazgo diciendo que la “courin”, sustancia purificada por precipitaciones repetidas en alcohol a 60 centígrados a partir de extractos de corazón de perros no tenía efectos tromboplásticos como las cefalinas sino por el contrario anticoagulante. Lo demostró agregando a 8 gotas de plasma de perro, tres gotas de courin y tres gotas de suero. A las seis horas el coágulo no se había formado. Por el contrario, cuando se agregaba cefalina extraída del corazón del perro en lugar de “courin” el coágulo se formaba en 3 minutos frente al tubo control que lo hacía en 9 minutos. Lo mismo ocurría cuando se utilizaba la “heparphosphatide” purificada del hígado del perro también por sucesivas precipitaciones en alcohol a 60 centígrados. El jefe de la investigación, Howell catedrático en Fisiología y especialista en coagulación, fue inicialmente escéptico, pero se convenció finalmente del hallazgo de su estudiante cuando la sangre fresca de un gato no coagulaba al agregar esta sustancia (117). En una conferencia que dictó Howell el 7 de abril de 1917 expuso los hallazgos del primer

año de trabajo sobre la sustancia que previene la coagulación de la sangre tanto *in vitro* como *in vivo*. La sangre del perro se volvía incoagulable cuando se administraba 100 mg por kilo de peso de esta sustancia purificada en su laboratorio. La inyección en animales no producía aumento de la presión arterial, de la frecuencia cardíaca o la respiración. Howell encontró que la inhibición de la coagulación se realizaba durante la primera fase del proceso dado que la protrombina circulante no se encontraba activada. Pensaba además, que esta antiprotrombina natural tenía una distribución general en el organismo. La última conclusión de su conferencia establecía que las dos sustancias, la cefalina y la antiprotrombina, influenciaban el sistema de coagulación de manera opuesta una acelerándolo y la otra retardándolo. Como ninguna de las dos sustancias provocan reacciones adversas cuando se inyectan a animales Howell establecía que en un futuro cercano podrían ser aplicadas para el tratamiento de las alteraciones de la coagulación en seres humanos.

Después que McLean dejara la Universidad, Howell se dedicó a estudiar este fenómeno y en 1918 otro alumno Emmett Holt Jr extrae otra sustancia, también liposoluble, del hígado del perro, pero diferente a la de McLean, que Howell denomina heparina lo cual proviene de la palabra griega “hepar” que significa hígado (118). Entre 1922 y 1926 introduce un protocolo para extraer heparina hidrosoluble. Esta heparina comienza a ser producida comercialmente por una compañía farmacéutica de Baltimore (Hynson, Westcott and Dunning) pero los estudios realizados en la Clínica Mayo de Minnesota por Edward Mason demuestran que esta preparación causa reacciones adversas como cefaleas, fiebre y náuseas (119). En 1924, Masson, utilizando un extracto de heparina que inyectó a voluntarios humanos sanos demostró que el tiempo de coagulación normal de 10 minutos se incrementaba a 30 minutos una hora después de la inyección y se reducía a 20 minutos otra hora después pero, algunos individuos, experimentaron reacciones adversas serias.

Sin embargo, la compañía farmacéutica no investiga la purificación de la heparina.

En 1931, Howell se retira del John's Hopkins y tampoco realiza otros estudios sobre la droga.

Por mucho tiempo siguió siendo un reactivo de laboratorio usado para prevenir la coagulación de las muestras de sangre. Esta demora antes de usarse terapéuticamente, se debió probablemente a los problemas presentes con la extracción a gran escala y purificación de la materia activa. En 1928, Charles Best, cuyo nombre está asociado con el de Banting por el descubrimiento de la insulina en el Connaught Laboratories de Toronto formó un equipo de bioquímicos, fisiólogos y clínicos para investigar la heparina. Dado el alto costo de la heparina extraída del hígado buscan otras fuentes tisulares. Encuentran que además del hígado, la heparina es abundante en el músculo y en el pulmón pero en cambio hay una muy pequeña proporción en sangre que es donde la droga ejerce su función (120). Así, se desarrolló un proceso de extracción de los pulmones bovinos y luego de intestinos porcinos.

En 1935 se obtuvo suficiente heparina pura para que Gordon Murray, un cirujano canadiense de Toronto (miembro del equipo médico de Best) y su colega sueco Clarence Crafoord de Estocolmo, trabajando en forma separada, realizaran las primeras pruebas clínicas metodológicas en el contexto de la profilaxis de la trombosis venosa postoperatoria. En 1937, Murray publica el uso de la heparina para la prevención de la trombosis en perros y luego en humanos pero, sin efectos tóxicos (121).

En 1939, Jay McLead 23 años después de que hallara la sustancia anticoagulante liposoluble del hígado canino, comienza a investigar la eficacia clínica de la heparina en pacientes con endocarditis. Lamentablemente los dos pacientes fallecen por la enfermedad y no se pudo demostrar la efectividad de la droga (122). En 1943 fue utilizada por McLead para preservar un miembro gangrenoso y evitar la amputación (123).

Antes de 1940, era un concepto generalizado en la comunidad médica que Howell era quien había descubierto la heparina. Sin embargo, McLead realizó varias conferencias nacionales y escribió varias cartas a Best reclamando su descubrimiento pero, mantuvo esta campaña en forma discreta hasta que Howell murió en 1945 debido a que no quería entrar en controversias dada la larga relación laboral que había tenido con él. Luego de su muerte en 1959, el orbituario establece “el descubridor de la heparina” sin mención a

Howell. En 1963 se coloca una placa recordatoria en el John's Hopkins que dice "por su contribución al descubrimiento de la heparina en 1916 en colaboración con el Profesor William Henry Howell" (124).

En 1939, Brinkhous y colaboradores (12) encuentran que la heparina actúa como anticoagulante sólo en presencia de proteínas plasmáticas y en 1968 Abildgaard purifica y caracteriza este factor plasmático como la ATIII (125). En la investigación de Boston en 1973, Rosenberg y Damus caracterizan el complejo heparina-ATIII (126).

A principios de la década de 1950, Connaught Laboratories deja de producir la heparina.

Durante muchos años, por lo menos hasta mediados de la década de 1970, la heparina fue administrada sólo intravenosa. Los estudios de Best en la década de 1950 determinaron el contenido plasmático de la heparina endógena aproximadamente en 0,1 unidades por ml, introduciendo así el concepto de la terapia con heparina a bajas dosis (127). No obstante, fueron necesarios más de 20 años para validar este concepto. A principios de la década de 1970, los esfuerzos cooperadores del Instituto Choay de Francia y los del cirujano británico Vijay Kakkar, confirmaron este avance. La firma farmacéutica Choay desarrolló la sal de heparina de calcio en forma concentrada y altamente purificada, posibilitando que fueran usadas cantidades mucho más pequeñas y permitiendo la administración subcutánea.

En 1971, Kakkar fue el primer investigador que demostró la eficacia de la Calciparina en bajas dosis (tres inyecciones subcutáneas por día) lo cual fue confirmado en 1975 en un estudio multicéntrico internacional realizado en 4121 pacientes sometidos a cirugía general (128). Hasta fines de 1980, el régimen a bajas dosis de Kakkar continuó siendo el método profiláctico estándar usado mundialmente.

Andersson y colaboradores (129) demostraron que los diferentes pesos moleculares de las diversas cadenas de polímeros de los cuales consta la heparina podrían estar relacionadas con los efectos en distintas serinoproteasas del sistema de coagulación y que sólo una pequeña fracción de la molécula de heparina conectada a la ATIII era responsable de la actividad anticoagulante de las cadenas (sitio activo).

Después de estos estudios surge la idea de fraccionar la molécula de heparina para producir mitades de bajo peso molecular (HBPM) dotadas con propiedades biológicas diferentes a las de la heparina no fraccionada (HNF). En base a esta hipótesis se aceptó que la inhibición del FX activado podía ser la expresión de la actividad antitrombótica y que la inhibición de la trombina era la expresión de su acción anticoagulante. Era lógico suponer que las HBPM podían ser agentes antitrombóticos con bajo riesgo de sangrado.

Jean Choay (130) fue el primero en darse cuenta de estos avances y su aplicación terapéutica. Consecuentemente, esto condujo al uso de la fracción de la heparina CY 216 en los estudios clínicos pioneros realizados por Kakkar en Londres en 1983. Las HBPM son actualmente utilizadas mundialmente para la profilaxis y tratamiento de los desórdenes tromboembólicos y tienen como ventaja que la dosis se calcula por el peso corporal sin necesidad de monitoreo o ajuste de la misma.

Trabajando en forma separada, los investigadores del Instituto Choay, el equipo de Lindahl en Suecia y el de Rosenberg de Boston buscaron definir la secuencia funcional crítica dentro del anticoagulante activo, el glucosaminoglicano. Como resultados de estos esfuerzos Choay tuvo éxito en sintetizar el lugar pentasacárido responsable de la unión de la heparina con la AT.

La fondaheparina (Fondaparinux) es un pentasacárido sintético que mediante su unión a la ATIII plasmática inhibe selectivamente el factor Xa. No tiene efectos directos sobre la trombina y las plaquetas por lo cual puede usarse en la trombocitopenia inducida por heparina (131). Su lanzamiento comercial en Uruguay fue realizado en el XXXI Congreso Mundial de la Sociedad Internacional de Hematología que se desarrolló en marzo del 2007 en Uruguay (132). En el nuevo milenio han aparecido numerosos trabajos que aprueban su uso clínico.

Anticoagulantes orales

En 1929, Henrik Dam en Dinamarca descubrió que los pollos alimentados sin grasas en la dieta desarrollaban una enfermedad hemorrágica que corregía administrando un extracto lipídico de alfalfa. Luego, se aisló y caracterizó el compuesto activo, la filoquinona, que se

conoció como la vitamina de la coagulación. Debido a que el término en danés se escribe con k (koagulations vitamin) se denominó, como hoy se conoce, vitamina K (133) (134).

Por su parte, Edward Doisy de USA, demostró que además de las plantas verdes numerosas bacterias sintetizaban vitamina K. A ambos investigadores se les concedió el premio Nobel en 1943 por el descubrimiento de esta vitamina liposoluble.

La naturaleza hemorrágica de la deficiencia de la vitamina K fue localizada en una alteración del complejo protrombina lo cual explicaba la enfermedad hemorrágica neonatal que se producía en recién nacidos normales, sobre todo alimentados a pecho dado que la leche materna contiene muy poca vitamina K comparada con la leche de vaca.

La síntesis de esta vitamina se logró por Almquist y Close en 1939 (135) y su uso profiláctico rutinario en recién nacidos fue recomendada por la Academia Americana de Pediatría (AAP) en 1961 (136).

En 1941, el bioquímico Karl Link descubre el dicumarol (hidroxicumarina), el primer anticoagulante oral. En 1945, Link estando internado por una pleuresía, se le ocurre la idea de usar este anticoagulante como raticida dado que los animales morirían de hemorragia interna. Pero, el dicumarol era un raticida de pobre acción dado que actuaba muy lentamente. Poco tiempo después hallaron un compuesto menos tóxico y más eficaz la warfarina cuyo nombre proviene de la unión de las iniciales del lugar donde se obtuvo Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF) seguido del sufijo tomado del nombre original cumarina, que fue propuesto como raticida en 1948 por el propio Karl Link.

Los cumarínicos son antagonistas de la vitamina K y su uso clínico se ha mantenido durante estos 50 años en la prevención de la embolia en pacientes con prótesis valvulares cardíacas, como prevención y tratamiento de la trombosis venosa, las arritmias prolongadas y trombofilias entre otras. En 1983 la OMS (137) recomendó adoptar el sistema INR (International Normalised Ratio) para estandarizar los resultados del tiempo de protrombina. La mayoría de los tratamientos antitrombóticos requieren un INR entre 2 y 3.

Con el nuevo milenio, aparece una nueva generación de anticoagulantes orales.

El dabigatrán (Pradaxa), representado por la empresa Boehringer, es un inhibidor directo y reversible de la trombina que a diferencia de los cumarínicos tiene poca interacción con otros medicamentos. No necesita control biológico.

En marzo de 2008, la Comisión Europea de Medicamentos aprobó su uso como profilaxis de trombosis venosas en la cirugía de reemplazo total de cadera y rodilla (138).

El Rivaroxabán (Xarelto), representado por el Laboratorio Bayer, es una droga sintética que actúa como un inhibidor directo del factor Xa y no necesita de la AT-III para actuar. Se administra por vía oral en dosis únicas diarias. No necesita monitoreo biológico salvo en situaciones especiales (138). La inhibición del factor Xa es un punto clave en la trombopprofilaxis dado que una molécula de factor Xa cataliza la formación de aproximadamente 1000 moléculas de trombina en la fase de amplificación de la coagulación. El programa clínico RECORD (REgulation of Coagulation in ORthopaedic Surgery to prevent Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism) consiste en cuatro estudios clínicos de fase III donde se evalúa el Xarelto (un comprimido de 10 mg una vez al día) en comparación con la enoxaparina subcutánea en más de 12.500 pacientes de 39 países sometidos a un reemplazo total de cadera (RTC) o reemplazo total de rodilla (RTR). Los pacientes con RTC recibirán trombopprofilaxis durante los 35 días posteriores a la intervención y los de RTR durante por lo menos 10 días. Los resultados de los estudios Record I y II para RTC y Record III y IV para RTR se pueden obtener a través de www.xareltolatinoamerica.com.

Pensamos que en el momento actual estamos ante un cambio histórico en la anticoagulación para la trombopprofilaxis y la terapéutica antitrombótica con beneficios reales para el paciente como ocurrió en el siglo pasado con la heparina y los antivitaminas K.

De las cosas buenas que han ocurrido en Latinoamérica en los últimos 35 años una de ellas ha sido la creación del Grupo Cooperativo Latino Americano de Hemostasis y Trombosis (CLATH) que organiza congresos internacionales en casi todos los países de América incluyendo Uruguay. Se realizó el último Congreso, el número XXI, en octubre del 2009 en Venezuela y el próximo se realizará en nuestro país en setiembre de 2011.

Después de los primeros contactos preliminares en febrero de 1973 en La Habana con motivo de la celebración de las Primeras Jornadas Latinoamericanas de Trabajos Cooperativos en Hematología, el grupo CLATH tomó forma en julio de 1975 cuando se reunieron en la ciudad de México 13 hematólogos provenientes de 6 países latinoamericanos. Se acordó realizar la siguiente reunión para consolidar y constituir oficial y jurídicamente el grupo en Caracas en 1976. A partir de allí se hicieron congresos anuales en los distintos países y se confeccionó un libro sobre la especialidad donde intervinieron 37 hematólogos latinoamericanos. A partir de 1981, los congresos del grupo se realizan cada dos años.

En Uruguay, la Dra Ana María Otero, del grupo CLATH, edita un libro "Hemostasis y Trombosis" en el año 2005 y una segunda edición en noviembre del 2006 en donde intervienen como autores varios integrantes del grupo CLATH y la cual se ha constituido en una obra de referencia y de consulta de la especialidad a nivel nacional e internacional (139).

BIBLIOGRAFÍA

- De Micheli A, Izaguirre R. Evolución del conocimiento sobre la sangre y su movimiento. Parte I. Integración de la doctrina circulatoria. Iatrofísica de la sangre. *Rev Invest Clin* 2004;56:783-792.
- Hewson W. The works of William Hewson. E.R.S. ed. By G Gulliver, Sydenham Society. London-UK, 1846.
- Malpighi M. De viscerum structura exercitatio anatomica. Accredit dissertatio eiusdem de Polypo Cordis. Bolonia, Iacobo Monti, 1666.
- Petit JL. Dissertation sur la maniere d' arreter le sang dans les hemorrhagies. *Mem Acad Roy Sci* 1731;1:122-146.
- Werlhof PG. Cautiones medicae de limitandis laudibus et uituperiis morborum et remediorum. Hannoverac: Sumtibus Haeredum Nicolai Foersteri, 1734.
- Izaguirre R. Breve historia de la hemostasis. En Hemostasis y Trombosis, Otero AM. Segunda Edición. Ed. Arena. Montevideo-Uruguay, 2006: 21.
- Dees, JE. The use of an intrapelvic coagulum in pyelolithotomy: a preliminary report. *South Med J* 1943;49:497.
- Decaro, J. Delger, J. Utilización del crioprecipitado en la coagulopielolitotomía. *Rev Arg Transf* 1983;IX:13-17.
- Morawitz P. Beitrage zur Kenntnis der blutgerinnung. *Beitrage zur Chemischen Physiologie und Pathologie* 1904;5:133.
- Howell WH. The factors concerned in the process of the clotting of blood. *Therapeutic Gazette* 1912;36:95-98.
- Howell WH, Holt E. Two new factors in blood coagulation – heparin and pro-antithrombin. *Am J Physiol* 1918;47:328-341.
- Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED, Seegers WH. The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. *Am J Physiol* 1939;125:683-687.
- Jorpes JE. On heparin, its chemical nature and properties. *Acta Med Scan* 1936;88:427-433.
- Howell WH. A text book of Physiology. Second ed. Philadelphia: WA Saunders Company, 1908:426-436.
- Quick A, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci* 1935;190:501-511.
- Quick A. Congenital hypoprothrombinaemia and pseudo-hypoprothrombinaemia. *Lancet* 1947;2:379-382.
- Owren PA. Parahaemophilia: a haemorrhagic diathesis due to absence of a previously unknown clotting factor. *Lancet* 1947;i:446-448.
- De Vries A, Alexander B, Goldstein R. A factor in serum which accelerates the conversion of prothrombin to thrombin. I. Its determination and some physiologic and biochemical properties. *Blood* 1949;4:247-258.
- Owen CA. A history of blood coagulation. Ed by Nichols WL and Bowie EJW. Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester-Minnesota, 2001: 117.
- Otto JC. An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families. *Med Repository* 1803;6:1-4.
- Hopff F. Ueber die Haemophilie oder die Erbliche Anlage zu Todtlichen Blutungen Wurzburg: Carl Wilhelm Becker, 1828.
- Brinkhous KM. A brief history of hemophilia, with some comments of word "hemophilia". In Brinkhous KM, Hemker HC, Eds: Handbook of Hemophilia. Part I Amsterdam: Excerpta Medica 1975: 3-20.
- Patek AJ, Stetson RP. Hemophilia I. The abnormal coagulation of the blood and its relation to the blood platelets. *J Clin Invest* 1936;15:531-542.
- Patek AJ, Taylor FHL. Hemophilia II. Some properties of a substance obtained from normal

- human plasma effective in accelerating the coagulation of hemophilic blood. *J Clin Invest* 1937;16:113-124.
25. Pavlosky A. Contribution to the pathogenesis of hemophilia. *Blood* 1947;2:185-191.
 26. Biggs R, Douglas As, MacFarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merske Y. Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J* 1952;2:1378-1382.
 27. Taylor SAM, Duffin J, Cameron C, Teitel J, Garvey B, Lillicrap DP. Characterization of the original Christmas disease mutation (cysteine 206 serine): from clinical recognition to molecular pathogenesis. *Thromb Haemost* 1992; 67:63-65.
 28. Giangrande P. Six characters in search of an author: the history of the nomenclature of coagulation factors. *Br J Haematol* 2003;121:703-712.
 29. Biggs R, MacFarlane RG. Human blood coagulation and its disorders. Blackwell Scientific Publications Oxford-UK, 1953.
 30. Rosenthal RL, Dreskin OH, Rosenthal N. New hemophilia like disease caused by deficiency of a third plasma thromboplastin factor. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;82:171-174.
 31. Birch CL. Haemophilia, Clinical and Genetics aspects. Urbana, University of Illinois 1937.
 32. Pool JD, Shannon AE. Production of high potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed bag system. *N Engl J Med* 1965;273:1443-1447.
 33. Decaro J, Correa H. Síndrome de trastorno respiratorio agudo debido a la infusión de crioprecipitado. *Rev Arg Transf.* 1982;VIII:29-36.
 34. Decaro J, Lavalle E, García L, Lacordelle F, Bethencur I, Vivero E, Ambrosioni P, Schwedt E, Mazzuchi N. Vigilancia centinela de virosis transmitidas por la sangre: retrovirus y hepatitis C. Segundo Premio del Premio Nacional de Medicina 1992 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay.
 35. Mannucci PM. Regreso al futuro : historia del tratamiento reciente en hemofilia. Federación Española de Hemofilia Fedhemo 2008;48 www.hemofilia.com/fedhemo. 2/12/2009.
 36. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion K, Chen E, Eaton D, Vehar G, Capon D, Lawn R. Characterization of human factor VIII gene. *Nature* 1984;312:326-330.
 37. Schwartz RS, Abildgaard CF, Aledort LM, Arkin S, Bloom AL, Brackman HH, Brettler DB, Fukui H, Hilgartner MW, Inwood MJ. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. *N Engl J Med* 1990;323:1800-1805.
 38. White G, Shapiro A, Ragni M, Garzone P, Goodfellow J, Tubridy K, Courter S. Clinical evaluation of recombinant factor IX. *Semin Hematol* 1998;35 suppl 2:33-38.
 39. Baru M, Carmel-Goren L, Barenholz Y, Dayan I, Ostropolets S, Slepoy I, Gvitzner N, Fukson V, Spira J. Factor VIII efficient and specific non covalent binding to PEGylated liposomes enables prolongation of its circulation time and hemostatic efficacy. *Thromb Haemost* 2005;93:1061-1068.
 40. Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker M, Kilcoyne R, Ingram D, Manco-Johnson M, Funk S, Jacobson L, Valentino L, Hoots K, Buchman G, Di Michele D, Recht M, Brown D, Leissinger C, Break S, Cohen A, Mathew P, Matsunaga A, Medeiros D, Nugent D, Thomas G, Thopson A, Mc Redmond K, Soucie J, Austin H, Evatt B. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* 2007;357:535-544.
 41. Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Fauckner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest* 2008;118:935-945.
 42. von Willebrand EA. Hereditär pseudohemofili. *Finska Lakarsallk Handl* 1926;67:7-112.
 43. Minot GR, Lee RI. Hemophilia. Miscellaneous hemorrhagic conditions. In Minot GR: Nelson 's Loose Leaf of Medicine. 1920;8: 138-145
 44. Lillicrap D. Ciencia básica, diagnóstico y tratamiento médico de la enfermedad de von Willebrand. Tratamiento de la Hemofilia. N° 35, abril 2008. World Federation of Hemophilia (WFH). www.wfh.org. 2/12/2009.
 45. Ginsburg D, Handin RJ, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH. Human von Willebrand factor (vWF) isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 1985;228:1401-1406.
 46. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Scie* 1974;71:1906-1909.
 47. Mannucci PM, Ruggeri ZM, Pareti FI, Capitanio AM. 1-Deamino-8-d-arginine vasopresin: a new pharmacological approach to the management of hemophilia and von Willebrand disease. *Lancet* 1977;I:869-872.
 48. Mendolicchio GL, Ruggeri ZM. New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol* 2005;42:5-14.
 49. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ Jr, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987;69:1691.
 50. Tefler TP, Denson KW, Wright DR. A new coagulation defect. *Br J Haematol* 1956;2:308-316.
 51. Denson KW. Electrophoretic studies of the Prower factor: a blood coagulation factor wich differs from factor VII. *Br J Haematol* 1957;4:313-325.
 52. Hougie C, Barrow EM, Graham JB. Stuart clotting defect. I. Segregation of an hereditary hemorrhagic state from the heterogenous group heredofore called "stable factor" (SPCA, proconvertin, factor VII). *J Clin Invest* 1957;36:485-496.
 53. Ratnoff OD, Colopy JE. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 1955;34:602-613.
 54. Roberts H. Oscar Ratnoff: his contributions to the golden era of coagulation research. *Br J Haematol* 2003;122:180-192.
 55. Robbins KC. A study of the conversion of fibrinogen to fibrin. *Am J Physiol* 1944;142:581-588.
 56. Laki K. The polymerization of proteins: the action of thrombin on fibrinogen. *Arch Biochem Biophys* 1951;32:317-324.
 57. Hathaway WE, Belhasen LP, Hathaway HS. Evidence for a new plasma thromboplastin factor. I.

- Case report, coagulation studies and physicochemical properties. *Blood* 1965;26:521-532.
58. Saito H, Ratnoff OD, Waldman R, Abraham P, Fitzgerald trait. Deficiency of a hitherto unrecognized agent, Fitzgerald factor, participating in surface mediated reactions of clotting, fibrinolysis, generation of kinins, and property of diluted plasma enhancing vascular permeability. *J Clin Invest* 1975;55:1082-1089.
 59. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964;202:498-499.
 60. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964;145:1310-1312.
 61. Lee RI, White PD. A clinical study of the coagulation time of blood. *Am J Med Sci* 1913;145:495-503.
 62. Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Effect of antihemophilic factor on one stage clotting test. A Presumptive test for hemophilia and a simple one stage antihemophilic factor assay procedure. *J Lab Clin Med* 1953;41:637-647.
 63. Proctor RR, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for the first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 1961;36:212-219.
 64. Hattersley PS. Activated coagulation time of whole blood. *JAMA* 1966;196:436-440.
 65. Decaro J, Alallón W, Novoa JE. Leucaféresis por centrifugación de flujo continuo y filtración e donantes normales. II Congreso Latinoamericano de Hemoterapia e Inmunohematología. Buenos Aires-Argentina, noviembre de 1982.
 66. Hartert H. Blugerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr* 1948;26:577-583.
 67. Kozek-Langenecker S. Management of massive operative blood loss. *Minerva Anesthesiol* 2007;73:401-415.
 68. Gupta S, Bhattacharya A. Point-of-Care testing in anaesthesiology and intensive care- An overview. *Indian J Anaesth* 2004;48:278-286.
 69. Hoffman M, Monroe DM. A cell based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-965.
 70. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Localzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick JM, Konkle BA, Schwartz BS, Mamathan ES, McKrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-3561.
 71. Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American* 1992;68-77.
 72. Furchgott RF, Zawadzki IV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
 73. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
 74. Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic based microsensor. *Nature* 1992;358:676-678.
 75. Murad F. Nitric oxide signaling. Would you believe that a simple free radical could be a second messenger, antacid, paracrine substance, neurotransmitter and hormone? *Recent Prog Horm Res* 1998;53:43-59.
 76. Dzik S. Nitric oxide: Nature third respiratory gas. *Transfusion* 2002;42:1532-1533.
 77. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. *JAMA* 2005;293:1653-1662.
 78. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PS, Star RA, Banks SM, Schechter AN, Natanson C, Gladwin MT, Solomon SB. Hemolysis associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 2005;115:3409-3417.
 79. Martinowitz U, Michaelson M. Guidelines for the use of recombinant activated factor VII (rFVIIa) in uncontrolled bleeding: a report by the Israeli Multidisciplinary rFVIIa Task Force. *J Thromb Haemost* 2005;3:640-648.
 80. Hoffman R, Brenner B. The use of recombinant factor VII in platelet disorders: Thrombocytopenia and thrombocytopathia. *Transfus Altern Transfus Med* 2003;5:45-47.
 81. Peters M, Heijboer H. Treatment of a patient with Bernard-Soulier syndrome and recurrent nosebleeds with recombinant factor VIIa. *Thromb Haemost* 1998;80:352.
 82. Almeida AM, Khair K, Hann I, Liesner R. The use of recombinant factor VIIa in children with inherited platelets function disorders. *Br J Haematol* 2003;121:477-481.
 83. Revesz T, Arets B, Bierings M, van den Bos C, Duval E. Recombinant factor VIIa in severe uremic bleeding. *Thromb Haemost* 1998;80:353.
 84. Brenner B, Hoffman R. Management of uncontrollable bleeding with recombinant factor VIIa (rFVIIa) in patients with thrombocytopenia associated with hematological malignancy. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33 (suppl):73.
 85. Heslet L, Dalsgaard Nielsen J, Levi M, Segelov H, Johansson P. Successful pulmonary administration of activated recombinant factor VII in diffuse alveolar hemorrhage. *Crit Care* 2006;10:1-6.
 86. Welsh A, McLintock C, Gatt S, Somerset D. Guidelines for the use of recombinant activated factor VII in massive obstetric haemorrhage. *Aust and N Z J of Obstet Gynaecol* 2008;48:12-16.
 87. Mehta Y, Kumar A, Karlekar A, Sharma KK, Trehan N. Recombinant factor VII-A as a rescue therapy for intractable haemorrhage after third time cardiac surgery-A case report. *Ann Card Anaesth* 2006;9:132-134.
 88. Boffard KD, Riou B, Warren B, Choong PI, Zizioli S, Rossaint R, Axelsen M, Kluger Y. Recombinant factor VIIa as adjunctive therapy for bleeding control in severely injured trauma patients: two parallel randomized placebo-controlled, double-blind clinical trials. *J Trauma* 2005;59:8-15.
 89. Nygaard K, Brown G. Essential Thrombophilia. Report of five cases. *Arch Int Med* 1937;59:82-106.
 90. Malpighi M. De viscerum structura exercitatio anatomico accedit dissertatio eiusdem de polypo cordis. Bononiae Iacobi Montij, 1666.
 91. Benivieni A. De abditis nonnullis ac mirandis morborum et sanationum causis, 1507 (English

- translation by C Singer). Springfield, IL. Charles C Thomas, 1954.
92. Stewart J. Case of enlargement of the heart with polypi, etc, which occurred on a board the honourable East India Company ship Carnatic. *Edinburgh Med Surg* 1817;13:182-184.
 93. Laënnec RTH. A Treatise on the disease of the chest, in which they are described according to their anatomical characters, and their diagnosis established on a new principle by means of acoustick instruments. (English translation by J Forbes). Philadelphia, J Webster, 1823.
 94. Hunter J. Observations on the inflammation of the internal coats of veins. *Trans Soc Improv Med Chir Knowledge* 1793;1:18-29.
 95. Cruveilhier J. Quinzieme classe des hemorrhagies. In *Traité de anatomie pathologique generale*. Paris, Bailliere 1862: 177-250.
 96. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol* 2008;143:180-190.
 97. Schulze M. Ein heizbarer objecttisch und seine verwendung bei untersuchungen des blutes. *Arch Mikroskop Anat* 1865;1:1-42.
 98. Hayem G. Contribution a le etude de la structure des hematoblastes et des hematies. *Gaz Med Paris* 1881;VI :479-481.
 99. Bizzorero J. Ueber einen neuen forrnbestandteil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und blutgerinnung. *Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medicin* 1882;90:261-332.
 100. Rokitsansky K. A manual of pathological anatomy. Vol I and IV. London. Sydenham Society 1852.
 101. Trousseau A. Ulcere chronique simple de le estomac (pp72-96); Phlegmatia alba dolens (654-712). *Clin Med Hop Dieu de Paris*. Balliere et Fils 1865.
 102. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13:516-530.
 103. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981;68:1370-1373.
 104. Comp PC, Nixon R, Cooper M, Esmon C. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984;74:1082-1088.
 105. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:1004-1008.
 106. Bertina RM, Loeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.
 107. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3 untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698-3703.
 108. Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G. Síndrome atifosfolípido. En Hemostasis y Trombosis, Ana María Otero. Segunda edición Ed Arena. Montevideo-Uruguay, 2006:301.
 109. Otero AM. Trombofilia genética. En Hemostasis y Trombosis, Ana María Otero. Segunda edición. Montevideo-Uruguay Ed Arena 2006:249.
 110. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *PNAS*; 2006; 103:903-908.
 111. Schmidt PJ, Ness PM. Hemotherapy: from bloodletting magic to transfusion medicine. *Transfusion* 2006;46:166-168.
 112. Abdelgabar AM, Bhowmick BK. The return of the leech. *Int J Clin Pract* 2003;57:103-105.
 113. Michalsen A, Klotz S, Ludtke S, Moebus S, Spahn G, Dobos GJ. Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2003;139:724-730.
 114. Hochberg MC. Multidisciplinary integrative approach to treating knee pain in patients with osteoarthritis. *Ann Intern Med* 2003; 139:781-783.
 115. Markwardt F. Die isolierung und chemische charakterisierung des hirudis. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1957;308:147-156.
 116. Bittl JA, Strony J, Brinker JA, Ahmed WH, Meckel CR, Chaitman BR, Maraganone J, Deutsch E, Adelman B. Treatment with bivalirudin (hirulog) as compared with heparin during coronary angioplasty for unstable or postinfarction angina. *N Engl J Med* 1995;333:764-769.
 117. Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol* 2008;141:757-763.
 118. Howell WH, Holt E. Two new factors in blood coagulation-heparin and pro antithrombin. *Am J Physiol* 1918;47:328-341.
 119. Mason Mc. A note on the use of heparin in blood transfusion. *J Lab Clin Med* 1924;10:203-206.
 120. Charles AF, Scott DA. Studies on heparin II. Heparin in various tissues. *J Biol Chem* 1933;102:431-435.
 121. Murray DWG, Jaques LB, Perret TS, Best CH. Heparin and thrombosis of veins following injury. *Surgery* 1937;2:163-187.
 122. McLean J, Meyer BBM, Griffith M. Heparin in subacute bacterial endocarditis. Reproduction of cases and critical review of literature. *JAMA* 1941;117:1870-1875.
 123. McLean J, Johnson AB. Gangrene following fracture treated with heparin, papaverine, and intermittent venous occlusion. *Surgery* 1946;20:324-336.
 124. Ulin AW, Gollub S. Posthumous award commemorating the discovery of heparin. *N Engl J Med* 1964;270:466.
 125. Abildgaard U. Inhibition of thrombin fibrinogen reaction by heparin and purified cofactor. *Scand J Haematol* 1968;5:440-453.
 126. Rosenberg Rd, Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1973;248:6490-6505.
 127. Best CH. Preparation of heparin and its use in the first clinical cases. *Circulation* 1959;19:79.
 128. Kakkar VV, Djazaeri B, Scully MF, Westwick J. Low molecular weight heparin and prevention

- of postoperative deep vein thrombosis. *Br Med J* 1982;284:375.
129. Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Sims GE. Anticoagulant properties of heparin fraccionated by affinity chromatography on matrix bound antithrombin III by gel filtration. *Thromb Res* 1976;9:575.
 130. Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu B, Gatti G. Structure activity relationship : a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high antifactor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116:492.
 131. Harenberg J, Jorg I, Fenyvesi T. Treatment of heparin induced thrombocytopenia with fondaparinux. *Haematologica* 2004;89:1017-1018.
 132. Korin JD. A new generation in antithrombotic treatment: fondaparinux. *Arch Med Int* 2007;XXIX (Suppl 1) s05 –s06.
 133. Dam H, Dyggve H, Larsen H, Plump P. The relationship of vitamin K deficiency to hemorrhagic disease of the newborn. *Adv Pediatr* 1952;5:129-153.
 134. Waddell WWJr, Guerry DP, Bray WE, Kelly OR. Possible effect of vitamin K on prothrombin and clotting time in newly born infants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937;40:432-434.
 135. Almquist HJ, Close AA. Synthetic and natural antihemorrhagic compounds. *Am J Chem Soc* 1939;61:2557-2558.
 136. Committee on Nutrition of the American Academy of Pediatrics. Vitamin K in the newborn. *Pediatrics* 1951;28:501-507.
 137. Who Expert Committee on Biological Standarization. Thirty third report. *WHO Technical Report Series* 1983;687:1-184.
 138. Otero AM. Antitrombóticos por vía oral. Una nueva generación. *Tendencias* año XVI, Montevideo, Uruguay, 2008:117
 139. Otero AM. Hemostasis y Trombosis. Segunda edición. Ed. Arena. Montevideo-Uruguay, 2006.

Resumen

La historia de la especialidad transcurre desde las sangrías mágicas hasta la transfusión de sangre primero y la Medicina Transfusional después.

Es una disciplina clínica que abarca la inmunohematología, la hemaféresis, la hemovigilancia, los trasplantes de células y órganos sólidos, las alteraciones de la hemostasis (hemorragias y trombosis) y la Salud Pública, evitando la transmisión de enfermedades y la aloinmunización. Últimamente se han ampliado sus aplicaciones con el desarrollo de la biología molecular, la terapia celular y la medicina regenerativa.

Estudia y practica procedimientos en individuos normales y/o en pacientes en todas las etapas de la vida desde la prenatal hasta la tercera edad y post mortem.

Se relaciona con la mayoría de las especialidades médico-quirúrgicas de manera que el médico hemoterapeuta integra múltiples equipos interdisciplinarios.

Inicialmente fueron las guerras o los médicos cirujanos u obstetras los que impulsaron el desarrollo de la hemoterapia exigidos por la necesidad imperiosa de transfundir sangre humana en los heridos de las batallas o en pacientes civiles con hemorragia aguda grave.

La sangría fue utilizada con fidelidad y entusiasmo durante mas de 2500 años. Nadie conoce exactamente sus orígenes pero tal vez los antiguos viendo que la hemorragia menstrual parecía aliviar el malestar de las mujeres, asociaron la pérdida de sangre con la mejoría de los síntomas. Desde ese entonces la sangre ocupa un lugar especial en la cultura de nuestras civilizaciones como símbolo de fuerza y fuente de vitalidad.

En la teoría de los humores de Hipócrates la sangre era reconocida como un elemento vital en la constitución del hombre. Los médicos sangraban a sus pacientes por cualquier afección imaginable incluyendo los cambios de conciencia y de ánimo. Los sangradores utilizaban la lanceta como herramienta prin-

cipal que consistía en un pequeño y aguzado cuchillo de dos filos. Los médicos británicos sentían tal respeto por la sangría que en 1823 denominaron *The Lancet* (la lanceta) a su inminente publicación científica denominación que permanece hasta nuestros días.

Durante la Edad Media la sangría fue ejercida casi exclusivamente por clérigos. En algunas órdenes los monjes eran sometidos a sangrías cinco veces por año salvo que estuvieran enfermos. A partir del siglo XII la Iglesia prohibió a los clérigos el ejercicio de toda práctica que causara pérdida de sangre.

En la primera escuela médica del mundo occidental fundada en Salerno en el siglo XII, la sangría era muy utilizada para tratar una amplia gama de enfermedades según figura en el “Regimen Sanitatis” escrito en verso.

En los siglos XV y XVI la sangría se convirtió en un procedimiento médico de uso casi irrestricto con objetivos terapéuticos y profilácticos.

El segundo texto médico salido de la imprenta de Gutenberg en Estrasburgo en 1462 era un Calendario de Sangrías y el primero fue el Calendario de Purgas impreso en 1457.

En 1492, año del descubrimiento de América, el Papa Inocencio VIII padecía una insuficiencia renal crónica que lo mantenía críticamente enfermo viviendo períodos de estupor y otros de lucidez. En ese momento apareció en Roma un médico que ofreció cambiar la sangre del viejo Papa por sangre de jóvenes plenos de vigor y salud. Ante la urgencia de la situación se consiguieron tres donantes niños varones de 10 años autorizados por sus respectivas familias mediante el pago de un ducado de oro a cada uno. Los niños fueron sangrados falleciendo los tres y como la sangre se coagulaba constantemente, la transfusión de sangre no fue realizada.

En el siglo XVII el médico francés Guy Patin, Decano de la Facultad de Medicina de París, escribió a un colega en 1645 que no existía remedio en el mundo que opere tantos

milagros como la sangría. Así, convencido de los beneficios de la flebotomía Patin sangró a su esposa doce veces por una congestión, a su hijo veinte por una fiebre y él mismo se realizó siete sangrías por un catarro nasal.

A Napoleón también se le realizaron flebotomías y sobrevivió llegando a decir que la “Medicina era la ciencia de los vampiros”.

Mozart, el niño prodigio de la música, cuya muerte se produjo en Viena en 1791, en su etapa terminal desarrolló un shock por las reiteradas sangrías y purgaciones realizadas.

En las colonias españolas quedó reglamentada la obtención del título de Maestro en Flebotomías, encargado de formar y proponer a los sangradores. En el Virreinato del Río de La Plata Pedro Faya fue el primer maestro sangrador por su gran habilidad y conocimiento del arte de la sangría. A partir de 1820, se creó en Buenos Aires el Tribunal de Medicina. Más tarde con la creación de la Facultad de Medicina, la práctica de la sangría fue agregada a esa carrera como una rama especial que persistió como tal hasta la década de 1870.

El 14 de diciembre de 1799 el presidente de los Estados Unidos de América, George Washington, fue sometido al tratamiento con sangrías previo a su fallecimiento.

A principios del siglo XIX en Francia se desempeñaba el doctor Broussais, veterano de las campañas napoleónicas. Con él la sangría alcanzaron la cima. Según su teoría todas las fiebres tenían el mismo origen: eran manifestaciones de la inflamación de los órganos. De esta manera se colocaban sanguijuelas en la parte del cuerpo con el órgano inflamado. Por ejemplo, si el paciente tenía neumonía se colocaban las sanguijuelas en el tórax con el fin de realizar sangrías localmente.

Las personas que realizaban las sangrías se denominaban cirujanos barberos o barberos cirujanos. Los cirujanos barberos eran considerados como trabajadores manuales que además de cortar el pelo y afeitar realizaban el tratamiento de heridas, extraían dientes, aplicaban ventosas, hacían enemas y también sangrías.

En el siglo XVIII, los barberos seguían practicando la cirugía menor y la odontología y muchos cirujanos famosos adquirían sus habilidades en las tiendas de los barberos como Ambroise Paré, cirujano francés considerado

el padre de la cirugía. Paré, empezaría su carrera como aprendiz de cirujano barbero o cirujanos de túnica corta. Estos estaban por debajo de los cirujanos de túnica larga que estudiaban en la Escuela de San Cosme (fundada en el siglo XIII), conocían las lenguas clásicas (griego y latín) y los escritos de Galeno.

El rojo y el blanco, que todavía se utiliza para identificar una barbería, fueron ideados originalmente para reflejar la sangre y el blanco de las servilletas usadas para limpiar el derramamiento de la misma.

Actualmente la sangría es utilizada en muy pocos casos con indicaciones precisas como en los pacientes con hemocromatosis, policitemia, porfiria cutánea tardía o edema agudo de pulmón. Sin embargo, la práctica no convencional se sigue realizando en países como Marruecos, Argelia y Oman.

La práctica de la transfusión de sangre documentada, en seres humanos, no tiene más de 200 años. Luego que William Harvey describe la circulación de la sangre en 1628 se comienzan a realizar transfusiones de animales a humanos en Londres y París en 1667. Pero, recién en 1818, el obstetra James Blundell en Londres, transfunde por primera vez a un ser humano con sangre humana.

La transición de la sangría a la transfusión como acto terapéutico fue el resultado de cambios religiosos, científicos, filosóficos y políticos que aún influyen en la práctica de la medicina moderna.

En 1921, se crea en la Cruz Roja de Londres el primer servicio de donantes de sangre del mundo (banco de sangre vivo). Cada donante voluntario debía someterse a una entrevista, un examen físico, a la determinación del grupo sanguíneo y a la investigación de la sífilis antes de ser inscripto en una lista. Debía estar dispuesto a correr al hospital si se producía una solicitud de su grupo sanguíneo.

A pesar que a partir de 1914 se obtiene la sangre citratada (anticoagulada) las transfusiones se realizaban de forma casi directa. Se extraía sangre del donante con citrato y casi inmediatamente se transfundía al receptor.

Los primeros intentos de conservar sangre a 4 centígrados fueron realizados en Rusia en 1930 con sangre cadavérica. Coincidiendo con el inicio de la Guerra Civil Española en 1936 se crea el primer Banco de Sangre en

Barcelona para recolectar sangre, conservarla y transportarla para ser transfundida a distancia. Cinco meses después, en 1937 se crea el Blood Bank de Chicago destinado a recoger donaciones en un frasco de vidrio con citrato y almacenarlo en frío. Estos dos servicios pioneros, reciben la denominación de Bancos de Sangre debido a que funcionan de manera similar a los Bancos de dinero y de ahí quizá surja el dicho popular que “la sangre vale oro”.

Bernard Fantus del Hospital Cook County de Chicago introduce el concepto de Banco de Sangre “it is obvious that one cannot obtain blood unless one has deposited blood” utilizando su similitud con el procedimiento en un banco de dinero. Esta denominación no se basaba sólo en la metáfora. Los primeros registros del First National Bank of Blood eran establecidos en una planilla denominada “Blood Bank Account” con columnas de “Debit” o “Credit” donde se anotaban los movimientos de las unidades de sangre. El concepto de Banco de Sangre y la donación comunitaria se desarrollaron con la segunda guerra mundial y luego con la formación de la American Association of Blood Bank (AABB) en 1947. De esta manera, el término Banco de Sangre se introdujo tanto en el lenguaje profesional como popular apareciendo conjuntamente en el diccionario médico y en las páginas amarillas de las guías telefónicas.

Se desarrolla el concepto que la sangre pertenece a la comunidad quien la dona para que sea almacenada hasta que sea retirada para algún individuo que la necesite.

En 1939, John Elliott junto con la compañía Baxter desarrollan el primer frasco de vidrio comercial para obtener sangre denominado “Transfuso Vac” sustituyendo a las copas de vidrio, frascos de boca ancha o botellas de leche que se utilizaban hasta ese momento para colectar sangre. El nuevo frasco se puso a prueba con más de 800 transfusiones en seis hospitales. Originalmente contenía citrato de sodio como anticoagulante pero luego, con el desarrollo del ACD (ácido cítrico dextrosa) durante la segunda guerra mundial, éste se utilizó en los frascos de vidrio al vacío para conservar sangre durante 21 días. En 1941, Baxter y Elliott crean el “Plasma Vac” frasco de vidrio al vacío para separar el plasma de la sangre total.

Luego, en la segunda mitad del siglo XX con el desarrollo del fraccionamiento plasmático, la preparación de hemocomponentes en bolsas plásticas en circuito cerrado, con una inmunohematología cada vez más compleja, con la aparición de varias infecciones transmisibles por la sangre y la hemaféresis los Bancos de Sangre pasan a denominarse Servicios de Hemoterapia.

A partir de la década de 1980, los servicios son denominados de Medicina Transfusional destacando el aspecto clínico de la especialidad y cerrando el circuito vena a vena (donante-producto-receptor). La mayoría de estos servicios pasan a estar dirigidos por médicos hemoterapeutas creándose así la enseñanza de postgrado.

Con el nuevo milenio se amplía el concepto a Medicina Transfusional y Terapia Celular abarcando áreas en desarrollo como la biología molecular y medicina regenerativa.

La Medicina Transfusional debe ser considerada actualmente como un puente científico entre los individuos sanos de la comunidad por un lado y el cuidado clínico de los individuos enfermos hacia el otro. Para el correcto funcionamiento se deben desarrollar igualmente las tres partes de la cadena vena a vena. El objetivo principal es establecer la seguridad de todo el proceso, la seguridad transfusional.

La historia de la medicina evoluciona desde el enfrentamiento a fuerzas ocultas, mágicas o divinas, hasta culminar en la pretensión del conocimiento de los hechos y su prevención.

Tanto la “enfermedad hemolítica perinatal” como la “enfermedad hemorrágica del recién nacido” son dos historias de Medicina Transfusional que muestran claramente los progresos de la medicina desde el reconocimiento del cuadro clínico y su descripción, la definición del mecanismo patogénico hasta el tratamiento y la prevención.

Sobre la historia de la transfusión de sangre en el Uruguay hemos encontrado tres publicaciones. Una la realizada por Mañé Garzón y Burgues Roca titulada “Publicaciones médicas uruguayas de los siglos XVIII y XIX” y otra el Boletín Médico Farmacéutico donde establecen que la primera transfusión de sangre en el Uruguay se realizó en el mes de marzo de 1877. La tercera publicación titulada la Historia de la Transfusión de Sangre. Sus comienzos en Uruguay, fue realizada por el Milton

Rizzi y publicada en la Revista Médica del Uruguay en 1999. En ella se relata la primera transfusión de sangre realizada por Florencio Ortega en 1877, luego la que produce Joseph Fort en 1884, la transfusión directa utilizada entre hermanos en 1912 o 1913 por Manuel Albo y José Iraola y por último, la primera transfusión realizada con sangre citratada el 25 de octubre de 1916 por Augusto Turenne, médico obstetra, en el servicio de Protección Maternal del Hospital Pereira Rossell. Dos testigos de esta acción, José Parietti y Julio César Estol, serían protagonistas de la historia de la Medicina Transfusional.

Ambos decidieron dedicarse a la hemoterapia y en 1917 comenzaron a realizar transfusiones en la Casa de la Maternidad. Parietti desarrolla un aparato transfusor laminado y Estol introduce luego las jeringas de pico excéntrico que resultaron mucho más manejables. En 1927 Turenne prologa el libro de Estol "La transfusión de Sangre" y recuerda esas épocas heroicas definiendo la publicación como un libro de buena fe.

Estol describe 202 pacientes con resúmenes de sus historias clínicas y cerca de 500 actos transfusionales. Julio César Estol es considerado como el primer médico hemoterapeuta del Uruguay y en su reconocimiento el Servicio Nacional de Sangre del MSP lleva su nombre desde el año 1991 (Ley 16.214).

Como dice el Dr. Rizzi en su trabajo sobre la historia de la transfusión de sangre, la hemoterapia moderna nace en Uruguay hace 90 años con Turenne y Estol. Su desarrollo posterior, al igual que el de tantas nuevas especialidades médicas, es una historia de éxitos y fracasos, olvidos y reconocimientos, descreimientos y esperanzas, sinsabores y gloria que espera ser escrita.

Precisamente, uno de los objetivos de este libro es contar esa historia pero no de la transfusión de sangre sino de la Medicina Transfusional como especialidad y su relación con el resto de los servicios clínicos y paraclínicos. Es una historia contada por hemoterapeutas con vivencias personales pero con actuación documentada.

La primera fotografía sobre una transfusión de sangre fue tomada en el año 1876 en el Hospital Bellevue de la ciudad de New York. En ella se observa una transfusión directa donante -receptor utilizando el equipo

del obstetra inglés James Aveling descrito en 1873. Hasta esta fotografía, entre los siglos XVII y XIX se realizaron numerosas ilustraciones que documentaban las sangrías y las transfusiones realizadas de animales a seres humanos o más tarde entre seres humanos de forma directa.

A pesar de que la sangre era anticoagulada con citrato, método descrito por Luis Agote en Buenos Aires en 1914, ésta era utilizada para la transfusión dentro de las primeras horas de la donación y a veces en forma inmediata, sin existir un almacenamiento prolongado lo cual se alcanzó con la creación de los primeros Bancos de Sangre después del fallecimiento del Dr. Julio Cesar Estol en 1935.

La historia continúa en el Uruguay con la creación de la Central de Sangre y Plasma por la Facultad de Medicina, el 12 de noviembre de 1942, sólo cinco a seis años después de los primeros Bancos de Sangre creados a nivel mundial en Barcelona y Chicago y gracias a los esfuerzos del ilustre cirujano Pedro Larghero. Dicha fecha se utiliza año a año para conmemorar el día nacional del donante voluntario de sangre. La Central de Sangre y Plasma comienza a funcionar en el Instituto de Patología de la Facultad de Medicina.

Sus primeros directores fueron Dinor Invernizzi, Raúl Canzani y Silio Yannicelli.

En 1947, la Central de Sangre y Plasma realizó un curso con el objetivo de divulgar y enseñar el conocimiento de la hemoterapia y la plasmoterapia en forma teórico-práctica, principalmente para médicos y técnicos del interior del país ya que la Central de Sangre y Plasma había colaborado, en todo lo que pudo, en instalar los servicios de transfusiones en Salto, Trinidad, San José así como el que se deseaba realizar por esa fecha en Melo.

Los temas tratados fueron publicados en un libro "Curso de Hemoterapia" por la propia Facultad de Medicina e impreso por la imprenta Rosgal de Montevideo en marzo de 1947.

En 1952 se resuelve integrar la Central de Sangre y Plasma al Hospital de Clínicas siendo el primer servicio médico del hospital. Un año después, con el ingreso de los primeros pacientes a la Clínica Semiológica del piso 8 pasa a denominarse Servicio de Transfusiones ocupando la planta física donde funciona actualmente, la Cátedra de Hemoterapia primero y de Medicina Transfusional después, a

partir de su creación en 1978. El Servicio de Transfusiones del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” es dirigido por el Dinor Invernizzi a partir de 1952 hasta 1962 y Julio César Beltrán desde el 1 de marzo de 1963 hasta 1970.

A partir de 1944 Freire Muñoz inicia en el Hospital Central de las Fuerzas Armadas la conservación de la sangre en frascos de vidrio de 200 cc, durante 8 días, en un refrigerador familiar.

En 1945, comienza a funcionar en la calle Misiones el Banco de Sangre privado denominado GABO por las iniciales de los apellidos de sus cuatro dueños (Gordon, Amoroso, Bazzano y Oliva). Se trabajaba con sangre universal grupo 0 pero aún no se tipificaba el sistema Rh. Uno de los sanatorios privados donde se realizaban las transfusiones por parte de GABO era el Sanatorio Navarro donde operaba Pedro Larguero. Otro de los sanatorios privados que contaban con la asistencia de GABO para realizar las transfusiones era el Sanatorio Americano inaugurado el 19 de setiembre 1948.

Pero, el primero de noviembre de 1949 el Sanatorio Americano inaugura su Banco de Sangre propio que es dirigido por Ricardo Magri.

En 1952, se crea el Banco de Sangre del Hospital Británico de Montevideo siendo dirigido por Diego Estol Ancell.

En 1953 se promulga la Ley 12.072 que crea el Servicio Nacional de Sangre (SNS) como organismo dependiente del Ministerio de Salud Pública (MSP).

En 1967 se nombra la Comisión Interventora Honoraria del SNS integrada por Silio Yannicelli, Germán Surraco y Diego Estol Ancell.

En 1979 se firma el decreto PE 392/979 que fija los cometidos del SNS y donde se establecen cuatro programas: 1- Banco de Sangre de Reserva e Intercambio, 2- Programa de elaboración de sueros hemoclasificadores, 3- Programa de hemoconcentrados y 4- Programa de pre-procesamiento de plasma.

En 1980 renuncian Yannicelli y Surraco asumiendo la Dirección del SNS Diego Estol Ancell, cargo que ocupa hasta 1990 cuando se retira por jubilación.

En el año 2000, con la llegada del nuevo milenio, el MSP aplica la Resolución GMC

del MERCOSUR número 41/2000 a nivel nacional mediante el decreto PE 384/000 de fecha 26 de diciembre, que establece el “Reglamento Técnico de los Niveles de Complejidad de los Servicios de Hemoterapia”. En él se establecen cuatro niveles de estructura y función de los servicios de Hemoterapia el cual se encuentra en vigencia para establecer la habilitación y registro. De forma simultánea al decreto PE 384/000, se adopta la Resolución GMC del MERCOSUR número 42/2000 para su aplicación nacional a través del decreto PE 385/000 que entra en vigencia a partir del 9/01/2001 y establece el “Reglamento Técnico de Medicina Transfusional”. Uruguay fue el primer país de los integrantes del MERCOSUR en aplicar estas resoluciones inclusive algunos miembros aún no lo han hecho.

En la actualidad, año 2010, existen 80 servicios de hemoterapia, públicos y privados, registrados en el SNS de los cuales 24 se encuentran en Montevideo y 56 en el interior del país.

En el período de diez años, 1995-2004, se extrajeron un promedio de 109.235 unidades de sangre por año en todo el país, con un valor máximo de 116.626 en 1998 y un mínimo de 96.993 en el 2004. Del total de unidades donadas se extrajo el 11% en los servicios de hemoterapia oficiales, el 36% en ASSE, el 43% en las Instituciones de Asistencia Médica Colectiva (IAMC) y el 10% en servicios privados.

En el mismo período de tiempo (1995-2004) el promedio de hemocomponentes transfundidos fue de 162.379, con un valor máximo en 1996 de 178.829 y un mínimo de 139.951 en el año 2001. Del total de hemocomponentes transfundidos los servicios oficiales realizaron el 10% de las transfusiones, ASSE el 33%, las IAMC el 43% y los privados el 10% restante.

Casi todos los servicios de hemoterapia existentes hoy en todo el país han surgido, de una manera descentralizada, como respuesta a las necesidades asistenciales de los centros de salud públicos o privados pero ninguno de ellos es autosuficiente en hemocomponentes y hemoderivados. La mayoría realizan la cadena vena a vena es decir, la selección del donante, la extracción, los estudios serológicos, la preparación de hemocomponentes y su infusión lo cual, al trabajar en forma individual aumenta los costos operativos.

Existe un proyecto del MSP-ASSE-SNS de transformación de la organización de los servicios de hemoterapia con el fin de concentrar la actividad en cuatro centros regionales que realicen la cobertura asistencial en todo el país. Precisamente, el 20 de octubre de 2009 se ha inaugurado el primer Centro Regional, el Hemocentro Maldonado, que cubrirá la región este del país y servirá como plan piloto para el desarrollo de los otros centros.

Hasta 1940, el plasma era separado de la sangre y conservado en forma líquida pero luego, la compañía Sharp and Dohme de Filadelfia produce el plasma liofilizado que es utilizado para el tratamiento del shock en los heridos de la segunda guerra mundial. Edwin Cohn, químico norteamericano, trabajando en la Facultad de Medicina de Harvard en Boston conocía que al añadir alcohol etílico al plasma las proteínas precipitaban en el fondo del tubo de ensayo pero, todas juntas. Al agregar concentraciones crecientes de alcohol etílico en distintas condiciones de sal, temperatura y pH observó que unas proteínas precipitaban antes que las demás. A este método se le denominó fraccionamiento plasmático y se utilizó luego como procedimiento industrial para la preparación de hemoderivados de origen humano. Edwin Cohn publica en 1946 "A brief survey of its chemical components and their natural function and clinical uses" en el primer número de la revista *Blood*, publicación oficial de la American Society of Hematology (ASH).

La fracción I del método de Cohn contenía principalmente fibrinógeno y factores de la coagulación mientras que en las fracciones II y III precipitaban las globulinas. La fracción IV era una mezcla de varias proteínas y en la V precipitaba la albúmina. Dada su capacidad osmótica, cinco veces superior a la del plasma, la albúmina fue rápidamente utilizada como expansor plasmático en el tratamiento del shock hipovolémico. Así, el 7 de diciembre de 1941 cuando los japoneses invaden Pearl Harbor el stock de albúmina fue enviado totalmente y utilizada por primera vez para tratar los heridos de guerra sin estudios clínicos previos. Por tanto, la albúmina fue el primer hemoderivado transfundido con fines terapéuticos.

Edwin Cohn sostenía que administrar sangre total constituía un derroche. Así, lo había demostrado con el plasma a partir de 1940. Una década después estimaba que podía separar los

componentes celulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). De una unidad de sangre total pretendía obtener varias unidades de productos celulares utilizables. Llamaba a este enfoque "terapia con hemocomponentes o economía de la sangre". Cohn presentó esta idea en 1949, en una conferencia organizada por el National Research Council y las Fuerzas Armadas de USA dado que los médicos que visitaron Hiroshima luego de la rendición, observaron que los rayos gamma producían un descenso importante de los componentes celulares de la sangre en los sobrevivientes de la explosión. Los estadounidenses comprendieron que en caso de una guerra atómica la sangre y sus componentes serían más vitales que nunca.

Cohn desarrolló una máquina para separar hemocomponentes celulares de la sangre total que la presentó luego en una conferencia en el Instituto Superior Técnico de Lisboa acompañado por su discípulo James Tullis. Para demostrar su funcionamiento en público él mismo se sometió a la extracción de sangre y mientras hablaba la máquina procesaba su propia sangre. Todas las superficies que entraban en contacto con la sangre estaban recubiertas de silicona para evitar la adhesión plaquetaria pero, el técnico había administrado demasiada silicona lo cual obturó un canal de salida aumentando la presión por detrás. Luego de cinco minutos de procedimiento algo estalló y la sangre del conferencista llovió sobre los oyentes de la primera fila. Mientras Cohn proseguía la exposición los médicos de la primera fila fueron redistribuidos en un sitio más seguro del auditorio. Todo el mundo comprendió la terapia con hemocomponentes celulares como siguiente fase de desarrollo del fraccionamiento de la sangre.

La sangre era recogida en frascos de vidrio con citrato y las tubuladuras de goma transportaban, en un circuito abierto, los elementos de la sangre de un frasco a otro. Este sistema tenía riesgos de contaminación bacteriana o por pirógenos e inconvenientes como la rotura de los frascos en la centrifugación, la caramelización del citrato y la no viabilidad plaquetaria o leucocitaria. Luego se realiza el agregado de ácido cítrico al anticoagulante y de silicona a las paredes de vidrio. Para realizar una infusión rápida la única posibilidad era infundir aire al frasco a través de una pera de goma.

Cohn comprendió que si deseaba realizar una terapia con hemocomponentes a gran escala debía sustituir el envase de vidrio por algo más práctico.

Del otro lado del laboratorio de Cohn en Boston, trabajaba el cirujano Carl Walter en procedimientos de asepsia desarrollando nuevos métodos de esterilización de instrumentos y de eliminación de contaminantes ambientales. Walter pensaba que los frascos de vidrio eran depósitos de contaminación puesto que la sangre entraba en contacto con el aire y para extraer componentes cada tubo de goma o aguja era un punto de posible contaminación bacteriana. Pensaba que la solución era un recipiente de plástico flexible sin aire y con las tubuladuras, agujas y recipientes satélites anexados formando un circuito cerrado estéril. Además, el recipiente debía ser lo suficientemente resistente para soportar los rudos traslados durante las guerras, ser lanzado desde un avión a baja altura y que, con la sola presión de las manos aumentara su velocidad de infusión sin dañar los hemocomponentes. Trabajó años tratando de cristalizar esta idea hasta que encontró el polímero adecuado y con una bolsa plástica llena de sangre se dirigió al laboratorio de Cohn. La lanzó al suelo y para probar su resistencia se subió a ella.

A partir de 1948 la compañía Fenwal comienza a desarrollar las bolsas plásticas para la colecta de sangre a gran escala. El nombre de la compañía se formaba por el apellido Fenn de un vecino de Walter que había aportado dinero para desarrollar la tecnología y las tres primeras letras de su propio apellido (Fen-Wal).

En Uruguay, las bolsas plásticas se comienzan a utilizar en la década de 1980. Hasta ese entonces los recipientes para la sangre y el plasma eran los frascos de vidrio luego siliconados para obtener plaquetas. Desde su inicio, las bolsas plásticas fueron sufriendo algunas modificaciones para perfeccionar su rendimiento y utilidad que se mantiene hasta el momento actual.

Una mañana de setiembre, estando en su despacho hablando por teléfono con su amigo el químico George Scatchard de Massachusetts, Edwin Cohn sufrió un derrame cerebral masivo muriendo unos días más tarde en el hospital de Boston a los 71 años de edad.

Como decía su amigo Scatchard “Cohn no

era un hombre sino dos” y creo que todos los hemoterapeutas estamos de acuerdo con esta afirmación dado que desarrolló primero el fraccionamiento plasmático lo que permitió la terapia con hemoderivados y luego, su equipo de separación de componentes celulares dio origen a los procedimientos de hemaféresis por un lado y a la terapia específica con hemocomponentes por otro.

En 1914, John Jacob Abel y colaboradores utilizan por primera vez el término plasmaféresis que proviene de la palabra griega “aphaeresis” que significa extraer. Describieron el procedimiento de extracción del plasma retornando los elementos celulares de la sangre como tratamiento experimental de la toxemia en perros nefrectomizados.

El primer procedimiento de plasmaféresis manual en humanos fue realizado en 1944 por Tui y colaboradores, con fines también experimentales, para determinar la tasa normal de regeneración proteica en seis donantes voluntarios. Encontraron que la habilidad de regenerar proteínas en el hombre normal es virtualmente ilimitada siempre y cuando se devuelvan los eritrocitos.

El primer objetivo de realizar plasmaféresis manual en donantes fue obtener plasma para reponer la volemia en las hemorragias y shock tanto para el tratamiento de soldados en la guerra como de civiles.

En 1952, en Barcelona, José Antonio Grifols i Lucas realiza las primeras plasmaféresis manuales en donantes normales con el fin de obtener plasma para producir hemoderivados.

El tercer objetivo de los métodos de plasmaféresis manual fue su aplicación no en donantes normales sino en pacientes con el fin de extraer sustancias patológicas presentes en el plasma (plasmaféresis terapéutica).

En 1952, Adams y colaboradores, utilizan un sofisticado sistema de plasmaféresis manual a través de un sistema cerrado de frascos al vacío para tratar la paraproteinemia en un paciente con mieloma múltiple.

Kliman en 1961 utiliza la aféresis para obtener un componente celular muy requerido para tratar pacientes con leucemia sometidos a quimioterapia y trombocitopénicos. Este autor demuestra que es posible coleccionar más de 1000 ml de plasma rico en plaquetas de un mismo donante por semana, durante tres meses, dando origen a un nuevo procedimiento

de aféresis, la plaquetaféresis. Como ocurrió con la plasmaféresis que se utilizó primero en donantes normales y luego en pacientes con fines terapéuticos, Colman y colaboradores en 1966 aplican la plaquetaféresis para tratar pacientes con trombocitosis sintomática.

La leucaféresis (obtención de leucocitos) fue realizada en humanos en 1964. Se obtuvieron polimorfonucleares de pacientes con leucemia mieloide crónica con fines transfusionales de pacientes con leucemia linfocítica aguda y crisis febriles.

Las técnicas manuales de leucaféresis se utilizaron después con fines terapéuticos en pacientes con leucemia mieloide crónica que desarrollaban síntomas por leucoestasis.

Seguidamente dos métodos de obtención de leucocitos de donantes normales fueron utilizados: la leucaféresis por filtración y la leucaféresis por sedimentación o gravedad.

En la década del 80 realizamos en Uruguay las primeras transfusiones de granulocitos en neonatos con sepsis bacteriana utilizando la técnica de sedimentación globular y en adultos, utilizando la técnica de filtración.

A mediados de la década de 1960, Latham desarrolla una máquina procesadora de sangre que denomina modelo 10. Por un breve período de tiempo es comercializada por los laboratorios Abbott. Luego Latham funda la compañía Haemonetics que en la década de 1970 crea el separador celular de flujo discontinuo modelo 30S, el primero en utilizar un equipo estéril totalmente descartable.

Entre 1990 y 1993 aparecen los separadores celulares Haemonetics de la línea MCS que constituyen en la actualidad el modelo más pequeño y portátil de hemaféresis que se puede utilizar tanto en donantes como pacientes.

En 1962 el hijo de 17 años del ingeniero George Judson de IBM, contrajo leucemia mieloide crónica, por lo cual consultó a su médico McLeod con el fin de contribuir con el tratamiento de esta enfermedad y específicamente para ayudar a su hijo. Dicho ingeniero convenció a IBM de trabajar en este proyecto junto al Instituto Nacional del Cáncer (NCI) para colaborar en la investigación y desarrollo de equipos para la obtención de granulocitos. El separador celular por centrifugación de flujo continuo NCI-IBM 2990 fue el primero en utilizarse para obtener leucocitos para transfusión.

Una máquina similar al 2990 fue desarrollada por la compañía Fenwal-Baxter, la Aminco Celltrifuge que utilizaba tubuladuras descartables pero con una cámara de centrifugación reutilizable previo lavado y esterilización. El primer recambio plasmático con esta máquina fue reportado en 1973.

En Uruguay, la historia de la hemaféresis mecánica comienza a principios de la década de 1980 con la llegada de los primeros separadores celulares. Uno de flujo continuo, Aminco Celltrifuge, para la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas y dos de flujo discontinuo Haemonetics modelo 30S para el servicio de Hemoterapia del Hospital Militar y del Hospital Británico. En la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas conectamos al separador celular el primer donante de aféresis el 23 de noviembre de 1981. En el período transcurrido entre el mes de noviembre de 1981 y abril de 1986, realizamos 336 procedimientos de hemaféresis, de los cuales 183 fueron en donantes (116 en el separador Aminco y 67 por filtración de flujo continuo).

En diciembre de 1982 presentamos en el II Congreso Latinoamericano de Hemoterapia e Inmunohematología que se desarrolló en Buenos Aires, nuestra experiencia en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas en la realización de 60 leucaféresis en donantes normales, 30 por filtración utilizando filtros de nylon (leucopack) y 30 por centrifugación de flujo continuo.

En 1984, realizamos en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas, leucaféresis terapéuticas en un paciente de 50 años con síndrome de Sézary refractario a la quimioterapia. Se realizaron cinco procedimientos de leucaféresis en el separador de flujo continuo Aminco Celltrifuge en un período de dos semanas removiendo un total de $6,9 \times 10^9$ leucocitos de los cuales el 90% eran células de Sézary. Luego del quinto procedimiento, disminuyeron las linfadenomegalias y retrocedieron completamente las lesiones de piel. Este trabajo fue publicado en inglés, en la revista Vox Sanguinis, Journal of International Society Blood Transfusion (ISBT) con sede en Ámsterdam.

En 1983, publicamos la experiencia de los primeros 30 procedimientos de plaquetaféresis mecánica mediante centrifugación de flujo continuo.

En Uruguay, se produjo un incremento progresivo de la plaquetaféresis a partir del año 1995 cuando el Fondo Nacional de Recursos (FNR) incluye al trasplante de médula ósea dentro de los Institutos de Medicina Altamente Especializada (IMAE). Según datos estadísticos aportados por el Servicio Nacional de Sangre en 1995 se realizaron 1106 plaquetaféresis, 1159 en 1996, 1599 en 1997, 1560 en 1998, 1792 en 1999 y 1853 en el año 2000 lo cual demuestra un incremento significativo.

Las primeras experiencias con células progenitoras hematopoyéticas (CPH) periféricas se originan con los estudios que demuestran la presencia de estas células en sangre de ratones, perros y primates entre 1962 y 1977. La cosecha de CPH de sangre periférica comienza prácticamente con el desarrollo de los separadores celulares por un lado y con la demostración entre 1987 y 1990 que la cantidad de CPH en sangre puede ser incrementada mediante la administración de factores recombinantes de crecimiento hematopoyéticos.

Las ventajas de la hemaféresis para coleccionar CPH es que el donante no debe concurrir a block quirúrgico y no recibe anestesia general ni múltiples punciones de la cresta iliaca pósterosuperior. A su vez, el número de células CD34+ que se coleccionan por vía periférica es muy superior al de la médula ósea con menos elementos celulares contaminantes y con una respuesta del injerto más acelerada.

En el Uruguay, en los primeros trasplantes que se realizaron en el Hospital Británico a partir de 1985 las CPH se obtienen de médula ósea (MO). Luego de 1995 cuando el Fondo Nacional de Recursos incluye el trasplante de MO dentro de los Institutos de Medicina Altamente especializada (IMAE) se crean tres centros de trasplante de MO: uno público en el Hospital Maciel y dos privados en Impasa y Asociación Española. Éste es el último centro autorizado por el FNR en 1997 pero consta de dos unidades de trasplante de MO una para pacientes adultos y otra pediátrica donde se concentra casi el 100% de los trasplantes hasta los 15 años de edad.

En 1997, en Uruguay, se comienza a producir un incremento significativo de la hemaféresis de sangre periférica como fuente de obtención de CPH siendo en el año 2000 la principal vía de obtención de CPH tanto para trasplantes autólogos como alogénicos

en pacientes adultos o pediátricos aún con bajo peso.

En la Asociación Española, centro donde trabajamos, en el período de 1997 a 2000 se realizaron un total de 162 cosechas de sangre periférica (SCP, stem cell periféricas) y 39 de médula ósea en 103 pacientes. Pero, en 1997 en 12 pacientes se realizaron 11 MO y 10 SCP mientras que en el año 2000 67 SCP y 5 MO en 41 pacientes.

En las cuatro unidades de trasplante funcionando en Uruguay actualmente todas utilizan un separador Cobe-Spectra para realizar la colecta de CPH de sangre periférica por hemaféresis con lo cual se unifican los protocolos.

Recientemente, hemos publicado nuestra experiencia durante 10 años en el trasplante de CPH en Pediatría la cual fue presentada en el Congreso Nacional de Hematología en noviembre de 2009. En Uruguay, la sobrevida de los niños con cáncer es comparable a la de los países desarrollados.

A partir de 1980 realizamos, en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas, recambios plasmáticos terapéuticos (RPT) en pacientes con mieloma y enfermedad de Waldeström que presentaban síndrome de hiperviscosidad y/o crioglobulinas.

Los primeros RPT en gestantes con aloinmunización anti-D severa se realizaron por Graham-Pole y colaboradores entre 1974 y 1977 en un separador celular Aminco Celltrifuge similar al que funcionó en la Cátedra de Hemoterapia a partir de noviembre de 1981. El objetivo de esta terapéutica materna prenatal es descender los niveles de anticuerpos IgG que pasan la placenta hacia el feto con el fin de disminuir la gravedad de la anemia hemolítica fetal.

En 1982, publicamos el primer caso en Uruguay de RPT intensivo en una embarazada de 40 años que presentaba una aloinmunización anti-D severa, con antecedentes de 6 gestas, 3 abortos espontáneos y 3 óbitos, sin hijos vivos. La inmunización anti-D se había producido por transfusiones con sangre RhD positiva que la señora había recibido en el año 1962, previamente a las gestaciones, por un cuadro de hemorragia digestiva.

Se trata entonces de la primera experiencia nacional de RPT en una gestante de 40 años con aloinmunización anti-D severa que no

tenía hijos vivos por esta causa. Se obtiene un recién nacido con enfermedad hemolítica perinatal severa pero que presenta una buena evolución con el tratamiento postnatal y al que denominamos cariñosamente “Féresis I”.

Actualmente, en el año 2010, existen en Uruguay 14 centros asistenciales con 21 separadores celulares en donde se realizan técnicas de hemaféresis en donantes y/o pacientes. Trece son de Montevideo y uno en el interior, en el Departamento de Maldonado. De los 21 separadores celulares 11 son Cobe-Spectra, 4 Cobe-Trima y 6 Haemonetics.

En 1859, Claude Bernard establece que la inyección de suero de perros a conejos es causa de orina sanguinolenta y contiene proteínas. Adolf Creite, en 1869 publica un trabajo donde establece que las proteínas del suero tienen la propiedad de “dissolving” and “clustering” los eritrocitos que corresponden a los términos actuales de hemólisis y aglutinación con lo cual anticipa el descubrimiento de los anticuerpos un cuarto de siglo.

La diferencia en la compatibilidad de la sangre entre las diferentes especies fueron publicadas por Leonard Landois en su tratado titulado “Die Transfusion des Blutes” en 1875, en el cual describe que la mezcla de células sanguíneas de un animal con el suero de otras especies frecuentemente resulta en lisis en menos de dos minutos. Landois demuestra en sus trabajos tanto la hemólisis in vivo como la aglutinación in vitro. Además, distingue la aglutinación del fenómeno de “rouleaux” para lo cual utiliza el término “like rolls of coins” (como pila de monedas). Considera que la lisis y aglutinación resultan de algún tipo de interacción del suero con los eritrocitos. No define la causa aunque sugiere una reacción química entre suero y células.

El descubrimiento del sistema inmune comienza en 1890 con la descripción de los anticuerpos específicos para la toxina antitetánica. Este descubrimiento de aglutininas bacterianas renueva el interés en los aspectos clínicos de las aglutininas y lisis eritrocitarias.

En 1900, Shattock describe en el St. Thomas Hospital de Londres la aglutinación de los eritrocitos de un individuo con el suero de otro de la misma especie pero lo relaciona con infecciones agudas. Por otra parte, el serólogo alemán Paul Ehrlich introduce el análisis microscópico de la sangre y establece que la

aglutinación de la sangre humana con suero humano debe ser denominada isoaglutinación.

En 1901 Karl Landsteiner, bacteriólogo austriaco, trabajando como asistente del Pathological-Anatomical Institute de Viena y basándose en estos trabajos preliminares observó que el suero de personas sanas no sólo aglutinaba los eritrocitos de animales sino también, muchas veces, el de sus semejantes. Describió las reacciones que se producían al mezclar los sueros y eritrocitos de 22 individuos normales incluyendo su propia sangre. Landsteiner establecía entonces que existían al menos dos diferentes tipos de isoaglutininas: una en el grupo A, otra en el B y ambas en el grupo C. Precisamente, Landsteiner pertenecía a este último grupo. Una traducción al inglés del trabajo original en alemán de Landsteiner en 1901 fue publicada en el primer número de la revista Transfusion de la American Association of Blood Bank (AABB) en 1961 y en la cual aparecen dos artículos uno escrito por Philip Levine “Memories of Karl Landsteiner” y otro por Wiener “My introduction to Karl Landsteiner” quienes, trabajando juntos, descubrieron los sistemas M, N y P en 1927 y el sistema Rh en 1940. Adjudicaron al antígeno D del sistema Rh la patogenia de la enfermedad hemolítica perinatal en 1941.

En 1911, Von Dungern y Hirsfeld fueron los primeros en utilizar la letra O (primera letra del término alemán “ohne” que significa “without” en inglés o “sin” en español) para describir los eritrocitos que no reaccionaban con las isoaglutininas anti-A y anti-B. Decastello y Sturli en 1902, dos discípulos de Landsteiner en Viena, confirman los hallazgos en un estudio sobre 155 individuos normales e identifican 4 sujetos (2,5%) que no aglutinaban con su propio suero pero lo hacían con el suero de los tres grupos identificados previamente y los denominaron con el término AB. De esta manera se describe el primer sistema de grupos sanguíneos humanos, el sistema ABO con sus cuatro posibilidades A, B, O y AB.

En 1930 Landsteiner recibe el premio Nobel por su descubrimiento del sistema ABO y el 26 de junio de 1943, seis meses antes que su esposa, fallece súbitamente por un ataque cardíaco. Actualmente todos los 14 de junio, día de su nacimiento, la OMS conmemora el día mundial del donante de sangre.

El resto de los antígenos eritrocitarios se descubren después de 1945 cuando Coombs, Mourant y Race describen el método para determinar la presencia de anticuerpos IgG que no producían aglutinación directamente (incompletos). La prueba de Coombs se sigue utilizando actualmente para la investigación de anticuerpos inmunes antieritrocitarios, de autoanticuerpos y para las pruebas de compatibilidad transfusional.

Los 270 antígenos eritrocitarios descritos hasta el momento actual se han agrupado en 30 sistemas que se pueden consultar en la página web del Internacional Blood Group Reference Laboratory (www.ibgrrl.co.uk).

Uno de los grandes avances de la inmunología en el siglo XX fue el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales por Milstein y Köhler en 1975, publicado en la revista *Nature* y por lo cual se les otorgó el Premio Nobel en 1984. Milstein era un químico argentino, nacido en Bahía Blanca, que escapó en 1962 de la represión política de su país y se radicó en Cambridge (Inglaterra). Milstein conoció a Köhler de origen alemán cuando en 1973 visitó el Instituto de Inmunobiología de Basilea. Los dos científicos congeniaron inmediatamente y en abril de 1974 Köhler llegó al Laboratory of Molecular Biology of the Medical Research Council (MRC) de la Universidad de Cambridge como becario postdoctoral bajo la dirección de Milstein.

Recién en 1975 fue posible preparar anticuerpos químicamente puros y capaces de ser cristalizados. Y eso no fue el resultado de progresos de purificación de proteínas sino el producto de un simple truco experimental.

Para esa época ya estaba generalmente aceptado, aunque no demostrado formalmente, que cada célula produce una molécula de anticuerpo. La teoría del origen clonal de los anticuerpos fue propuesta por Burnet lo que le valió el premio Nobel en 1960. Como hay miles y miles de clones de células, cada una produciendo un anticuerpo diferente, los anticuerpos secretados se mezclan en el suero y a partir de ese momento es imposible purificarlos. Lo importante entonces es purificar las células productoras del anticuerpo. Cada célula produce un anticuerpo puro pero, una célula no produce una alta cantidad de anticuerpo por lo cual, se necesita cultivar esa célula para tener poblaciones de células idénticas

que produzcan cantidades ilimitadas del mismo anticuerpo. Esto no era posible porque las células productoras de anticuerpos (linfocitos B) se mueren rápidamente fuera del organismo. El truco fue pues immortalizar las células. Se logró fusionando la célula productora de anticuerpos con células de origen tumoral (mieloma) que tienen la capacidad de crecer en un tubo de ensayo. Los híbridos heredan las propiedades de las dos células: la de producir y secretar anticuerpos específicos y la de crecer indefinidamente en botellas de cultivo celular. Una célula que crece y multiplica da lugar a un gran cultivo monoclonal que puede ser mantenido congelado por tiempo indefinido y que produce siempre el mismo anticuerpo. Actualmente se cumplen 35 años del primer híbrido clonado (hibridoma) por Milstein y Köhler.

Este simple concepto dio lugar a los llamados “inmunoensayos” que permitieron la medición precisa de hormonas y muchas otras sustancias no sólo en medicina sino en la química analítica en general. Esto tuvo un efecto inmediato en la industria farmacéutica en el área de los análisis clínicos. El ejemplo más interesante fue el desarrollo del diagnóstico precoz y casero del embarazo con un anticuerpo monoclonal dirigido a la gonadotropina coriónica en orina.

En la inmunohematología se utilizan los anticuerpos monoclonales para la caracterización de los antígenos eritrocitarios, plaquetarios y leucocitarios. Los anticuerpos producidos por animales reaccionan ante diferentes fracciones del antígeno (epitopes). Los monoclonales pueden reaccionar frente a sólo uno de ellos lo cual sirvió por ejemplo para diferenciar la variante cuantitativa y la cualitativa del antígeno D del sistema Rh. El primer anticuerpo monoclonal con especificidad de grupo sanguíneo fue producido en 1980 mediante la transformación de los linfocitos B con el virus de Epstein-Barr (EBV). Los linfocitos tomados de sujetos Rh D negativos inmunizados produjeron un IgG anti-D o un anti-D IgM. También se lograron obtener anticuerpos monoclonales dirigidos a varias fracciones del sistema complemento.

Los anticuerpos monoclonales pueden identificar componentes desconocidos de las paredes celulares. Por ejemplo, cuando uno observa al microscopio la mezcla de células

blancas de la sangre, puede diferenciar unos pocos tipos celulares como linfocitos y monocitos. Pero, el número de tipos de células es mucho mayor que aquello que muestran las diferencias morfológicas. Los linfocitos por ejemplo mirados al microscopio son grandes, medianos o pequeños pero, hay muchos tipos y éstos no pueden diferenciarse morfológicamente. Por otro lado, las proteínas presentes en la pared celular son de gran complejidad y no compartidas por todas las células. Estas diferencias pueden ser reconocidas fácilmente por anticuerpos monoclonales que identifican antígenos de diferenciación celular (CD) es decir, sustancias que distinguen distintas poblaciones de células. Los progenitoras hematopoyéticos (CPH) pueden diferenciarse del resto de las células de la médula ósea por la presencia del antígeno CD 34 reconocido por anticuerpos monoclonales en citometría de flujo. Esto ha traído grandes ventajas en los trasplantes de CPH como por ejemplo, poder establecer el momento óptimo de la cosecha por hemaféresis al determinar la cantidad de células CD34+ en sangre periférica. Nos permite realizar también un control de calidad del producto a trasplantar, al medir la concentración en la bolsa de cosecha lo cual, nos determina el número de leucoaféresis a realizar.

Los anticuerpos monoclonales no sólo se han utilizado para diagnóstico y tratamiento sino también para la prevención de la inmunización anti-RhD o para inducir tolerancia inmunológica.

Lo que al inicio fue la identificación e investigación de moléculas presentes en los leucocitos, actualmente se ha extendido a otras células lo cual hace que en el momento actual (2009) haya más de 350 CD descritas.

En 1953, James Dewey Watson biólogo y zoólogo estadounidense y Francis Crick biofísico británico trabajaron juntos en la Universidad de Cambridge y postularon la estructura de doble hélice del ADN basados en los trabajos de otro biofísico británico Maurice Wilkins. Los tres recibieron el premio Nobel en 1962.

En 1968 Watson fue nombrado director del Laboratorio de Biología Cuantitativa de Cold Spring Harbor en New York. Escribió la historia del descubrimiento de la estructura del ADN (*The Double Helix*, 1968) y participó del proyecto Genoma Humano en los Institutos

Nacionales de Salud. Cincuenta años después, en el 2003, un consorcio internacional formado por científicos de seis países, logró descifrar la secuencia completa del genoma humano o “libro de la vida” lo que abre innumerables puertas para el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue concebida por Kary Banks Mullis, doctorado en bioquímica en la Universidad de Berkeley, California (USA). Fue desarrollada por el mismo Mullis y su grupo de colaboradores dentro de Cetus Corporation y publicada por primera vez en 1987. Mullis descubrió que es posible realizar la amplificación in vitro de un fragmento del ADN, extraído de distintas muestras, utilizando una enzima denominada ADN polimerasa en condiciones de temperatura, pH y concentración iónica adecuadas mediante un proceso cíclico que permite la amplificación exponencial de dicho fragmento de ADN. Por el descubrimiento de la PCR recibió el premio Nobel de Química en 1993 compartido con el canadiense Michael Smith.

Una de las primeras aplicaciones en la Medicina Transfusional fue su utilización para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas transmisibles por la sangre con el fin de disminuir los falsos positivos de las pruebas de tamizaje (mayor especificidad) y sobre todo aumentar la sensibilidad evitando los falsos negativos. Los Tests de Ácidos Nucleicos (NAT, sigla en inglés) se comenzaron a aplicar con este fin a los donantes de sangre a partir de 1999 en USA, primero para el HIV y luego para Hepatitis C.

En nuestro país aun no se ha implementado la PCR rutinariamente para el diagnóstico de agentes infecciosos en los donantes de sangre. Se utiliza como prueba confirmatoria o para el seguimiento del tratamiento de pacientes con infección por VIH o hepatitis C.

Otra aplicación del desarrollo de la biología molecular a la Medicina Transfusional es la determinación del genotipo fetal, por métodos no invasivos, principalmente para los sistemas Rh y Kell con el fin de determinar, por un lado, la posibilidad cierta de que se produzca EHP en las gestantes aloinmunizadas a estos sistemas de grupo sanguíneo y por otro, cuando el feto es RhD negativo en gestantes no aloinmunizadas evitar la inmunoprofilaxis

antenatal. También la determinación prenatal de los antígenos plaquetarios humanos (HPA) sería de utilidad para el diagnóstico de la trombocitopenia neonatal aloinmune (TNAI).

El método clásico para definir antígenos y anticuerpos de los sistemas de grupos sanguíneos humanos es la hemaglutinación. Esta técnica es utilizada desde hace más de 100 años en la medicina transfusional.

El conocimiento de las bases moleculares de los polimorfismos de los grupos sanguíneos (single nucleotide polymorphism, SNP), ha sido usado para desarrollar sistemas automatizados para tipificar antígenos y para la detección e identificación de anticuerpos.

Así, el BLOODchip permite determinar en una prueba más de 60 fenotipos de 9 sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios abarcando las variantes más representativas en los distintos grupos étnicos. El chip de ADN minimiza los costos asociados a la repetición de los test ya que sólo ha de realizarse una sola vez en la vida tanto en el donante como en el receptor. Probablemente la compatibilidad transfusional, en unos años, se realice rutinariamente en una computadora y adiós aglutinación.

La historia de las enfermedades infecciosas transmisibles por la sangre comienza con la sífilis. El 3 de marzo de 1905, en la clínica La Charité de Berlín, el médico Erich Hoffmann y el zoólogo Fritz Schaudinn identifican el agente causante de la sífilis, el *treponema pallidum* (era casi transparente y sólo visible al microscopio mediante contraste de fase o fondo oscuro). En 1906, el bacteriólogo alemán August Paul Wassermann introduce la primera prueba diagnóstica que permitió diagnosticar con mayor certeza la sospecha clínica. Pero, esta reacción daba muchos resultados falsos positivos y negativos. Luego, Kahn describe un nuevo método diagnóstico con menos falsos positivos. En 1960 aparece la Venereal Disease Research Laboratory o VDRL seguida de la reacción RPR carbón que es la que se utiliza en la actualidad en los donantes de sangre para detectar la infección por el *treponema pallidum*.

En el primer servicio de donantes de sangre creado por Percy Oliver en Londres en 1921, a cada donante voluntario se le realizaba una entrevista con un examen físico, la determinación del grupo sanguíneo ABO y la prueba para la sífilis antes de ingresar al panel de donantes.

En Uruguay, en lo referente a la transmisión sanguínea de la sífilis, conocemos la cita bibliográfica de 1944 de Invernizzi y Yannicelli, que eran directores de la Central de Sangre y Plasma, sobre la “Exclusión de la sífilis y otras enfermedades infecciosas en los dadores de sangre” refiriéndose a dos pacientes contaminados, en un hospital de Montevideo, por un dador profesional. En el Curso de Hemoterapia que organiza la Central de Sangre y Plasma de la Facultad de Medicina en 1947, Talice menciona esta cita y se refiere a la realización de exámenes de laboratorio sistemáticos a los donantes de sangre así como a la esterilización espontánea de la sangre *in vitro*. Se ha demostrado dice, que la sangre que se conserva en heladera a 4 centígrados más de cuatro días y el plasma más de dos días a -20 centígrados, no transmiten la sífilis.

En 1909, Carlos Chagas un joven médico de Brasil, identifica en la sangre a un protozoo al que denomina *Trypanosoma cruzi* en honor a Oswaldo Cruz que era su maestro. Describe el ciclo de vida del parásito, cómo se transmite, los reservorios y establece las medidas preventivas. En 1911, diagnostica el primer caso congénito y establece la posibilidad que la enfermedad afecte al aparato digestivo.

La posibilidad de su transmisión sanguínea fue sugerida por Mazza en Argentina en 1936 pero los primeros donantes de sangre infectados se encontraron en Brasil en 1949 y los primeros casos de Chagas transfusional fueron publicados en 1952. Al año siguiente se comienza a utilizar el violeta de genciana en la sangre constituyéndose en el primer método de inactivación de agentes patógenos transmitidos por la sangre.

La prueba para detectar la enfermedad de Chagas en Uruguay, se establece como obligatoria para ser realizada a todos los donantes de sangre a partir de 1985 (Decreto PE 193/85). Al revés que en la sífilis, el *Trypanosoma cruzi* permanece viable por lo menos 18 días a temperaturas de 18 centígrados y por más de 250 a temperatura ambiente. Congelado también es infectante por períodos prolongados.

En Uruguay, la transmisión vectorial se ha detenido según lo declaró un grupo de expertos de la OPS/OMS en 1997. No han aparecido nuevos casos agudos por transmisión vectorial según el Programa Nacional de Chagas del MSP. El primer caso agudo registrado de

la enfermedad en nuestro país fue el descrito por Talice en Paysandú en abril de 1937 y el último registrado por transmisión vectorial fue en Tacuarembó en 1984.

Después de la segunda guerra mundial aparecen un importante número de casos de ictericias luego de una transfusión. El cuadro clínico fue denominado inicialmente “ictericia por suero homólogo”. Recién en 1963, Baruch Blumberg, un genetista que trabajaba en los National Institutes of Health (NIH), descubre el virus de la hepatitis B en el suero de un aborigen australiano. Inicialmente denominado “red antigen”, luego antígeno Australia (Au) y finalmente antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) como se conoce actualmente.

En 1970, los NIH Blood Bank simultáneamente adoptan la donación voluntaria y utilizan el primer test de enzimo-inmunoanálisis (ELISA) para el estudio de la hepatitis B en la sangre donada. La implementación de estas dos medidas tuvo un impacto inmediato en la reducción de la hepatitis postransfusional (HPT) al 10%. En 1973 se introduce un reactivo de segunda generación ELISA con mayor sensibilidad que el primero lo que se traduce en una caída de la incidencia de la HPT al 6%. En 1980, para el diagnóstico y prevención de las HPT se asocian como marcadores serológicos la determinación del antígeno core del HBV y la enzima alaninoaminotransferasa pero tienen un efecto moderado sobre la prevalencia de la HPT que cae en 1989 al 4%. En ese año, Houghton y colaboradores, en la Chiron Corporation descubren el agente de la HPT noA noB y lo denominan virus C (HCV). Aparece el primer reactivo comercial que es utilizado en los donantes de sangre cayendo la incidencia de la HPT del 4 al 1,5% y con la introducción de la segunda generación de reactivos prácticamente la incidencia disminuye al 0,3%.

En Uruguay, la determinación rutinaria y obligatoria de toda la sangre donada para hepatitis B (HBsAg) ocurre a partir de 1985, de la hepatitis C en 1995 y el anticuerpo anti-core de HBV a partir del año 2001.

En 1981, se reporta una inusual prevalencia de infecciones oportunistas, principalmente *Pneumocystis carinii* y Sarcoma de Kaposi en pacientes homosexuales de la costa este (New York) y oeste (San Francisco, California) de USA. Este síndrome de inmunodeficiencia

adquirida se propaga rápidamente y al año, en 1982 existían 355 casos en USA en homosexuales pero también en usuarios de drogas intravenosas y haitianos.

Se plantea la posible transmisión por transfusión cuando a finales de 1982 se observaron tres pacientes con hemofilia A en donde el único factor de riesgo eran los concentrados comerciales de factor VIII que aparecieron en la década de 1970. Esta sospecha, se confirma al año siguiente, en 1983, cuando un niño multitransfundido desarrolla inmunodeficiencia e infecciones oportunistas y uno de sus donantes de plaquetas desarrolla SIDA 10 meses después de la donación. A falta de un agente identificado y por ende de un test de diagnóstico específico, los casos por transfusión siguieron ocurriendo.

En 1983, los doctores Barré-Sinoussi y Montagnier del Instituto Pasteur de París, aislaron una partícula viral de los ganglios linfáticos de un paciente al que denominaron LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) que pertenecía a la familia de los retrovirus de los que ya se conocían dos tipos de virus linfotrópicos humanos (HTLV-I y HTLV-II) descritos unos pocos años antes por el Dr. Robert Gallo en Bethesda, USA. Por este descubrimiento Barré-Sinoussi y Montagnier reciben el premio Nobel en 2008.

El equipo de Gallo, en 1984, desarrolla la primera prueba de detección de anticuerpos específicos contra el VIH lo cual permite detectar individuos infectados asintomáticos en los donantes de sangre. Desde 1985, esta prueba fue obligatoria en toda la sangre donada en USA. En Uruguay se realiza rutinariamente a partir de 1988 para evitar la transmisión del VIH por transfusiones.

En 1985, un nuevo retrovirus fue aislado por el mismo grupo de científicos del Instituto Pasteur de París, en pacientes con SIDA del oeste de África que tenían estudios serológicos repetidamente negativos para HIV. Este nuevo virus que tenía una morfología y biología similar al anterior, difería en algunos componentes antigénicos y fue denominado LAV-2, luego HIV-2. En Uruguay, los primeros reactivos de diagnóstico para HIV por ELISA llegaron a fines del año 1986, mediante donación, a la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de Clínicas por parte del laboratorio Abbott. A partir de 1987, comenzamos un

estudio de vigilancia centinela que obtiene el segundo premio del Premio Nacional de Medicina otorgado por la Academia Nacional de Medicina en el año 1991. Ese mismo año, realizamos también en la Cátedra de Hemoterapia, los estudios serológicos de VIH-2 en poblaciones de riesgo. En la actualidad, existen reactivos mixtos que detectan ambos virus y algunas variantes descritas posteriormente como el HIV-0, así como pruebas combo que detectan a la vez anticuerpos y antígenos virales.

Jorge Decaro escribe el Manual para el personal de la salud sobre SIDA el cual recibe el Premio "El País" 1987 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay que se edita en 1988. Fue prologado por Hugo Villar Director del Hospital de Clínicas.

El HTLV-I fue el primer retrovirus humano aislado en 1978 y publicado en 1980 por el equipo de Robert Gallo en USA. Este retrovirus ha sido asociado etiológicamente con un tipo de leucemia a células T (CD4+,CD25+) que afecta a adultos, por lo general mayores de 40 años, con un cuadro clínico muy agresivo. El HTLV-I también se asocia a enfermedades neuromusculares con un período de incubación más corto, meses o años, aún en zonas no endémicas. En 1990, se publica en el New England Journal of Medicine, el primer caso postransfusional en un paciente de 41 años que es sometido a un trasplante cardíaco en Francia.

A principios de la década de 1990, realizamos en la Cátedra de Hemoterapia en el Hospital de Clínicas el diagnóstico serológico del primer caso de transmisión transfusional de HTLV-I en nuestro país con reactivos de aglutinación de partículas de gelatina (Fujirebio-Serodia) de origen Japonés, donados por el Laboratorio Bayer. La paciente originaria de San José concurrió a un IMAE de Montevideo para realizarse una cirugía cardiaca donde recibió transfusiones de sangre. A los meses de la cirugía desarrolla una mielopatía difusa (paraparesia espástica). El Western Blot muestra una positividad a todas las proteínas del virus HTLV-I con lo que se confirma la infección. De manera similar al caso francés, se demuestra y se publica la transmisión transfusional en una paciente sin otros factores de riesgo para la infección por HTLV-I.

En Uruguay, en un estudio piloto que publi-

camos en Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes en 1992, sobre 266 donantes de sangre estudiados 6 fueron reactivos por aglutinación de partículas de gelatina (APG) de los cuales 2 (0,75%) fueron confirmados por Western Blot y por radioinmunoprecipitación (RIPA) por Guillermo Muchinik del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Dr Mariano Castex" de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina.

La determinación rutinaria de HTLV a todos los donantes de sangre comienza de forma obligatoria en nuestro país a partir de la aplicación del Reglamento Técnico de Medicina Transfusional del MERCOSUR recién en el año 2001.

Si bien el movimiento de hemocomponentes de un país a otro no es lo habitual, la migración de personas o animales así como el aumento de frecuencia de los viajes hacen que los agentes infecciosos traspasen fronteras. En nuestro país no existe el reservorio para que se transmita la malaria pero personas que viajan a zonas endémicas tienen riesgo de infectarse y si lo hacen, cuando regresan pueden transmitirla al donar sangre. Éste es un ejemplo típico de una infección importada cuyo vehículo para traspasar fronteras es el hombre. Por el contrario, en países de América Central y Sudamérica la enfermedad de Chagas tiene una alta prevalencia y la migración de personas hacia países del primer mundo donde carecen de esta patología y por ende, no se realiza su investigación en la sangre donada, hace que el *Tripanosoma Cruzi* pueda transmitirse de un individuo a otro. Para nosotros, este es un ejemplo de una infección exportada cuyo vehículo también es el ser humano. El movimiento internacional de agentes infecciosos y sus variantes puede afectar la seguridad sanguínea a nivel mundial. Es una de las razones por la cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece un programa global de seguridad sanguínea con el fin de uniformizar las políticas sanitarias en los distintos países para evitar la transmisión de agentes infecciosos por la sangre donada.

Actualmente, los agentes infecciosos que se pueden transmitir por la transfusión de hemocomponentes los podemos dividir en tres categorías. En la primera se agrupan aquellos agentes a los que se les realiza, de forma obligatoria, un diagnóstico serológico en la

sangre donada. Esto puede variar de un país a otro así como también los test utilizados para tal fin. En nuestro país, se realiza el diagnóstico serológico para sífilis, Chagas, VIH 1-2, HTLV I-II, hepatitis B (antígeno Australia y anticuerpos anti-core) y hepatitis C. La segunda categoría agrupa a patógenos conocidos a los cuales no se les realiza el diagnóstico serológico de rutina pero se puede realizar en situaciones especiales como el CMV para pacientes inmunodeprimidos o el parvovirus B19 para receptores con aplasia medular o neonatos. También en esta categoría estarían las especies de *Plasmodium* que transmiten la malaria en los seres humanos. En la tercera categoría se agrupan los patógenos denominados emergentes como el virus del oeste del Nilo, el coronavirus que produce un síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y la variante (prion) de la Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) que puede producir en el hombre una enfermedad neurológica fatal.

Hipócrates, Aristóteles y Galeno describían que cuando la sangre fresca fluía del cuerpo coagulaba en unos pocos minutos sin embargo no asociaron la coagulación con la hemostasis. Establecieron la teoría del contacto con el aire y del enfriamiento.

Con la teoría de la circulación sanguínea descrita por Harvey en 1628, los fisiólogos de la época atribuían al movimiento de la circulación sanguínea varias propiedades como por ejemplo, mantener a la sangre en su estado líquido. Por el contrario, la cesación del movimiento producía la coagulación. Este concepto fue mantenido por Marcelo Malpighi, quien estudiando los coágulos cadavéricos mediante lavados eliminó los eritrocitos y descubrió la fibrina. Cuando cesa la circulación decía, la sangre tiene la consistencia del barro similar al que muestran los quesos y requesones cuando su sustancia está cuajada.

En el año 1731, el cirujano francés Jean Louis Petit describió, luego de una cirugía de amputación de un brazo, que se formaban coágulos en las arterias lesionadas que detenían la hemorragia y no sólo como consecuencia del enfriamiento corporal que sigue a la muerte.

Fue la primera vez que la coagulación sanguínea fue relacionada con la hemostasis recién dos milenios después de las observaciones de Hipócrates, Aristóteles y Galeno.

A su vez, la hemorragia como enfermedad

no fue reconocida hasta que también en el siglo XVIII, en el año 1734 Paul Werlhof, médico de la corte inglesa de Jorge II, describe el púrpura. En el siglo siguiente, ya conociendo la fibrina descrita por Malpighi y la idea de Hewson de que la coagulación era una propiedad del plasma, Schmidt describe la sustancia procoagulante, el fermento de la fibrina (luego trombina), desarrollando el concepto de las reacciones enzimáticas de la coagulación. Más tarde, Cornelius Pekelhearing describe su precursor la protrombina. Entre 1877 y 1879, Olav Hammerstein aísla por primera vez el fibrinógeno y establece que la cantidad de fibrina generada así como la velocidad de la coagulación varían con la cantidad de calcio presente.

En el año 1905 Paul Morawitz logró integrar los conocimientos de los cuatro factores descubiertos hasta ese momento (fibrinógeno, protrombina, calcio y factor de los tejidos) en una teoría donde la coagulación ocurre en dos etapas enzimáticas: la primera era la conversión de la protrombina en trombina mediante la acción de la trombokinasa (factor tisular) y el calcio y en la segunda, se producía la transformación del fibrinógeno en fibrina mediante la acción de la trombina.

William Henry Howell estudió el factor tisular, al que dio el nombre de tromboplastina, término que se ha empleado hasta la actualidad. Jean MacLean estudiante de medicina y discípulo de Howell descubrió en 1916 un anticoagulante, al que luego Howell en 1918 llamó heparina por provenir de extractos de hígado.

En 1939, Brinkhous y colaboradores encuentran que la heparina actúa sólo en presencia de una proteína plasmática ahora conocida como cofactor de la heparina o antitrombina III.

Se le atribuye al bioquímico sueco Erick Jorpes, del Instituto Karolinska de Estocolmo, la identificación de la estructura química de la heparina. A mediados de la década de 1930 Armand Quick, desarrolló un método de laboratorio para reproducir la teoría de la coagulación de Morawitz. La prueba consistía en añadir extractos de tejidos al plasma en presencia de calcio para convertir la protrombina en trombina y transformar el fibrinógeno en fibrina (tiempo de Quick).

El trabajo de Quick fue rechazado ocho veces por las revistas más influyentes antes de

ser publicado en el año 1936, debido a que se fundamentaba en la teoría de Morawitz y no coincidía con la teoría de Howell.

En el año 1947 Quick, postuló la existencia de dos factores más, el factor V que acelera la coagulación (cofactor) y que se destruye con el almacenamiento (lábil), y un factor VI o factor estable. Este último posteriormente fue eliminado de la lista de los factores de la coagulación ya que era una variante del mismo factor. Casi de forma simultánea, Paul Owren, en Noruega, también descubre el factor V.

En el año 1949 André de Vries propuso la existencia de un factor que mejora la conversión de protrombina en el suero, éste fue descrito en forma independiente en el mismo año por Benjamín Alexander y por Owren en el año 1950. Se denominó convertina y proconvertina a su precursor, al cual le correspondió el número VII.

La primer referencia vinculada con la hemofilia es probablemente la que se encuentra en el Talmud y en los textos hebreos del siglo II DC, donde se fija la norma de no circuncidar a los niños, cuando otros hijos de la misma madre hubieran fallecido por hemorragia a raíz de la circuncisión. Maimónides establece que si un niño muere después de la circuncisión y al segundo hijo le pasa lo mismo, aunque sea de diferente padre, el tercero no debe ser circuncidado. Este médico y líder del judaísmo medieval, nacido en Córdoba en el sur de España en el año 1135, establece claramente que la enfermedad hemorrágica es transmitida por la madre a sus hijos varones independientemente de su o sus padres.

En 1936, Patek y Stetson descubren que al agregar plasma normal al plasma de un paciente con hemofilia se corregía el tiempo de coagulación y sugirieron que en plasma normal existe una fracción que estaba ausente en la hemofilia. Al año siguiente, caracterizaron este factor plasmático y lo denominaron globulina anti-hemofílica (AHG).

La deficiencia del factor VIII es ahora denominada Hemofilia A.

En el año 1947, en Buenos Aires, Alfredo Pavlosky, postuló la existencia de dos tipos de hemofilia basado en que el tiempo de coagulación de un paciente con hemofilia se abreviaba al agregar sangre de otro hemofílico.

Rosemary Biggs, Stuart Douglas y Robert Macfarlane comunicaron haber encontrado

varios enfermos con una anomalía de la coagulación diferente de la hemofilia clásica, a la que llamaron enfermedad de Christmas por el apellido de un niño que la padecía Stephen Christmas. A este factor se le denominó factor de Christmas y posteriormente correspondió al número IX. A los pacientes con este déficit en 1952 se los denominó hemofílicos B.

En el año 1953, Robert Rosenthal y colaboradores describieron una tercera clase de hemofilia, que a diferencia de las antes descritas, afectaba a dos mujeres y a un varón de una familia. Atribuyó a esta enfermedad el déficit de un factor al que llamó antecedente tromboplastínico del plasma y la nombró Hemofilia C. Varios años después a este factor se le asignó el número XI y se le quitó la denominación de hemofilia por no ser de herencia ligada al sexo y tener un cuadro clínico diferente con poca tendencia al sangrado.

En el año 1926, Eric von Willebrand en Finlandia describió un trastorno hemorrágico en 23 de 66 miembros de una familia en las Islas Aland. Se encontraban afectados ambos sexos y el tiempo de hemorragia o de sangría se mostraba alargado, con un recuento plaquetario normal y un tiempo de coagulación con una retracción del coágulo también normal.

Von Willebrand distinguió estas características, reconoció una base genética y llamó al trastorno “seudohemofilia hereditaria” ya que los pacientes no presentaban hemartrosis o sangrados profundos como en la hemofilia ni tampoco un alargamiento en el tiempo de coagulación. Pero, identificó en forma incorrecta un patrón de herencia dominante ligada al cromosoma X. Se realizó una transfusión de plasma de un paciente con hemofilia a uno con EvW provocando un lento aumento del FVIII, que se mantenía unos días para luego decaer. Por el contrario, al transfundir plasma a la inversa, de EvW a hemofílico, los valores del FVIII permanecían iguales. Así se descubrió que en los casos de EvW se encontraba la deficiencia de un nuevo factor plasmático que podía ser corregida con la infusión de plasma hemofílico o normal.

En la década de 1960, se describe que un antibiótico, la ristocetina, estimula la agregación plaquetaria en personas normales y con hemofilia pero no en la EvW.

En 1977, Pier Mannucci de Milán, demuestra que la desmopresina (DDAVP) puede au-

mentar tanto los niveles de factor VIII como de factor von Willebrand en algunas modalidades de hemofilia y enfermedad de von Willebrand.

El factor X fue descubierto por el estudio de dos pacientes con una tendencia hemorrágica congénita. Primero en Audrey Prower de 22 años de edad que consultó en el University College Hospital de Londres en 1956 para ser investigada por su tendencia hemorrágica previo a una extracción dentaria. Luego en 1957, Cecil Hougie y colaboradores de Chapel Hill de Carolina del Norte en USA describen un paciente, Rufus Stuart de 36 años que presentaba epistaxis recurrentes, hematomas fáciles y ocasionalmente hemartrosis.

En el año 1955, Oscar Ratnoff de Case Western Reserve University en Cleveland, USA comunicó un defecto en la coagulación de un paciente de profesión ferrocarrilero llamado John Hageman quien presentaba un tiempo de coagulación anormal pero sin tendencia al sangrado. El estudio del defecto in vitro de la coagulación, que corregía con plasma normal al igual que la mayoría de los factores descubiertos anteriormente, llevó a descubrir un nuevo factor al que se le denominó con el nombre del paciente, y después se le asignó el número XII.

En 1963 al factor estabilizador de la fibrina, que había sido descrito por Robbins y Laki en el año 1944 y 1951 respectivamente, se lo denominó factor XIII.

En el año 1964 dos grupos de investigadores casi en forma simultánea, concibieron, una serie de reacciones enzimáticas secuenciales, en las que el producto de una serie activa a la siguiente y fue comparada con una reacción en cascada. Este término aún es utilizado en la comunidad científica. El concepto de cascada de la coagulación se debe a Robert MacFarlane de Oxford, Inglaterra quien la publica en la revista Nature y a Oscar Ratnoff en colaboración con Earl Davie de USA quienes publican en la revista Science el concepto de “water-fall” en el mismo año.

En la década de 1980 se cuestionó el modelo de la coagulación “en cascada” basado en las vías extrínseca, intrínseca y común. En la década de 1990, Dougald Monroe y Maureane Hoffman desarrollan un nuevo modelo celular de la hemostasis en donde las células de la sangre y del endotelio regulan el proceso de la coagulación en tres fases: iniciación, ampli-

ficación y propagación. Este nuevo modelo rompe el paradigma anterior y establece que la coagulación es regulada por la interacción del complejo Factor VII activado y Factor tisular con las superficies celulares. Para que este proceso se cumpla adecuadamente se necesitan por lo menos de dos tipos de células: las plaquetas y células que contienen factor tisular (FT) como la célula endotelial y los monocitos circulantes.

En el año 1937 surgió el concepto de trombofilia introducido en la clínica por primera vez por Nygaard y Brown, para definir esta patología caracterizada por trombosis arteriales y venosas con tendencia a la recurrencia. Estos autores propusieron que la trombofilia se debía a la hipercoagulabilidad del plasma.

Rudolph Virchow nacido en 1821 en Prusia, hoy Polonia, obtuvo su título de médico en 1843 en el Instituto de Medicina de Berlín-Alemania. A mediados del siglo XIX, en 1856, trabajando en el hospital Charité de Berlín, realiza 76 autopsias: en 18 de ellas encontró trombos venosos y en 11 émbolos pulmonares. Creó la famosa tríada de causas de trombosis que aún sigue vigente: estasis, lesión vascular y alteraciones en la composición de la sangre que conducen a hipercoagulabilidad.

Virchow fallece en el año 1902 a la edad de 81 años y la mención a su famosa tríada no aparece en ningún libro o artículo científico hasta después de 1950 es decir luego de 100 años de sus trabajos en trombosis.

En 1882, Giulio Bizzozero nacido en Varese en la región de Lombardía en Italia, quien trabajó con Virchow en Berlín, descubre la relación de las plaquetas con la trombosis.

En su monografía, claramente reconoce estas células pequeñas separándolas de los “blood corpuscles” descritos por el holandés Leeuwenhoek en 1674 y de los leucocitos reconocidos por William Hewson. Sugiere, por primera vez, que a estas células se le debe denominar “plattchen” y le asigna su función hemostática. Describe la formación del trombo blanco. Concluye que los “elements of a third kind” contienen tres constituyentes: una parte granular, una transparente y otra invisible que induce la coagulación. No tienen núcleo ni hemoglobina como sostenía Hayem.

En 1854, Karl Rokitansky describe el proceso aterosclerótico como responsable de la formación del trombo de fibrina y otros componentes de la sangre en las paredes arteriales.

En 1865, Armand Trousseau determina que la tromboflebitis (phlegmasia alba dolens) refleja la presencia de un carcinoma visceral o gástrico. Irónicamente, Trousseau desarrolla tromboflebitis en su pierna izquierda en enero de 1867 y reconoce el pronóstico de su enfermedad que lo lleva a la muerte en junio del mismo año.

En 1965, Egeberg describe la primera familia con factor de riesgo genético que determina la hipercoagulabilidad: la deficiencia de antitrombina III.

En la década de 1980, Griffin y colaboradores y Comp y Esmon descubren respectivamente las deficiencias genéticas de los otros anticoagulantes naturales, las proteínas C y S estando presentes en el 0,5% de los pacientes con primer episodio trombótico. En 1993, Dahlback y colaboradores demostraron la asociación entre la resistencia heredada a la proteína C activada y el desarrollo de trombosis venosa. La base genética fue descubierta por Rogier Bertina y colaboradores en Leiden en 1994, demostrando una mutación puntual del gen que codifica el FV de la coagulación.

Posteriormente en 1996, también el grupo de Bertina identifica una nueva mutación que determina una ganancia de función en el gen de protrombina que se asocia a hipercoagulabilidad y trombosis (PT G20210A).

Los anticuerpos antifosfolípidos (AFL) fueron detectados por primera vez en pacientes con sífilis a partir de la reacción de Wassermann en 1906.

En las décadas de 1960 y 1970 se publicaron algunos estudios que hallaban asociación de los AFL con trombosis y pérdidas fetales. Sin embargo, recién en 1980 esta asociación fue considerada relevante y se propuso el término Síndrome Antifosfolipídico (SAF) para definir a los individuos que presentan AFL en asociación con complicaciones clínicas de trombosis venosa, arterial, pérdidas fetales recurrentes y/o trombocitopenia.

Luego, se describen otras trombofilias genéticas como el aumento de la lipoproteína a Lp(a) que al tener un parecido estructural con el plasminógeno le permite competir con él disminuyendo la fibrinólisis. También la variante termolábil C677T metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que sobre todo, en su forma homocigota, produce niveles aumentados de homocisteinemia la cual tiene

una acción tóxica sobre el endotelio arterial favoreciendo la trombosis.

Durante muchos años se pensó que una gran cantidad de enfermedades provenían de la “mala sangre” y por tanto la cura eficaz era realizar sangrías. Como ya vimos, la lanceta fue utilizada a diestra y siniestra. Sin embargo, en otros muchos casos se utilizaba una bomba extractora biológica: la sanguijuela. Ya en el siglo II AC, el médico y botánico griego Nicandro de Colofón recogía en su poema Theriaca la primera referencia al uso terapéutico de la sanguijuela. Las sanguijuelas, son anélidos que se utilizaron durante gran cantidad de años para tratar numerosos trastornos desde dolores de cabeza, obesidad e incluso algunos tumores. Pero, estos bichitos han sido famosos porque contienen en su saliva un compuesto anticoagulante, la hirudina, un inhibidor selectivo de la trombina.

En 1957, Markwardt denomina a la sustancia anticoagulante de la sanguijuela hirudina y en 1985 establece la bioquímica del compuesto, un polipéptido que contiene 65 aminoácidos. A mediados de la década de 1980 se desarrollaron sustancias anticoagulantes similares a la hirudina (hirudinas recombinantes) como alternativa a la heparina. Son una antitrombina tan potente que tienen mayor riesgo de sangrado que la heparina.

En 1941, el bioquímico Karl Link descubre el dicumarol (hidroxicumarina) el primer anticoagulante oral. Poco tiempo después hallaron un compuesto menos tóxico y más eficaz la warfarina cuyo nombre proviene de la unión de las iniciales del lugar donde se obtuvo Wiscosin Alumni Research Foundation (WARF) seguido del sufijo tomado del nombre original cumarina. Los cumarínicos son antagonistas de la vitamina K y su uso clínico se ha mantenido durante estos 50 años en la prevención de la embolia en pacientes con prótesis valvulares cardíacas, como prevención y tratamiento de la trombosis venosa, las arritmias prolongadas y las trombofilias entre otras. En 1983 la OMS recomendó adoptar el sistema INR (International Normalised Ratio) para estandarizar los resultados del tiempo de protrombina utilizado en los pacientes tratados con warfarina.

Con el nuevo milenio, aparece una nueva generación de anticoagulantes orales.

El dabigatrán (Pradaxa), es un inhibidor

directo y reversible de la trombina que a diferencia de los cumarínicos tiene poca interacción medicamentosa y no necesita control biológico.

En marzo de 2008, la Comisión Europea de Medicamentos aprobó su uso como profilaxis de trombosis venosas en la cirugía de reemplazo total de cadera y rodilla.

El Rivaroxabán (Xarelto), es una droga sintética que actúa como un inhibidor directo del factor Xa y no necesita de la antitrombina-III para actuar. Se administra por vía oral en dosis únicas diarias y no necesita monitoreo biológico.

Pensamos que en el momento actual estamos ante un cambio histórico en la tromboprofilaxis y en la terapéutica antitrombótica con beneficios reales para el paciente como ocurrió en el siglo pasado con la heparina y los antivitaminas K.

Por fin, esta historia ha sido contada. “No está mal estar vivo y poder recordar”.







Ediciones de la Plaza - Galería Plaza Libertad
Zelmar Michelini 1329 - Locales 18 y 20
Impreso en junio de 2011
en los talleres gráficos de EL PAÍS S.A.
Montevideo - Uruguay
Depósito Legal N° 355.293





