

PROGRAMA EDUCACIONAL

**Coordinadores: S. Brunet
R. González Boullosa**

RESUMEN

S. BRUNET* Y R. GONZÁLEZ BOULLOSA**

*Servicio de Hematología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. **Servicio de Hematología. Hospital Mexoeiro. Vigo.

El objetivo de este programa educacional es poner al día los conocimientos científicos de conceptos básicos sobre hemopoyesis y apoptosis, nuevas metodologías en el seguimiento de la enfermedad mínima residual (ERM) en hemopatías malignas, el estado actual de diversas patologías de todo el espectro de la hematología, y de la trombosis y hemostasia que han ido evolucionando a lo largo de los años y la situación de los sustitutos celulares de la sangre en el campo de la hemoterapia.

El control de la hemopoyesis se realiza a través de una compleja trama de citocinas y de moléculas de adhesión que activan diversas vías imprescindibles para la correcta diferenciación, proliferación y supervivencia de los progenitores hemopoyéticos (PH). La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico que elimina las células senescentes, innecesarias o dañadas y los genes que la regulan generan una cascada de reacciones en las células diana que finaliza con el suicidio de dicha célula. Este proceso es de vital importancia, entre otras razones, para prevenir el crecimiento celular incontrolado. La alteración de este sistema está en el origen de varias patologías diversas, desde enfermedades autoinmunes y degenerativas al cáncer. El Dr. José L. Fernández-Luna analiza los mecanismos de regulación de la apoptosis (caspasas entre otras), las vías que regulan la supervivencia de los PH inmaduros (factores de crecimiento, factores de transcripción) así como los mediadores de la apoptosis en los PH. Finalmente expone los últimos avances en la regulación de la apoptosis en los síndromes mieloproliferativos crónicos.

Con los esquemas habituales de quimioterapia la mayoría de pacientes con leucemia aguda (LA) y linfoma alcanzan la remisión completa (RC) de su enfermedad. Lamentablemente, numerosos pacientes en RC recaen. Con frecuencia, las células que sobreviven son indetectables con métodos convencionales, pero existen actualmente técnicas para identificar la enfermedad residual mínima (ERM) en los pacientes en RC morfológica. El Dr. Marcos González analiza los aspectos metodológicos generales del estudio de la ERM mediante PCR y más concretamente su detección mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se analizan los 3 métodos que existen actualmente con sus ventajas e inconvenientes y su

posible aplicación en la toma de decisiones terapéuticas en las hemopatías malignas una vez la técnica esté completamente estandarizada.

El diagnóstico y tratamiento de las anemias hemolíticas (AH) son habituales en la consulta hematólogica. Sin embargo, en nuestro ámbito hasta el momento, la AH aparece menos frecuente en el contexto de infección. La Dra. Ana Villegas discute los distintos mecanismos fisiopatológicos de la AH de las infecciones junto a una descripción de la clínica dependiendo del germen causal y los métodos diagnósticos.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) en pacientes adultos constituye un reto terapéutico, pues si bien mediante el tratamiento de inducción se consigue alcanzar la RC en un amplio porcentaje de pacientes, la supervivencia a largo plazo es del 35%. La LLA no es una enfermedad uniforme y su pronóstico viene condicionado por el subtipo inmunológico y el cariotipo, que determinan 2 grupos de riesgo (bajo y alto) con diferentes aproximaciones terapéuticas. En este apartado el Profesor Dieter Hoelzer resume el estado actual del tratamiento de inducción y post-inducción con incorporación de esquemas que incluyen dosis altas de Ara-C o metotrexato para vencer la resistencia a drogas. También analiza los resultados de estudios aleatorizados con quimioterapia frente al trasplante de PH alogénico a partir de hermano HLA idéntico (alo-TPH), del auto-TPH y del alo-TPH a partir de donante no emparentado. Además se discute el impacto de la detección de ERM en la recaída. Finalmente se comenta el tratamiento de la LLA Ph/BCR/ABL positiva con el inhibidor de la tirosinasa STI571. Con el tratamiento intensivo convencional solamente entre 10-30% de los pacientes que alcanzan RC presentan remisión molecular. El alo-TPH, tratamiento de elección hasta la actualidad, consigue un 30-35% de supervivencia. Con STI571, se han comunicado hasta el momento resultados esperanzadores. Otras modalidades terapéuticas incluyen la utilización de anticuerpos monoclonales (AcMn). Los resultados con Rituximab (AcMn anti-CD20) son prometedores y permiten investigar su incorporación en el manejo de la LLA-B. Otros AcMn han sido también investigados.

El TPH forma parte en la actualidad del tratamiento de muchas hemopatías. Con los múltiples

avances de los últimos años se ha logrado reducir la morbimortalidad relacionada con el procedimiento. Sin embargo las infecciones continúan siendo una de las complicaciones más frecuentes de estos pacientes. En esta ponencia la Dra. Montserrat Rovira analiza los factores predisponentes, los patrones de infección en las diferentes fases del procedimiento, así como los microorganismos responsables de la infección. Además de describir las bacterias, virus y hongos más frecuentes durante el TPH incluye patrones diagnósticos y el tratamiento según el tipo de infección y/o fase del TPH.

En el campo de la hemoterapia el hallazgo de un sustituto de los hematíes humanos constituye un desafío desde hace muchos años. El Dr. Eduardo Muñoz-Díaz presenta las diversas soluciones transportadoras de oxígeno actualmente desarrolladas, las soluciones de hemoglobina (Hb) libre, los perfluorocarbonos y una variante de las primeras, las Hb encapsuladas en liposomas. Asimismo analiza las posibles fuentes de obtención de estas soluciones (humana, bovina o recombinante) con sus ventajas e inconvenientes. El impacto en la práctica clínica depende de que puedan introducirse en los pacientes con hemorragia aguda secundaria a traumatismos. Finalmente analiza los nuevos productos derivados de las plaquetas y sustitutos plaquetarios con la ventaja de permitir la conservación de plaquetas con una vida más larga pero con un coste superior, mayor complejidad del proceso de obtención y conservación y menor recuperación.

La trombosis y hemostasia se muestra como una ciencia emergente que precisa de la formación de especialistas con dedicación a estos aspectos cuya demanda en nuestra sociedad ha experimentado un crecimiento exponencial. Así la Dra. Marta Picó revisa aquellos mecanismos implicados en la formación de la fibrina, su regulación y su íntima relación con la fibrinólisis. Nos señala los “puntos calientes” en los que se centra la investigación en la actualidad y las importantes implicaciones que se derivan de su conocimiento para que podamos entender e incluso actuar sobre ellos de determinadas patologías como pueden ser: CID secundaria de sepsis, enfermedad cardiovascular o cáncer. El Dr. Josep Ordi examina el concepto relativamente nuevo de trombofilia como consecuencia de fenómenos inmunes y sugiere que la aplicación de metodologías utilizadas en la Inmunología puede ayudar a demostrar la existencia de nuevos anticuerpos implicados en la trombosis y que es posible que en algunos casos pueda llegarse a modificar el enfoque terapéutico clásico. El Dr. Francisco Velasco pone a punto el concepto PTT/SHU, centrándose a continuación en los recientes hallazgos que demuestran un déficit de proteasa del FvW en la PTT hereditaria y pérdida de la capacidad proteolítica en la PTT “idiopática”, siendo esta actividad normal en el SHU. Estos hallazgos sugieren que una deficiencia adquirida o congénita de la actividad proteolítica sobre el FvW, podría estar involucrada en la aparición de esta microangiopatía trombótica.

APOPTOSIS AND HEMATOPOIESIS

J.L. FERNÁNDEZ-LUNA

Unidad de Genética Molecular, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Summary

During hematopoiesis, the survival of progenitor cells is controlled by a network of cytokines and adhesion molecules that activate a number of signaling pathways aimed to inhibit apoptosis. Apoptosis, or programmed cell death, is a normal physiological process that eliminates unneeded, old, or damaged cells. Selected genes regulate a cascade of signaling pathways in the cell, causing targeted cells to commit suicide. This process is important to embryonic development, the daily maintenance of body systems, and the prevention of cellular overgrowth. Its disruption, however, contributes to many disorders ranging from cancer and autoimmune diseases to degenerative syndromes. Without this death signal, tumor cells can be allowed to grow uncontrolled. Apoptosis is currently the focus of intense research to better understand this process and to explain how it contributes to cancer development and how it controls tissue homeostasis.

Key proteins in the regulation of apoptosis

Hematopoietic progenitor cells require growth factors for survival, differentiation and proliferation. The absence of these growth factors leads to apoptosis, which is critical to control cell numbers within the hematopoietic compartment^{1,2}. In mammals, the executory arm of apoptosis involves a family of death proteases, called caspases, that are activated in a proteolytic cascade to execute the cell death program. The activation of upstream caspases represents a critical checkpoint in the decision to survive or to die³. The Bcl-2 family of proteins play a central role in the regulation of caspases. Members of this family possess at least one of four conserved motifs known as Bcl-2 homology domains (BH1 to BH4), and can exert both pro-survival and pro-apoptotic activity. In addition, caspases can also be controlled downstream of Bcl-2 by the IAP (inhibitor of apoptosis) family of proteins, which appear to directly block caspase activity and/or activation⁴.

Several growth factors, including interleukin-3 (IL-3) and erythropoietin (Epo), have been shown to maintain the expression of pro-survival Bcl-2 family members (i.e., Bcl-2, Bcl-x_L, A1, and Mcl-1) at the transcriptional level. By contrast, proapoptotic

members such as Bax, Bad, Bim and Bid, appear to undergo a post-translational regulation. Although IL-3 signaling regulates the transcription of the family members that function as cell death antagonists, only the down-regulation of Bcl-x_L protein was consistent kinetically with a key role in regulating the apoptosis of myeloid progenitors⁵. This is in agreement with the results found in *bcl-x*-deficient mice, in which the absence of this survival factor induced a lethal level of apoptosis within the hematopoietic system⁶.

Survival pathways in hematopoietic progenitors

The intracellular molecular pathways that regulate the survival of primitive hematopoietic progenitors are still poorly understood. Models of erythropoiesis and granulopoiesis have been extensively used to demonstrate the need of growth factors to induce cell survival, proliferation and maturation and to show that apoptosis is a normal physiological process controlling homeostasis. Epo is the main factor involved in red cell production as the lack of Epo results in anemia, which can be efficiently treated with recombinant Epo. This erythroid growth and survival factor binds to a specific cell surface receptor that is expressed on erythroid progenitors. The Epo receptor associates with Jak2, a member of a subfamily of protein tyrosine kinases, which plays an important role in cytokine-dependent gene regulation. Activated Jak2, in turn, converts a latent cytoplasmic transcription factor, Stat5, into its active form by tyrosine phosphorylation. The activated Stat5 translocates into the nucleus, where it binds to specific DNA response elements in the promoter region of target genes and activates transcription. Stat5 belongs to a family of transcription factors that are activated in response to diverse cytokines and growth factors. It has been shown that Epo functions as a survival factor, at least in part by repressing apoptosis through Bcl-x_L during proliferation and differentiation of erythroid progenitors⁷. Consistent with this, an Epo-responsive motif for the binding of Stat5 has been identified in the untranslated 5' region of the mouse *bcl-x* gene⁸. In Epo-dependent erythroid progenitors, this Stat5 motif is

active in response to Epo, a finding confirmed as site-directed mutagenesis abrogates its promoter activity and overexpression of a dominant negative Stat5 protein blocks transactivation of *bcl-x*. These *in vitro* studies have been confirmed in Stat5-deficient mice. Stat5 knockout embryos are severely anemic and consistently, erythroid progenitors show higher levels of apoptosis and are less responsive to Epo. Stat5 has also been shown to induce the expression of Bcl-x_L in hematopoietic progenitor cells in response to IL-3.

In a model of a human multiple myeloma cell line it has been shown that Stat3, another member of the Stat family, is constitutively activated as a result of aberrant upstream signals, and that this activation is induced by interleukin-6 and blocked by Jak inhibitors. Moreover, constitutive Stat3 up-regulates the expression of Bcl-x_L, which is a crucial event for the survival of myeloma cells⁹. All these data indicate that growth factor-dependent activation of Stats is a critical transcriptional pathway to induce the expression of Bcl-x_L and consequently to inhibit apoptosis in hematopoietic cells.

Mediators of apoptosis in hematopoietic progenitors

As mentioned above, post-translational mechanisms control a number of pro-apoptotic members of the Bcl-2 family. Bid remains inert until cleaved by caspase 8, and Bim is retained on microtubules by the dynein light chain LC8, whereas phosphorylation of Bad by the serine/threonine kinase Akt allows its sequestration and subsequent inactivation by 14-3-3 proteins⁴. However, other pro-apoptotic members of the Bcl-2 family, including Noxa and Hrk are transcriptionally regulated. Noxa is a target of the p53 tumor suppressor gene that might mediate its apoptotic activity, and Hrk is a strong apoptotic inducer expressed in hematopoietic progenitors upon growth factor withdrawal or treatment with chemotherapeutic drugs. Human Hrk was isolated as a Bcl-x_L and Bcl-2-interacting protein that was preferentially expressed in spleen and bone marrow¹⁰. The expression of Hrk is undetectable in erythroid, myeloid and lymphoid cells cultured with growth factors, but it is rapidly and specifically up-regulated on growth factor deprivation, whereas the expression levels of Bcl-x_L, Bax, Bad, and Bak either decrease or remain constant¹¹. Furthermore, ectopic expression of Hrk induces cell death of hematopoietic progenitors in the presence of growth factor, indicating that the presence of this protein is sufficient to induce apoptosis. Thus, one can envision that transcriptional repression of Hrk would be a safeguard mechanism to avoid inappropriate cell death in normal hematopoietic progenitors. Consistent with this hypothesis, a silencer sequence that binds to the transcriptional repressor DREAM has been found in the 3' untranslated region of the *hrk*

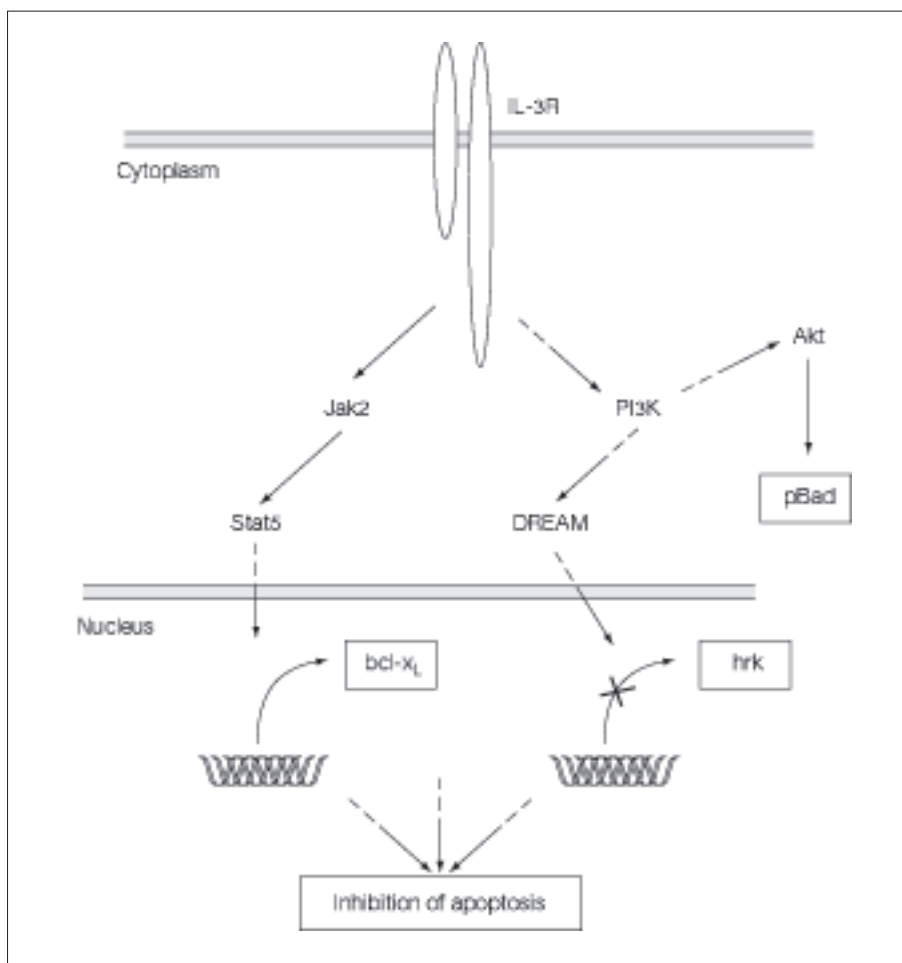
gene¹². DREAM is normally bound to the *hrk* gene in hematopoietic progenitor cells blocking transcription, but following an apoptotic insult such as growth factor deprivation, DREAM comes off the DNA allowing transcription of *hrk* and consequently inducing apoptosis. Furthermore, DREAM can be regulated by calcium mobilization and also by direct phosphorylation through a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-dependent, but Akt-independent pathway. Thus, based on current data, IL-3 functions as a cell survival factor in hematopoietic progenitors by repressing the expression of *hrk* through DREAM, inhibiting the activity of another pro-apoptotic protein, Bad, through phosphorylation by Akt and inducing the expression of the anti-apoptotic Bcl-x_L protein by a Jak-Stat transcriptional pathway (fig. 1).

Regulation of apoptosis in myeloproliferative syndromes

With the exception of chronic myelogenous leukemia (CML), all other myeloproliferative syndromes (polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis) lack a molecular hallmark that define the pathogenesis of these clonal diseases. Numerous studies have been focussed on understanding the molecular basis of polycythemia vera (PV). Chromosomal abnormalities have long been known to be associated with PV, but structural chromosomal alterations are seen in about 15% of patients with PV at diagnosis, which indicates that the genetic changes responsible for the pathogenesis of PV are likely to be due to DNA mutations unable to be detected by cytogenetic methods. Although analysis of mutant mice has established an essential role for Epo and its receptor in the development of erythroid progenitors *in vivo*, several studies have failed to identify mutations in the Epo receptor gene that may render Epo-independent erythroid cells in PV¹³.

That erythroid colonies from patients with PV can survive and undergo maturation *in vitro* in the absence of Epo suggests that the anti-apoptotic pathways usually activated via binding of Epo to its cognate receptor may be either constitutively active or induced by other growth factors. Since Epo induces the expression of Bcl-x_L in erythroid progenitors, an attractive hypothesis is that the levels of Bcl-x_L are maintained in PV erythroid cells regardless of the presence of Epo, which may allow these cells to survive in the absence of their physiologic stimulus. This hypothesis has been recently confirmed with the finding that the Epo-independent erythroid cells express high levels of Bcl-x_L when cultured in the absence of Epo, and that the expression of Bcl-x_L in bone marrow erythroid cells is significantly higher in patients with untreated PV than in those with other myeloproliferative disorders or secondary erythrocytosis¹⁴. Since Stat5 transacti-

Figure 1. Schematic representation of different survival pathways triggered by binding of IL-3 to its cognate receptor in hematopoietic progenitors. IL-3 inhibits the expression of Hrk through activation of the transcriptional repressor DREAM, blocks the activity of another pro-apoptotic protein, Bad, through phosphorylation by the serine/threonine kinase Akt and induces the expression of the anti-apoptotic Bcl-x_L protein by activation of a Jak-Stat transcriptional pathway.



vates the *bcl-x* gene in erythroid progenitors, a constitutively active Stat5 could account for the Epo-independent expression of Bcl-x_L. Although recent data obtained in patients with PV show that neither Jak2 nor Stat5 are constitutively active in platelets¹⁵, it is likely that an increased sensitivity of PV erythroid cells to a growth factor may induce activation of Stat5 or other anti-apoptotic signaling molecules, which in turn give rise to a dysregulated expression of Bcl-x_L.

CML is another myeloproliferative syndrome characterized by the translocation t(9;22). This translocation produces a chimeric gene that encodes a 210 K Bcr-Abl oncoprotein with dysregulated tyrosine kinase activity. Expression of Bcr-Abl in hematopoietic cells induces inhibition of apoptosis, growth factor independence, alterations in cell-cell and cell-matrix interactions, and leukemogenesis. In addition, due to the anti-apoptotic activity of this oncogene, Bcr-Abl-expressing leukemic cells are highly resistant to chemotherapeutic drugs¹⁶. Although it has been demonstrated that expression of Bcr-Abl is the initiating event in CML, the downstream signaling pathways involved in transforma-

tion are not fully understood. Nevertheless, some of the pathways activated by Bcr-Abl that prevent apoptosis in leukemic cells begin to be uncovered. The PI3K/Akt pathway may represent an important bridge between the survival signal triggered by Bcr-Abl and modulators of apoptosis, such as Bad. However, the capacity of Bcr-Abl to induce phosphorylation of Bad through Akt, does not account for the complete protection of CML cells from apoptosis¹⁷, suggesting the existence of alternative Bad-independent survival pathways. Consistent with this, it has been shown that Bcr-Abl induces the expression of Bcl-x_L through the constitutive activation of Stat5, and this seems to be a major survival pathway in CML cells as inhibition of Stat5 activation leads to down-regulation of Bcl-x_L and loss of cell viability¹⁸. Furthermore, when Bcr-Abl-expressing cell lines and CD34+ cells from CML patients are incubated with an inhibitor of the Bcr-Abl kinase activity such as STI571, Stat5 loses its ability to interact with the *bcl-x* gene and consequently the expression of Bcl-x_L is reduced and leukemic cells undergo apoptosis. This mechanistic understanding of Bcr-Abl signaling opens the possibility to develop novel therapies

addressed to inhibit key molecules (i.e., Stat5, PI3K/Akt) that transduce survival signals in CML and may be other hematologic malignancies.

Acknowledgements

The contribution of my group to the results shown in this review has been possible in part thanks to the financial support of the Fundación Marcelino Botín.

References

- Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM, Taylor DR. Hematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 76-79.
- Sachs L. The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4742-4749.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *TRENDS Biochem Sci* 2001; 26: 61-66.
- Packham G, White EL, Eischen CM, Yang H, Parganas E, Ihle JN et al. Selective regulation of Bcl-x_L by a Jak kinase-dependent pathway is bypassed in murine hematopoietic malignancies. *Genes Dev* 1998; 12: 2475-2487.
- Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in *bcl-x*-deficient mice. *Science* 1995; 267: 1506-1510.
- Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nuñez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-x_L and Bcl-2. *Blood* 1996; 88: 1576-1582.
- Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nuñez G et al. Erythropoietin can induce the expression of Bcl-x_L through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* 1999; 274: 22165-22169.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999; 10: 105-115.
- Inohara N, Ding L, Chen S, Nuñez G. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-x_L. *EMBO J* 1997; 16: 1686-1694.
- Sanz C, Benito A, Inohara N, Ekhterae D, Nuñez G, Fernandez-Luna JL. Specific and rapid induction of the proapoptotic protein Hrk after growth factor withdrawal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 2742-2747.
- Sanz C, Mellstrom B, Link WA, Naranjo JR, Fernandez-Luna JL. Interleukin 3-dependent activation of DREAM is involved in transcriptional silencing of the apoptotic *hrk* gene in hematopoietic progenitor cells. *EMBO J* 2001; 20: 2286-2292.
- Le Couedic JP, Mitjavila MT, Villeval JL. Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood* 1996; 87: 1502-1511.
- Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338: 564-571.
- Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338: 572-580.
- Bedi A, Barber JP, Bedi GC, El-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anti-cancer agents. *Blood* 1995; 86: 1148-1158.
- Neshat MS, Raitano AB, Wang H-G, Reed JC, Sawyers CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: Roles for PI-3k and Raf. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1179-1186.
- Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-x_L. *J Exp Med* 2000; 191: 977-984.

REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL. DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN HEMOPATÍAS MALIGNAS

M. GONZÁLEZ, M.C. CHILLÓN, R. GARCÍA-SANZ, R. LÓPEZ-PÉREZ, A. BALANZATEGUI, D. GONZÁLEZ, I. ALAEJOS, R. HERNÁNDEZ, M. SILVA Y J.F. SAN MIGUEL

Servicio de Hematología-Hemoterapia. Hospital Clínico Universitario. Salamanca.

En la actualidad, las estrategias terapéuticas empleadas en el tratamiento de las leucemias y linfomas consiguen una elevada tasa de remisiones completas (RC), definida como la ausencia de células tumorales detectadas mediante técnicas citomorfológicas (límite de detección del 5%)¹. Sin embargo, muchos pacientes van a recaer de su enfermedad debido a la existencia de un pequeño número de células malignas que no son detectadas con la metodología convencional, que es lo que se denomina enfermedad mínima residual (ERM)^{1,2}. Debido a esto, los enfermos son sometidos indiscriminadamente a tratamientos de consolidación, incluido el trasplante de progenitores hemopoyéticos, para eliminar la ERM. Ello hace que algunos pacientes reciban más tratamiento del necesario, mientras que en otros es insuficiente. Así, en la actualidad, todos los pacientes en RC reciben el mismo tratamiento pese a que el número de células tumorales en ese momento puede oscilar entre 10^0 y 10^{10} células leucémicas (10^{10} es la masa tumoral correspondiente al límite de detección de la morfología -1%-). Por tanto, son necesarias técnicas más sensibles que permitan evaluar la masa residual de forma más precisa, lo que posibilitaría realizar tratamientos de consolidación adaptados a cada enfermo. Por otro lado, el uso de métodos de detección de ERM también es útil para valorar la contaminación (porcentaje de células tumorales) de los concentrados de progenitores hemopoyéticos de médula ósea o sangre periférica que se emplean en los trasplantes autólogos¹⁻³. Además, el estudio de la ERM puede ser útil en la detección precoz de recaídas y como marcador para monitorizar la respuesta a la terapia administrada. Así el análisis del transcrito *BCR/ABL* en pacientes con leucemia mieloide crónica Ph1+ sometidos a alotrasplante es un ejemplo de su aplicabilidad clínica. Diferentes trabajos muestran que su detección antes de que se produzca la recaída hematológica/citogenética es indicación de iniciar tratamiento inmunoterápico (perfusión de linfocitos y/o reducción de la inmunodepresión) ya que su efectividad es mayor cuanto menor sea la masa tumoral residual⁴.

Entre todas las metodologías propuestas para el estudio de ERM, las dos más utilizadas por su alta sensibilidad (detección de una célula leucémica entre

10^4 y 10^6 células normales), y de las que se dispone de más información, son las técnicas de inmunofenotipo mediante citometría de flujo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{1,5}.

En esta revisión se analizará en primer lugar aspectos metodológicos generales del estudio de ERM mediante PCR y en la segunda parte nos centraremos en las distintas metodologías utilizadas en la detección de ERM mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Aspectos metodológicos. Estrategias de estudio y limitaciones

Los dos marcadores moleculares más empleados en la detección de ERM mediante PCR son: a) análisis de los reordenamientos clonales de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y del receptor de célula T (RCT), presentes en los síndromes linfoproliferativos B y T y b) detección de aberraciones cromosómicas en las que se conocen los oncogenes implicados que dan lugar a regiones quiméricas de fusión características de diferentes enfermedades (p. ej., *BCR/ABL*, en la leucemia mieloide crónica)^{1,5}. Más recientemente también se han incorporado otros posibles marcadores de ERM analizables por RT-PCR como por ejemplo los transcritos *WT-1* y *Flt-3*⁽²⁾.

Las técnicas de PCR permiten la amplificación selectiva de un fragmento específico de ADN o cADN permitiendo, en las enfermedades donde se genera un fragmento de ADN tumor-específico, la detección de un número pequeño de células neoplásicas. Los estudios pueden realizarse a partir de ADN lo que facilita el manejo de las muestras o bien a partir de ARN. Los análisis de los reordenamientos *V(D)J* así como aquellas translocaciones donde el punto de rotura es preciso y el fragmento de PCR a amplificar es menor de 2 Kb el estudio se realiza a partir de ADN (p. ej., *t(14;18)* (*BCL-2/JH* regiones *mbr* y *mcr*). Por el contrario, en otras translocaciones el punto de rotura es variable afectando a zonas muy amplias de ADN lo que imposibilita su estudio a partir de ADN genómico. Esto ocurre en algunas enfermedades linfoproliferativas como en el linfoma de Burkitt así como en la mayoría de las translocaciones más frecuentes de las leucemias mieloblásticas agudas (LMA) y leucemias linfoblásticas agudas (LLA)^{1,6}. Sin embargo, en las LMA y LLA, el punto de rotura

generalmente afecta regiones intrónicas y la translocación da lugar a la generación de genes híbridos que se encuentran en marco de lectura lo que permite su detección a partir de ARN tras su transformación a cADN mediante técnica de transcriptasa inversa seguida de reacción de PCR (técnica de RT-PCR)^{1,6}.

La sensibilidad de la técnica de PCR (PCR anidada y RT-PCR) se sitúa entre 10^{-4} y 10^{-6} ; es decir, permite discriminar una célula tumoral entre 10^4 - 10^6 células normales. Sin embargo, a pesar de esta alta sensibilidad, no es una técnica exenta de limitaciones, tanto específicas de la estrategia que se está empleando, como problemas comunes a cualquier reacción de PCR¹. Un problema importante son los falsos positivos debidos a la contaminación de muestras, principalmente en los métodos basados en ARN. Por ello, es imprescindible la inclusión de muestras control y extremar las medidas para evitar la contaminación. En el otro extremo se situarían los falsos negativos por emplear muestras de mala calidad (p. ej., ARN degradado), por lo que se debe realizar un control de la reacción amplificando genes normales constitucionales. (p. ej., gen *ABL* o *RARA*) En los análisis de PCR que se basan en la unión clono-específica de reordenamiento de Ig o RCT pueden producirse además, tanto falsos positivos debido a la amplificación de secuencias V(D)J en células normales con reordenamientos similares a los de las células tumorales o bien falsos negativos debido a la posible existencia de cambios evolutivos en el tipo de reordenamientos (evolución clonal o presencia de subclones) lo que impediría su detección⁷. Estos cambios clonales son especialmente frecuentes en algunos subtipos biológicos de LLA y en algunos genes (especialmente IgH) lo que obliga que el seguimiento molecular de la ERM de cada paciente se deba hacer con más de uno de estos reordenamientos clonales ya que al menos uno de ellos permanece estable en la evolución. Por otro lado, el estudio de las alteraciones cromosómicas a diferencia de los reordenamientos genéticos de Ig/RCT, son sólo tumor-específicos y no paciente-específicos, por lo que el riesgo de contaminación cruzada es mayor.

Otro aspecto metodológico importante es la necesidad de estandarización de estas técnicas, especialmente en los estudios cooperativos debido a las variaciones interlaboratorios⁸. En este sentido, es interesante la experiencia recientemente publicada del estudio Biomed-1 en el que ha participado nuestro grupo sobre estandarización de estas metodologías⁹. En este estudio, en el que se ha estandarizado el análisis por PCR de las principales translocaciones cromosómicas presentes en LLA y LMA, se muestra que las variaciones interlaboratorios son pequeñas cuando se utilizan los controles adecuados y una metodología común⁹. También es importante conocer las características específicas de cada translocación que puede estar incidiendo en la significación clínica de cada translocación. Así en las t(9;22) (*BCR/ABL*) y

t(15;17) (*PML/RARA*) la persistencia de células PCR+ en fases específicas del tratamiento o su reaparición tras una negativización previa predice con gran precisión la recaída clínica⁹. Por el contrario, en otras translocaciones como la t(8;21) o la inv(16) la capacidad predictiva es menor; así, en pacientes con LMA-M2 o LMA-M4 con eosinofilia, positivas para estas translocaciones, que se encuentran en RC durante largo tiempo, es posible todavía detectar transcritos de ambas translocaciones sin que ello se siga de recaída de la enfermedad^{9,10}. Diferentes trabajos señalan que estos resultados se relacionan al menos en parte con la mayor o menor sensibilidad de la técnica que se está empleando. Así la sensibilidad de la determinación de *PML/RARA* que tiene una importante significación clínica, es sensiblemente inferior (generalmente, 10^3 - 10^4) a la alcanzada en las otras translocaciones -t(8;21) e inv(16)- que generalmente es superior a $10^{-5(9)}$. Un reciente trabajo del grupo de Pred'homme¹¹ demuestra que el estudio de la t(8;21) (*ETO/AML1*) es predictivo cuando se realiza una RT-PCR en una sola etapa (sensibilidad 10^{-4}) en lugar de la clásica RT-PCR anidada (sensibilidad 10^{-6}), lo que es concordante con esta hipótesis. Otra limitación de los estudios de ERM por PCR es que la mayoría de los estudios publicados proporcionan información cualitativa o a lo sumo semicuantitativa y el análisis del producto de PCR es a tiempo final por lo que no es posible conocer con exactitud el número de células tumorales existente en la muestra⁹. Por este motivo, se han desarrollado técnicas de PCR cuantitativa (generalmente PCR competitiva) que sugieren que la cuantificación de las células tumorales residuales pueden ser útil para definir pacientes con pronóstico diferente. En este sentido, los trabajos llevados a cabo en las t(9;22), t(8;21) e inv(16), demostrando su utilidad, son indicativos de la eficacia de la PCR cuantitativa^{12,13}. Sin embargo, estos estudios son muy laboriosos y de difícil estandarización por lo que en la actualidad es una técnica de difícil aplicación rutinaria en laboratorios clínicos. Por este motivo ha despertado notable interés el desarrollo de una nueva tecnología de PCR cuantitativa denominada PCR cuantitativa en tiempo real^{14,15}.

PCR cuantitativa en tiempo real

Esta metodología de PCR cuantitativa, a diferencia de la PCR competitiva, permite la automatización y además es rápida y no necesita el procesamiento ulterior del producto de PCR lo que reduce el riesgo de contaminación. En la actualidad, existen en el mercado varios equipos que con algunas peculiaridades metodológicas diferentes, permiten su determinación^{14,15}. Desde el punto de vista técnico, existen tres principales métodos de análisis de PCR cuantitativa que se basan en técnicas de fluorescencia que se diferencian en la metodología de detección de los productos de PCR. Estos métodos son: el que emplea sondas TaqMan, los basados en el uso de dos

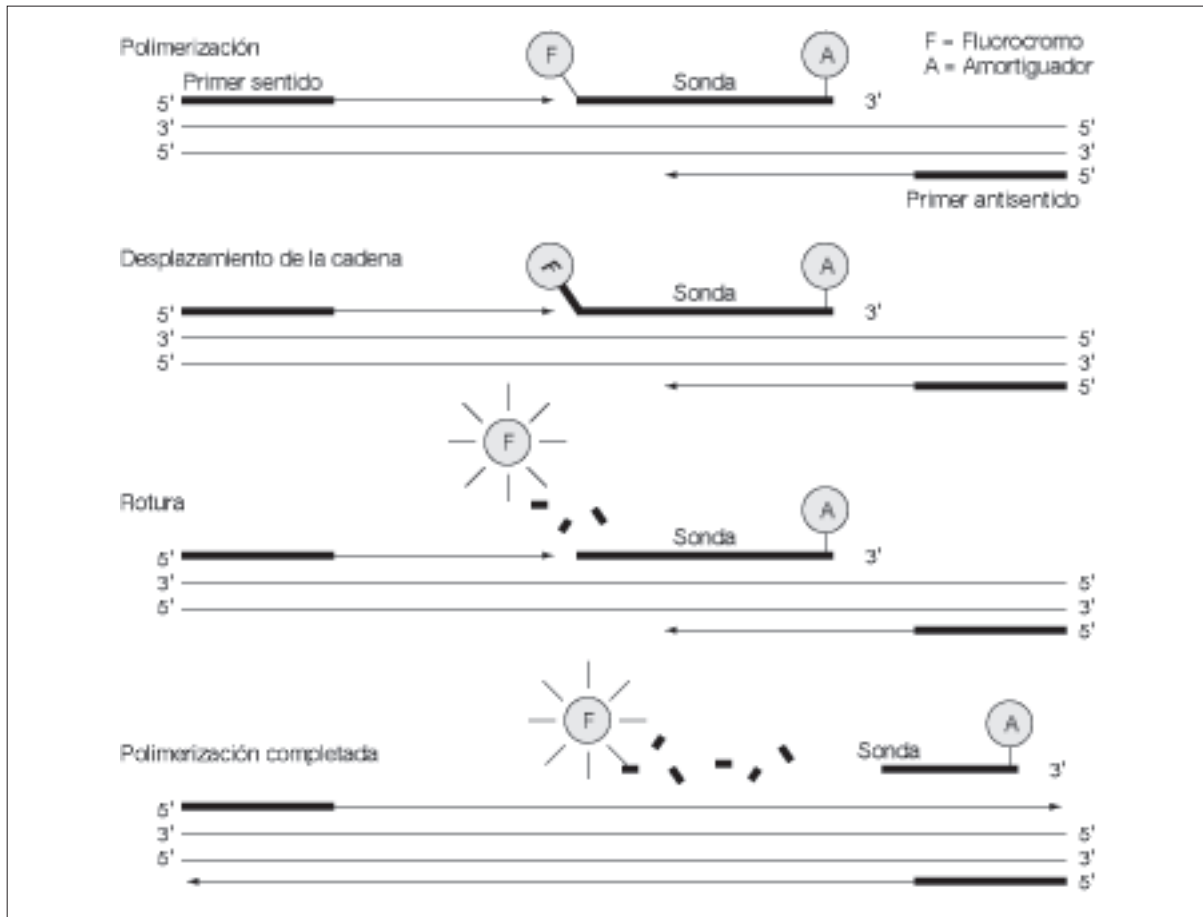


Figura 1. PCR en tiempo real. Fundamentos de la estrategia empleando sondas TAQMAN. Actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa.

sondas que hibridan en las secuencias específicas y, por último, el que utiliza el fluorocromo intercalante que se une a la doble cadena de ADN denominado SYBR Green I. El método más difundido, es el que emplea sondas TaqMan¹⁴ que se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación mediante PCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan) que hibrida con la secuencia diana que estamos amplificando (fig. 1). La sonda TaqMan, de un tamaño aproximado de 20-30 bases, tiene unido un fluorocromo en posición 5' y un amortiguador de fluorescencia en posición 3' (TAMRA: 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Además, esta sonda está fosforilada en 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR. Si la secuencia diana está presente en la muestra, la sonda TaqMan hibridará específicamente con ella, situándose entre los dos cebadores. Cuando se produce la etapa de extensión en la reacción de PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa degradaría la sonda TaqMan liberando el fluorocromo, que al estar fuera de la influencia del amortiguador emitirá una señal que puede ser captada por el sistema óptico del equipo. Este pro-

ceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de la PCR. por lo que se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción de PCR. Además, la Taq polimerasa no digiere la sonda libre sino únicamente la hibridada, por lo que la cantidad de señal fluorescente emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado. La medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua lo que nos proporciona una información dinámica en tiempo real (análisis cinético) del proceso. De esta forma podemos establecer el ciclo umbral (*CT-cycle threshold*), es decir, el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que hayamos fijado, lo que a su vez se correlaciona directamente con la cantidad de cADN de la secuencia diana. Generalmente, el umbral se define como 10 veces la desviación estándar de la señal de fluorescencia basal. La cuantificación del número de copias de una muestra se realiza mediante la comparación de la CT de la muestra problema con la CT de una serie de diluciones de una muestra-control positiva (fig. 2). La cuantificación de la muestra control

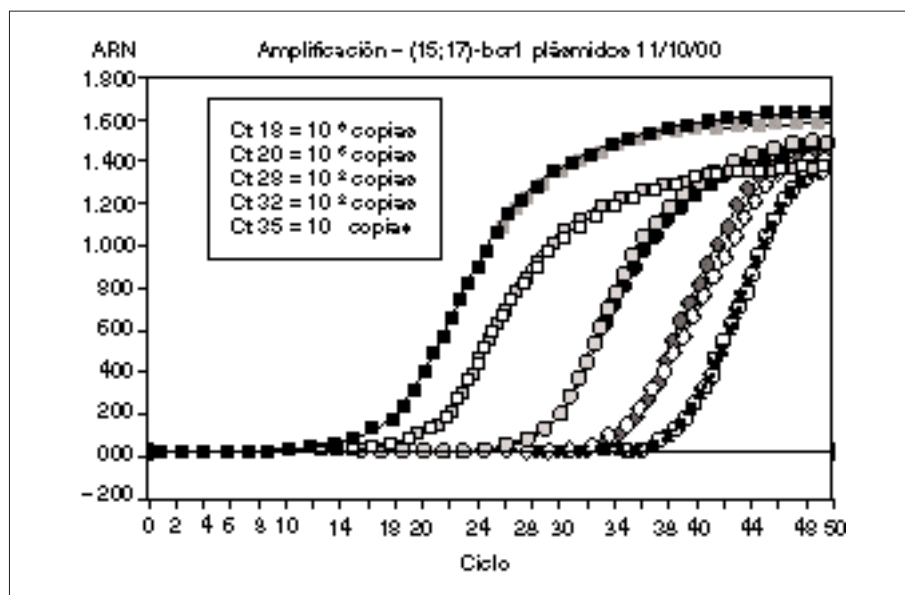


Figura 2. Gráfica de la amplificación por PCR cuantitativa de diferentes diluciones de muestra control positiva [n.º de copias definidas de plásmidos que presentan el inserto bcr-1 del transcrito PML/RARA de la t(15;17)]. El ciclo umbral oscila entre el 18 para 10^6 copias y el ciclo 35 que correspondería a 10 copias del transcrito. El experimento se realiza por triplicado.

positiva (generalmente un número conocido de copias de plásmido que contiene la secuencia diana) permite establecer una curva estándar que refleja el número de copias y el número de ciclo en el que fue posible su detección de forma objetiva y reproducible. Cuando se realiza la cuantificación de la muestra problema, el ciclo umbral de su detección se lleva a la curva estándar lo que permite conocer el número de copias de la secuencia diana que tiene la muestra que estamos analizando (fig. 3). Además, para la cuantificación del ARN tumoral del que partimos debemos tener en cuenta la eficiencia de la reacción de transcripción inversa, ya que esto condiciona el número de copias de cADN. Para controlar esta variable es necesaria la amplificación en la misma muestra de un gen control expresado constantemente en todas las células, como *ABL*, *b2*-microglobulina o *GUS* (beta glucuronidasa) lo que nos permite corregir los cambios debidos a la cantidad y calidad de ARN total y compensar la diferencia en eficiencia de la reacción de transcripción inversa. Igualmente, el diseño de los primeros así como de las sondas TaqMan, específicas de cada translocación cromosómica es de gran importancia para que la eficiencia de la reacción sea la adecuada y se consiga una sensibilidad suficiente¹⁴.

El método de PCR cuantitativa basado en la química de sondas que se hibridan emplea dos sondas secuencias-específicas que hibridan a secuencias adyacentes espaciadas entre uno y cinco nucleótidos. Una sonda está marcada con un fluorocromo emisor en posición 3' y la otra sonda está marcada con un fluorocromo aceptor en su extremo 5'. Esta sonda además tiene bloqueado su extremo 3' con un grupo fosfato para evitar su extensión. Cuando las dos sondas han hibridado y están en vecindad, la luz emitida por el fluorocromo emisor es transmitida al fluorocromo aceptor mediante un proceso denomi-

nado transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Este fenómeno origina una emisión de fluorescencia por el fluorocromo aceptor cuya intensidad aumenta paralelamente a la cantidad de secuencia diana formada en la reacción de PCR. Esta metodología se diferencia de la química de sondas TaqMan en que no se requiere hidrólisis de la sonda y por tanto no precisa tiempo adicional en la fase de extensión de la reacción de PCR.

La tercera posibilidad metodológica de PCR cuantitativa en tiempo real es la detección de los productos específicos de PCR de la secuencia diana tumoral mediante el colorante intercalante de ADN denominado SYBR Green I. Este colorante se une específicamente a la doble hélice de las moléculas de ADN formadas en cada reacción de PCR. De esta forma, la emisión de fluorescencia se incrementa paralela a la formación de los productos de PCR. La ventaja de esta opción es que no se precisa sondas fluorescentes específicas de cada secuencia tumoral pero su desventaja es que detectaría todos los productos de PCR formados tanto específicos como inespecíficos.

Estudios preliminares han demostrado que esta tecnología es útil en la detección de ERM empleando tanto los reordenamientos clonales de los genes de *Ig/RCT* como translocaciones cromosómicas específicas como diana de la reacción de PCR [p. ej., t(9,22), t(14,18), t(8,21) y t(15;17)]¹⁶⁻¹⁹. Sin embargo, el número de pacientes analizado es escaso y por tanto su utilidad exacta se desconoce. Además la tecnología de PCR cuantitativa en tiempo real necesita ser optimada y estandarizada para su aplicación clínica. En este sentido es interesante el estudio europeo que se está llevando a cabo y que coordina el Dr. J. Gabert (Institut Paoli Calmettes, Marsella, Francia) (European commission DG V/F) en el que participa nuestro grupo junto a otros 14

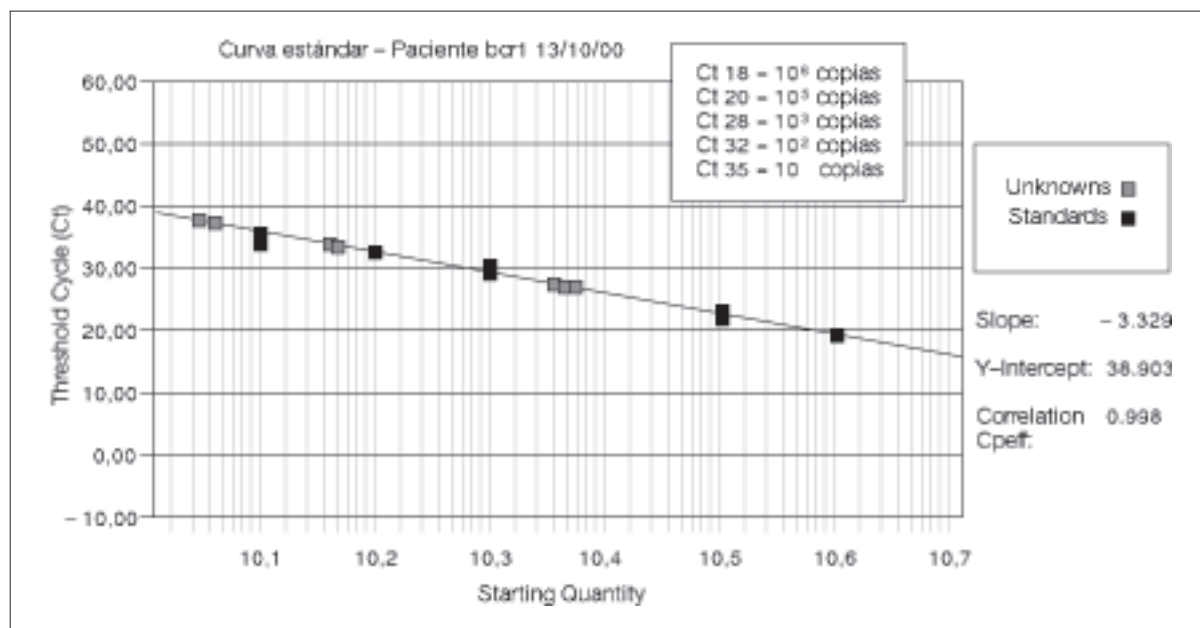


Figura 3. Curva estándar de la muestra control positiva correlacionando el número de copias del transcrito (entre 10^6 y 10^1) (eje X) y el ciclo umbral (CT) de la dilución (entre 18 y 35) (eje Y). En negro se representa las diluciones de la muestra control positiva y en gris la muestra problema.

laboratorios europeos. Este estudio pretende estandarizar y optimizar la tecnología de PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan (ABI Prism 7.700) para el estudio de la ERM así como evaluar sus posibles implicaciones clínico-terapéuticas²⁰.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Proyecto FIS/SS n.º 00/1079.

Bibliografía

- San Miguel JF, Van Dongen J, Bartram C, Parreira A, Worman B, Biondi A et al. Investigation of minimal residual disease (MRD) in acute leukemia (AL): international standardization and evaluation. Cancer Research supported under Biomed 1, SS Baig (Ed). IOS Press, 1998; 300-306.
- San Miguel JF, Gonzalez M, Orfao A. Minimal residual disease in myeloid malignancies. En: Degos L, Linch D, Lowenberg B, eds. Textbook of malignant Haematology. Londres: Martin Dunitz, 1999; 871-891.
- Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Langerak AW, Gonzalez M, Chillón MC et al. The detection of contaminating clonal cells in apheresis products is related to response and outcome in Multiple Myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. Leukemia 2000; 14: 1493-1499.
- Mackinnon S, Papadopoulos EP, Carabasi MH, Reich L, Collins NH, Poulad F et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leucocytes for relapse of chronic myeloid leukemia following bone marrow transplantation: separation of graft versus leukemia responses from graft versus host disease. Blood 1999; 86: 11-1268.
- San Miguel JF, Van Dongen J. Methods for detection of minimal residual disease. En: Buchner T et al, eds. Acute Leukemias VI. Berlín: Springer Verlag, 1997; 307-312.
- González M, García-Sanz R, Vargas M, Balanzategui A, Chillón MC, Mateos MV et al. Biología molecular en hemopatías malignas. Aplicaciones clínicas. Estudio de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y receptor de célula T (RCT) y análisis molecular de las translocaciones cromosómicas. Sangre 1996; 41: 321-333.
- Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P et al. Primers and protocols for standardized MRD detection in ALL using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. Report of the BIOMED-1 Concerted Action investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia 1999; 13: 110-118.

- Bolufer P, Barragán E, Sanz MA, Martín G, Borstein R, Colomer D et al. Preliminary experience in external quality control of RT-PCR PML-RARA detection in promyelocytic leukemia. Leukemia 1998; 12: 2024-2028.
- Van Dongen JMM, Macintyre EA, Delabesse E, Gabert JA, Biondi A, Cazzaniga G et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukaemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia 1999; 13: 1901-1928.
- Martin G, Barragán E, Bolufer P, Chillón C, García-Sanz R, Gómez T et al. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBF/MYH11 rearrangement. Haematologica 2000; 85: 699-703.
- Morschhauser F, Cayuela JM, Martini S, Baruchel A, Rousselot P, Socié G et al. Evaluation of minimal residual disease using reverse-transcription polymerase chain reaction in t(8;21) acute myeloid leukemia: a multicenter study of 51 patients. J Clin Oncol 2000; 18: 788-794.
- Cross NCP, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR/ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. Blood 1993; 82: 1929-1936.
- Tobal K, Yin AL. Monitoring of minimal residual disease by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for AML1-MTG8 transcripts in AML-M2 with t(8;21). Blood 1996; 88: 3704-3709.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996; 6: 986-994.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 1997; 22: 176-181.
- Verhagen O, Willems MJ, Breunis WB, Wijkhuijs A, Jacobs D, Joosten SA et al. Application of germline IgH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2000; 14: 1426-1435.
- Bolufer P, Sanz GF, Barragan E, Sanz MA, Cervera J, Lerma E et al. Rapid quantitative detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients by real-time reverse transcriptase polymerase-chain reaction using fluorescently labeled probes. Haematologica 2000; 85: 1248-1254.
- Luthra R, McBride JA, Cabanillas F, Sarris A. Novel 5' exonuclease-based real-time PCR assay for the detection of t(14,18)(q32;q21) in patients with follicular lymphoma. Am J Pathol 1998; 153: 63-68.
- Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N, Barbey C, Rain JD, Feneax P et al. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. Leukemia 2000; 14: 324-328.
- Gabert J, Beillard E, Bi W, Pallisgaard N, Gottardi E, Cazzaniga G et al. European standardization and quality control program of real time quantitative RT-PCR analysis of fusion gene transcripts for minimal residual disease detection in leukemia patients. San Francisco: 42nd Annual Meeting, American Society of Hematology (ASH), December 1-5, 2000 (Abstract n.º 1343).

ANEMIAS HEMOLÍTICAS DE LAS INFECCIONES

A. VILLEGAS Y F.A. GONZÁLEZ

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

Introducción

Las anemias hemolíticas constituyen un grupo de procesos que tienen como denominador común la disminución de la supervivencia eritrocitaria en la circulación, más allá de la capacidad normal que la médula ósea tiene de compensarla.

Las anemias hemolíticas se clasifican en dos grandes grupos: adquiridas y congénitas. En las anemias hemolíticas congénitas, existe un defecto estructural del hematíe que se transmite de forma hereditaria. En las anemias hemolíticas adquiridas, la hemólisis se produce por la acción sobre el hematíe de diferentes agresiones entre las que se encuentran las infecciones. Se clasifican en autoinmunes y no autoinmunes.

En un gran número de enfermedades infecciosas se produce un acortamiento de la vida media del hematíe, especialmente en aquellos pacientes con déficit de glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa o hiperesplenismo. No obstante, existen determinadas enfermedades infecciosas en las que la alteración de los hematíes constituye una de las principales características del cuadro clínico.

La causa fisiopatológica de la anemia hemolítica puede producirse por parasitación directa de los hematíes, por mecanismo inmune, por hiperesplenis-

mo, por alteración topográfica de la superficie del hematíe o por la acción directa sobre el hematíe de diferentes toxinas (tabla 1)¹.

Parasitación directa de los hematíes

El ejemplo clásico es la malaria por parasitación directa del hematíe por *Plasmodium*. En esta enfermedad, el esporozoito de la malaria se introduce en el organismo mediante la saliva del mosquito *Anopheles* hembra. Se acumula en el hígado del huésped y tras 1-2 semanas, se transforma en merozoito, parasitando directamente a los hematíes. El *P. vivax* presenta receptores específicos en su superficie (grupo sanguíneo Duffy) mientras que el *P. falciparum* utiliza, ácido siálico, como lugar especial de anclaje celular. El parásito degrada e ingiere la hemoglobina, y las células rojas se hemolizan, bien intravascularmente, como consecuencia directa de la destrucción del parásito o bien en la microcirculación esplénica por la activación del sistema monocítico-macrófago¹.

Otras infecciones que involucran directamente a los hematíes son las bartonelosis o enfermedad de Carrión, producida por la picadura de un mosquito que fija la *Bartonella bacilliforme* a la membrana de la célula roja, ocasionando la rotura del hematíe y la hemólisis.

En la babesiosis el parásito se transmite por la picadura de garrapatas. El parásito invade directamente los hematíes dando lugar al cuadro clínico de fiebre y anemia hemolítica.

La leptospirosis y toxoplasmosis crónica pueden producir ocasionalmente anemia hemolítica.

Alteración de la membrana del hematíe por productos bacterianos

La infección puede desencadenar hemólisis alterando la superficie del hematíe.

Un ejemplo de este tipo de hemólisis está causado por el *Haemophilus influenzae* tipo b. Los pacientes con enfermedad grave, sobre todo con meningitis, desarrollan anemia hemolítica requiriendo transfusiones¹.

El polisacárido de la bacteria, compuesto por polirribosil ribosil fosfato (PRP), se libera durante la infección y se fija en la superficie eritrocitaria. Los pacientes infectados desarrollan anticuerpos frente a

Tabla 1. Mecanismo fisiopatológico de la anemia hemolítica de las infecciones

Parasitación directa de los hematíes

Malaria y babesiosis

Mecanismo inmune

Aglutininas frías que causan hemólisis en la infección de mononucleosis infecciosa o *Mycoplasma pneumoniae*

Inducción de hiperesplenismo

Malaria, esquistosomiasis

Alteración de la topología de la superficie eritrocitaria

Haemophilus influenzae

Salida de toxinas y productos bacterianos que causan hemólisis por daño directo de los hematíes

Infección por *Clostridium welchii*. *E. coli* 0197, VIH?

Tomada de S.L. Schrier, 2000.

PRP, que fijan complemento y producen hemólisis autoinmune. La destrucción de las células puede producirse intra o extravascularmente.

Salida de toxinas y productos bacterianos que causan hemólisis por lesión directa de los hematíes

El ejemplo más grave es el de la septicemia causada por *Clostridium perfringens* (*C. welchii*), que produce una hemólisis grave, que progresa tan rápidamente que a menos que se bloquee inmediatamente el proceso hemolítico, puede afectar a la totalidad de los hematíes.

El *Clostridium* libera una α -toxina fosfolipasa que actúa sobre la capa bilipídica de la membrana eritrocitaria, degradando los fosfolípidos y produciendo proteólisis de las proteínas de la estructura proteica de la membrana, incluida la espectrina. Se forman esferocitos. Sin embargo no aparecen cuerpos de inclusión, ni fragmentos eritrocitarios¹.

La infección por *C. welchii* se produce en el curso de heridas penetrantes, colecistitis gangrenosas o vísceras perforadas, cirugía de vías biliares y procesos ginecológicos, que afectan al útero grávido, complicaciones del aborto séptico y otras situaciones que engendran necrosis tisular por anaerobios.

Anemias hemolíticas esporádicas originadas por otras infecciones

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede originar anemia hemolítica con test de Coombs positivo o cuadros de microangiopatía hemolítica y púrpura trombótica trombocitopénica.

La infección por citomegalovirus se ha descrito asociada a anemia hemolítica y trombocitopenia de mecanismo inmune.

Otras infecciones que causan anemia hemolítica de mecanismo inmune son: *Treponema pallidum*, varicela, rubéola, *Mycoplasma pneumoniae*, infección por virus de Epstein-Barr, *influenza*, virus *Coxsackie*, hepatitis viral y *Streptococcus pneumoniae*².

En la leishmaniasis visceral pueden también observarse cuadros hemolíticos por la generación de procesos metabólicos oxidativos que alteran la composición del hematíe.

Otros procesos infecciosos que pueden ocasionar anemia hemolítica de mecanismo no inmune son endocarditis bacteriana, rubéola, pielonefritis, etc.

Anemia hemolítica producida por infección por malaria

La malaria afecta a millones de personas en la población mundial (490 millones), siendo en África tropical su mortalidad anual de 2,3 millones. Se encuentra en regiones del mundo en las que con frecuencia se asocia con deficiencias nutricionales, infecciones bacterianas, virales o parasitarias de todo tipo, talasemias, hemoglobinopatías y enzimopa-

tías. En consecuencia una proporción importante de los pacientes con malaria presentan a la vez varias de estas condiciones patológicas^{3,4}.

En los países desarrollados, a pesar de estar erradicada desde hace más de 40 años, pueden observarse esporádicamente casos importados de África o de otros continentes en donde la malaria es endémica. Más del 90% de los portadores (250 millones) pertenecen a África tropical.

Es la infección producida por protozoos del tipo *Plasmodium vivax*, *ovale*, *malariae* o *falciparum*, transmitida por el mosquito hembra *Anopheles* que sirve de reservorio y vector. Los esporozoitos llegan al torrente circulatorio del huésped en número escaso, por medio de la saliva de los mosquitos. Los esporozoitos se adhieren rápidamente a los receptores específicos en los macrófagos hepáticos, invaden los hepatocitos e inician la fase subclínica hepática de la infección y se transforman dividiéndose rápida y repetitivamente en esquizontes. Tras un período de entre 6 y 16 días, según la especie, los merozoitos o células hijas invaden la sangre e infectan a los hematíes.

Las glucoforinas A, B y C, con su ácido siálico constituyen lugares especiales de anclaje celular del parásito *P. falciparum*, mientras que en el *P. vivax* utilizan el grupo Duffy (Fy^a , Fy^b) como receptor específico en la superficie del eritrocito⁵.

Una vez en el interior de los hematíes, el parásito mediante un proceso de endocitosis activo mediado por receptores, adopta la forma anular o trofozoito. Éste ingiere y degrada la hemoglobina del huésped dando lugar a un pigmento marrón denominado hemozoína. A medida que los trofozoitos aumentan de tamaño, se segmentan y dan lugar a formas multinucleadas denominadas esquizontes. Cuando el esquizonte maduro contiene un número determinado de merozoitos el hematíe se rompe y salen a la sangre, para volver a infectar a un nuevo hematíe virgen. Así se inicia un nuevo ciclo de infección y destrucción eritrocitaria³.

Una pequeña fracción de los anillos del trofozoito, dan lugar a grandes formas sexuales denominadas gametocitos, que sólo completan su actividad proliferativa si ambos gametos masculino y femenino se ingieren por el mosquito *Anopheles*, del huésped humano infectado⁶.

Manifestaciones clínicas

La anemia de la malaria puede ser severa, con un amplio abanico de manifestaciones clínicas. La forma aguda es una enfermedad febril, reciente, de comienzo brusco, en una persona previamente sana y no inmune⁴. En estos pacientes se observa un alto nivel de parasitemia. En el otro extremo del espectro clínico, se encuentran los pacientes con anemia severa crónica, que no suelen cursar con un cuadro febril, aunque sí con intensa anemia, en sujetos semiinmunes con un bajo grado de parasitemia.

Durante la fase aguda de la enfermedad se produce fiebre con escalofríos, cefaleas, dolores musculares, postración, etc., reflejando la producción de altos niveles de interferón gamma (INF γ) y de factor de necrosis tumoral (TNF α), con salida entre otras citocinas de IL-1⁴.

La sintomatología ocasionada por la malaria *falciparum* es más severa que las de otras formas de *Plasmodium*. Una característica del *P. vivax* es que invade preferencialmente los hematíes jóvenes, reticulocitos, con lo cual se limita la infección, al no encontrar formas jóvenes para ser parasitadas. El bazo crece rápidamente, así como los signos infecciosos o los síntomas derivados de la hipotensión y el shock. La encefalopatía malárica es causa fundamental de la mayoría de muertes, aproximadamente dos millones anuales.

La causa más frecuente de anemia es la rotura de los hematíes sobre todo en las fases agudas precoces de la enfermedad. La extensión de la hemólisis es proporcional al número de células parasitadas y produce anemia, aumento de reticulocitos, esferocitos, acortamiento de la vida media de los hematíes, medido con Cr⁵¹ y destrucción de los hematíes parasitados en el bazo. Durante la secuestro de los hematíes en el bazo también pueden destruirse células normales, no parasitadas.

Los monocitos de la sangre periférica también fagocitan hematíes, aunque la mayoría son atrapados en los macrófagos de hígado, bazo y médula ósea.

Aunque indudablemente la hemólisis periférica desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la anemia de la malaria aguda, en la etiopatogenia incide también una reducción de la eritropoyesis total. La médula ósea presenta una celularidad normal o disminuida, con hipoplasia eritroide. En definitiva, en la patogénesis de la malaria aguda se suman una destrucción intramedular de normoblastos, con secuestro de hematíes en los sinusoides esplénicos. La respuesta reticulocitaria no es la adecuada de acuerdo con el grado de hemólisis. En la médula ósea pueden observarse signos de diseritropoyesis con bi o multinuclearidad, cambios megaloblásticos, hematíes con puentes internucleares o cariorrexis. Estos signos son más notables en la malaria crónica que en la aguda. En las formas agudas existe un franco predominio de macrófagos con fagocitosis de los eritroblastos policromatófilos.

En un porcentaje de pacientes con malaria se produce un test directo de antiglobulina positivo. La forma más común de sensibilización es con C3d, seguida de positividad con C3d + IgG. Esta positividad es más frecuente en las formas agudas que en las crónicas.

El cuadro clínico denominado "fiebre biliosa intermitente hemoglobinúrica" es un cuadro clínico agudo que se caracteriza por hemólisis brusca y violenta intravascular masiva que se acompaña de fiebre elevada, escalofríos, vómitos, cefalea, dolores en am-

bas fosas renales, ictericia, hemoglobinuria y fallo renal agudo, producido por la hemoglobinuria. El pronóstico depende de la evolución de la insuficiencia renal, del grado de anemia y del estado del aparato circulatorio⁶.

Aunque no se conoce si el cuadro clínico se debe a una reacción inmune, parece que en un gran número de casos está asociado al tratamiento con quinina, al déficit de G6PD o a ambos. Puede también producirse por la crisis hemolítica sincronizada en pacientes hiperparasitados.

En la anemia del paludismo crónico a diferencia de lo que sucede en la malaria aguda, la intensa anemia está motivada fundamentalmente por la diseritropoyesis y la eritropoyesis ineficaz, no jugando la hemólisis un papel predominante. En la malaria crónica no se encuentra un aumento tan marcado del INF γ y de las interleucinas IL2 y IL10. La relación TNF/IL10 está disminuida. Es probable que a pesar de incrementos moderados de INF γ , su acción prolongada sobre la eritropoyesis consigue un mayor grado de diseritropoyesis y eritropoyesis ineficaz. Los niveles de eritropoyetina están elevados, lo que motiva una marcada hiperplasia de la serie roja en médula agravando la eritropoyesis ineficaz, que por otra parte se pone de manifiesto tanto por la baja respuesta reticulocitaria como por la infectividad eritropoyética de los estudios ferroquímicos.

Diagnóstico

El diagnóstico de la malaria depende de la identificación del parásito en los hematíes. Se observan mejor en los bordes de la extensión, permitiendo identificar la especie de *Plasmodium*. Las extensiones de "gota gruesa" son para algunos óptimas para el *screening* de parásitos.

Como caracteres distintivos podemos señalar como el trofozoito del *P. vivax* se observa como un solo anillo, excepcionalmente con dos. El hematíe parasitado con el *P. vivax* es pálido, con gránulos rojos brillantes denominados bastones de Shüffner y con policromatofilia por su carácter de reticulocito.

En *P. falciparum* los anillos son numerosos, pequeños y delicados, y difíciles de visualizar. En los parásitos aislados se produce la esquizogonia sexual dando lugar a macrogametos femeninos y microgametos que pueden observarse en las extensiones de sangre periférica.

El diagnóstico puede así mismo realizarse mediante el análisis de ADN o por doble PCR.

Otros hallazgos hematológicos consisten en eosinopenia, linfopenia y trombocitopenia. Esta última ocurre al menos en el 70% de los enfermos infectados por malaria. Los merozoitos del *P. vivax* y *falciparum* pueden observarse en las plaquetas en la fase aguda, y la trombocitopenia puede ser el fruto de varios factores: parasitación por parásitos, absorción de inmunocomplejos, esplenomegalia y/o coagulación intravascular diseminada.

Babesiosis

Es una infección producida por el protozoo *Babesia*, *Piroplasma* de la clase *sporozoa*, de la familia *Babesiidae*. La mayoría de las infecciones están causadas por el *B. microti*, que se transmite a los humanos por la picadura de una garrapata de los géneros *Dermacentor* e *Ixodes*. La enfermedad se produce en la costa norte de EE.UU., California, Francia y Escocia. El *Ixodes dammini* es un vector de la espiroqueta *B. burgdorferi* responsable de la enfermedad de Lyme, repartida por más de 43 de los Estados Americanos³.

La babesiosis comienza cuando la garrapata hembra inocula al huésped con la saliva conteniendo los cuerpos infecciosos piriformes. En presencia de properdina, factor B, C3, C5 e iones Mg^{+2} , los merozoitos de la *Babesia* activan la vía alternativa del complemento y se adhieren a los receptores C3b en la superficie eritrocitaria. Su mecanismo de adhesión es similar al del *P. falciparum*. Una vez en el interior del hematíe el trofozoito adquiere la forma de anillo.

Manifestaciones clínicas

La enfermedad se produce mayoritariamente en pacientes con edad superior a 50 años, aunque también niños y sujetos jóvenes pueden padecerla.

Los síntomas infecciosos aparecen entre la 1.^a y 4.^a semana después de la picadura por garrapata. En sujetos sin anesplenía la enfermedad puede presentar un curso clínico variable, con anemia hemolítica severa, con fiebre y mialgias o una enfermedad subclínica, detectada únicamente por el elevado título de anticuerpos contra *B. microti*. Esto suele suceder en individuos jóvenes por debajo de 40 años.

En pacientes esplenectomizados la anemia hemolítica puede ser severa, a veces mortal, simulando el cuadro de "fiebre biliosa intermitente hemoglobinúrica", con hemólisis intravascular, hemoglobinemia y hemoglobinuria, y shock hipovolémico con fallo renal. Si el paciente sobrevive, el enfermo va mejorando paulatinamente a medida que aumenta el título de anticuerpos. Al faltar las formas sexuales del parásito, éste no se recicla y la enfermedad se delimita³.

El 40 % de las babesiosis severas ocurren en pacientes esplenectomizados, por lo tanto la babesiosis debe incluirse dentro de las sepsis postesplenectomía. Debe evitarse que pacientes esplenectomizados viajen por áreas endémicas por *B. microti*.

Diagnóstico

La anemia hemolítica es a menudo brusca de tipo intravascular y de características similares a las de la malaria. La hemoglobina puede descender a 50-110 g/l. Las características de la hemólisis intravascular se demuestran por la presencia de Hb en plasma y orina y descenso de haptoglobina.

El diagnóstico se establece al encontrar parásitos en el interior de los hematíes, que como en la *P. fal-*

ciparum forman anillos. Estos anillos son pequeños, a menudo múltiples, confluentes y con una clara vacuola central. Las babesias son pequeñas, de 1,2-2 μm . No producen esquizontes o gamecitos.

Bartonelosis o enfermedad de Carrión

La bartonelosis es un síndrome consistente en anemia hemolítica severa de curso agudo, producida por un bacilo gramnegativo denominado *Bartonella bacilliformis*. La enfermedad se denomina también enfermedad de Carrión por el estudiante peruano que demostró que la verruga peruana crónica está producida por el mismo bacilo.

B. bacilliformis se transmite por la picadura de una mosca del género *Phlebotomus* denominada *P. verrucarum*. La enfermedad se observa en las cimas elevadas de los Andes, en Perú, Ecuador y Colombia, siempre en altitudes superiores a 700 m. En la costa de Ecuador la enfermedad es endémica.

El cuadro clínico se produce tras la picadura durante una sola noche, en estas zonas. A las 3 semanas de la picadura del mosquito se produce bruscamente un cuadro con fiebre, escalofríos, dolores musculares y esqueléticos y cefaleas. En algún caso la infección es tan severa, que prácticamente la cifra de hematíes es inferior al millón.

Esta fase puede complicarse con una infección secundaria por *Salmonella* y septicemia, lo que hace que la enfermedad, si no se trata, sea de una importante gravedad. Más del 40 % de los enfermos sin tratamiento fallecen en la fase aguda de la enfermedad.

En las personas que superan la anemia hemolítica y sobreviven, el curso de la enfermedad es bifásico con el desarrollo posteriormente de un proceso eruptivo de piel denominado verruga peruana, con lesiones proliferativas en brazos y piernas que recuerdan al sarcoma de Kaposi.

Diagnóstico hematológico

Durante la fase de bacteriemia la borrelia puede infectar a gran número de hematíes. A diferencia del *Plasmodium* o la babesiosis no degrada la hemoglobina. Se forman esferocitos, estomatocitos, hematíes crenados y decolorados, y aumento de reticulocitos. Pueden aparecer normoblastos y punteado basófilo.

Se observan filamentos de 1-4 μm . de longitud, algunos con configuraciones en V o Y, y si la bacteriemia persiste aparecen formas cocoides, fundamentalmente durante la fase álgida de la infección³.

La hemólisis se produce por la fagocitosis de las esferocitosis en los macrófagos esplénicos. El test de Coombs es negativo.

Durante la infección por bartonelosis los pacientes sufren una importante inmunodepresión, con una alta incidencia de infecciones secundarias como

salmonellosis, malaria, tuberculosis, amebiosis, infecciones coloriformes, etc.

Bibliografía

1. Schrier SL. Extrinsic nonimmune hemolytic anemias. En: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein L et al, eds. Hematology. Basic Principles and Practice, 3.^a ed. Nueva York: Churchill Livingstone, 2000; 630-638.
2. Means RT. The anaemia of infection. *Baillière's Clin. Haematol* 2000; 13: 151-162.
3. Jandl JH. Hemolytic anemias caused by infection of Red cells. En: Jandl JH, ed. *Blood Textbook of Hematology*. Boston: Little Brown, 1996; 473-501.
4. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillière's Clinic Haematol* 2000; 13: 277-299.
5. Becker PS, Lux SE. Disorders of the red cell membrane. En: Nathan, Oski WB, eds. *Hematology of Infancy and childhood*. Filadelfia: Saunders, 1993; 529-633.
6. Menéndez Santos C. Paludismo. En: Rodes Teixidor J, Guardia Massó J, eds. *Medicina Interna*. Barcelona: Masson, 1997; 1836-1841.

ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN ADULTS

D. HOELZER AND J.W. GOETHE

University Hospital, Frankfurt, Germany.

In adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) complete remission rates (CR) of 80-90% and long term survival of 35% at the best could be achieved. ALL is however not a uniform disease and outcome shows considerable variations between subtypes with LFS rates between 50% for T- and mature B-ALL and < 10% for Ph/BCR-ABL positive ALL. Table 1 gives the clinical and laboratory characteristics of subtypes in adult ALL, the relapse kinetics and localisation and the leukemia free survival (LFS).

Chemotherapy is the essential part of ALL therapy, and childhood trials have convincingly shown how by selection of cytostatic drugs, better timing and high dose therapy outcome can be substantially improved. In adult ALL optimisation of chemotherapeutic regimens is necessary as well, however it seems that new treatment options are needed to proceed further¹. These new options in the management of adult ALL include.

1. *Stem cell transplantation* (SCT) with extension of indications for SCT and inclusion of new modalities including allogeneic non-myeloablative transplants.
2. *Minimal residual disease* to guide individual treatment decisions.
3. *Molecular targeting* such as Abl-tyrosine kinase inhibitor STI571 (GLIVEC®) in Ph/BCR-ABL positive ALL.
4. *Antibody treatment*.

Induction chemotherapy

To improve CR rates and thereby remission quality several attempts have been or are currently explored in adult ALL, such as high dose therapy, intensification of anthracyclines and use of PEG-asparaginase. With high dose cytarabine (HdAC) administered up-front before standard induction CR rates of 75-85% were achieved, but this approach did not lead to superior LFS. Retrospective analysis of published results in adult ALL suggests that the application of dose-intensive anthracyclines during induction therapy may contribute to an improvement of CR rate and LFS².

Postinduction therapy

Postinduction therapy mainly consists of intensive rotational consolidation therapy, high-dose chemo-

therapy cycles and SCT. There is generally a superior outcome from trials implementing intensive multidrug consolidation therapy (median: 27-36%) compared to those without consolidation (median: 25%)¹. High-dose chemotherapy –mainly cytarabine (HdAC) or methotrexate (HDMTX)– has been used to overcome drug resistance and to achieve therapeutic drug levels in the cerebrospinal fluid. The overall impression is that the inclusion of HdAC, HdM or both might be beneficial particularly if included in regimens with intensive rotational conventional dose chemotherapy with LFS rates of 45-55%, but all in small series.

Stem cell transplantation

Stem cell transplantation (SCT) from bone marrow grafts and to an increasing extent transplantation of peripheral blood stem cells (PBSCT) is an essential part of consolidation treatment in adult ALL. The optimal strategies and indications for SCT are at present explored in randomized studies.

Survival for adult ALL patients with allogeneic (allo) SCT from sibling donors in first CR is approximately 50%. LFS after allo SCT thus seems superior to that obtained with chemotherapy alone although this advantage could not be clearly demonstrated in prospective trials with adjustment for age and risk factors.

In the so far largest randomised trial allo SCT was scheduled for all patients below 40 years with sibling donor. The remaining patients were randomised (control group) to receive either autologous (auto) SCT or chemotherapy. In a recent update the survival after allo SCT was significantly superior (46%) to the control group (31%), which was predominantly due to a higher survival in HR patients with allo SCT (37%) compared to the control group (15%), whereas in SR ALL (46% versus 42%) no significant difference was observed³. In the ongoing ECOG/MRC trial allo SCT is scheduled in all patients with sibling donor and compared to auto SCT randomized versus chemotherapy (control group). In an interim analysis the LFS after 3 years was 58% for patients who actually received allo SCT compared to 39% for the control group. Allo SCT yielded superior LFS for HR (57% versus 32%) and for SR

Table 1. Characteristics of subgroups of adult ALL*

| Subgroup | Clinical/Laboratory characteristics | Relapse kinetics and localisation | LFS |
|------------------|--|---|-------------------|
| <i>B-Lineage</i> | | | |
| Pro-B-ALL | t(4;11)/ALL1-AF4 (70%) High WBC (> 100/ml) (26%) Myeloid coexpression (> 50%) | Mainly BM (> 90%) | ~ 40-50% |
| c-ALL/pre-B-ALL | Higher age (24% > 50 yrs) | Mainly BM (90%) Up to 5-7 yrs | ~ 30% |
| B-ALL | Ph/BCR-ABL (40-50%) m-BCR (70%), M-BCR (30%) Organ involvement (32%) CNS involvement (13%) Higher age (27% > 50 yrs) | Frequent CNS (10%) Up to 1-1 ~ yrs | ~ 10% ~ 40-50% |
| <i>T-Lineage</i> | | | |
| Thymic ALL | Mediastinal tumor (60%) CNS involvement (8%) | Frequent CNS (10%) Extramedullary (6%) | ~ 50-60% |
| Early T-ALL | High WBC (> 50/ml) (46%) | Up to 3-4 yrs | ~ 20-30% |
| Mature T-ALL | Younger age (11% > 50 yrs) | | ~ 20% |

*Data based on German multicenter trials of adult ALL.

Table 2. Prognostic factors for LFS in adult ALL

| | Low risk features | High risk features |
|---------------------------------------|--|---|
| Age | Adolescents (15-20 yrs) | Higher age (> 50 yrs) |
| WBC (B-lineage) | < 30000/ μ l | > 30000/ μ l |
| Immunophenotype | Thymic T-ALL | Pro B-ALL Early T-ALL Mature T-ALL |
| Cytogenetics/ | Normal diploid karyotype (?) | (t(9;22)/ BCR-ABL |
| Molecular genetics | Hyperdiploid karyotype (?) | t(4;11)/ ALL1-AF4 |
| Time to CR | CR < 2-4 wks | CR > 2-4 wks |
| MRD after induction during consol. | < 10 ⁻³ -10 ⁻⁴ < 10 ⁻⁴ or negative | > 10 ⁻³ -10 ⁻⁴ > 10 ⁻⁴ or increasing |

(71% versus 54%) ALL patients < 60 years⁴. A final intent-to-treat analysis of this study is awaited.

Matched unrelated SCT (MUD) is increasingly employed in adult ALL and the LFS (39%) in patients with more advanced disease (\geq CR2) is promising. In adult poor risk ALL with a median age of 34 years the results of MUD SCT were particularly favorable for patients in CR1 (42%)⁵. Up to now the low relapse rate –most probably due to a more pronounced Graft versus Leukemia (GvL) effect– is nearly outweighed by the high TRM. With better donor selection, increasing experience, improved supportive care and management of GvHD results for MUD transplants are constantly improving and MUD is already a choice for high risk patients in

CR1 such as Ph/BCR-ABL + ALL if a sibling donor is not available.

New approaches for allogeneic SCT include donor leukocyte infusions, new conditioning regimens e.g. with radiolabeled antibodies and non-myeloablative stem cell transplantation (“mini transplant”) which may lead to an extension of the upper age limit for allo SCT⁶.

After autologous (auto) SCT in CR1 in adult ALL the survival at 3 years is approximately 42%; again the LFS shows a wide range from 15-65%. There is apparently no significant difference in LFS whether peripheral blood stem cells (PBSCT) (41%) or bone marrow (35%) is used as stem cell source, as evidenced by a preliminary evaluation of the EBMT data⁷. Overall these data seem somewhat optimistic.

Prognostic factors and risk stratification

Prognostic factors in ALL include age, white blood cell count, cytogenetics, molecular genetics and response to treatment which is time to achieve CR and minimal residual disease during the course of treatment. Table 2 summarizes low risk and high risk features derived from the GMALL studies⁸. These risk factors emerge in a similar pattern also in other adult ALL trials. The consequences in terms of clinical studies are however different. In the GMALL trials they are used to define a standard, a high and a very high risk group (exclusively Ph/BCR-ABL positive ALL). These patients are treated differently according to their risk profile e.g. standard risk patients are not candidates for SCT in first CR whereas in other studies all patients are treated uniformly, including allogeneic SCT in first CR⁴.

Minimal residual disease

ALL is an "ideal" disease for detection and monitoring of minimal residual disease (MRD) and for the development of MRD adapted treatment strategies since > 90 % of the patients have individual markers. MRD refers to residual leukemic blast cells which cannot be detected by microscopic examination of the bone marrow smear. With conventional microscopic examination the detection limit for residual blast cells is 1-5 % and after achievement of haematologic CR further evaluation of the individual course is not possible. With new methods the detection of leukemia by specific phenotypes (flow cytometry), translocation breakpoints e.g. BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4, and TEL-AML1 (Fluorescence-in-situ-hybridization, polymerase chain reaction [PCR]) or rearrangements of immunoglobulin heavy chain (IgH) or T-cell-receptor (TCR- β , - δ , - λ , - γ) genes (PCR, real-time PCR) a sensitivity of 10^{-3} - 10^{-6} can be reached⁹. A prerequisite for longitudinal MRD evaluation is the identification of individual rearrangements or leukemia-specific phenotype at the time of diagnosis in each patient. In childhood ALL it has been shown that positive MRD is correlated with a very poor outcome, whereas children without detectable MRD have a high chance of cure^{10,11}. In a pilot study of the GMALL study group a strong correlation between MRD level and relapse risk also could be shown^{12,13}. Further prospective trials are needed to establish the value of MRD based treatment decisions for adult ALL.

Ph/BCR-ABL positive ALL – Molecular targeting

Ph/BCR-ABL positive ALL has an overall incidence in adult ALL of 20-25 %, increasing with age to > 40 % in patients above 50 years, and is the worst prognostic subgroup with an survival of only 10 %. Ph/BCR-ABL nearly exclusively occurs in B-precursor (common/pre-B-ALL). Diagnosis is made by cytogenetic analysis of the translocation t(9;22) and – with a higher sensitivity – by detection of the BCR-ABL rearrangement with PCR analysis. The CR rate for this group is 70 % and thus somewhat lower than the 80-90 % achieved for Ph/BCR-ABL negative common/pre-B-ALL patients. However, only 10-30 % of the CR patients are in molecular remission after intensive induction therapy. At present the best results can be achieved with allo SCT from sibling donors where the survival rate is 30-35 %, thus lower than allo SCT in CR1 in B-lineage Ph/BCR-ABL negative ALL. The tendency for the outcome of MUD transplants in small patient cohorts is even better (35-40 %) and the outcome of auto transplants is somewhere between 20-30 %.

Abl-tyrosine kinase inhibitor STI571

The BCR-ABL fusion gene leads to an upregulation of tyrosine kinase (TK) activity which plays a crucial

role in pathogenesis and disease progression of BCR-ABL positive leukemias. With a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase (STI571) cellular proliferation of BCR-ABL positive CML and ALL cells can be inhibited selectively¹⁴. Promising results have also been achieved in a phase II study in heavily pretreated patients with relapsed or refractory Ph/BCR-ABL positive ALL with haematological response in 19 out of 32 patients¹⁵. Clinical responses were correlated to MRD levels in bone marrow and peripheral blood¹⁶. Thus quantitative PCR provides an option for continuous monitoring of the therapeutic effects of STI571. Oral treatment with STI571 is generally well tolerated and feasible also in elderly patients. Based on these promising results phase II studies in patients with de novo Ph/BCR-ABL positive ALL have been started. Several approaches such as treatment with STI571 in patients with MRD after induction therapy or after BMT or parallel to induction chemotherapy will be evaluated.

Antibody treatment

ALL blast cells express a variety of specific antigens such as CD20, CD19 and leukemia-specific combinations of antigens which may serve as targets for treatment with monoclonal antibodies (MoAbs). A prerequisite for Ab therapy is the presence of the target antigen on at least 20-30 %, preferably > 50 % of the blast cells. The largest experience exists with Rituximab, a MoAb to CD20, which is expressed on normal and malignant B-cells. It exerted significant antitumor activity in Non-Hodgkin's lymphoma. CD20 (> 30 % of the cells) is also expressed on 1/3 of B-precursor ALL blasts, particularly in the elderly patients (40-50 %), and the majority of mature B-ALL blast cells (70-80 %). This provides a rationale to explore the potential role of treatment with Rituximab in B-precursor ALL, mature B-ALL and Burkitt's lymphoma. Further Abs [B43(Anti-CD19)-Genistein, B43(Anti-CD19)-PAP; Anti-B4-bR (Anti-CD19) in B-Lineage ALL and Anti-CD52 antibodies (Campath-1H) and Anti-CD7-Ricin in T-lineage ALL] have been investigated in phase I-II pilot trials in ALL¹. Antibody treatment could have a potential role in the treatment of elderly ALL patients in whom intensive chemotherapy is limited and could be administered as single agents or in combination with chemotherapy, for purging and as post-transplant therapy.

References

1. Hoelzer D, Gökbuğut N. New approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults: Where do we go? *Semin Oncol* 2000; 27 (5): 540-559.
2. Bassan R, Lerede T, Rambaldi A, Di Bona E, Rossi G, Pogliani E et al. The role of anthracyclines in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1996; 10 (52): 58-61.
3. Fiere D. Long term results of a prospective Belgium French protocol of treatment for adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): LALA87 study. *Ann Hematol* 1999; 78: 32a.

4. Rowe JM, Richards S, Wiernik PH et al. Allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for adults with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in first complete remission (CR): Early results from the international ALL trial (MRC UKALL/ECOG E2993). *Blood* 1999; 94: 732a.
5. Cornelissen JJ, Shipp K, Kollman C, King R, Van Esser JW, Dekker AW. Bone marrow transplantation from unrelated donors for adult patients with poor-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the National Marrow Donor Programme (NMDP). *Blood* 1998; 92: 114.
6. Arnold R, Massenkeil G, Beelen DW, Ehninger G, Fauser AA, Hertenstein B et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation in adults with high-risk ALL. *Blood* 2000; 96 (11): 351.
7. Gorin NC, Labopin M. Analysis of the Acute Leukemia EBMT Registry: NC.Gorin on behalf of the ALWT. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19 (Suppl 1): S77.
8. Gökbuğet N, Hoelzer D, Arnold R, Böhme A, Bartram CR, Freund M et al. Treatment of Adult ALL According to the Protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Hemat/Oncol Clin North Am* 2000; 14 (6): 1307-1325.
9. Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. *Br J Haematol* 1999; 105: 7-24.
10. Cavé H, Van der Werff Ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339 (9): 591-598.
11. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998; 352 (9142): 1731-1738.
12. Bruggemann M, Droese J, Bolz I, Lueth P, Pott C, Von Neuhoff N et al. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2000; 14 (8): 1419-1425.
13. Nakao M, Janssen JW, Flohr T, Bartram CR. Rapid and reliable quantification of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using rearranged immunoglobulin and T-cell receptor loci by LightCycler technology. *Cancer Res* 2000; 60 (12): 3281-3289.
14. Druker BJ, Sawyers C, Kantarjian H, Resta DJ, Fernandes Reese S, Ford JM et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344 (14): 1038-1042.
15. Ottmann OG, Sawyers C, Druker B, Reiffers J, Goldman JM, O'Brien SG et al. A phase II study to determine the safety and anti-leukemic effects of ST1571 in adult patients with Philadelphia-chromosome positive acute leukemias. *Blood* 2000; 96 (11): 828.
16. Scheuring U, Wassmann B, Pfeiffer H, Capdeville R, Petershofen E, Gschaidmeier H et al. Minimal residual disease (MRD) analysis of BCR-ABL positive acute lymphocytic leukemia (ALL) patients during ST1571 kinase inhibitor therapy. *Blood* 2000; 96 (11): 465.

COMPLICACIONES INFECCIOSAS DEL TRASPLANTU HEMOPOYÉTICO

M. ROVIRA

Unitat de TPH. Departamento de Hematología. Hospital Clínic. Barcelona.

La morbimortalidad asociada a las infecciones en el trasplante de progenitores hemopoyéticos (TPH) tanto autólogo (TAPH) como alogénico (alo-TPH), ha disminuido considerablemente en los últimos años debido a un mejor conocimiento de los factores de riesgo, de la recuperación inmune, del patrón de infección según la fase evolutiva del TPH, y a la introducción de nuevos y más efectivos antimicrobianos. Estos avances junto con el empleo de progenitores de sangre periférica, depleción linfocida T (DLT), factores estimulantes, inmunodepresores más potentes, han reducido la mortalidad asociada al trasplante y permitido la ampliación de indicaciones de TPH. Sin embargo, las infecciones continúan siendo una de las complicaciones más destacables en estos pacientes¹.

Factores predisponentes y patrones de infección

Pretrasplante

La mayor parte de los receptores de un TPH están inmunodeprimidos en el momento de iniciar el procedimiento, tanto por la enfermedad de base como por los tratamientos recibidos (p. ej., análogos de la purinas). Por ello es de suma importancia la búsqueda exhaustiva de un foco infeccioso asintomático, y la realización de tests serológicos frente a citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple (VHS), virus varicela zoster (VVZ), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la hepatitis B y C, y toxoplasma. Si el paciente presenta un proceso infeccioso, el TPH deberá aplazarse hasta su resolución.

Postrasplante

El período de reconstitución inmunológica después del TPH es muy variable y depende del tipo de trasplante (TAPH o alo-TPH), de la fuente de progenitores (sangre periférica o médula ósea), del régimen de acondicionamiento, del grado de histocompatibilidad entre donante y receptor, de la presencia de EICH y de su tratamiento². Por ello, la incidencia de infecciones en el TAPH será mucho menor que en el alo-TPH. Mientras no esté reconstituida la función inmune el paciente se halla en un estado de in-

munodeficiencia que afecta tanto a la inmunidad celular como a la humoral. Además de la inmunodepresión, existen otros factores comunes a ambos tipos de trasplante que aumentan el riesgo de contraer infecciones, como son la intensidad del régimen de acondicionamiento, la duración de la neutropenia, el grado de lesión de las barreras anatómicas, el estado serológico pre-TPH y el tipo de enfermedad de base.

La alteración en el número y función de los linfocitos T predispone a las infecciones víricas. Esta alteración en los linfocitos T persiste durante 6 meses tras el alo-TPH y hasta 18 meses si se trata de un alo-TPH con DLT. En el TAPH la inmunidad celular se recupera a los 4-12 meses. Los niveles de inmunoglobulinas después de un TPH son también anormales. En el alo-TPH la IgG está disminuida durante 9 meses (18 meses si es un alo-TPH con DLT). Los pacientes con EICH crónica mantienen niveles de IgG bajos mientras persiste dicha complicación. Ello predispone a infecciones por gérmenes encapsulados. El déficit persistente de IgA aumenta la predisposición a infecciones de las barreras mucosas. Se conoce peor la evolución de la inmunidad humoral después de un trasplante autólogo pero la hipogamaglobulinemia persiste durante 3-4 meses.

A partir del día del TPH (día 0), en función de los factores de riesgo antes mencionados, y de la recuperación inmune se distinguen tres fases evolutivas en las que predominan determinados tipos de infección³ (tabla 1).

Período neutropénico. Días 0-30

La neutropenia es el principal factor de riesgo durante este período. El riesgo de infección aumenta con la severidad de la neutropenia (mayor si $< 100 \mu\text{l}$), la rapidez con que se produce y la duración de la misma. La duración media de la neutropenia ($< 500 \mu\text{l}$) después del TPH es de 2-3 semanas. Los patógenos más frecuentes en esta fase son las bacterias, *Candida* sp. y VHS. Entre las bacterias, los organismos gramnegativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*) y/o organismos grampositivos (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium*, *Fusobacteria*, *Propionibacteria*) pueden causar

Tabla 1. Riesgo de infección en el receptor de un trasplante hemopoyético

| Período | Agentes infecciosos |
|--|--|
| Período neutropénico (días 0-30) | Bacterias Hongos <i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. Virus VHS, VRS Protozoos <i>Toxoplasma gondii</i> |
| Período intermedio (después del implante medular, días 30-100) | Bacterias Virus CMV, VZV, HHV-6, VRS, Adenovirus, BK virus Hongos <i>Aspergillus</i> sp., <i>Pneumocystis carinii</i> Protozoos <i>Toxoplasma gondii</i> |
| Período tardío (> 100 días post-TPH) | Bacterias encapsuladas <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> Virus VZV, CMV, VRS Hongos <i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Aspergillus</i> Protozoos <i>Toxoplasma gondii</i> |

sepsis, neumonía, orofaringitis, infecciones perianales-perirrectales, sinusitis e infecciones cutáneas. En pacientes con inmunodeficiencias previas (p. ej., anemia aplásica, inmunodeficiencia severa combinada) pueden observarse infecciones por *Aspergillus* sp. en los primeros 30 días post-TPH.

Período intermedio. Días 30-100

Es el período que sigue al implante medular, incluye el segundo y tercer mes post-TPH y se caracteriza por las infecciones víricas y fúngicas. La inmunodepresión post-TPH y la EICH aguda en el alo-TPH son responsables de las infecciones de este período. Destacan por su frecuencia la infección por CMV, cistitis hemorrágica por adenovirus o virus BK, neumonía por *Pneumocystis carinii*, candidiasis diseminada y aspergilosis con afectación de pulmón y senos paranasales. Las infecciones oportunistas por hongos aumentan de forma alarmante si el período de neutropenia ha sido prolongado.

Período tardío (> 100 días post-TPH)

Después de los primeros 100 días, el riesgo de infección depende de la rapidez en completar la recuperación del sistema inmune, de la coexistencia o no de EICH crónica y de la intensidad de su tratamiento. Las infecciones tardías suelen ser secundarias a bacterias encapsuladas (*Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*), *Aspergillus*, *Pneumocystis carinii* y VZV.

Microorganismos responsables y manifestaciones clínicas

Bacterias. Patógenos bacterianos más comunes

Las infecciones bacterianas en el TPH suelen observarse durante el período de neutropenia (días 0-30). Los gérmenes implicados son los mismos que se observan en pacientes neutropénicos por otras causas. Al igual que en éstos, a lo largo de los últimos años se ha asistido a una disminución de las infecciones causadas por gramnegativos, y a un aumento de las originadas por grampositivos; en particular *S. epidermidis*, *S. aureus* y *S. viridans*, causantes del 68% de las bacteriemias en el TPH (3). El principal reservorio de estos gérmenes es el tracto oro-gastro-intestinal, y las bacterias responsables pueden proceder de la flora propia del paciente o haberse adquirido durante su ingreso. La colonización de orofaringe o estómago se ve facilitada por la previa administración de antibióticos de amplio espectro y/o el uso de antiácidos y de antagonistas de los receptores H2 que suprimen la producción de ácido clorhídrico. La colonización intestinal por *C. difficile* toxigénico no es infrecuente en niños sometidos a TPH con la flora intestinal alterada por los antibióticos. El uso universal de catéteres venosos centrales (CVC) durante largos períodos de tiempo ha contribuido notablemente al aumento global de estas infecciones, sobre todo de las causadas por *S. epidermidis*. Las sepsis por *S. viridans* suelen originarse en la

orofaringe como complicación de la mucositis. Algunos de estos pacientes desarrollan un síndrome de distrés respiratorio del adulto que, en el 12% de los casos conlleva la muerte del individuo. Después del implante y de la recuperación leucocitaria *S. pneumoniae* y *H. influenzae* son causa de infecciones pulmonares tardías en el 27% de los largos supervivientes; incidiendo predominantemente en aquellos con EICH crónica⁴. Existen otros gérmenes que por sus características propias cabe mencionar pero que son poco frecuentes (*Listeria monocytogenes*, *Legionella* sp., *Nocardia* sp. y *Mycobacterias*).

Hongos

La prevalencia de infección fúngica invasiva demostrada en autopsias de pacientes sometidos a TPH durante las dos últimas décadas oscila en torno al 25%⁵. Son factores predisponentes la inmunodepresión, la administración de antibióticos de amplio espectro, el uso de CVC durante largos períodos de tiempo, la administración de nutrición parenteral, la desnutrición, la alteración de las barreras anatómicas (piel y mucosas) y la neutropenia prolongada⁶. Por todo ello, estas infecciones pueden suceder en cualquier período post-TPH. En el período precoz la neutropenia es el principal factor de riesgo, en los otros períodos la infección fúngica está relacionada con la presencia de la EICH y su tratamiento. Los hongos patógenos más comunes en el contexto del TPH son la *Candida* sp.^{7,8} y el *Aspergillus* sp.⁸⁻¹⁰. Las infecciones por *Trichosporon beigelli*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria* y *Cryptococcus neoformans* son menos frecuentes¹¹.

Candida sp.

Como se ha mencionado el riesgo de infección candidiásica está unido a la neutropenia. Ocurre en 10-25% de los pacientes y conlleva un pronóstico desfavorable (39% de mortalidad si sólo hay candidemia y hasta 90% si existe invasión tisular). En el TPH suele colonizar las superficies mucocutáneas que actúan de puerta de entrada así como los CVC. En el TPH la forma más frecuente de candidiasis es la diseminada con afectación de hígado, bazo, riñón, corazón, tracto gastrointestinal, pulmón, piel y cerebro. A pesar de ser una infección tan extensa, los síntomas no son específicos, lo que hace que el diagnóstico sea difícil. El cuadro de candidiasis crónica hepatoesplénica rara vez se observa en el contexto del TPH.

Aspergillus sp.

La infección por *Aspergillus* sp. tiene una incidencia inferior al 6% en el TPH. Sin embargo, es la infección más temida con una mortalidad de casi el 100%. Además de los factores de riesgo antes descritos y comunes a todos los hongos, hay que añadir la exposición ambiental, ya que se trata de un organismo ubicuo en el medio. Se han descrito epidemias de

aspergilosis en hospitales coincidiendo con períodos de obras o cambios en los sistemas de ventilación. Esta infección se establece por inhalación de conidias de *Aspergillus* en el tracto respiratorio. En el alveolo pulmonar, dichas conidias germinan y forman hifas. Las especies más frecuentemente aisladas son *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*. La afectación pulmonar por *Aspergillus* sp. puede desarrollarse como una enfermedad invasiva (la más frecuente en el TPH), como un proceso saprofito, o como una aspergilosis broncopulmonar alérgica. Los signos clínicos tampoco son específicos y se precisa un alto índice de sospecha para facilitar un diagnóstico precoz. Este organismo tiene predilección por invadir y obstruir los vasos sanguíneos produciendo infartos y necrosis. Los síntomas en consecuencia pueden ser: fiebre, disnea, tos, dolor pleurítico y hemoptisis. Las pruebas de imagen son de gran ayuda diagnóstica. No son infrecuentes las aspergilosis localizadas en senos paranasales (15% del total). Esta afectación puede ser destructiva y extenderse a paladar, órbitas, tejidos blandos y base del cerebro. Es frecuente la diseminación a partir de pulmón o de los senos siendo el SNC es el órgano más afectado (meningitis, meningoencefalitis, abscesos hemorrágicos).

Virus

Los virus, y en especial los herpesvirus, con frecuencia complican los TPH favorecidos por la fase de inmunodepresión post-TPH^{12,13}.

Herpesvirus

Los herpesvirus son un grupo de virus muy comunes a los que la mayoría de la población está expuesta en las etapas más tempranas de la vida. Como virus latente, su genoma viral permanece en la célula infectada durante toda la vida del individuo, con posibilidad de reactivarse y expresarse durante períodos de inmunodepresión. La potencial oncogenicidad de estos virus es de especial relevancia en los pacientes sometidos a TPH, ya que puede producirse una proliferación celular incontrolada cuando los mecanismos de vigilancia inmune normales están alterados. Dada la inefectividad de la inmunidad humoral en los virus asociados a células, el mecanismo de defensa más importante frente a estos agentes es la inmunidad celular, en concreto las células T citotóxicas específicas.

Virus herpes simple (VHS). Alrededor del 80% de los pacientes que reciben un TPH son seropositivos para el VHS pre-TPH. Las reinfecciones se observan en la 2.^a-3.^a semana post-TPH aunque también pueden observarse más tarde en períodos de intensa inmunodepresión. Antes de la introducción del aciclovir el 70% de los pacientes desarrollaban mucositis, con úlceras extensas en el paladar, lengua, labios, nariz e incluso neumonías fatales. Las infecciones por VHS tipo 2, con afectación genital y perineal son menos frecuentes.

Citomegalovirus (CMV). Es uno de los agentes infecciosos que con más frecuencia se detectan en el curso del TPH alogénico. Su infección ocurre entre el implante y el día +100. En el trasplante alogénico la infección puede producirse por la transmisión del virus de un inóculo de un donante seropositivo a un receptor seronegativo. El estado serológico del donante parece ser de menos importancia que en el trasplante de órganos sólidos ya que el virus no se transmite tan fácilmente por los progenitores hemopoyéticos como por dichos órganos. Incluso es posible que la seropositividad del donante tenga un efecto protector. La transmisión del virus a través de los productos sanguíneos desempeña un papel más importante en el TPH que en los trasplantes de órgano sólido por su elevado requerimiento transfusional. Por ello, si el receptor es seronegativo, se administrará todo el soporte transfusional peritrasplante con productos CMV negativos o, en su defecto, productos desleucocitados, aunque esta última medida no sea tan eficaz. Con todo, los pacientes que se infectan con más frecuencia son los seropositivos pretrasplante que presentan una reactivación del virus endógeno. Otro factor de gran importancia para la infección por CMV es el tipo de inmunodepresión¹⁴. El empleo de esteroides tiene un efecto mínimo en la reactivación vírica. La ciclosporina A y el FK506 también tienen poco efecto en la reactivación vírica, aunque pueden perpetuar la replicación después de que se haya producido reactivación. Los agentes capaces de inducir reactivación son la globulina antitimocítica y el OKT3. Ello es debido a la marcada disminución de la inmunidad celular al eliminar los linfocitos T circulantes. Finalmente, la irradiación corporal total y la presencia de EICH aguda pueden favorecer la reactivación del CMV.

Las consecuencias de una primoinfección o reactivación pueden ir desde una infección asintomática a una afectación multiorgánica muy severa. Algunos pacientes presentan un cuadro subagudo parecido a la mononucleosis, que puede limitarse o evolucionar y afectar uno o varios órganos con neumonía, hepatitis, pancreatitis, esofagitis, gastritis, colitis, encefalitis, mielitis transversa, o lesiones cutáneas. La coriorretinitis por CMV, frecuente en el paciente con sida es infrecuente en el TPH y si ocurre lo hace de forma más tardía que las otras manifestaciones (> 6 meses). La neumonía intersticial relacionada con el CMV es casi siempre fatal. Típicamente ocurre durante el 2.º mes del TPH (50-60 días) y se presenta con tos seca, hipoxemia, disnea y fiebre. La radiología inicial es la de un patrón intersticial que rápidamente se convierte en difuso. Además de las manifestaciones clínicas, esta infección también tiene efectos indirectos. En primer lugar, el CMV es un virus inmunomodulador y actúa disminuyendo la inmunidad y produciendo una inversión del cociente CD4/CD8. En segundo lugar, puede producir leucopenia. Todo ello conduce a un riesgo adicional

de superinfección por bacterias oportunistas y hongos. Excepcionalmente el CMV puede provocar el rechazo del injerto.

Virus de la varicela zoster (VZV)

Afecta al 40 % de los TPH y, si no se trata, tiene una mortalidad de hasta el 30 %. Aparece a partir del segundo mes del TPH pero se han descrito casos años después del mismo. Los factores de riesgo más importantes son la EICH aguda y crónica. Las manifestaciones clínicas incluyen desde afectación cutánea de una o varias metámeras a la forma diseminada con, en ocasiones, afectación visceral con hepatitis, encefalitis y neumonía hemorrágica.

Virus respiratorios

Estos virus pueden afectar a los pacientes sometidos a TPH con una frecuencia y período de aparición que coincide con el mismo patrón observado en la comunidad y que puede variar de año en año. En los últimos años se está dando un interés creciente a este grupo de virus. Los síntomas más comunes son los debidos a una afección de vías respiratorias altas aunque también pueden causar neumonías^{15,16}.

Virus respiratorio sincitial (VRS). Puede aparecer en forma de epidemias en unidades de trasplante y tiene una mortalidad de hasta el 80 %. Más frecuente entre diciembre y febrero.

Parainfluenza e influenza. Ambos virus pueden causar neumonías en ocasiones fatales.

*Virus de Epstein-Barr (VEB)*¹⁷

Es un virus extremadamente común, el 90 % de la población adulta ha estado en contacto con él. El virus permanece latente en los linfocitos B y la reactivación viral sucede durante los períodos de inmunodepresión. La infección de los linfocitos B por el VEB provoca su proliferación. En los pacientes inmunodeprimidos, los linfocitos T citotóxicos específicos contra el VEB no son capaces de controlar al virus, produciéndose una proliferación linfoide B policlonal y con menos frecuencia monoclonal. Los linfocitos afectados pueden ser tanto del donante como del receptor. Los síndromes linfoproliferativos asociados al VEB ocurren en el 0,5 % de los TPH alogénicos. Son factores de riesgo para su aparición la depleción linfoide T, el uso de ATG o anticuerpos anti-CD3 y la disparidad HLA. La mayor parte de los casos se desarrollan alrededor del día 70 post-TPH aunque no son infrecuentes formas precoces (45 días post-TPH) o muy tardíos (años después del TPH). Las precoces, se suelen presentar de forma agresiva con fiebre y afectación extranodal. Las tardías tienen un curso más indolente con febrícula y adenopatías.

Diagnóstico

El diagnóstico de infección en el TPH no es siempre fácil debido a múltiples causas. En primer lugar

Tabla 2. Evaluación microbiológica del paciente trasplantado con sospecha de infección

| Muestra | Examen microscópico | | | Cultivos | | | Otros | | |
|------------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|----------|-----------|---------------|--------|-------|---|
| | Tinción de Gram | Tinción de Micobacterias | Tinción de hongos | Aerobio | Anaerobio | Micobacterias | Hongos | Virus | |
| Sangre | | | | XX | XX | XX | XX | XX | Ag CMV, criptococo |
| Orina | XX | X | | XX | | X | X | X | Ag Legionella |
| Espuito | XX | X | X | XX | | X | X | X | |
| BAL | XX | XX | XX | XX | X | XX | XX | XX | Cultivo Legionella y Mycoplasma, PCP, VRS |
| Herida | XX | X | X | XX | X | X | X | | |
| Lesión | XX | X | X | XX | | X | X | X | Ag VHS |
| Líquidos orgánicos o tejidos | | | | | | | | | |
| LCR | XX | XX | XX | XX | XX | XX | XX | XX | Ag criptococo, tinción tinta china |
| Punta CVC | | | | XX | | | | | |
| Heces | | | | XX | | | | | Examen huevos y parásitos, toxina Clostridium difficile |

XX: exámenes básicos; X: exámenes opcionales.
 Adaptada de La Rocco MT, Burgest SJ. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 288.

suele ser difícil el practicar exploraciones diagnósticas invasivas en estos pacientes debido a su estado crítico. En segundo lugar muchas infecciones son causadas por microorganismos de difícil diagnóstico. En los hospitales donde existen unidades de TPH los microbiólogos deben tener amplia experiencia en bacteriología, micología, parasitología, virología y serología. Finalmente, en un porcentaje no desdenable de casos (30-40 %) el episodio febril no se debe a una infección. En cualquier caso, el diagnóstico de infección en estos pacientes exige un elevado índice de sospecha, ya que su evolución puede ser rápidamente fatal si no se instaura un tratamiento adecuado.

Las causas de infección en el TPH son variables y dependen del tipo de trasplante y del momento cronológico de aparición como se ha mencionado antes. En la tabla 2 se enumeran las muestras que se deben obtener para detectar los posibles patógenos en caso de sospecha de infección. Es importante su transporte rápido al laboratorio. Cuando existe fiebre sin focalidad infecciosa deben obtenerse muestras de sangre y orina para cultivos de bacterias, hongos y virus. Un cultivo puro de > 10⁴ CFU/ml en orina es indicativo de bacteriuria. En los pacientes con síntomas respiratorios o con alteraciones radiológicas pulmonares una adecuada muestra de esputo permitirá el diagnóstico de hasta el 75 % de neumonías bacterianas. Deberá efectuarse tinción de Gram, cultivo, tinción de Ziehl-Neelsen, cultivo para micobacterias, anticuerpos por fluorescencia directa y cultivo de Legionella sp. El estudio de esputo es de

menor ayuda en el diagnóstico de infección por hongos, virus y Nocardia sp. Con todo, el lavado broncoalveolar (LBA) o la biopsia bronquial, será, en muchos casos el mejor método diagnóstico en las infecciones pulmonares (tabla 2). El diagnóstico de infección fúngica puede obtenerse a partir del aislamiento del organismo, la detección serológica del anticuerpo o antígeno o la evidencia histopatológica de invasión. El método de centrifugación-lisis facilita el aislamiento en sangre de hongos (excepto Aspergillus sp). Recientemente han aparecido múltiples tests serológicos para la detección de hongos pero su valor está en controversia. Los únicos efectivos para el diagnóstico son aquellos que permiten la detección del antígeno polisacárido circulante de Cryptococcus neoformans y la detección, en suero y orina, del antígeno de Histoplasma capsulatum. Es de destacar que los estudios radiológicos son de gran utilidad en el diagnóstico de las infecciones fúngicas, en particular la tomografía computarizada (TC) ante la sospecha de aspergilosis invasiva.

Las aproximaciones diagnósticas para las infecciones víricas incluyen tests serológicos, cultivos y examen histológico de tejidos. La utilidad del diagnóstico serológico en el paciente infectado se ve limitada por el tiempo necesario para que se produzca la respuesta inmunológica y la escasa producción de anticuerpos, debido al estado de inmunodepresión. El tiempo necesario para que los virus del grupo herpes, en particular el CMV, expresen su efecto citopático en cultivos celulares hace que los métodos virológicos clásicos sean de poca utilidad práctica.

La técnica de *shell vial* acorta este tiempo; lamentablemente sólo es útil para muestras respiratorias, de orina y líquidos biológicos ya que la sangre altera el proceso ofreciendo resultados subóptimos. Existen dos técnicas más recientes¹⁸, la antigenemia y la PCR que son muy útiles para la detección precoz de la viremia por CMV. La antigenemia utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína del máxix/tegumento pp65 del CMV y se efectúa en muestras de leucoconcentrado. El número de granulocitos y monocitos infectados que reaccionan con el anticuerpo parece que se correlaciona con el grado de enfermedad pudiendo ser detectados una semana antes de que aparezca la enfermedad citomegálica.

Medidas preventivas

Las medidas preventivas de la infección deben enfocarse hacia la descontaminación de gérmenes endógenos y la prevención de la adquisición de exógenos. Las medidas más importantes son el lavado de manos, la higiene oral, las dietas con bajo contenido bacteriano, los antibióticos orales para la descontaminación intestinal selectiva aerobia y la filtración del aire¹⁹.

Tratamiento²⁰

Período neutropénico

El tratamiento inicial de un paciente neutropénico (neutrófilos < 500/l) con fiebre (> 38 °C) o con sospecha clínica de infección sin focalidad infecciosa, consiste en una cobertura empírica con antibióticos de amplio espectro. Pueden escogerse distintos regímenes: 1) Betalactámico antipseudomónico más un aminoglucósido; 2) los anteriores más un glucopéptido, o 3) monoterapia con un carbapenémico. Para pacientes alérgicos a la penicilina puede utilizarse la combinación de vancomicina y aztreonam. Si la fiebre persiste tras 5 días de tratamiento y los cultivos son negativos se debe añadir anfotericina B de forma empírica. Los antibióticos deben suspenderse cuando el paciente alcance > 500 neutrófilos/ μ l o bien si el paciente está afebril y estable durante 5-7 días de tratamiento aunque persista la neutropenia.

En este período no son infrecuentes las infecciones fúngicas. En caso de candidiasis diseminadas el fármaco de elección es la anfotericina B a la que puede asociarse 5-fluorocitosina. Si existe una aspergilosis invasiva las posibilidades de éxito radican en un diagnóstico precoz, dosis elevadas de anfotericina B y la recuperación de la granulocitopenia. Si existe una lesión única puede beneficiarse de exéresis quirúrgica. En el caso de que poder administrar las dosis previstas de anfotericina B por toxicidad renal, o por progresión de la infección, deben emplearse las formulaciones lipídicas o liposomales de anfotericina B a pesar de su elevado coste. El itraconazol es un

nuevo triazol con actividad demostrada contra el *Aspergillus* sp. Sin embargo, su presentación oral lo hace de escasa eficacia en estos pacientes que a menudo presentan aclorhidria gástrica y mucositis. En pacientes con infecciones graves durante este período, el empleo de factores estimulantes de colonias granulocitarias (G-CSF) o el factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas (GM-CSF) puede ayudar al control de la infección.

La profilaxis con aciclovir en los pacientes seropositivos para VHS pre-TPH ha reducido notablemente las infecciones por este agente.

Período intermedio

En este período el microorganismo más importante es el CMV^{21,22}. Por ello debe hacerse énfasis en las medidas preventivas como son la administración de productos CMV negativos o, en su defecto, el uso de filtros de alta eficacia para el soporte transfusional en receptores seronegativos. El tratamiento preventivo ha sido uno de los grandes avances en este campo y consiste en el tratamiento de la infección, detectada por antigenemia o PCR en sangre o en LBA, con ganciclovir o foscarnet antes de que aparezca la enfermedad. Si se desarrolla una neumonía intersticial por CMV el tratamiento con ganciclovir asociado a inmunoglobulinas permitirá su control en el 30-50% de los casos. Este mismo tratamiento se aplica a casos de enteritis por CMV. De menor importancia son las infecciones por VVZ que serán tratadas con aciclovir. También en este período aparecen infecciones fúngicas cuyo tratamiento se ha descrito anteriormente.

Período tardío

En los pacientes con EICH crónica deberá efectuarse siempre profilaxis de los gérmenes encapsulados (*Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*) con penicilina oral o antibioticoterapia rotatoria. La infección por *Toxoplasma gondii* puede aparecer en cualquier período post-TPH. Es importante su diagnóstico precoz al ser una infección potencialmente mortal que con un tratamiento adecuado (sulfadiazina y pirimetamina) es curable.

Agradecimientos

Trabajo realizado en parte gracias a las ayudas y becas: 2000 SGR00111 de la Generalitat de Catalunya, FIJC-01/P-CR, y FIJC-01/P-EM de la Fundación Internacional Josep Carreras para la Lucha contra la Leucemia.

Bibliografía

1. Winston DJ. Infections in bone marrow transplant recipients. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practices of Infectious Diseases, 4.^a ed. New York: Churchill Livingstone, 1995; 2717-2722.
2. Rowe JM, Ciobanu N, Ascensao J et al. Recommended guidelines for the management of autologous and allogeneic bone marrow transplantation. Ann Intern Med 1994; 120: 143-158.

3. Bowden RA, Meyers JD. Infection complicating bone marrow transplantation. En: Rubin RH, Young LS, eds. *Clinical approach to infection in the compromised host*, 3.^a ed. Plenum Nueva York: Medical Book Company, 1994; 601-628.
4. Winston DJ, Schiffman G, Wang DC et al. Pneumococcal infection after human bone-marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1979; 91: 835-841.
5. Bodey G, Buelman B, Duguid W et al. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 99-109.
6. Wheat LJ. Fungal infections in the immunocompromised host. En: Rubin RH, Young LS, eds. *Clinical approach to infection in the compromised host*, 3.^a ed. Nueva York: Plenum Medical Book Company, 1994; 211-237.
7. Goodrich JM, Reed EC, Mori M et al. Clinical features and analysis of risk factors for invasive candidal infection after marrow transplantation. *J Infect Dis* 1991; 164: 731-740.
8. Saral R. Candida and Aspergillus infections in immunocompromised patients: an overview. *Clin Infect Dis* 1991; 13: 487-492.
9. McWhinney PHM, Kibbler CC, Hamon MD et al. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years' experience. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 397-404.
10. Wald A, Leisenring W, Van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997; 175: 1459-1466.
11. Anaissie EJ, Bodey GP, Rinaldi MG. Emerging fungal pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 323-330.
12. Chou S. Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Infect Dis* 1992; 5: 427-432.
13. Bowden RA. Other viruses after marrow transplantation. En: Thomas DE, Blume KG, Forman SJ, eds. *Hematopoietic cell transplantation*. Blackwell Scientific 1999; 618-626.
14. Rubin RH. Impact of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Rev Infect Dis* 1990; 12: S754-S766.
15. Whimbey E, Englund JA, Couch RB et al. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med* 1997; 102 (3A): 10-18.
16. Ljungman P. Respiratory virus infection in bone marrow transplant recipients: the European perspective. *Am J Med* 1997; 102 (3A): 44-47.
17. Straus SE, Cohen JL, Tosato G, Meier J. Epstein-Barr virus infections: biology pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 1993; 118: 45-58.
18. Gerna G, Zipeta D, Marea M, Revello MG et al. Monitoring of human cytomegalovirus infectious and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J Infect Dis* 1991; 64: 488-498.
19. Burt RK, Walsh T. Infection prophylaxis in bone marrow transplant recipients. Myths, legends and microbes. En: *On call in..... Bone marrow transplantation*. RG Landes Company and Chapman and Hall 1996; 438-451.
20. LaRocco MT, Burgert SJ. Infection in the bone marrow transplant recipient and role of the microbiology laboratory in clinical transplantation. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:277-297.
21. Ljungman P, De Bock R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Grundy J et al. Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogeneic bone marrow transplant recipients: a report from the Working Party for Infectious Diseases of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 399-403.
22. Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 1996; 88: 4063-4071.

ESTADO ACTUAL DE LOS SUSTITUTOS CELULARES DE LA SANGRE

E. MUÑIZ-DÍAZ Y P. MADOZ

Banco de Sangre. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Sustitutos de los hematíes

En los últimos 30 años se ha venido trabajando intensamente en el desarrollo de un posible sustituto de los hematíes humanos. La complejidad y diversidad de funciones realizadas por estas células ha hecho que, aún hoy, no se haya conseguido un completo y verdadero sustituto. No obstante, en el curso de estos años se han ido produciendo una serie de productos que en algunos casos son capaces de reemplazar parcial y temporalmente a los hematíes en la función que les es más propia, el transporte de O₂. Por esta razón, aunque el término “sustitutos de los hematíes” es aceptable, parece más adecuado referirse a ellos como soluciones transportadoras de oxígeno¹⁻⁴. Básicamente, son tres los tipos de productos desarrollados: las soluciones de hemoglobina (Hb) libre, los perfluorocarbonos (PFC) y, más recientemente, una variante de las primeras, las hemoglobinas encapsuladas en liposomas.

Soluciones de Hb libre

Las soluciones de Hb libre fueron consideradas como el sustituto natural de los hematíes. Se sabía que los animales podían sobrevivir a la exanguinación cuando eran transfundidos con soluciones de Hb, pero no cuando sólo recibían sustitutos del plasma. Los primeros experimentos realizados con estas soluciones se llevaron a cabo con Hb humana libre de estromas obtenida a partir de sangre caducada. Esta Hb se preparaba lisando hematíes en un medio hipotónico y eliminado las estromas residuales a través de diferentes procedimientos que iban desde la centrifugación simple hasta la filtración y la extracción química. Pronto se vio que la utilidad de este potencial sustituto iba a ser muy limitada debido a los inconvenientes que comporta la utilización de Hb libre de su envoltura celular:

1. *Aclaramiento intravascular rápido de la Hb extracelular.* La molécula de HbA (PM 64 kDa) es un tetrámero constituido por cuatro cadenas de globinas, 2 α y 2 β , unidas a un grupo hem. Fuera del hematíe, esta molécula se disocia en dos dímeros α - β (PM 32 kDa) que atraviesan con gran rapidez el glomérulo renal. La Hb no filtrada es finalmente eliminada a través del sistema mononuclear fagocítico en forma de complejos Hb-haptoglobina.

2. *Efectos hipertensivos.* Estos efectos se deben a la unión de la Hb libre con el óxido nítrico (ON) o factor relajante del endotelio vascular, que comporta una vasoconstricción. También parecen contribuir las interacciones de la Hb con la endotelina o receptor adrenérgico responsable del tono vascular. Aunque, en principio, supone una desventaja, algunas empresas han aprovechado este efecto para investigar su posible beneficio en pacientes afectados de shock séptico y shock hemorrágico. La unión Hb libre-ON también parece responsable de las molestias gastrointestinales relacionadas con el tono muscular observadas en algunos pacientes.

3. *La Hb libre* muestra una afinidad por el O₂ muy superior a la de la Hb celular. La pérdida con las estromas del regulador 2,3-difosfoglicerato y un pH del plasma más alcalino que el intraeritrocitario dificultan la liberación del O₂ transportado por esta Hb.

4. Entre los *inconvenientes menores*, o no suficientemente probados, cabe señalar: a) una presión osmótica coloidal elevada que impide su empleo a concentraciones superiores a 7 g/dl; b) la progresiva oxidación de la Hb a metahemoglobina que obliga a conservarla en ambientes carentes de O₂; c) la inmunogenicidad, y d) el posible efecto potenciador de la sepsis bacteriana observado en experimentos animales, que parece relacionado con una alteración de la función fagocítica inducida por la Hb libre o con un aumento del crecimiento bacteriano propiciado por el aporte de hierro que ésta realiza.

Finalmente, y en relación con las posibles fuentes de obtención de las soluciones de Hb libre, cabe añadir que en el caso de las de *procedencia humana* a partir de sangre caducada, es imposible plantearse una producción a gran escala y, lo que es más importante, esta fuente acarrea con los mismos riesgos de transmisión de enfermedades que los hematíes humanos. Las soluciones de *procedencia bovina* no estaban sujetas a límites de producción, pero la irrupción de la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob supone un obstáculo para su empleo que, por el momento, parece insalvable, a pesar de que sigue sin demostrarse la posible transmisión de la enfermedad a través de la sangre. En el caso de la *Hb recombinante* falta por determinar si podría asumirse la producción que se estima necesaria

(más de 100 g de Hb recombinante equivaldrían a dos unidades de concentrados de hematíes), y queda por asumir el nivel de purificación exigible para asegurar la ausencia de endotoxinas bacterianas.

Para solucionar algunos de estos problemas se han introducido una serie de modificaciones químicas en la estructura de la molécula de Hb que evitan la disociación del tetrámero y la rápida filtración glomerular de los dímeros y monómeros resultantes.

Estabilización interna del tetrámero

Esta modificación se basa en la creación de enlaces químicos entre las cadenas polipeptídicas α y/o β para conseguir tetrámeros estables.

La solución conocida como *HemAssist* o DCLHb (Baxter) consiste en una Hb humana estabilizada mediante la formación de enlaces fumarato entre las dos cadenas α (lisina 99 α_1 y lisina 99 α_2)⁵. La producción de esta solución de Hb fue patrocinada por la armada de Estados Unidos que contrató a la empresa Baxter para su desarrollo. La vida media en humanos es de unas 12 h. En marzo de 1998 se interrumpió temporalmente la producción de HemAssist al detectarse una tasa de mortalidad y de morbilidad superior en el grupo de pacientes tratados con esta solución en un ensayo en fase III efectuado en pacientes con hemorragia secundaria a un traumatismo⁶. Se concluyó que el efecto vasopresor de la solución habría podido ser determinante en la evolución de los pacientes, ya fuera por incremento de la hemorragia o por hipertensión y, en cualquier caso, por disminución del grado de perfusión tisular. En septiembre del mismo año se dio por finalizada la producción con carácter definitivo.

La empresa Somatogen produjo una Hb recombinante (*Optro* o rHb1.1) que se apoya en una modificación similar a la de la Hb HemAssist para conseguir estabilizar el tetrámero⁷. Las cadenas se mantienen unidas mediante un enlace covalente y, a la vez, se ha introducido un cambio de aminoácido en las cadenas β (asparagina 108/lisina 108) que da lugar a una molécula de Hb idéntica a la Hb presbiteriana, con una afinidad por el O₂ similar a la de la Hb celular. Los primeros ensayos realizados mostraron, entre sus efectos indeseados más destacados, la aparición de complicaciones gastrointestinales, probablemente relacionadas con una alteración de la musculatura lisa, en forma de contracción de los esfínteres del esófago y del intestino. Este efecto se relacionó con la acción quelante de la Hb acelular por el óxido nítrico (ON). *Optro* estaba siendo examinada en ensayos en fase II cuando Somatogen fue adquirida por Baxter quien decidió interrumpir la producción y los ensayos clínicos para mejorar el desarrollo del producto.

Polimerización

Consiste en la creación de polímeros a través de enlaces entre los tetrámeros de Hb que dan como

resultado unas moléculas con un PM muy superior. Una de las sustancias más empleadas para la polimerización es el glutaraldehído con el que se consiguen polímeros de Hb formados por dos a seis tetrámeros (PM 130-400 kDa), con una vida media de 40-46 h.

Los laboratorios Northfield fueron una de las primeras compañías implicadas en el desarrollo comercial de transportadores de O₂ en 1980 y, actualmente, después de la interrupción del HemAssist de Baxter, es quien dispone de resultados más avanzados, basados en ensayos en fase III. La solución de Hb, denominada *PolyHeme*, se obtiene de hematíes humanos, y la Hb purificada se hace reaccionar con piridoxal fosfato para reducir su afinidad por el O₂ antes de polimerizarla con glutaraldehído⁸. Una unidad consiste en 50 g de Hb en 500 ml, con una concentración aproximada de 10 g/dl. Es iso-oncótica respecto a la sangre y posee una viscosidad ligeramente superior a la del agua. Su vida media es de unas 24 h y su principal aplicación parece ser en la reposición de sangre de los pacientes con hemorragia secundaria a politraumatismo. Actualmente se están efectuando ensayos en fase III diseñados para esta indicación. En septiembre de 1999, un total de 150 pacientes ya habían sido tratados con PolyHeme, 53 de los cuales habían recibido entre 6 y 20 unidades. No se observaron efectos adversos mayores, ni disfunción gastrointestinal. El único efecto negativo observado en los pacientes que habían recibido 20 unidades de PolyHeme fue la hemodilución significativa de los factores de coagulación^{2,3}.

La compañía Biopure también produjo hacia 1980 una Hb polimerizada con glutaraldehído (*Hemopure*), cuya principal diferencia con aquella es su procedencia bovina⁹. Esta Hb no requiere reacción con el piridoxal fosfato, dado que la afinidad por el O₂ de la Hb bovina es muy baja en presencia del ion cloro. Una unidad de Hemopure contiene 30 g de Hb bovina en 250 ml de una solución iso-oncótica que posee una viscosidad ligeramente superior a la del agua. Su principal aplicación parece residir en los programas de hemodilución empleados en determinadas cirugías que pretenden evitar o diferir la transfusión de hematíes hasta una fase en la que el paciente esté estabilizado y la hemorragia haya cesado. Actualmente se están efectuando, en Estados Unidos y Europa, ensayos en fase II/III en pacientes de cirugía cardíaca y no cardíaca, y un estudio multicéntrico en el que están implicados, además, Canadá y Sudáfrica, con pacientes en cirugía ortopédica electiva. Recientemente, se reportó la administración de esta solución de Hb a una paciente afectada de una anemia hemolítica autoinmune refractaria al tratamiento inmunodepresor convencional en la que la solución de Hb resultó efectiva, permitiendo obviar la transfusión de sangre y mantener estable a la paciente hasta que el tratamiento con ciclosporina comenzó a resultar efectivo¹⁰. En abril del

Tabla 1. Soluciones transportadoras de oxígeno en estudio

| Producto (empresa) | Fuente de obtención | Ensayo clínico | Aplicaciones |
|-----------------------|---|----------------|--|
| PolyHeme (Northfield) | Hb humana polimerizada (glutaraldehído) | II III | Hemorragia en cirugía Hemorragia en politraumatizados |
| Hemopure (Biopure) | Hb bovina polimerizada (glutaraldehído) | III II | Cirugía ortopédica y cardíaca Cirugía. Anemia células falciformes Hemodilución |
| Oxyglobin (Biopure) | Hb bovina polimerizada (glutaraldehído) | Aprobada | Veterinaria |
| Hemolink (Hemosol) | Hb humana polimerizada (glutaraldehído) | III II | Cirugía cardíaca Hemodilución |
| PHP (Apex Bioscience) | Hb humana conjugada (PEG) | III | Hipotensión inducida por ON |
| PEG-Hb (Enzon) | Hb bovina conjugada (PEG) | Ib | Tumores sólidos para ↑ la radiosensibilización |

Tabla 2. Aplicaciones de las soluciones transportadoras de oxígeno

| |
|--|
| Hemorragia aguda de causa quirúrgica o secundaria a un traumatismo |
| Hemorragia aguda en pacientes que no aceptan la transfusión convencional (Testigos de Jehová), con problemas de compatibilidad, o en regiones con infecciones endémicas |
| Hemodilución normovolémica aguda |
| Shock séptico |
| Para aumentar el grado de oxigenación en: <i>by-pass</i> cardiopulmonar, accidentes vasculares cerebrales, crisis venoclusivas en la anemia de células falciformes, etc. |
| Para preservar y mejorar la conservación de órganos <i>ex vivo</i> |
| Para potenciar el efecto de la radioterapia sobre ciertos tumores sólidos |
| En ventilación líquida parcial |
| Para estimular la producción de hematíes (eritropoyesis) |

presente año se ha hecho público el anuncio de que el Consejo africano para el control de medicamentos ha autorizado en Sudáfrica la utilización del Hemopure en pacientes con anemia aguda¹¹. Biopure también dispone de un producto similar denominado *Oxypure*, que fue aprobado en 1998 para su empleo en veterinaria^{2,3}.

La compañía canadiense Hemosol produjo una solución de Hb de procedencia humana (*Hemolink*) polimerizada con glutaraldehído, pero que a su vez es estabilizada mediante enlaces intratetraméricos¹². Como las anteriores es iso-oncótica y muestra una viscosidad ligeramente superior a la del agua. Su vida media es de unas 18-20 h. Su principal aplicación también reside en los programas de hemodilución que se efectúan en determinadas cirugías. Actualmente se están llevando a cabo ensayos en fase III en Canadá, Reino Unido y Estados Unidos,

en pacientes intervenidos de *by-pass* aortocoronario a quienes intraoperatoriamente se les extraen entre 1 y 4 unidades autólogas mientras se les mantiene en hemodilución con la ayuda complementaria del Hemolink. Al final de la cirugía, los hematíes autólogos son transfundidos. Hasta el momento se sabe que unos 200 pacientes incluidos en el ensayo de Estados Unidos han recibido Hemolink sin que se hayan producido efectos adversos mayores, pero también con una eficacia limitada (tabla 1).

Hemoglobinas conjugadas

Se basa en la unión de la molécula de Hb a grandes moléculas inertes como el dextrano, el polietilenglicol (PEG) y el polioxietileno. Esta modificación supone un aumento muy importante del PM de la molécula resultante, reduce la antigenicidad y el reconocimiento por parte del sistema inmune e induce un incremento de la viscosidad y de la presión oncótica, propiedades que pueden resultar muy útiles para determinadas aplicaciones (tabla 2).

Apex Bioscience desarrolló la producción de una Hb conjugada con polioxietileno y modificada con piridoxal fosfato (*PHP*) para su empleo en pacientes afectados de shock séptico, gracias a su efecto hipertensivo mediado por su acción quelante sobre el ON¹³. Por su parte Enzon ha desarrollado una Hb conjugada con PEG (*PEG-Hb*) de procedencia bovina¹⁴. Ambas están siendo evaluadas en estudios preclínicos, aunque el futuro de la Hb de Enzon, dada su procedencia bovina es incierto.

En 1999, la compañía Sangart comenzó a desarrollar una nueva Hb conjugada con PEG (*Hemospan*) que muestra como propiedades características una viscosidad, una presión oncótica y una afinidad por el O₂ muy elevadas¹⁵. Su evaluación se encuentra en fase preclínica.

Perfluorocarbonos

Son compuestos químicos sintéticos análogos a los hidrocarburos, de estructura lineal o cíclica en la que

los átomos de hidrógeno son sustituidos por flúor y, ocasionalmente, por otros halógenos. Su capacidad para disolver el O₂ es entre diez y veinte veces superior a la del agua o el plasma y, a diferencia de la Hb, no reaccionan químicamente con el O₂^(2,4).

El carácter hidrofóbico de estas moléculas las hace insolubles en agua, por lo que deben ser emulsionadas antes de su aplicación intravenosa. Suelen combinarse con un surfactante, habitualmente un fosfolípido, para conseguir una emulsión estable de partículas de pequeño tamaño (submicrones). La cantidad de O₂ disuelto está en relación directa con la presión parcial de O₂, de manera que aunque teóricamente pueden disolver veinte veces más O₂ que el plasma, en el medio ambiente normal sólo disuelven tres veces más. Para compensar este inconveniente las emulsiones se exponen a una concentración de O₂ elevada pero, aun así, su capacidad de transporte de O₂ se ve limitada por el hecho de que la inspiración de porcentajes de O₂ superiores al 60 % puede inducir lesiones pulmonares.

Aunque los perfluorocarbonos (PFC) son biológicamente inertes, los agentes emulsionantes pueden no serlo totalmente y producir toxicidad. Asimismo resulta complicado controlar el tamaño de las partículas que configuran el producto final, y las de mayor tamaño plantean problemas de metabolización en el sistema mononuclear fagocítico. Algunos PFC activan el complemento y estimulan la secreción de citocinas inflamatorias que producen un síndrome "flu-like" en algunos pacientes. También puede observarse una trombocitopenia moderada en los pacientes que reciben dosis altas.

A diferencia de las soluciones de Hb, los PFC pueden obtenerse de forma totalmente sintética, evitando la contaminación con patógenos humanos. Además, pueden producirse en grandes cantidades.

El primer perfluorocarbono (PFC) evaluado fue el *Fluosol-DA*, desarrollado por Green Cross Corporation (Osaka, Japón) en colaboración con Alpha Therapeutics (Los Angeles, CA). La FDA aprobó en 1989 su utilización en la angioplastia coronaria transluminal percutánea para oxigenar el lecho distal¹⁶. Fue retirado del mercado en 1994 por problemas relacionados con la preparación del producto y su estabilidad una vez reconstituido, y coincidiendo con las mejoras introducidas en los catéteres empleados en la angioplastia que comenzaron a garantizar una perfusión distal correcta. En otros ensayos clínicos con pacientes afectados de hemorragia aguda pudo comprobarse que el *Fluosol* era capaz de transportar O₂ al tejido isquémico, pero no introdujo ningún beneficio en la evolución de los pacientes¹⁷.

Los PFC de segunda generación comenzaron a evaluarse hace una década, mostrando una solubilidad para el O₂ muy superior a la del *Fluosol* (hasta 5 veces más), mayor estabilidad a temperatura ambiente y menos toxicidad. *Oxygent* (Alliance Pharma-

ceutical) es un PFC que combina el perflubron (perfluoro-octil bromide) con fosfolípidos de yema de huevo como surfactantes. *Oxyfluor* (HemaGen Diagnostics, Waltham, MA) es una emulsión trifásica de perfluorodichlorooctano, triglicéridos y fosfolípidos de yema de huevo⁴.

Actualmente sólo *Oxygent* estaba siendo evaluado, a través de ensayos clínicos en fase II y III, en pacientes en programas de hemodilución normovolémica aguda en los que se pretendía conseguir una hemodilución extrema¹⁸, pero el pasado mes de enero se interrumpieron los ensayos en fase III al observar una incidencia superior de los episodios de infarto en los pacientes tratados con este PFC⁴. Otra posible aplicación que está siendo considerada es en la hemorragia aguda intraoperatoria, donde el PFC aportaría de manera transitoria el O₂ necesario hasta que la transfusión convencional u otras medidas de soporte pudieran administrarse.

Las propiedades de los PFC pueden resultar especialmente útiles en el contexto del *by-pass* cardiopulmonar, donde facilitarían una hemodilución máxima que permitiría limitar la cantidad de sangre expuesta al circuito del *by-pass* y potenciar el grado de oxigenación por el efecto sinérgico de la sangre conservada y el PFC. La posibilidad de exponer el PFC a concentraciones de O₂ del 100 % en el oxigenador proporciona una manera rápida de cargar éste con grandes cantidades de O₂. La vida media intravascular de 6-12 h no supondría un inconveniente significativo porque resultaría suficiente para la mayoría de procedimientos⁴. No obstante, tras la súbita interrupción de los ensayos que se estaban efectuando, habrá que esperar a conocer los planes de las empresas productoras de estos sustitutos.

Hemoglobinas encapsuladas

El último paso en el diseño de un sustituto de los hematíes ha sido la fabricación de liposomas que contienen Hb. Por su reciente desarrollo, todavía se encuentran en fase preclínica. Generalmente se emplea fosfatidilcolina para producir esferas bilamelares cargadas de una solución de Hb. Además, suelen añadirse otros componentes como el colesterol que incrementa la elasticidad de la envoltura y su persistencia *in vivo*.

Esta nueva alternativa plantea interesantes ventajas respecto a las soluciones de Hb libre y los PFC: una vida media más prolongada, no requiere modificaciones como las requeridas por las soluciones de Hb libre, pueden encapsularse simultáneamente 2,3-difosfoglicerato y metahemoglobina reductasa para regular la afinidad por el O₂ y la tendencia a oxidar la Hb libre. No obstante, las Hb encapsuladas también plantean algunos inconvenientes: su fabricación resulta compleja y exige que los liposomas finales sean uniformes en su tamaño y, por otra parte, se desconoce el impacto que puede tener so-

bre el sistema mononuclear-fagocítico la eliminación de grandes cantidades de fosfatidilcolina. En cualquier caso, estos seudoeritrocitos apuntan como el producto que mejor reproduce la estructura de los hematíes y, tal vez, el conjunto de sus funciones biológicas^{1,2,4}.

Impacto de los sustitutos de los hematíes en los servicios de transfusión hospitalarios y centros de donación

Probablemente las primeras licencias para el empleo de estos sustitutos de los hematíes se producirán para su aplicación como transportadores de O₂ en situaciones clínicas en las que habitualmente no se emplean hematíes, como la dilución normovolémica aguda o el *by-pass* cardiopulmonar, por lo que el impacto inicial puede ser mínimo. Sin embargo, su predecible introducción en el ámbito de la hemorragia aguda secundaria a traumatismos o quirúrgica, hasta que el paciente, en una fase más estable, pueda requerir la transfusión de hematíes alogénicos, sí que puede llegar a tener un impacto significativo sobre la transfusión convencional. Los bancos de sangre deberán incorporar paulatinamente los transportadores de O₂ que se vayan aprobando al conjunto de productos y componentes sanguíneos empleados en hemoterapia. Habrá que diseñar nuevas guías de indicaciones de los diversos transportadores de O₂ y, seguramente, habrá que redefinir los umbrales de transfusión alogénica en los pacientes tratados con estos sustitutos, ya que la concentración de Hb reflejará tanto la Hb intraeritrocitaria como extraeritrocitaria, cuyas características son muy diferentes. La llegada de nuevas generaciones de sustitutos de los hematíes con una vida media más prolongada (las Hb encapsuladas en liposomas, o conjugadas con PEG u otras macromoléculas, ya muestran una supervivencia potencial superior) incrementará el número de indicaciones posibles.

Aunque la seguridad de los hematíes alogénicos, en el momento actual, en lo que concierne a su ca-

pacidad infectiva es muy elevada, la percepción del riesgo por parte de la sociedad, sigue siendo otra. Además, muchos de los efectos adversos no infecciosos de la transfusión, especialmente los de carácter inmune, tienen una prevalencia significativa que pueden decantar el interés por los sustitutos celulares. El coste de los sustitutos, en principio puede influir sobre su posible difusión en el ámbito hospitalario, pero si se demuestra de forma evidente su eficacia, los propios pacientes irán demandando su uso como ya ha sucedido con la autotransfusión predeposición, a pesar de no satisfacer, en muchos casos, los criterios de coste-eficacia.

Las condiciones permisivas de almacenamiento, su mayor duración y la compatibilidad universal de los mismos podrían derivar su distribución hacia los servicios de farmacia hospitalarios, lo que podría conllevar una pérdida de esta actividad que es propia del banco de sangre, así como del personal necesario para llevarla a cabo. Aunque esta decisión pudiera escapar a la voluntad de los expertos en transfusión sanguínea, hay que intentar contrarrestarla familiarizándonos con estos nuevos agentes terapéuticos, conociendo las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos y sus indicaciones precisas, de manera que su empleo hospitalario quede sujeto a la valoración y aprobación del experto en Medicina Transfusional.

El impacto sobre los centros de transfusión dependerá del tipo de productos que se vayan aprobando y de sus aplicaciones. En teoría, si se incrementan las indicaciones y la producción de los productos basados en PFC, Hb bovina o Hb recombinante, podría verse afectada la necesidad de obtención de sangre humana. Por el contrario, si los productos de procedencia humana dominan el mercado, los centros de transfusión deberían asumir un nuevo reto como proveedores de Hb humana para la fabricación de soluciones de Hb libre. Sin embargo, la reducida tasa de caducidad de hematíes, difícilmente sería suficiente para proporcionar la cantidad de sangre necesaria, ni siquiera para fabricar la cantidad de Hb libre que reemplazara un porcentaje mínimo de las transfusiones alogénicas. Las eritrocitoaféresis podrían contribuir en parte a paliar este déficit, pero serían insuficientes. Ante esta previsible situación se ha vuelto a plantear la posibilidad de aceptar donantes de hematíes remunerados, una opción nada recomendable desde el punto de vista de los expertos en Medicina Transfusional, por su carácter involutivo en el proceso de supresión de la donación retribuida y de atentado contra uno de los pilares más firmes de la seguridad transfusional.

Nuevos productos derivados de las plaquetas y sustitutos de las plaquetas

Los nuevos productos derivados de las plaquetas y sustitutos de plaquetas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Sustitutos de las plaquetas y nuevos productos plaquetarios

| | |
|-------------------------------|---|
| Nuevos productos plaquetarios | |
| | Plaquetas congeladas |
| | Plaquetas conservadas en frío |
| | Plaquetas tratadas con agentes fotoquímicos |
| | Micropartículas plaquetarias |
| | Plaquetas liofilizadas |
| Sustitutos de las plaquetas | |
| | Hematíes recubiertos de fibrinógeno o de péptidos RGD |
| | Microcápsulas o microesferas de albúmina recubiertas de fibrinógeno |
| | Agentes hemostáticos basados en liposomas |

Nuevos productos derivados de las plaquetas

Plaquetas congeladas

Aunque la congelación de plaquetas es un procedimiento aceptado, la congelación-descongelación resulta más compleja y más cara que la utilización de los concentrados de plaquetas conservados en fase líquida. Por este motivo, la única indicación que ha justificado el empleo de esta alternativa es la congelación de plaquetas autólogas en los pacientes afectados de leucosis aguda con refractariedad inmune a las transfusiones de plaquetas. Las plaquetas congeladas en dimetil-sulfóxido (DMSO) al 5-6% pueden conservarse a -80°C durante unos 10 años. Un 75% de las plaquetas se recuperan tras la descongelación y una vez transfundidas en voluntarios sanos, la recuperación 1 h después de la transfusión es de un 33%, con una supervivencia media aproximada de 8 días. La congelación induce en las plaquetas una serie de cambios morfológicos y funcionales *in vitro*, pero en cambio mantienen su acción hemostática *in vivo*¹⁹. Recientemente, se ha demostrado que la adición de inhibidores de la activación plaquetaria: amiloride, adenosina y nitropruside sódico (ThrombosolTM LifeCell Corp., The Woodlands, TX, USA) permite reducir la cantidad de DMSO de un 6 a un 2% y mejorar sensiblemente las características de las plaquetas *in vitro* e *in vivo*²⁰. En conjunto, los inconvenientes para su empleo (coste superior, complejidad del proceso, menor recuperación) superan a su única ventaja (plaquetas conservadas con una vida más prolongada), por lo que no es previsible que el uso clínico de esta alternativa vaya a ir en aumento²¹.

Plaquetas conservadas en frío

La conservación de plaquetas a 4°C retrasa el crecimiento bacteriano, pero después de las primeras 24 h se acorta su supervivencia *in vivo* y se pierde parte de su capacidad hemostática. Ambos hechos se deben a la "lesión inducida por el almacenamiento" a 4°C , que se correlaciona con la activación de las plaquetas y con una serie de cambios morfológicos significativos²².

Una de las estrategias para prevenir la activación ha sido la inhibición de las proteínas del citoesqueleto, que están implicadas en la transformación de disco a esfera que se produce con el enfriamiento de las plaquetas. A 4°C , y en presencia de citocalasina B y de un quelante del Ca^{++} , las plaquetas conservan su forma discoide y responden a la acción de la trombina cuando se añade el Ca^{++} necesario para sobrepasar el efecto del quelante. También se han efectuado experimentos con plaquetas conservadas a 4°C a las que se ha añadido soluciones conteniendo efectores de segundos mensajeros, con resultados preliminares prometedores. Una nueva variante en estudio es la utilización de glucoproteínas anticongelantes ("antifreeze glycoproteins" or

AFGP) obtenidas de peces adaptados a sobrevivir en condiciones extremas en las regiones polares que reducen la activación asociada a la lesión por enfriamiento. Los primeros resultados, no obstante, indican ausencia de actividad hemostática *in vivo* de este tipo de plaquetas²³.

Plaquetas tratadas con agentes fotoquímicos

Actualmente se están efectuando estudios en fase III sobre el efecto que ejerce en las plaquetas el tratamiento de éstas con un agente fotoquímico y la ulterior exposición a luz ultravioleta (UVA), que se efectúa para inactivar las bacterias y virus que pudieran estar presentes. En principio las plaquetas tratadas parecen mostrar, *in vitro*, una acción hemostática correcta y, de confirmarse estas observaciones, es probable que esta nueva modalidad de plaquetas se imponga en un plazo corto²⁴.

Micropartículas derivadas de las plaquetas

Las micropartículas plaquetarias son microvesículas de la membrana que fueron descritas hace más de 30 años, sin embargo su papel en la hemostasia no había sido hasta ahora definido. Aparecen en el curso del almacenamiento y pueden detectarse en los concentrados de plaquetas, en el plasma fresco y en los crioprecipitados. Al igual que las plaquetas intactas, las micropartículas poseen actividad procoagulante, se adhieren al subendotelio e incrementan la adhesión plaquetaria. Todas estas propiedades las hacen buenas candidatas para investigar sus posibilidades como sustitutas de las plaquetas convencionales²⁵.

Las primeras preparaciones de micropartículas no resultaron efectivas desde el punto de vista hemostático e, incluso, producían un estrés importante en los animales a los que eran perfundidas por vía intravenosa. Posteriormente, una nueva preparación se demostró útil en conejos trombocitopénicos sin morbilidad importante asociada.

Más recientemente, una preparación a base de pequeñas micropartículas ($< 1\ \mu\text{m}$ de diámetro) ha sido desarrollada con el nombre de "membranas plaquetarias infundibles" o IPM (CyplexR. Cypress Bioscience. San Diego, CA, USA)²⁶. Estas membranas se obtienen de plaquetas caducadas que tras ser centrifugadas para eliminar el plasma sobrenadante y otras células contaminantes, se lisan mediante un proceso de congelación/descongelación. Tras el lavado, la preparación se calienta a 60°C durante 20 min con la intención de inactivar algunos virus y, a continuación se procede a sonicar y centrifugar. Finalmente, el material se combina con sucrosa y albúmina y se liofiliza, convirtiéndose en un producto estable por un período de 2 años a 4°C .

Las IPM que se perfunden consisten en vesículas esféricas de un diámetro aproximado de $0.6\ \mu\text{m}$ compuestas de proteínas y fosfolípidos. La GPIb permanece y parece ser funcional, ya que la agrega-

ción inducida por ristocetina es factible; sin embargo, la integrina α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) no es detectable. También parecen contribuir a la actividad protrombinasa.

Se ha comprobado que *in vivo*, la administración de 2 mg/kg de IPM a conejos trombocitopénicos consigue acortar el tiempo de sangría durante un período mínimo de 6 h y un máximo de 24 h, sin que ello conlleve mayor riesgo de trombogenicidad o de instauración de un proceso de coagulación intravascular diseminada (CID).

En voluntarios sanos, la perfusión de IPM fue bien tolerada sin que se observaran anomalías en los valores bioquímicos o de coagulación²³. Tampoco se observó mayor inmunogenicidad en 15 voluntarios que recibieron dos dosis en un intervalo de 30 días, en muestras extraídas 57 días después de la última perfusión. En un estudio en fase I pudo comprobarse que 6 de los 8 pacientes que habían recibido de 3 a 6 mg/kg de IPM, experimentaron un acortamiento significativo del tiempo de sangría de 2 a 6 h después de la perfusión, pero el mismo efecto pudo observarse en dos pacientes que recibieron un placebo. En otro estudio aleatorizado en fase II, 31 pacientes con recuentos de plaquetas inferiores a $50 \times 10^9/l$ y con diátesis hemorrágica mucosa moderada recibieron una sola dosis de IPM (2-6 mg/kg), o bien plaquetas. El cese de la hemorragia, o una importante mejoría, pudo observarse en 17 de los 26 pacientes que recibieron IPM, pero también en 3 de los 5 que recibieron plaquetas.

Plaquetas liofilizadas

Los primeros y controvertidos trabajos sobre el uso de plaquetas liofilizadas datan de mediados de los años cincuenta en que aparecieron dos tipos de estudios, los que apoyaban la eficacia de esta nueva modalidad de plaquetas y los que no confirmaban su capacidad hemostática. A este lapso de más de 40 años le ha sucedido un nuevo período en el que han emergido nuevos preparados de plaquetas liofilizadas con resultados preclínicos alentadores.

En esta etapa las plaquetas se fijan con paraformaldehído y, posteriormente, se liofilizan a -20 °C o -40 °C durante 24 h. La fijación tiene un efecto virucida y bactericida. Al reconstituirlas muestran, a través de la microscopía electrónica, una estructura similar a las plaquetas frescas y una reducción moderada de la expresión de las glucoproteínas Ib, Ib/IX, IV y IIb/IIIa (integrina α IIb β 3) en la citometría de flujo. La densidad del receptor α IIb β 3 es un 42% del presente en las plaquetas frescas, por lo que sólo puede fijar un 23% de fibrinógeno marcado con I¹²⁵. Igualmente, los coágulos resultantes son más lábiles que los generados en presencia de plaquetas frescas, en correspondencia con la cantidad de fibrina producida dependiente del fibrinógeno previo fijado. Sin embargo, en otros preparados de características similares, la plaquetas no fueron capaces de inducir la

retracción del coágulo, respondían a la acción de la ristocetina, pero no agregaban por estímulo de ADP o colágeno y sólo participaban del proceso de agregación cuando se añadían plaquetas frescas²³.

Las membranas de plaquetas liofilizadas reconstituidas son capaces de soportar la generación de trombina y aumentar el depósito de fibrina sobre el subendotelio expuesto. Además, son capaces de adherirse a este endotelio, aunque con menos pseudópodos y menos extensión de la pared vascular que las plaquetas frescas. Su actividad metabólica también parece conservada como prueba el moderado incremento de los marcadores de activación presentes en las plaquetas circulantes no adheridas y por su capacidad de síntesis de tromboxano B₂. El conjunto de observaciones apoya la viabilidad de este derivado plaquetario.

Los afectados *in vivo* han sido evaluados en perros, ratas y conejos. La perfusión en dos ratas trombocitopénicas se acompañó de un acortamiento del tiempo de sangría. En una serie más larga de conejos trombocitopénicos, la perfusión de $40-50 \times 10^9/l$ plaquetas liofilizadas acortó el tiempo de sangría medio de más de 900 a 234 seg, mientras que con plaquetas frescas se alcanzaron los 177 seg. En perros, las plaquetas liofilizadas consiguieron corregir el tiempo de sangría prolongado a través de la yugular, asociado a *by-pass* cardiopulmonar, en un modelo canino en el que se simulaba una cirugía a corazón abierto²³.

Plaquetas producidas *in vitro*

Se han producido *in vitro* plaquetas capaces de agregar a partir de progenitores megacariocíticos aislados por leucoféresis. Sin embargo no se han efectuado pruebas que demuestren si las plaquetas producidas a partir de progenitores autólogos pueden ser eficaces en los pacientes trombocitopénicos aloinmunizados²⁷.

Sustitutos de las plaquetas

Hematíes con fibrinógeno o péptidos RGD unidos a su superficie

1. *Agregación de las plaquetas con células o esferas inertes portadoras de péptidos RGD en su superficie.* La observación de que las plaquetas aglutinan con esferas inertes cubiertas de fibrinógeno fue publicada por Coller en 1980. Estas esferas eran capaces de aglutinar espontáneamente a las plaquetas humanas en ausencia de agonistas, pero la interacción aumentaba sensiblemente en presencia de ADP o adrenalina. El efecto no era posible cuando las esferas estaban recubiertas de albúmina²⁸.

2. *Hematíes portadores de fibrinógeno unido a su superficie.* El uso de hematíes como célula candidata a sustituir a las plaquetas plantea ventajas e inconvenientes. La presencia de la membrana del hematíe en la hemostasia primaria puede proveer una superficie adicional para que se produzca la coagulación

sanguínea. De hecho, se sabe que micropartículas procedentes de la membrana del hematíe son capaces de desarrollar actividad procoagulante. Sin embargo el tamaño del hematíe puede acarrear una teórica desventaja. Normalmente, cuando la sangre circula a través de un vaso, que no sea un capilar, los elementos celulares se distribuyen de acuerdo con un gradiente en el que la concentración de hematíes aumenta a medida que nos acercamos a la luz del vaso y disminuye a medida que nos acercamos a la pared del mismo. Por este mismo motivo, las plaquetas son empujadas hacia la pared, lo que facilita la función para la que están previstas. Teóricamente, si las propiedades reológicas de los hematíes candidatos a sustituir a las plaquetas son idénticas a las de los hematíes convencionales, la accesibilidad de los sustitutos a la pared vascular puede verse mermada en virtud del gradiente radial²⁹.

Agam and Livne examinaron la utilidad de los hematíes autólogos con fibrinógeno fijado de forma covalente como agente hemostático en la trombocitopenia. En los experimentos se emplearon hematíes humanos y de rata a los que se fijó fibrinógeno hasta conseguir una densidad equivalente a 50-1.400 moléculas/hematíe. El tiempo de sangría en la cola en las ratas trombocitopénicas se acortó de un promedio de 18 a 4,5 min, 1 h después de la administración de 1×10^9 hematíes recubiertos de fibrinógeno. La duración del efecto fue superior a la conseguida con la perfusión de plaquetas frescas de rata. El efecto ya era detectable empleando las preparaciones de hematíes recubiertos con tan sólo 58 moléculas/célula³⁰.

3. *Hematíes recubiertos de péptidos RGD*. Se han efectuado diversos experimentos en los que los hematíes empleados se han recubierto de péptidos conteniendo la secuencia RGD. La unión de los mismos a la superficie del hematíe se ha efectuado a través de la glicoforina A, y el término tromboeritrocito se ha acuñado para definir a este nuevo sustituto plaquetario³¹.

Los tromboeritrocitos facilitan la agregación inducida por ADP y coagregan las plaquetas expuestas a ADP. Estos efectos pueden inhibirse con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los receptores α IIb- β III de las plaquetas activadas. La fragilidad osmótica y la deformabilidad de los eritrocitos es comparable a la de los hematíes control. En un estudio preliminar de la eficacia *in vivo* de este sustituto se observó que los tromboeritrocitos eran capaces de acortar el tiempo de hemorragia de los cerdos tratados, pero en cambio, la perfusión de una solución de tromboeritrocitos al 2% no consiguió acortar el tiempo de sangría en los primates²⁴.

Microcápsulas/microesferas de albúmina recubiertas de fibrinógeno

Actualmente existen dos preparaciones distintas de microcápsulas que se están evaluando en fase

preclínica. Los SynthocytesTM (Andaris, Nottingham, UK) son similares a las microcápsulas de albúmina que se han desarrollado para su uso como agente de contraste en ultrasonidos. En los Synthocytes, el fibrinógeno es inmovilizado sobre la superficie bajo condiciones iónicas y de pH controladas hasta conseguir un nivel de fibrinógeno que representa menos del 2% del total de proteínas de las microcápsulas. El diámetro medio es de 3,5-4,5 μ m con menos de un 2% de las que tienen un diámetro $> 6 \mu$ m³².

En un modelo de conejo trombocitopénico, la perfusión de un bolo de 1,5 o $0,75 \times 10^9$ microcápsulas de Andaris/kg acortó el tiempo de sangría de un promedio de 21,7 a 5,2 min, 15 min después de la perfusión. Igualmente, las microvesículas consiguieron reducir las pérdidas sanguíneas a través de una herida quirúrgica estándar de la pared abdominal. El efecto hemostático permaneció durante un período máximo de 8 h. No se observó trombogenicidad empleando un modelo de conejo con trombosis de la vena yugular, ni tampoco toxicidad cardiopulmonar en los estudios efectuados con una sola dosis.

Resultados similares se han observado con ThrombospheresTM (Hemophere, Irvine, CA, USA) que consisten en microcápsulas de 1,2 μ m de diámetro. También acortan el tiempo de sangría de los conejos trombocitopénicos, pero, en este caso, durante un período más amplio de hasta 72 h. En conejos normales no acortan la supervivencia plaquetaria y tampoco inducen trombogenicidad³³.

Agentes hemostáticos basados en los liposomas

Se han desarrollado dos tipos de agentes hemostáticos, el primero consiste en liposomas recubiertos con determinadas glucoproteínas de membrana para simular una plaqueta artificial (sin actividad metabólica), y el segundo se basa en la perfusión de liposomas procoagulantes junto con factor Xa.

1. *Plaquetosomas*. La idea de unir las glucoproteínas de membrana a vesículas lipídicas data de hace más de 10 años. Estos modelos fueron diseñados para poder estudiar la organización de las glucoproteínas sobre la membrana plaquetaria y el papel de cada una de ellas en la agregación de las plaquetas. Un sustituto basado en los liposomas, al que se denominó "plaquetosoma" fue evaluado por Rybak y Renzulli (34). Un extracto de la membrana conteniendo hasta 15 proteínas se unió a vesículas lipídicas unilamelares de esfingomielina, fosfatidilcolina, monosialilgangliósido, o fosfátida de huevo. Estos plaquetosomas no demostraron capacidad de agregación de las plaquetas *in vitro*, sin embargo sí que fueron capaces de reducir las pérdidas sanguíneas de la cola de ratas trombocitopénicas. El mismo efecto se observó en ratas afectas de un déficit de gránulos densos. No se observaron complicaciones trombóticas ni coagulopatía de consumo. En otro estudio más reciente empleando liposomas recubiertos de fragmentos re-

combinantes de GPIb o anticuerpos anticolágeno se observó que se adherían al colágeno o al factor de von Willebrand. Hasta el momento no se han efectuado experimentos *in vivo* en humanos³⁵.

2. *Factor Xa con vesículas fosfolípidicas*. Se ha observado que la perfusión de una combinación de factor Xa y vesículas de fosfatidilcolina/fosfatidilserina consigue normalizar el coágulo hemostático y el tiempo de sangría en la cutícula de perros hemofílicos. Sin embargo el efecto resultó mínimo cuando se perfundieron a ratas con déficit de gránulos densos³⁶. Además, se ha observado que esta combinación conlleva un grado de toxicidad inaceptable. Recientemente, se han evaluado preparaciones de fosfolípidos sintéticos sin factor Xa que parecen favorecer el depósito de fibrina sobre el subendotelio en situación de trombocitopenia de un modelo de Baumgartner³⁷. No se dispone, por el momento, de resultados obtenidos *in vivo*.

Bibliografía

- Spiess BD. Oxygen carriers. What is behind us? What is ahead? *TATM* 1999; 4: 27-33.
- Winslow RM. Blood substitutes, refocusing an elusive goal. *Br J Haematol* 2000; 111 (2): 387-396.
- Vandegriff KD. Haemoglobin-based oxygen carriers. *Exp Opin Invest Drugs* 2000; 9 (9): 1967-1984.
- Stowell CP, Levin J, Spiess BD, Winslow RM. Progress in the development of RBC substitutes. *Transfusion* 2001; 41: 287-299.
- Chatterjee R, Welty E, Walder R, Pruitt S, Rogers P, Amoné A. Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative crosslinked between α chains (Lysine 99 α 1-Lysine 99 α 2). *J Biol Chem* 1986; 261: 9929-9937.
- Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MNRG. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. A randomized controlled efficacy trial. *J Am Med Assoc* 1999; 282: 1857-1864.
- Looker D, Abbot D, Cozart P, Durfee S, Hoffman S, Matthews A. A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* 1992; 356: 258-260.
- Gould S, Sehgal L, Sehgal H, Moss G. The development of hemoglobin solutions as red cell substitutes, hemoglobin solutions. *Transf Science* 1995; 16: 5-17.
- Feola M, Gonzalez H, Canizaro P, Bingham D, Periman P. Development of a bovine stroma-free hemoglobin solution as a blood substitute. *Surg Gynecol Obstet* 1983; 157: 399-408.
- Mullon J, Giacoppe G, Clagett C, McCune D, Dillard T. Transfusions of polymerized bovine hemoglobin in a patient with severe autoimmune hemolytic anemia. *N Engl J Med* 2000; 342: 1638-1643.
- Industry News. AABB. April 13, 2001.
- Hsia J, Song D, Er S, Wong L, Keipert P, Gómez C et al. Pharmacokinetic studies in the rat on a α -raffinose polymerized hemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immob Biotechnol* 1992; 20: 587-595.
- Iwasaki K, Ajsaka K, Iwashita Y. Modification of human hemoglobin with polyoxyethylene glycol, a new candidate for blood substitutes. *Biochem Biophys Com* 1980; 97: 1976-1981.
- Dechallerie E, Bonneaux F, Labrude P, Vigneron C. Modification of human hemoglobin by covalent association with soluble dextran. *Biochim Biophys Acta* 1983; 749: 106-114.
- Page TC, Light WR, McKay CB, Hellums JD. Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an *in vitro* capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvasc Res* 1998; 55: 54-64.
- Naito R, Yokohama K. An improved perfluorodecalin emulsion. En: Jamieson GA, Greenwalt TJ, eds. *Blood substitutes and plasma expanders*. Nueva York: Alan R Liss, 1978: 81-89.
- Gould SA, Rosen A, Sehgal L. Fluosol-DA as a red-cell substitute in acute anemia. *N Engl J Med* 1986; 314: 1653-1656.
- Wahr JA, Trouwborst A, Spence RK. A pilot study of the effects of perflubron emulsion, AF0104, on mixed venous oxygen tension in anesthetized surgical patients. *Anesth Analg* 1996; 82: 103-107.
- Melaragno AJ, Carciaro R, Feingold H, Talarico L, Weitraub L, Valeri CR. Cryopreservation of human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80 °C. *Vox Sang* 1985; 49: 245-258.
- Currie LM, Lichtiger B, Livesey SA, Tansey W, Yang DJ, Connor J. Enhanced circulatory parameters of human platelets cryopreserved with second-messenger effectors: An *in vivo* study of 16 volunteer platelet donors. *Br J Haematol* 1999; 105: 826-831.
- Reid TJ, Gao D. Symposium on cryopreservation of human platelets: an overview. *Criobiology* 1999; 38: 177-179.
- Vostal JG, Mondoro TH. Liquid cold storage of platelets: a revitalized possible alternative for limiting bacterial contamination of platelet products. *Transfus Med Rev* 1997; 11: 286-295.
- Lee DH, Blajchman MA. Platelet substitutes and novel platelet products. *Exp Opin Invest Drugs* 2000; 9: 457-469.
- Corash L. Inactivation of viruses, bacteria, protozoa and leukocytes in platelet concentrates. Current research perspectives. *Transf Med Rev* 1999; 13: 18-30.
- Owens M. The role of platelet microparticles in hemostasis. *Transf Med Rev* 1994; 8: 37-44.
- Chao FC, Kim BK, Houranieh AM. Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelets. *Transfusion* 1996; 36: 536-542.
- Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Horkhol AC, Hunt P. Platelets generated *in vitro* from proplatelet displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995; 85: 402-413.
- Coller BS. Interaction of normal, thrombasthenic, and Bernard-Doulier platelets with immobilized fibrinogen: defective platelet-fibrinogen interaction in thrombasthenia. *Blood* 1980; 55: 169-178.
- Weiss HJ. Flow-related platelet deposition on subendothelium. *Thromb Haemost* 1995; 74: 117-122.
- Agam G, Livine AA. Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 105-112.
- Coller BS, Springer KT, Beer JH. Thromboerythrocytes: *in vitro* studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* 1992; 89: 564-565.
- Levi M, Friedrich PW, Middleton S. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nature Med* 1999; 5: 107-111.
- Yen RCK, Ho TWC, Blajchman MA. A new hemostatic agent: thrombospheres shorten the bleeding time in thrombocytopenic rabbits. *Thromb Haemost* 1995; 73 (Suppl): 986.
- Rybak ME, Renzulli LA. A liposome based platelet substitute, the plateletsome with hemostasis efficacy. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1993; 21: 101-118.
- Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Adhesion of liposomes carrying a recombinant fragment of platelet glycoproteins Ib or anti-collagen antibody to collagen surface under flow conditions. Approach to platelet substitutes. *Blood* 1998; 92 (Suppl 1): 346-347.
- Ni HY, Giles AR. Normalization of the haemostatic plugs of dogs with hemophilia A (Factor VIII deficiency) following the infusion of a combination of Factor Xa and phosphatidylcholine/phosphatidylserine vesicles. *Thromb Haemost* 1992; 67: 264-271.
- Galan AM, Hernández MR, Bozso J. Preparation of synthetic phospholipids promote procoagulant activity on damaged vessels: studies under flow conditions. *Transfusion* 1998; 38: 1004-1010.

PÚRPURA TROMBÓTICA TROMBOCITOPÉNICA FRENTE A SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

F. VELASCO¹, CH. LÓPEZ-PEDRERA², P.M. DOBADO-BERRIOS² Y A. TORRES¹

¹Servicio de Hematología. ²Unidad de Investigación. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Resumen

La patogenia de la PTT es muy compleja. Estudios recientes sugieren que una deficiencia, adquirida o hereditaria, de la actividad proteolítica sobre la molécula de FvW puede estar involucrada en la aparición de esta microangiopatía trombótica. Se desconoce si las formas secundarias de PTT se asocian igualmente a anomalías en el procesamiento del FvW.

La similitud clínica entre la PTT y el SUH dificulta un diagnóstico diferencial. El estudio de la molécula de FvW podría ser útil para distinguir ambas entidades, visto que la actividad proteolítica sobre este factor parece escasa o nula en la PTT y normal en el SUH.

La plasmaféresis es la opción terapéutica más aceptada. Sin embargo, se requieren más ensayos clínicos que definan algunas cuestiones, p. ej., el grupo de enfermos que se benefician de la plasmaféresis y/o del tratamiento con glucocorticoides, el tipo de hemoderivado a utilizar en el recambio plasmático (plasma fresco congelado o "cryosupernatant"), y la frecuencia y duración del recambio plasmático.

Introducción

La púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), descrita por Moschcowitz en 1924¹, es una forma diseminada de microangiopatía trombótica. El cuadro clínico clásico se caracteriza por la asociación de trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, signos neurológicos, disfunción renal y fiebre^{1,2}.

La agregación plaquetaria intravascular es el fenómeno responsable de la trombocitopenia, la disfunción renal y neurológica, y la hemólisis intravascular (al fragmentarse los hematíes en los capilares y arteriolas parcialmente ocluidos). Sustancias con capacidad agregante de las plaquetas, presentes en el suero o en el plasma de los pacientes, y daños al endotelio microvascular, como primera lesión, se consideran los principales componentes del mecanismo patogénico³.

La administración de plasma fresco congelado o combinado con plasmaféresis ha cambiado sustancialmente la historia de esta enfermedad. Actualmente, estos tratamientos permiten que la mayoría de los pacientes sobrevivan al episodio agudo y se recuperen sin secuelas⁴.

El síndrome urémico hemolítico (SUH), descrito por Gasser en 1955, es una enfermedad que se ha

considerado muy similar a la PTT⁵. En la práctica clínica diaria, el término PTT se utiliza para distinguir casos de microangiopatía trombótica y síntomas neurológicos en pacientes adultos, mientras que los casos infantiles con un predominio de la disfunción renal, el SUH. Sin embargo, esta distinción no es absoluta, razón por la cual algunos autores recomiendan el término PTT/SUH, que alude a dos entidades con un mecanismo patogénico común pero con distinta predilección orgánica.

Espectro clínico de la PTT

La forma clínica clásica de la PTT se presenta en un 50-75% de los casos. En el resto, la microangiopatía es secundaria a una complicación médica subyacente. Las condiciones que con más frecuencia se complican con la aparición de una PTT son las patologías infecciosas (p. ej., por el virus de inmunodeficiencia humana, VIH), las neoplasias diseminadas, las enfermedades autoinmunes, el trasplante de progenitores hematopoyéticos y el tratamiento con ciertos fármacos antineoplásicos (p. ej., mitomicina C) y fármacos (p. ej., ciclosporina A, cinina, FK506 y ticlopidina). Mención especial merecen las formas infantiles de SUH precedidas por una gastroenteritis causada por *Escherichia coli* 0157:H7. Es preciso comprobar si los mecanismos patogénicos de estas formas de PTT secundaria son similares al descrito para la forma clásica de la enfermedad⁶.

Patogenia

Histológicamente, la PTT se caracteriza por la presencia de agregados plaquetarios, depósitos de factor von Willebrand (FvW) y fibrina en la microcirculación, y signos visibles de lesión endotelial.

Lesiones endoteliales debidas a un estrés oxidante, disminución de la producción de prostaciclina por las células endoteliales, y disfunciones en la capacidad fibrinolítica global se han barajado como posibles mecanismos patogénicos de la PTT. Además, la presencia en pacientes con PTT activa de IgG dirigidas contra las células microvasculares y la glicoproteína IV (CD 36) de células vasculares y plaquetas ha sugerido la posibilidad de una etiología autoinmune. También se han propuesto mecanismos relacionados con la apoptosis, visto el efecto proapoptóti-

co del plasma de los enfermos con PTT en las células endoteliales, que se asocia con la expresión de Fas (CD 59)^{7,8}. Otros factores responsables de la agregación plaquetaria *in vivo* se han relacionado con ciertas proteínas plasmáticas (con pesos moleculares de 37 y 59 kDa) o con una calpaína.

Sin embargo, el hallazgo más relevante en la historia de esta enfermedad ha sido la observación de Moake et al, en 1982, de que el plasma de estos pacientes contiene multímeros extremadamente grandes de la molécula de FvW⁹.

PTT y proteólisis de la molécula de FvW

El FvW circula en el plasma como una proteína multimérica resultado de la unión de numerosos monómeros por puentes disulfuro. Debido al efecto de una proteasa plasmática, los multímeros circulantes son habitualmente más cortos que en el momento de ser producidos por las células endoteliales y los megacariocitos. Se impide así que multímeros extremadamente grandes puedan interactuar con las glucoproteínas plaquetarias Ib y IIb/IIIa e inducir la formación de agregados en presencia de Ca⁺⁺, ADP o un intenso flujo sanguíneo. La proteasa responsable de la rotura de los multímeros de FvW es diferente a otras proteasas conocidas. Tiene un peso molecular de 300 kDa y su actividad no es inhibida por inhibidores clásicos de las serín-proteasas o los reactivos sulfidrílicos¹⁰⁻¹².

En los pacientes con formas crónicas de PTT se ha observado la presencia de multímeros de FvW extremadamente largos. Estos, al permanecer desplegados en los sitios de alto flujo sanguíneo, podrían unirse a los receptores de la superficie plaquetaria y facilitar la formación patológica de agregados en la microcirculación. La presencia en el plasma de multímeros de FvW anormalmente largos podría resultar de una excesiva e incontrolada producción por parte de las células endoteliales, o bien, de un defecto en el procesamiento fisiológico de los mismos⁹. Los pacientes con un cuadro clínico de múltiples recaídas, afectación familiar y presencia de formas ultralargas de FvW en el plasma muestran además un déficit de su capacidad proteolítica. Los resultados sugieren que esta microangiopatía trombótica puede transmitirse de forma autosómica recesiva¹³.

En otros enfermos con PTT se ha encontrado una pérdida de la capacidad proteolítica sobre el FvW secundaria a la presencia de un inhibidor identificado como IgG. Estudios retrospectivos y multicéntricos de pacientes con formas adquiridas y familiares de PTT han confirmado la asociación entre esta patología y las anomalías en el procesamiento de la molécula de FvW^{14,15}. Por tanto, una deficiencia, adquirida o hereditaria, de la actividad proteolítica sobre el FvW podría ser uno de los mecanismos patogénicos de la PTT.

La PTT y el SUH presentan tal grado de similitud clínica que, la mayoría de las veces, resulta difícil esta-

blecer una clara distinción entre ambas entidades. Es usual encontrar PTT con síntomas renales y, viceversa, SUH con manifestaciones extrarenales. El análisis de la molécula de FvW podría ayudar a establecer diferencias diagnósticas. En este sentido, se ha observado que pacientes diagnosticados de PTT tienen poca o ninguna actividad proteolítica sobre el FvW, a diferencia de otros diagnosticados de SUH, donde esta actividad es normal¹⁵. Estos hallazgos pueden explicar la efectividad de la plasmaféresis en la PTT y los resultados discutibles de esta forma de terapia en el SUH.

Queda por demostrar si las microangiopatías consideradas secundarias, como las asociadas a fármacos, embarazo o malignidad, están relacionadas también con anomalías en el procesamiento de la molécula de FvW. En un estudio reciente de pacientes con microangiopatía trombótica secundaria al trasplante de progenitores hematopoyéticos se ha observado que la actividad proteolítica sobre el FvW es normal¹⁶.

Tratamiento

La plasmaféresis es la terapia más aceptada. Sin embargo, no existen ensayos clínicos que apoyen científicamente esta opción, con la excepción de un estudio que compara esta terapia con la infusión de plasma^{4,17,18}.

Sugerimos seguir el algoritmo de George¹⁹, que se ha representado en la figura 1. El tratamiento se inicia con la plasmaféresis diaria, sustituyendo el volumen plasmático con plasma fresco congelado o "cryosupernatant". Las respuestas obtenidas con esta terapéutica son muy variables, lo que refleja la heterogeneidad de la PTT. Los signos neurológicos y de hemólisis suelen experimentar una mejora rápida. Sin embargo, pueden ser necesarios varios días para obtener una recuperación en la trombocitopenia y la anemia. A veces, esta última puede requerir la administración de un concentrado de hematíes. El número de plaquetas puede ser el parámetro más fiable a la hora de tomar decisiones. Fallos en la recuperación de la trombocitopenia o una exacerbación de la enfermedad son indicadores que obligan a intensificar el volumen de plasma intercambiado y, además, a asociar al tratamiento la administración de corticosteroides.

No se dispone de parámetros que establezcan el momento de suspender el recambio plasmático. Por lo tanto, ésta es una decisión empírica. Disminuir progresivamente las sesiones hasta varias veces por semana parece la estrategia más utilizada por los distintos centros.

Otras modalidades terapéuticas recogidas en la literatura son la esplenectomía o el tratamiento con distintos fármacos (AAS, dipiridamol, vincristina, agentes inmunodepresores e inmunoglobulinas). La eficacia de estas opciones es discutible.

Finalmente, en los enfermos con una PTT secundaria, su manejo estará relacionado con la evolución de la condición subyacente.

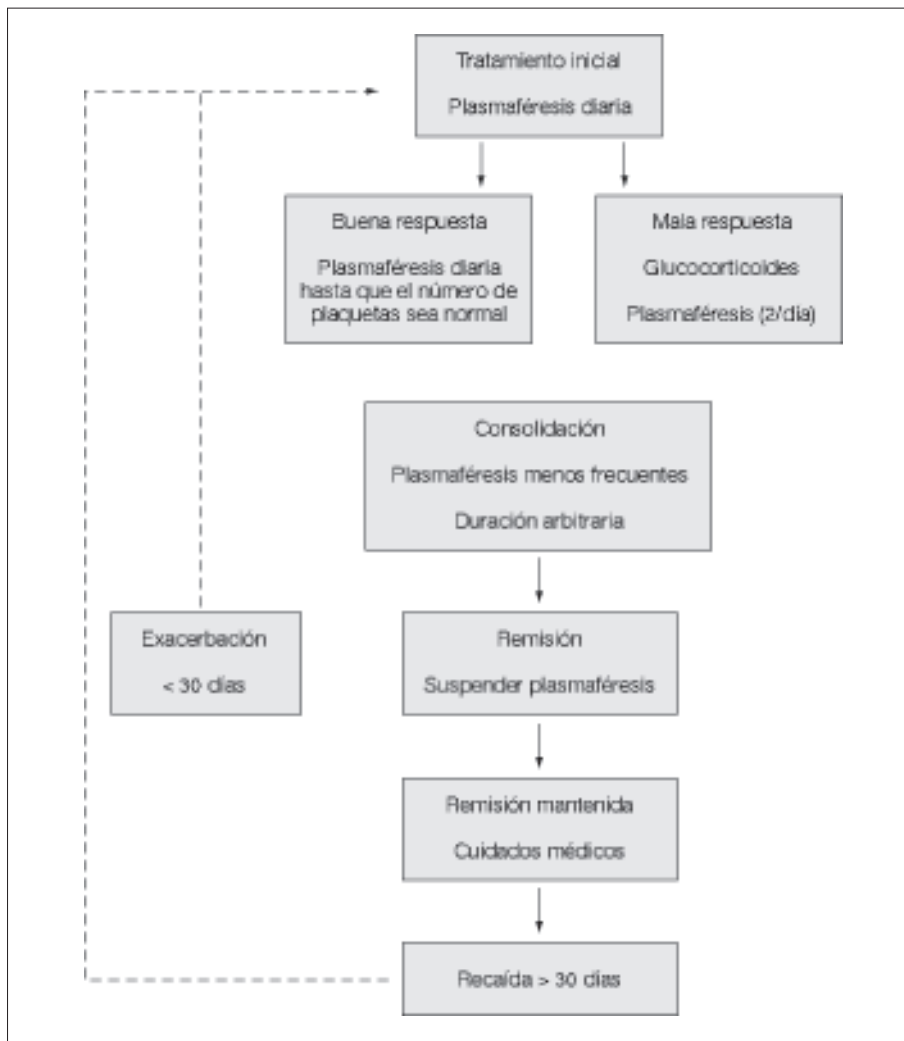


Figura 1. Algoritmo terapéutico de la púrpura trombótica trombocitopénica (modificado de George¹⁹).

Bibliografía

- Moschowitz E. Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. Proc NY Pathol Soc 1924; 24: 21-24.
- Ruggenti P, Remuzzi G. The pathophysiology and management of thrombotic thrombocytopenic purpura. Eur J Haematol 1996; 56: 191-194.
- Siddiqui FA, Lian ECY. Novel platelet-agglutinating protein from a thrombotic thrombocytopenic purpura plasma. J Clin Invest 1985; 76: 1330-1337.
- Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC et al and the Canadian Apheresis Study Group. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1991; 325: 393-397.
- Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. Hemolytic-uramic syndrome: Bilaterale Nierenrindennekrosen bei akut erworbenen hamolytischen Anamien. Schweiz Med Wochenschr 1995; 85: 905-909.
- Clines DB, Konkle BA, Furlan M. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a paradigm shift. Thromb Haemost 2000; 84: 528-535.
- Tandon NN, Rock G, Jamieson GA. Anti-CD 36 antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1994; 88: 816-825.
- Mitra D, Jaffe EA, Weksler B, Haijar KA, Soderland C, Laurence J. Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells. Blood 1997; 89: 1224-1234.
- Moake J, Rudy C, Troll J, Weinstein MJ, Colanino NM, Azocar J et al. Unusually large plasma factor VIII: Von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1982; 307: 1432-1435.
- Kelton JG, Moore JC, Warkentin TE, Hayward CP. Isolation and characterization of cysteine proteinase in thrombotic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1996; 93: 421-426.
- Furlan M, Robles R, Lammle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. Blood 1996; 87: 4223-4234.
- Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. Blood 1996; 87: 4235-4244.
- Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle BL. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 1997; 89: 3097-3103.
- Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lammle BL. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 1998; 91: 2839-2846.
- Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic syndrome. N Engl J Med 1998; 339: 1578-1584.
- Van der Plas RM, Schiphorst ME, Huizinga EG, Hené RJ, Verdonck LF, Sixma JJ et al. Von Willebrand factor proteolysis is deficient, but not in bone marrow transplantation-associated, thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 1999; 93: 3798-3802.
- Rock G, Shumak KH, Sutton DMC, Buskard NA, Nair RC, Group at-MotCA. Cryosupernatant as replacement fluid for plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1996; 94: 383-386.
- North American TTP Group, Ziegler Z, Gryn JF. Cryopoor plasma does not improve early response in primary adult thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) [abstract]. Blood 1998; 92: 707.
- George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Blood 2000; 96: 1223-1229.

NOVEDADES EN LOS MECANISMOS DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

M. PICÓ PASCUAL

Ciutat Sanitaria i Universitaria de la Vall d'Hebron. Barcelona.

Recuerdo de la fisiología

La formación de un tapón hemostático que impide la pérdida de sangre cuando se lesiona un vaso sanguíneo es el resultado final de una serie de reacciones llamada hemostasia.

Esta es un conjunto de sistemas extraordinariamente equilibrado. En condiciones fisiológicas, si estos sistemas funcionan correctamente, la sangre permanece en estado fluido en el árbol vascular aunque rápidamente coagula localmente en el lugar donde aparece una lesión. Cuando la función hemostática falla, puede producirse bien una hemorragia (por déficit de factores activadores de la coagulación), bien una trombosis (por déficit de inhibidores o agotamiento local de los mismos).

Dentro de este conjunto de sistemas equilibrado está incluida la función coagulativa, que conduce a la formación de fibrina y que está controlada por un sistema de inhibidores.

En la década de los sesenta, dos grupos (McFarlane y Ratnoff) propusieron la llamada cascada enzimática de la coagulación, que consistía en una secuencia de pasos en la cual la activación de un factor de la coagulación conducía a la activación de otro hasta entonces inactivo y así sucesivamente hasta llegar a la formación de trombina. Se pensó ya entonces que cada factor de la coagulación circulaba como una proenzima o zimógeno inactivo, el cual podía ser convertido en una enzima con actividad serinproteasa, mediante proteólisis limitada. Este modelo original se fue modificando con la observación de que algunos de estos factores se comportaban como cofactores y no poseían actividad enzimática. Y, además, se dividió la coagulación en dos sistemas, intrínseco y extrínseco.

La activación de la vía extrínseca comenzaría con la interacción del factor tisular (TF) y el FVII activo, mientras que en el inicio de la vía intrínseca se hallarían el llamado sistema de contacto y los factores antihemofílicos. Ambos sistemas activarían el factor X, el cual, acomplejándose con su cofactor, el factor V activo, convertiría la protrombina en trombina.

Esta división tradicional (útil por otra parte para la analítica en el laboratorio) no parece ocurrir en realidad *in vivo*, porque el complejo TF/factor VIIa es

un potente activador tanto del factor IX como del factor X¹.

El TF es una proteína transmembrana que está compuesta de una cadena polipeptídica y pertenece a la familia de receptores de citocinas. Contiene un corto dominio citoplasmático, un único dominio transmembrana y un dominio extracelular. Entra en contacto con los factores de coagulación plasmáticos cuando se lesiona el vaso (fibroblastos) o cuando es sintetizado por monocitos u otras células vasculares estimuladas por endotoxinas o citocinas como la interleucina 1 o el factor de necrosis tumoral, entre otros agentes.

Casi todos los factores de la coagulación se sintetizan en el hepatocito. De ellos, los factores II, VII, IX y X, que son las serinproteasas realmente importantes en la coagulación fisiológica (y también la proteína C y su cofactor la proteína S), necesitan la presencia de la vitamina K para su síntesis y se llaman por ello vitamina-K dependientes. Estos factores precisan una carboxilación de los residuos de ácido glutámico (Glu), que se transforman en carboxiglutámico (Gla), en una reacción en la que actúa como cofactor la vitamina K. Esta transformación les confiere una gran afinidad por los fosfolípidos a los que se unen mediante puentes de calcio. Por otra parte, los cofactores no enzimáticos, FV y FVIII, se hallan flotando en la propia membrana celular, actuando como "cunas" sobre las que se realizan las reacciones de activación. Debido a ello, todas las reacciones entre factores se realizan sobre membranas celulares (*in vivo*) o sobre micelas de fosfolípidos (*in vitro*)².

Tal como hemos dicho, la antiguamente llamada vía extrínseca o, más correctamente, vía del TF, constituye en condiciones fisiológicas el inicio de la coagulación.

El primer complejo en la cascada de la coagulación consta de dos elementos: una serinproteasa, factor VIIa, y un cofactor proteico, el TF. Dado que el TF es, como hemos dicho, una proteína que atraviesa la membrana celular, el complejo TF:VIIa, se forma en la superficie celular. El FVIIa libre es una enzima muy débil, pero una vez unido al TF es el activador más potente conocido de la coagulación sanguínea. Ya hemos mencionado que todas las se-

rinproteasas de la cascada de la coagulación (incluido el factor VII) circulan en el plasma como cimógenos inactivos. Asimismo la mayoría de cofactores proteicos también circulan como precursores inertes o procofactores. El TF es la única excepción: no requiere ninguna proteólisis para ser activo. La cuestión, durante muchos años, ha sido: ¿cómo puede iniciarse la coagulación a partir de una colección de precursores inactivos? La respuesta es que pequeñas cantidades de FVIIa están siempre presentes en la circulación. Las formas activas de la mayoría de las otras serinproteasas tienen una vida media extraordinariamente corta (segundos), porque el plasma contiene elevadas concentraciones de inhibidores específicos de las serinproteasas que las inactivan rápidamente.

El factor VIIa no sufre esta inhibición³. Cuando se inyecta FVIIa tanto a animales como a seres humanos, permanece en circulación aproximadamente 2 h⁴. Además, algunos estudios han demostrado que todos los individuos normales tienen FVIIa circulante, aunque sea en pequeñas cantidades: aproximadamente un 1 % de la concentración total de FVII⁵.

El factor tisular puede unirse bien al FVII, bien al FVIIa, en proporción 1:1 en la superficie celular (fig. 1).

Una vez unido al TF, el FVII se convierte por una proteólisis limitada en FVIIa⁶. Y, una vez formado el complejo TF:VIIa, la cascada de la coagulación puede seguir dos caminos: uno de ellos es la activación del factor IX; el otro camino es la activación directa del factor X. El FXa también es capaz de activar al FIX, acelerando el proceso de formación del FIXa.

El FIXa forma un segundo complejo con el FVIIIa y el FX (complejo X-asa), formando FXa de una forma cincuenta veces más eficiente que el que se forma con el complejo TF:VIIa:X.

El FXa, formado por cualquiera de las dos vías mencionadas, forma a su vez un complejo con el FVa y el FII o protrombina (complejo protrombinasa) para transformarla en su forma activa o trombina.

El complejo TF:VIIa:Xa, genera una pequeña cantidad de trombina suficiente, sin embargo, para producir una proteólisis parcial del FV y del FVIII, que aumenta en gran medida su función de cofactores, por lo que se habla de FVa y FVIIIa, aunque, en realidad, no se tratan de enzimas.

Cuando la sangre *in vitro* o *in vivo*, entra en contacto con superficies extrañas, se activa el llamado sistema de contacto, que conduce a la activación del FIX por otra serinproteasa, el FXIa. Hay una importante diferencia entre estos dos caminos de activación del FIX. La activación del FIX por el FXIa requiere únicamente la presencia de calcio iónico, mientras que, como ya hemos dicho, la activación del FIX por el VIIa requiere calcio y el cofactor pro-

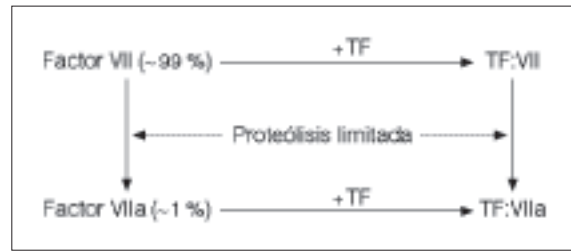


Figura 1. Activación del factor VII por el factor tisular.

teico factor tisular, embebido en la membrana celular (bicapa lipídica).

En condiciones fisiológicas, la activación del FXI se produce por trazas de trombina. La fase de contacto se inicia al ponerse en contacto el plasma con una superficie cargada electronegativamente, como fibras de colágeno, cristal o caolín. El FXII se activa parcialmente y actúa sobre la precalicreína, formando calicreína; ésta, junto con el cininógeno de alto peso molecular amplifica la activación del FXI para que se produzca FXIa⁷ (fig. 2).

En una última etapa, la trombina abandona la superficie celular para transformar el fibrinógeno en fibrina (fig. 3).

Todas las vías de activación descritas están reguladas por proteínas inhibitorias. Podemos distinguir, por una parte, las que inhiben serinproteasas, denominadas serpinas, de las cuales las principales son la antitrombina, el cofactor II de la heparina y el inhibidor de la proteína C activada. La inhibición de los cofactores no enzimáticos (FV y FVIII) corre a cargo de una serinproteasa, la proteína C, activada por la trombina en presencia de trombomodulina, y de su cofactor, la proteína S.

En la fase inicial de la coagulación fisiológica, el principal inhibidor es el inhibidor de la vía del TF (TFPI), que forma complejos con el FVII, el FX, y el TF.

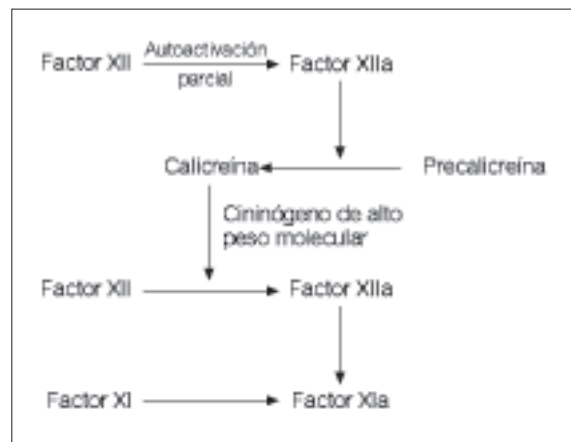


Figura 2. Activación del factor XI por el sistema de contacto.

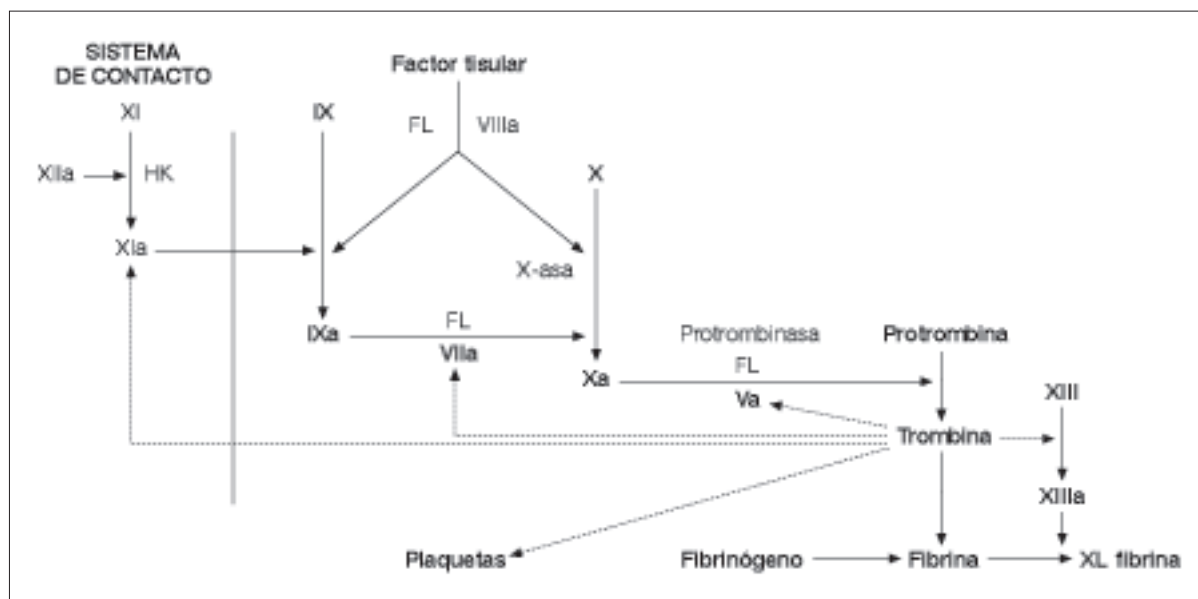


Figura 3. Esquema fisiológico de la coagulación.

Dentro de la fase de contacto, el principal inhibidor es el inhibidor de C1-esterasa.

El factor tisular (TF) y su inhibidor natural, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)

El conocimiento de que la vía del TF es el mecanismo más importante de la activación de la coagulación *in vivo*, ha producido una explosión de estudios en esta última década, que ha puesto de manifiesto el papel central del TF en algunas patologías trombóticas. Entre estos estudios se incluyen la coagulación intravascular diseminada (CID) inducida por sepsis, la trombosis arterial en la placa de aterosclerosis y también aquellos que, inhibiendo el TF en modelos animales, sugieren que esta vía podría ser un mediador importante en la hiperplasia de la íntima vascular.

Otros trabajos sugieren que el complejo TF:VIIa tiene un papel importante en la angiogénesis: hay una correlación entre la expresión del TF en las células tumorales con la capacidad de éstas de secretar factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Abe et al⁸ demostraron que el dominio citoplasmático del TF regula la producción del VEGF en las células tumorales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. Así, la relación entre la activación de la vía del TF y la expresión del VEGF podría suponer también una estrecha relación entre la coagulación y las citocinas inflamatorias con el crecimiento y las metástasis de los tumores malignos. Normalmente el TF no se expresa en la superficie de las células del endotelio vascular, pero estudios de hibridación *in situ*, han detectado TFARNm en las células tumorales de pacientes con cáncer de mama invasivo.

La vía del TF podría ser inhibida por agentes farmacológicos o biológicos. Algunos de ellos, ya for-

man parte de ensayos clínicos. Entre otros, los más interesantes son: la inhibición de su transcripción genética por la curcumina (diferulolymetano), con conocidas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias; la inhibición de la unión del VII/VIIa al TF, por anticuerpos humanizados (D₃ y D₃H₄₄); el bloqueo de la activación del FVII a FVIIa y la inhibición directa del FVIIa. A la vista de todo ello, parece razonable pensar que entramos en una era de nuevos inhibidores del TF que aumentarán el arsenal terapéutico para la enfermedad cardiovascular y, posiblemente, para la sepsis y el cáncer⁹.

Como hemos dicho, la vía del TF está regulada, fisiológicamente, por un potente inhibidor llamado TFPI. Es una proteína que contiene 276 aminoácidos y es sintetizada por el endotelio vascular mayoritariamente. Ha sido detectada en cuatro "pools" intravasculares: unido a la superficie del endotelio vascular, asociado con las lipoproteínas (la mayor parte del TFPI circulante), libre en el plasma y secuestrado en las plaquetas. La molécula del TFPI contiene tres dominios tipo Kunitz. Girard et al demostraron que el segundo dominio es necesario para una unión e inhibición eficaz del FXa y los dominios 1 y 2 son necesarios para la inhibición de la actividad TF:VIIa. El tercer dominio no tiene estas funciones, pero se une a la superficie celular por interacción con los glucosaminoglucanos. La administración de heparina libera al TFPI unido a la superficie de la célula y eleva sus niveles en plasma.

Se han realizado estudios genéticos para investigar si mutaciones de la proteína estaban relacionadas con historia de enfermedad tromboembólica. Kleesiek et al, en 1999, descubrieron una sustitución en el exón 7, 536 C-T, que producía un cambio de pro-

lina a leucina y que la prevalencia de heterocigotos, para esta mutación, en donantes de sangre en Alemania estaba alrededor del 0,2%. También hallaron que cuatro personas no relacionadas de 14 portadores de esta variante, habían sufrido trombosis venosas, apareciendo, pues, esta mutación como un factor de riesgo relativo. No se ha observado la asociación de otras mutaciones o polimorfismos con aumento del riesgo trombótico.

Hemos mencionado el papel del TF en la sepsis. Un trabajo reciente demuestra que los pacientes con sepsis meningocócica, muestran un descenso del TFPI, tanto si medimos la actividad plasmática como el antígeno, en fases tempranas de la enfermedad. Hay un incremento del TFPI en orina, sugiriendo que la pérdida por orina (y por el espacio extravascular) es parcialmente responsable del descenso de los niveles plasmáticos. El descenso del TFPI puede contribuir a la tendencia trombótica (CID) inducida por el factor tisular¹⁰. La administración de TFPI, del que está disponible una forma recombinante, ha mostrado, en la sepsis grave, tanto a nivel experimental como en seres humanos, una tendencia a reducir las alteraciones de la coagulación y la mortalidad, estando actualmente en marcha un estudio en fase III.

En cuanto a que, al parecer, el complejo TF:VIIa tiene un papel en la proliferación patológica de las células endoteliales, Hembrough et al quisieron averiguar si el TFPI era capaz de regular este proceso. Su último estudio ha demostrado que el TFPI es un potente inhibidor del crecimiento de células endoteliales estimuladas por el factor de crecimiento de los fibroblastos, y que esta actividad antiproliferativa es independiente de su acción inhibidora sobre el complejo TF:VIIa, pero no de su asociación con el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Proteína Z

La proteína Z (PZ) que fue identificada inicialmente en el plasma bovino en 1977 y aislada del plasma humano en 1984, es una proteína plasmática vitamina-K dependiente, que forma un complejo calcio dependiente con el FXa en las superficies fosfolípicas. Esta unión incrementa de forma importante la inhibición del FXa por la serpina denominada PZI (inhibidor dependiente de la proteína Z). Por lo tanto, la PZ es el cofactor para el PZI. El PZI es una glucoproteína de una sola cadena que pertenece a la familia de las serpinas, el cual, en presencia de PZ, calcio iónico y fosfolípidos, inhibe rápidamente (menos de 15 seg) al FXa. El PZI inhibe también al FXIa y no necesita para ello PZ, fosfolípidos o calcio iónico¹¹. Un hecho que puede tener relevancia es que los monos sin PZ son fenotípicamente normales, pero el déficit de PZ incrementa, en ellos, el fenotipo protrombótico del factor V de Leiden¹².

Sistema de contacto

El factor XII, el factor XI, la precalicreína, el cininógeno de alto peso molecular y C1-inhibidor son las proteínas del sistema contacto, el cual, como hemos dicho, no sería importante en condiciones fisiológicas para el inicio de la coagulación. De hecho, los déficit del FXII, precalicreína y cininógeno no se han asociado nunca con diátesis hemorrágica. Sin embargo, el sistema de contacto desempeña un papel importante en el crecimiento y mantenimiento del coágulo. Es conocido que el déficit de FXI, que ya hemos visto que puede activarse independientemente de las otras proteínas del sistema contacto, sí puede producir cuadros hemorrágicos, en ocasiones severos.

En condiciones fisiológicas, las principales funciones del sistema contacto son antitrombóticas, profibrinolíticas, antiadhesivas y proinflamatorias.

La observación de que el cininógeno de alto peso molecular (HK), controla la unión de la trombina a las plaquetas, parece ponerse de manifiesto en un paciente con déficit severo de esta proteína, sometido a un *bypass* cardiopulmonar, en el cual la cifra de plaquetas sólo descendió ligeramente. Esto parece sugerir que el descenso significativo de la cifra de plaquetas en este tipo de cirugía cardíaca, es debido a la unión de la trombina a las plaquetas y a la consiguiente activación de las mismas.

La inhibición de la activación plaquetaria inducida por la trombina puede producirse por varios mecanismos. Uno de ellos sería la inhibición de la calpaína plaquetaria, externalizada en la membrana de la plaqueta tras la activación de las mismas. La calpaína puede agregar las plaquetas por clivaje del receptor para el ADP, que expone el receptor para el fibrinógeno. Así pues, la inhibición de la calpaína plaquetaria impediría la unión de las plaquetas entre sí, a través de los puentes de fibrinógeno y, por tanto, la agregación plaquetaria. Otro mecanismo importante es que el HK bloquea la unión de la trombina al complejo glucoproteico GPIb-IX-V de la plaqueta, compitiendo por los lugares de unión. Recientemente, los mismos autores que han descrito dicho mecanismo, han demostrado que también el FXIIa, pero no el FXII, se une al complejo GPIb-IX-V e inhibe la agregación plaquetaria inducida por la trombina, pero el lugar de unión no es idéntico al del HK, ya que anticuerpos dirigidos contra la GPIb y la GPIX, que inhiben la unión del HK a las plaquetas, no bloquean la unión del FXIIa¹³.

TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina)

La coagulación y la fibrinólisis son frecuentemente consideradas como entidades separadas, a pesar de la conexión existente entre ambos sistemas: el sistema coagulativo produce fibrina, que es el sustrato para el sistema fibrinolítico¹⁴. Esta conexión se ha visto aún más reforzada por el hecho de que la trom-

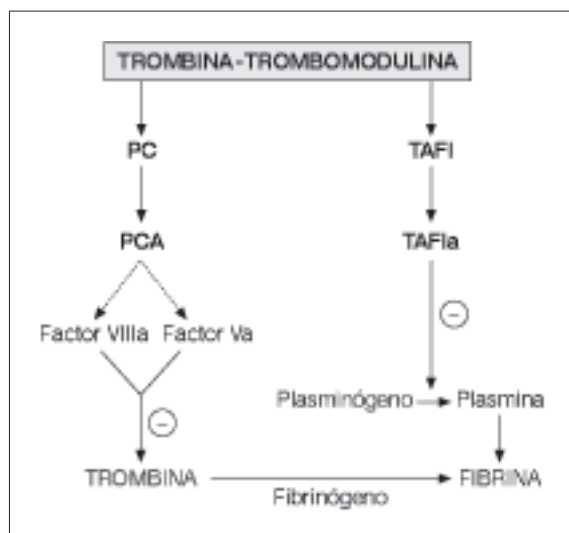


Figura 4. Influencia del sistema trombina-trombomodulina sobre la coagulación y la fibrinólisis.

bina es capaz de generar un inhibidor de la fibrinólisis, llamado TAFI. El TAFI, o procarboxipeptidasa-B plasmática, es una molécula de una sola cadena de 60 kDa de peso molecular. La trombina activa al zimógeno inactivo y lo transforma en TAFIa. El TAFIa inhibe la fibrinólisis mediante una proteólisis de residuos arginina y lisina de la región carboxiterminal de la fibrina. Estos residuos son esenciales para la unión y activación del plasminógeno en la superficie de la fibrina.

La trombina tiene muchas interacciones con otras moléculas y de ellas es muy importante su interacción con la trombomodulina. La unión trombina-trombomodulina activa la proteína C que, como es sabido, es una importante vía anticoagulante. La observación de que la trombomodulina incrementa de forma importante la activación del TAFI, es sugestiva de que el complejo trombina-trombomodulina es el activador fisiológico de esta procarboxipeptidasa. El balance entre estas actividades es esencial para la hemostasia local, y la concentración local de trombomodulina desempeña un papel principal¹⁵ (fig. 4).

El hallazgo de que, en mujeres que usan contraceptivos orales, en mujeres menopáusicas y en pacientes que han sufrido una trombosis venosa profunda, el nivel de TAFI es más alto de lo normal, sugiere que este hecho podría ser un factor de riesgo moderado para la trombosis venosa. En este sen-

tido, en un estudio reciente¹⁶, se hallaron niveles altos de TAFI en el 9% de controles normales y en el 14% de pacientes con su primer episodio de trombosis venosa. Éstos no incrementan el riesgo asociado con el factor V de Leiden, pero pueden interactuar con niveles elevados de FVIII. Se han encontrado también niveles elevados de TAFI en la angina inestable.

Por otra parte, en pacientes con leucosis aguda promielocítica, que cursa con una hiperfibrinólisis, los niveles de su actividad descienden a un 60%.

El proceso coagulativo, todavía sólo parcialmente conocido, ofrece numerosos puntos calientes en los que se centra actualmente la investigación. En este texto hemos tratado solamente de mostrar algunos de ellos que nos pueden ayudar a entender mejor los mecanismos fisiológicos y patológicos de dicho proceso.

Bibliografía

- Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5260-5264.
- Mann KC. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 165-174.
- Kondo S, Kiesel W. Regulation of FVIIa in plasma: evidence that antithrombin III is the sole plasma proteinase inhibitor of human FVIIa. *Thromb Res* 1987; 46: 325-335.
- Seligsohn U, Kasper CK, Osterud B, Rapaport SI. Activated factor VII: presence in factor IX concentrate and persistence in the circulation after infusion. *Blood* 1978; 53: 828-832.
- Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting FVII activation. *Blood* 1993; 81: 734-744.
- Nemerson Y, Repke D. Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb Res* 1985; 40: 351-358.
- Colman RW, Shmainer AM. Contact system. A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90: 3819-3843.
- Abe K, Shoji M, Hem C, Bierhaus A. Regulation of vascular endothelial growth factor production by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8663-8668.
- Key NS, Bach RR. Tissue factor as a therapeutic target. *Thromb Haemost* 2001; 85: 375-376.
- Eling M, Stephens AC, Oragui EE, Rivers RPA, Levis M. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) level in the plasma and urine of children with meningococcal disease. *Thromb Haemost* 2001; 85: 240-244.
- Tabatabai A, Fiehler RR, Broze G. Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 85: 655-660.
- Yin ZF, Huang ZT, Cui J, Fiehler R, Lasky N, Ginsberg D, Broze G. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 6734-6738.
- Bradford HN, Pixley RA, Colman RW. Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 2000; 275 (30): 22756-22763.
- Booth NA. TAFI meets the sticky ends. *Thromb Haemost* 2000; 85: 1-2.
- Mosnier CO, Meijers JCM, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost* 2001; 85: 5-11.
- Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000; 95: 2855-2859.

TROMBOSIS MEDIADA POR ANTICUERPOS

J. ORDI-ROS Y J. CORTÉS HERNÁNDEZ

Medicina Interna. Laboratorio de Investigación en Enfermedades Sistémicas Autoinmunes. Hospital Universitario Vall D'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona.

Introducción

La trombosis venosa o arterial es una manifestación clínica que pueden presentar alrededor del 10% de la población general, pero en la mayoría de los casos la etiología sigue siendo desconocida. Los estudios encaminados a buscar la causa de las mismas sólo han sido capaces de encontrar uno o varios factores en alrededor del 15% de las mismas. No obstante, en las últimas tres décadas ha aumentado mucho las posibilidades de conocer la etiología de las trombosis y esto significa un tratamiento terapéutico y de profilaxis de trombosis secundaria, más adecuado, en los llamados casos de hipercoagulabilidad primaria.

En las últimas tres décadas hemos descubierto una clara relación entre la predisposición a sufrir trombosis en personas con déficit congénitos de algunos de los inhibidores fisiológicos de la coagulación sanguínea que se conocen. La existencia de factores epidemiológicos tales como el traumatismo, la inmovilización, la arteriosclerosis, el síndrome nefrótico, la coexistencia de algún tipo de cáncer como los adenocarcinomas o la ingesta de anticonceptivos orales, son otros factores claramente relacionados con una predisposición a sufrir fenómenos trombóticos.

El concepto de la trombosis como consecuencia de un fenómeno inmune y, en particular, que algunos anticuerpos circulantes estaban implicados en la etiopatogenia de las trombosis es un concepto relativamente nuevo y aceptado por algunos autores^{1,2}. El anticoagulante lúpico (AL) y más tarde los anticuerpos anticardiolipina (aCl) de forma casi unánime, en múltiples estudios, se han relacionado con manifestaciones trombóticas venosas y/o arteriales. En la actualidad el AL y/o los aCl, ambos conocidos como anticuerpos antifosfolípido (aFl), significan el marcador adquirido más frecuente de trombosis que se conoce³. Los conocimientos actuales demuestran que estos anticuerpos son no sólo un marcador de trombosis, sino que contribuyen directamente al desarrollo de las mismas. Otros anticuerpos contra las plaquetas inducidos por la heparina, o contra el factor von Willebrand (FvW), el activador tisular del plasminógeno (aTPI), la trombomodulina, la proteína S (PS) o la proteína C

(PC) han sido implicados en la etiopatogenia inmune de las trombosis.

El concepto de la autoinmunidad, como un mecanismo de trombosis, puede ser importante, en el estudio, diagnóstico y tratamiento de las trombosis. El empleo de la metodología aplicada a la inmunología nos puede ayudar a demostrar la existencia de nuevos anticuerpos implicados en la patogenia de las trombosis y, así mismo, el enfoque terapéutico ante las trombosis puede cambiar. Así, aparte del clásico tratamiento anticoagulante con heparina o anticoagulantes orales, se puede aplicar tratamientos inmunodepresores o inmunomoduladores tanto en la fase aguda como en la profilaxis de las trombosis, aunque hasta la actualidad esta faceta haya sido una quimera, tal como ha sucedido en el campo de los anticuerpos antifosfolípido, ya sea el anticoagulante lúpico (AL) o los anticuerpos anticardiolipina (aCl).

Anticuerpos antifosfolípido: anticoagulante lúpico, anticardiolipina y antifosfatidiletanolamina

El AL es un anticuerpos antifosfolípido que se determina mediante métodos indirectos o pruebas de coagulación inespecíficas. En general, pueden usarse todas aquellas que sean tiempos de coagulación fosfolípido-dependientes⁴. Aunque la presencia de un anticoagulante circulante sugiere diátesis hemorrágica, sólo una pequeña minoría de pacientes con AL van a presentar hemorragias. En estos casos el AL se asocia a trombocitopenia o a un déficit adquirido de protrombina, que son las responsables de las manifestaciones hemorrágicas⁵. En el resto de los pacientes las complicaciones tromboembólicas son las manifestaciones más frecuentes. En las mujeres gestantes, este estado de hipercoagulación se manifiesta en la placenta provocando múltiples complicaciones obstétricas como abortos de repetición, muertes fetales intrauterinas, retrasos de crecimiento, estrés fetal, preeclampsia y eclampsia, síndrome de HELLP o trombosis neonatal.

El AL pertenece a una familia de anticuerpos que han sido caracterizados con la definición de anticuerpos antifosfolípido. Los otros componentes de esta familia de aFl incluye los aCl⁶, la serología lúe-

Tabla 1. Antígenos relacionados con la trombosis autoinmune.

| Anticuerpo | Antígeno | Aspectos clínicos |
|-----------------|---|---------------------------------------|
| AL | PL (PS, PE) + FII, β_2 GPI, anexina, PC, PS | Trombosis, pérdidas fetales |
| aCl, aFS | β_2 GPI | Trombosis, pérdidas fetales |
| aFE, | PE + Kininógeno | <i>Livedo reticularis</i> , trombosis |
| a-HF | Heparin + Factor 4 plaquetario | Trombosis arterial |
| a-FvW | Factor von Willebrand | Trombosis, pérdidas fetales |
| a-tPA | Fibrina + activador tisular del plasminógeno | Trombosis. Fenómeno de Raynaud |
| a-metaloprotesa | Metaloproteasas-FvW | PTT SHU |

AL: anticoagulante lúpico; SAP: síndrome antifosfolípido; FI: fosfolípido; FS: fosfatidilserina; FE: fosfatidiletanolamina; FII: protrombina; β_2 GPI: β_2 -glucoproteína I; PC: proteína C; PS: proteína S; aCl: anticuerpos anticardiolipina; aHF anticuerpos antiheparina-factor 4 plaquetario; a-FvW: anticuerpos antifactor von Willebrand; a-tPA: anticuerpos antiactivador tisular del plasminógeno; PTT: púrpura trombótica trombocitopénica; SHU: síndrome hemolítico urémico.

tica falsamente positiva (SLFP) y anticuerpos dirigidos contra otros fosfolípidos iónicos como la fosfatidilserina o el ácido fosfatídico u otros fosfolípidos neutros como la fosfatidiletanolamina (aPe)⁷.

En diversos estudios se ha encontrado una alta correlación entre el AL y los aCl. Así, entre el 60 a 90 % de los pacientes que presentan AL se les detecta aCl del isotipo IgG y/o IgM. Es muy raro encontrar aCl isotipo IgM solamente, pero es posible la asociación de AL con aCl isotipo IgM.

La presencia del AL y/o aCl junto a las manifestaciones tromboembólicas y/o complicaciones obstétricas ha sido definido como síndrome antifosfolípido (SAP). Se habla de SAP primario cuando el paciente no tiene ninguna enfermedad definida y de SAP secundario cuando sí existe, siendo el lupus eritematoso sistémico (LES), la enfermedad más frecuente asociada a estos aFl. No obstante, en las series de enfermos con aFl el 50 % de los casos no tienen ninguna enfermedad de base y alrededor del 60 % han presentado complicaciones trombóticas. Hoy se cree que los aFl son el factor que con más frecuencia se puede encontrar cuando se investiga la causa de trombofilia adquirida en la población general.

El AL y/o los aCl se pueden encontrar en cualquier persona, desde la edad pediátrica hasta la geriátrica. En consecuencia cualquier clínico debe tener conocimiento de este tipo de anticuerpos y del SAP porque tiene muchas posibilidades de encontrar personas afectadas de esta patología. Una prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) con un tiempo de protrombina (TP) normal o prolongado o una SLFP debe hacernos sospechar en la presencia de aFl. Ante esta sospecha el diagnóstico definitivo del AL se realizará con el empleo de otras pruebas de coagulación encaminadas a diagnosticar y confirmar el mismo. Entre las pruebas diagnósticas suele emplearse el tiempo de cefalina kaolín (TCK), que explora la vía intrínseca y el tiempo del veneno de víbora de Russell diluido (TVVRd)

que explora la vía común de la coagulación sanguínea y que ambas son pobres en la concentración de FI. Como pruebas de coagulación confirmatorias se usa el propio TTPA o el TVVRd pero aumentando la concentración de FI. Las primeras evidencian una prolongación de los tiempos normales de coagulación ante la presencia de un AL y las segundas corrigen las prolongaciones de los tiempos al aportar más concentración de FI o de antígeno.

Mediante un ELISA casero (home ELISA) o mediante un ELISA a partir de kit comercial se diagnosticarán los aCl o contra otros fosfolípidos como la fosfatidilserina, el ácido fosfatídico o la fosfatidiletanolamina.

Desde el inicio del descubrimiento de los aFl ha habido dudas sobre el verdadero antígeno de estos anticuerpos, ya que sólo las proteínas parecen capaces de inducir autoanticuerpos y no los FI. La casualidad en la investigación dio importantes descubrimientos. Así, con la idea de dilucidar si la actividad plasmática anticardiolipina era la misma que la actividad AL, se realizaron estudios mediante cromatografía de afinidad inmovilizando cardiolipina o fosfatidilserina en un gel homogeneizado de acrilamida-bisacrilamida. Las investigaciones fueron incapaces de aclarar este interrogante, pero sí pusieron en evidencia que el verdadero antígeno de los aFl no son los FI sino más bien unas proteínas o cofactores plasmáticos imprescindibles para demostrar la actividad de estos anticuerpos en el laboratorio y por lo tanto para realizar su diagnóstico. En realidad, ahora estamos ante el concepto de anticuerpos antifosfolípido-proteínas más que verdaderos aFl. Proteínas o cofactores como la β_2 -glucoproteína I (β_2 GPI), la protrombina o factor II de la coagulación sanguínea (FII) o el cininógeno de bajo y alto peso molecular (KBA), han sido identificadas como los verdaderos antígenos de estos aFl o formando parte del antígeno (tabla 1).

El AL ha sido caracterizado por ser un anticuerpo dirigido contra la protrombina o β_2 GPI unidos a

fosfolípidos iónicos y/o aniónicos. Una gran parte de los pacientes con AL tienen anticuerpos contra la protrombina o la β_2 GPI mediante el estudio por ELISA de los plasmas de pacientes en los que previamente se ha demostrado actividad AL mediante pruebas de coagulación.

La β_2 GPI es absolutamente necesaria para la determinación de la actividad anticardiolipina en sueros de pacientes con los aCl. Otros antígenos como la proteína C, la S, la anexina V, factor XI o el XII, también, han sido considerados como posibles componentes del antígeno o cofactores de los aFl, pero esto ha sido menos probado⁸.

Los aFe han sido poco estudiados y su interés en el SAP no está demostrado. Su determinación puede estar indicada en los pacientes con la sospecha de SAP y en los cuales el AL y los aCl son negativos. El antígeno de estos aFe parece ser la etanolamina y el kininógeno. En series de pacientes con LES estos anticuerpos se han asociado con trombosis, fenómeno de Raynaud y *livedo reticularis*. No obstante, su incidencia, como único aFl, en los pacientes con LES es inferior que el AL o los aCl.

A pesar de los últimos avances debemos saber que los aFl verdaderos sí existen y son los que se detectan en personas con ciertas infecciones como la sífilis, la fiebre Q, la lepra, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o por citomegalovirus. En esta situación no es necesaria la presencia de la β_2 GPI en la placa de ELISA para demostrar los aCl. Ni tampoco, se ha podido demostrar que existan otras proteínas como componentes de los antígenos de los aFl en las enfermedades infecciosas.

Lo más importante del hallazgo de los cofactores de los aFl ha sido comprobar que las personas con anticuerpos antifosfolípido-proteínas presentan manifestaciones trombóticas y/o diversos síntomas relacionados con el SAP como son la *livedo reticularis* cutánea, valvulopatía cardíaca, trombocitopenia, anemia hemolítica o pioderma gangrenoso. Mientras que las personas con aFl verdaderos, no cofactor o proteínas dependiente, no presentan manifestaciones trombóticas relacionadas con estos anticuerpos.

El mecanismo de trombosis inducido por los aFl es desconocido. Los múltiples estudios realizados sugieren que dos tipos de interacciones pueden ser importantes en la fisiopatología del SAP; una reacción cruzada de los aFl con los fosfolípidos de membrana celular y así alterar la cinética celular de las reacciones fosfolípido dependiente o que esta interacción con receptores celulares de membrana puede transmitir una señal de transducción o activación celular anormal. La segunda hipótesis de inducción a trombosis por los aFl puede estar relacionada con las proteínas o los cofactores ya que las personas con aFl no cofactor dependientes no presentan manifestaciones trombóticas⁹.

Anticuerpos antiplaquetarios inducidos por la heparina

La trombocitopenia y trombosis inducida por la heparina es otro mecanismo de trombosis relacionado con anticuerpos. La trombocitopenia inducida por heparina (TIH) se debe a dos mecanismos: a) uno común, de inicio precoz que cursa con moderada trombocitopenia, que probablemente está relacionado con la capacidad de la heparina de facilitar una agregación plaquetaria ligera, y b) casos esporádicos y aislados de trombocitopenia severa de inicio más lento que son inmunodependientes y que frecuentemente se asocian a fenómenos trombóticos catastróficos. El hecho de que unos anticuerpos inducidos por el tratamiento con heparina y con actividad antiplaqueta pueden causar trombosis ha sido convenientemente demostrado en este momento⁹. El suero o la IgG purificada del plasma de pacientes con TIH inducen agregación de plaquetas normales en presencia de concentraciones terapéuticas de heparina a nivel plasmático. Los primeros cirujanos que tuvieron la necesidad de extraer los trombos intravasculares de los pacientes con TIH pudieron comprobar, de forma sorprendente, que se trataba de trombos blancos, lo cual hizo sospechar que las plaquetas podían estar implicadas en este tipo de trombosis o también llamado síndrome del coagulo blanco. Los estudios más recientes han mostrado que el determinante antigénico es un complejo entre la heparina y el factor 4 plaquetario. Es decir, una glucoproteína unida a la heparina que está almacenada en los gránulos alfa intraplaquetarios pero que también actúa como un receptor en la superficie plaquetaria. Es importante mencionar que estos anticuerpos antiplaqueta-heparina-dependientes son potentes activadores plaquetarios, lo cual ha sido confirmado por varios autores, quienes han demostrado que actúan generando tromboxano A₂ a través de la liberación de los gránulos intraplaquetarios. La experiencia clínica de trombosis arterial es más común en los pacientes con la existencia previa de una enfermedad cardiovascular. Mientras la trombosis venosa es más probable que ocurra en pacientes postoperados en tratamiento con heparina profiláctica para la prevención de trombosis¹⁰.

Anticuerpos contra el factor von Willebrand (FvW)

Puntualmente ha sido demostrado que la presencia de anticuerpos espontáneos contra el FvW pueden inducir manifestaciones trombóticas en las personas que los presentan¹¹. Estos mismos autores publicaron que anticuerpos monoclonales murinos facilitan la unión del FvW a las plaquetas y así propiciar trombosis vía un aumento de la agregación plaquetaria. La unión de estos anticuerpos a las plaquetas vía el FvW induciría la activación a través del receptor Fc γ RII. La fracción plasmática IgG del

plasma de estos pacientes, cuando se mezcla con plaquetas normales lavadas, más FvW normal, se produce una respuesta dosis dependiente a la ristocetina, mientras que la IgG normal no produce este efecto sobre las plaquetas vía la ristocetina o FvW. Una enferma con este anticuerpo desarrolló trombotosis arterial causando un accidente vascular cerebral, un infarto de miocardio con arterias coronarias normales y una muerte fetal intrauterina por trombotosis e infartos placentarios. El recuento plaquetario plasmático y el FvW eran normales. Las plaquetas mostraron una agregación plaquetaria espontánea muy importante que desaparecía con la ingesta de aspirina.

Anticuerpos contra los inhibidores fisiológicos de la coagulación sanguínea

Algunos trabajos han sugerido que anticuerpos contra proteínas plasmáticas inhibitoras fisiológicas de la coagulación sanguínea (PC, PS, AT-III), pueden ser causa de trombotosis inmune e incluso estar implicados en la patogenia del síndrome antifosfolípido.

Niños con varicela, ocasionalmente, pueden desarrollar deficiencia severa de PS debido a la producción de anticuerpos IgG e IgM contra esta proteína y desarrollar un cuadro clínico de púrpura fulminante y alteraciones de laboratorio compatibles con una coagulación intravascular diseminada. Los niveles bajos de proteína S no mejoraron a pesar de la perfusión de plasma fresco, probablemente como consecuencia de la formación de inmunocomplejos y un rápido aclaramiento de los mismos. El descenso de los anticuerpos anti-PS era proporcional al aumento de los niveles plasmáticos de la PS¹². En algunos enfermos con enfermedad de Behçet los anticuerpos anti-PS han sido implicados como un mecanismo de trombotosis.

Anticuerpos contra la proteína C (anti-PC) de la coagulación han sido detectados por ELISA en pacientes con LES, pero no han sido asociados con un déficit antigénico o funcional de la PC¹³. No obstante, una inhibición de la activación de la PC y de su función, también, se ha observado en asociación con la presencia del AL. El plasma o fracción plasmática IgG purificada de pacientes con SAP puede reducir la actividad de la PC en ensayos funcionales para valorar la resistencia a la PC activada. Otros autores han demostrado que los anticuerpos van dirigidos contra fosfolípidos unidos a la PC o PS¹⁴.

Anticuerpos contra el sistema de activación del plasminógeno

Anticuerpos contra un epítipo antigénico expresado en la molécula de fibrina unida al t-PA han sido demostrados en el suero de pacientes con LES, esclerodermia o con hipertensión arterial pulmonar primaria. Estos pacientes tienen una mayor frecuencia de fenómeno de Raynaud y fenómenos trombóticos arteriales o venosos¹⁵.

Anticuerpos contra una proteasa del factor von Willebrand: púrpura trombótica trombocitopénica y síndrome hemolítico urémico

La púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) es una microangiopatía trombótica consecuencia de una formación generalizada de trombos plaquetarios en arteriolas y capilares. Un cuadro clínico de alteraciones neurológicas transitorias y multifocales junto con una trombocitopenia por una microangiopatía trombótica y deterioro de la función renal debe hacernos sospechar en una PTT o un síndrome hemolítico urémico (SHU). En la patogenia intervienen una agregación plaquetaria intravascular aumentada y la lesión de la célula endotelial. El FvW es secretado a partir de la célula endotelial como un gran polímero de un polipéptido unido por puentes disulfuro, que es partido por la metaloproteasa en la circulación en la posición 842-843 o tiroxina-metionina. Por la acción de esta enzima el FvW disminuye de tamaño y queda roto en dos fragmentos de 176 kDa y 140 kDa. En la PTT parece que esto no sucede y el tamaño de los polímeros del FvW son normales o de gran tamaño. Hoy se cree que esto es debido a la presencia de anticuerpos inhibidores de la proteasa encargada de romper estos polímeros¹⁶.

Otros autoanticuerpos protrombóticos

Anticuerpos contra el inhibidor del factor tisular (IFT) han sido detectados en pacientes con síndrome antifosfolípido o con simplemente aFl. Uno de los mecanismos de trombotosis inducida por los aFl ha sido a través de un aumento de la expresión del factor tisular a partir de cultivos de macrófagos incubados con aFl. Parece que anti-IFP o inmunocomplejos pueden desempeñar un papel importante en una mayor expresión de IFT y en consecuencia inducir trombotosis.

Un trabajo reciente también demostró la presencia de anticuerpos anti-factor XII de la coagulación sanguínea en personas con AL. Estos anticuerpos inducirían una disminución de la actividad fibrinolítica dependiente del factor XII y podría ser otro mecanismo protrombótico en relación al AL o no¹⁷.

En conclusión, en estos momentos existe bastante evidencia de que algunos autoanticuerpos pueden desempeñar algún papel en los estados de hipercoagulación de personas con o sin enfermedades autoinmunes. En el futuro es importante pensar en la presencia de autoanticuerpos como causa de trombotosis no explicable por otras causas.

Bibliografía

1. Roubey RAS. Mechanisms of autoantibody-mediated thrombosis. *Lupus* 1998; 7 (Suppl 2): 114-119.
2. Vermylen J, Hoylaerts MF, Arnout J. Antibody-mediated thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 420-426.
3. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1444-1445.

4. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Sharrer SA. Criteria for diagnosis of lupus anticoagulant: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-1197.
5. Horbach DA, Van Oort E, Derksen RHWM, De Groot PhG. The contribution of anti-prothrombin antibodies to lupus anticoagulant activity. Discrimination between functional and nonfunctional anti-prothrombin antibodies. *Thromb Haemost* 1998; 79: 790-795.
6. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackwoth-Young GC, Loizou S. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211-1214.
7. Berard M, Chantome R, Marcelli A, Boffa MC. Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies. Association with thrombosis and vascular cutaneous disease. *J Rheumatol* 1996; 23: 1369-1374.
8. McIntyre JA, Wagenknecht DR, Sugi T. Phospholipid binding plasma proteins required for antiphospholipid antibody detection-an overview. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 101-110.
9. Ordi-Ros J, Selva-O'Callaghan A, Monegal-Ferran F, Monasterio-Aspiri Y, Perez-Peman P, Vilardell-Tarres M. Prevalence, significance and specificity of antiphospholipid antibodies in Q fever. *J Rheumatol* 1994; 18: 213-217.
10. Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1-7.
11. Hoylaerts MF, Thys C, Arnout J, Vermeylen J. Recurrent arterial thrombosis linked to auto-immune antibodies enhancing von Willebrand factor binding to platelets and inducing FcγRII receptor-mediated platelet activation. *Blood* 1998; 91: 2810-2817.
12. Levin M, Eley BS, Louis J, Cohen H, Young L, Heydeman RS. Postinfectious purpura fulminans caused by an auto-antibody directed against protein S. *J Pediatr* 1995; 127: 355-363.
13. Ruiz-Argüelles A, Vázquez-Prado J, Deleze M, Pérez-Romano B, Drenkard C, Alarcón-Segovia D et al. Presence of serum antibodies to coagulation protein C in patients with systemic lupus erythematosus is not associated with antigenic or functional protein C deficiencies. *Am J Haematol* 1993; 44: 58-59.
14. Oosting JD, Derksen RHWM, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BM, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S. An explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81: 2618-2625.
15. Salazar-Paramo M, Garcia de la Torre I, Fritler MJ, Loyau S, Angles-Cano E. Antibodies to fibrin-bound tissue type plasminogen activator in systemic lupus erythematosus are associated with Raynaud's phenomenon and thrombosis. *Lupus* 1996; 5: 275-278.
16. Tsai HM, Chun-Yet Lian E. Antibodies to von Willebrand factor cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998; 339: 1585-1594.
17. Jones DW, Gallimore MJ, Harris SL, Winter M. Antibodies to factor XII associated with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1999; 81: 387-390.