



EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA
Vicerrectoría Académica

Colección e-book

HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico

Editores

Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.

e-book

HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico

Editores

Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.



EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA
COLECCIÓN E-BOOK
Serie de libros electrónicos

HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico

Editores

Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA
Vicerrectoría Académica
COLECCIÓN E-BOOK
Serie de libros electrónicos

Registro de propiedad intelectual © N° 146.421

ISBN: 978-956-7059-85-0

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA

Talca- Chile, julio de 2009
Edición soporte papel año 2005

Diseño Editorial:
Marcela Albornoz Dachelet

Corrección de textos:
María Cecilia Tapia Castro



HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico

Editores

Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.

UNIVERSIDAD DE TALCA

HEMATOLOGÍA: Fisiopatología y Diagnóstico

Editores

Prof. TM. Dr. Iván Palomo González
Unidad de Hematología e Inmunología
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Prof. Dr. Jaime Pereira Garcés
Departamento de Hematología y Oncología
Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Prof. Dra. Julia Palma Behnke
Departamento de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Unidad de Trasplante de Médula Ósea
Hospital Luis Calvo Mackenna

Editorial Universidad de Talca
Registro de propiedad intelectual N° 146.421
ISBN: 956 - 7059 - 63 - 2

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA

Talca - CHILE, 2005

Ilustraciones
Bárbara Fuentes Y.
Estudiante de Tecnología Médica, Universidad de Talca

Diseño gráfico:
Marcela Albornoz Dachelet
Impresión:
Impresora Gutenberg ® Talca
Revisión de textos:
María Cecilia Tapia Castro

TM. Lic. Marianela Agurto O.

AUTORES DE CAPÍTULOS

Escuela de Tecnología Médica
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción

TM. Lic. Marcelo Alarcón L.
Depto. de Bioquímica Clínica e
Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Dr. Jorge Aldunate O.
Servicio Laboratorio Clínico
Hospital Clínico
Universidad de Chile

Dr. Jorge Alfaro L.
Depto. de Hematología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

BQ. Dr. Eduardo Aranda L.
Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
P. Universidad Católica de Chile

TM. Mg. Leonor Armanet B.
Escuela de Tecnología Médica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

TM. Dr. Miguel Arredondo O.
Laboratorio de Micronutrientes
Instituto de Tecnología de los Alimentos
Universidad de Chile

TM. Lic. Carmen Gloria Artigas A. Mg (c)
Depto. de Medicina Interna
Facultad de Medicina
Universidad de La Frontera

Dr. Pablo Bertin C-M.
Depto. de Hematología y
Oncología
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

Dr. Juan Francisco Cabello A.
Unidad de Enfermedades metabólicas
Instituto de Nutrición y Tecnología de los
Alimentos
Universidad de Chile

Dra. Myriam Campbell B.

Unidad Oncología
Hospital Roberto del Río
Dpto. de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

BQ. Dr. Flavio Carrión A.
Unidad de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad de los Andes

TM. Mg. Juan Luis Castillo N.
Laboratorio de Citometría de Flujo
Hospital del Trabajador
Concepción

Dr. Guillermo Conte L.
Depto. de Hematología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Claudio Cruzat C.
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Regional de Talca
Universidad Católica del Maule

Dra. Patricia Dal Borgo A.
Laboratorio de Hematología
Hospital Calvo Mackenna

Dr. Mario Donoso S.
Programa Nacional de Hemostasia y
Trombosis
Ministerio de Salud
Banco de Sangre
Hospital del Salvador

BQ. Dr. Alejandro Erices O.
Laboratorio de Biología Celular y
Farmacología
Depto. de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Andrés Bello

Dra. Patricia Fardella B.
Depto. de Hematología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

BQ. Dr. Ricardo Forastiero V.

Depto. de Hematología
Facultad de Medicina
Universidad Favaloro
Buenos Aires, Argentina

Dr. Óscar González R.
Unidad de Trasplantes de Progenitores
Hematopoyéticos
Hospital Civil de Guadalajara
Universidad de Guadalajara
México

TM. Patricia Hidalgo P.
Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Hospital Clínico
P. Universidad Católica de Chile

Dr. Ricardo Hojas B.
Unidad Docente asociada de la
Asistencia Pública
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

Dra. Alejandra King D.
Unidad de Trasplante de Médula Ósea
Hospital Luis Calvo Mackenna

Dr. Milton Larrondo L.
Banco de Sangre
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

TM. María Eugenia Legues S.
Laboratorio de Hematología
Hospital Clínico
P. Universidad Católica de Chile

TM. Mg. Elba Leiva M.
Depto. de Bioquímica Clínica e
Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Dr. Pablo Lira V.
Depto. de Hematología y
Oncología
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

Dr. Alejandro Majlis L.

Unidad de Hemato-Oncología
Clínica Alemana, Santiago

TM. Mg. Mónica Maldonado R.
Depto. de Bioquímica Clínica e
Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Dr. Diego Mezzano A.
Depto. de Hematología y
Oncología
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

BQ. Dr. José Minguell U.
Programa terapias celulares, INTA,
Universidad de Chile y
Laboratorio de Trasplante de Médula
Ósea, Clínica Las Condes

Dr. Claudio Mosso Ch.
Unidad de Trasplante de Médula Ósea
Hospital Luis Calvo Mackenna

TM. Lic. Victor Muñoz F. Mg (c)
Escuela de Tecnología Médica
Universidad de Chile

TM. Blanca Muñoz V.
Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Hospital Clínico
P. Universidad Católica de Chile

Dr. Mauricio Ocqueteau T.
Depto. de Hematología y
Oncología
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

Dr. Manuel Olivares G.
Laboratorio de Micronutrientes
Instituto de Tecnología de los Alimentos
Universidad de Chile

TM. Mg. Santiago Orizola G.
Depto. de Tecnología Médica
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Antofagasta

Dra. Julia Palma B.

Depto. de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Unidad de Trasplante de Médula Ósea
Hospital Luis Calvo Mackenna

TM. Dr. Iván Palomo G.
Depto. de Bioquímica Clínica e
Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

BQ. Dra. Olga Panes B.
Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Hospital Clínico
P. Universidad Católica de Chile

Dra. Claudia Paris D.
Unidad de Trasplante de Médula Ósea
Hospital Luis Calvo Mackenna

Dr. Jaime Pereira G.
Depto. de Hematología y
Oncología
Facultad de Medicina
P. Universidad Católica de Chile

BQ. Dra. Silvia Pierangeli
Department of Microbiology
Biochemistry and Immunology,
Morehouse School of Medicine
Estados Unidos

TM. Fernando Pizarro A.
Laboratorio de Micronutrientes
Instituto de Tecnología de los Alimentos
Universidad de Chile

Dr. Gonzalo Pombo V.
Depto. de Hematología
Facultad de Medicina
Universidad Favaloro
Argentina

Dra. Erna Raimann B.
Unidad de Enfermedades metabólicas
Instituto de Nutrición y Tecnología de los
Alimentos
Universidad de Chile

TM. Mg. Eduardo Retamales C.

Laboratorio Nacional y de Referencia en
Hematología
Instituto de Salud Pública

Biol. Lic. Concepción Risueño A.
Laboratorio de Hematología
Hospital Clínico
P. Universidad Católica de Chile

Dr. Jaime Rodríguez C.
Depto. de Ciencias Básicas Biomédicas
Facultad de Ciencias de la Salud,
Universidad de Talca

Dr. Carlos Rodríguez-Galindo
Department of Hematology Oncology
St. Jude Children's Research Hospital
Estados Unidos

Dr. Pablo Rubinstein
National Cord Blood Program
New York Blood Center
Estados Unidos

Dr. Guillermo Ruiz-Argüelles
Centro de Hematología y Medicina
Interna de Puebla
Laboratorios Clínicos de Puebla
Secretario General
División Interamericana, ISH
México

Dr. Guillermo J. Ruiz-Delgado
Hospital Médica Sur
Ciudad de México, México

Dr. Guillermo Ruiz-Reyes
Laboratorios Clínicos de Puebla
Puebla, México

BQ. Dra. Claudia Sáez S.
Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Hospital Clínico
P. Universidad Católica de Chile

Dra. Carmen Salgado M.

Unidad de Onco-Hematología
Hospital Infantil
Dr. Exequiel González Cortés
Depto. de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Unidad Hemato-Oncología
Clínica Alemana, Santiago

Dra. BQ. María Teresa Santos D.
Unidad de Aterosclerosis, Trombosis y
Biología Vascular
Centro de Investigación
Hospital Universitario La Fe
Valencia, España

Dra. Rosario Silva C.
Laboratorio de Hematología
Hospital Luis Calvo Mackenna

Dr. Juan Tordecilla C.
Depto. de Hematología
Hospital Roberto del Río

Dra. QF. Juana Vallés G.
Unidad de Aterosclerosis, Trombosis y
Biología Vascular
Centro de Investigación
Hospital Universitario La Fe
Valencia, España

TM. Mg. Cs. Marcela Vásquez R.

Depto. de Bioquímica Clínica e
Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

MV. Dr. Ulises Vergara C.
Laboratorio de Inmunología
Depto. de Medicina
Preventiva Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias
y Pecuarias
Universidad de Chile

Dra. María Jesús Vial C.
Servicio Laboratorio Clínico
Hospital Clínico
Universidad de Chile

Dr. Vicente Vicente G.
Unidad de Hematología
y Oncología Médica
Hospital Universitario Morales Meseguer
Murcia, España

PATROCINIO

Sociedad Chilena de Hematología
Universidad de Talca
Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera
Universidad de Antofagasta
Dirección de Investigación, Universidad Andrés Bello
Instituto de Salud Pública de Chile

AUSPICIO

Bayer Healthcare Diagnóstico S.A.
Clínica Santa María S.A.
Clinitest Ltda.
Dirección de Investigación, Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca
Farmalatina Ltda.
Grifols Chile S.A.
Ivens S.A.
Laboratorio Clínico Loncomilla Ltda.
Laboratorio Clínico Talca Ltda.
Laboratorio Recalcine S.A.
Sociedad Clínica del Maule S.A.

A nuestras queridas familias y a nuestros estimados alumnos

CONTENIDOS

	Página
PREFACIO	39
PRÓLOGO	41
SECCIÓN I. HEMATOPOYESIS	43
Capítulo 1 HEMATOPOYESIS <i>Claudia Sáez S. e Iván Palomo G.</i>	45
1. Introducción	46
2. Médula ósea	46
2.1. Histología	
3. Células troncales hematopoyéticas	49
3.1. Definición de célula troncal hematopoyética	
3.2. Estudio de la célula troncal hematopoyética	
3.3. Identificación y aislamiento de las células troncales hematopoyéticas	
3.4. Heterogeneidad de las células troncales hematopoyéticas	
3.5. División de las células troncales hematopoyéticas	
3.6. Ontogenia de la célula troncal hematopoyética	
3.7. Influencia de factores de crecimiento involucrados en la decisión de linaje	
3.8. Genes involucrados en la decisión de linaje	
4. El microambiente de la médula ósea	56
5. Granulomonopoyesis	58
5.1. Estadios madurativos	
5.2. Factores de maduración	
6. Eritropoyesis	59
6.1. Estadios madurativos	
6.2. Eritropoyetina	
6.3. Gen de EPO	
7. Megacariopoyesis	61
7.1. Estadios madurativos	
7.2. Regulación	
8. Linfopoyesis	63
8.1. Células B	
8.2. Células T	
9. Estudio de la hematopoyesis	65
Capítulo 2 CÉLULAS TRONCALES DE MÉDULA ÓSEA <i>José Minguell U. y Alejandro Erices O.</i>	67
1. Introducción	68

2. Propiedades de las células troncales adultas	69
3. Célula troncal hematopoyética	70
4. Células troncales mesenquimáticas	71
5. Células troncales de la médula ósea y su potencial uso clínico	73

SECCIÓN II. GLÓBULOS ROJOS 79

Capítulo 3 81

GLÓBULOS ROJOS Y HEMOGLOBINA

Iván Palomo G., Santiago Orizola G., Jaime Rodríguez C. y Ricardo Hojas B.

1. Introducción	82
2. Estructura de los glóbulos rojos	82
2.1. Membrana eritrocitaria	
2.1.1. Proteínas integrales	
2.1.2. Proteínas periféricas	
2.1.3. Moléculas de adhesión	
3. Metabolismo de los hematíes	85
3.1. Glucólisis anaerobia	
3.2. Metabolismo óxido-reductor (vía de las pentosas o hexosamonofosfato)	
3.3. Metabolismo nucleotídico	
3.4. Sistema de diaforasas	
4. Hemoglobina	88
4.1. Estructura de la Hb	
4.1.1. Estructura primaria a cuaternaria	
4.1.2. Hemo	
4.1.3. Tipos de hemoglobinas	
4.1.4. Ontogenia de la hemoglobina humana	
4.2. Función de la hemoglobina	
4.2.1. Transporte de oxígeno	
4.2.2. Descarga de oxígeno a los tejidos	
4.2.3. Mecanismo de carga de oxígeno	
4.2.4. Interacción hemo-hemo	
4.2.5. Sistema tampón	
4.2.6. Transporte de CO ₂	
4.2.7. Interacción con aniones inorgánicos	
4.2.8. Interacción con fosfatos orgánicos	
5. Destrucción de los hematíes	102

Capítulo 4 105

ANEMIA Y SÍNDROME ANÉMICO

Iván Palomo G. y Pablo Lira V.

1. Introducción	106
2. Definición de Anemia	106

3. Estudio de laboratorio	107
3.1. Recuento de GR, Hto y Hb	
3.2. Índices eritrocitarios	
3.3. Recuento de reticulocitos e índice reticulocitario	
4. Mecanismos de adaptación y sintomatología	108
4.1. Mecanismos de adaptación	
4.2. Síntomas y signos	
5. Clasificaciones de las anemias	110
5.1. Clasificación morfológica	
5.2. Clasificación fisiopatológica	
5.2.1. Anemias arregenerativas	
5.2.2. Anemias regenerativas	
 Capítulo 5	 115
APLASIA MEDULAR	
<i>Claudio Mosso Ch., Claudia Paris D. y Rosario Silva C.</i>	
 1. Introducción	 116
2. Aplasia medular adquirida	118
2.1. Epidemiología	
2.2. Cuadro clínico	
2.3. Estudios de laboratorio	
2.3.1. Sangre periférica	
2.3.2. Otros estudios de laboratorio	
2.3.3. Médula ósea	
2.4. Etiología	
2.5. Fisiopatología	
2.6. Tratamiento y evolución de la aplasia medular	
2.6.1. Tratamiento de soporte	
2.6.2. Tratamiento y respuesta	
2.7. Tratamiento de soporte	
2.8. Tratamiento y respuesta	
2.8.1. Trasplante de médula ósea	
2.8.2. Tratamiento inmunosupresor	
3. Aplasias medulares hereditarias y/o congénitas	125
3.1. Anemia de Fanconi	
3.2. Disqueratosis congénita	
3.3. Síndrome de Shwachman-Diamond	
3.4. Hipoplasia cartílogo-pelo	
3.5. Síndrome de Pearson	
3.6. Disgenesia reticular	
3.7. Trombocitopenia amegacariocítica	
3.8. Anemia Blackfan-Diamond	
3.9. Neutropenia congénita severa (síndrome Kostmann)	
3.10. Trombocitopenia con ausencia de radio	

Capítulo 6	133
ALTERACIONES DEL METABOLISMO DEL HIERRO Y DE LA SÍNTESIS DEL GRUPO HEM	
<i>Iván Palomo G., Manuel Olivares G., Miguel Arredondo O. y Fernando Pizarro A.</i>	
1. Introducción	134
2. Metabolismo del hierro	135
2.1. Homeostasis del hierro	
2.2. Absorción intestinal de hierro	
2.3. Regulación intracelular de los niveles de hierro	
2.3.1. Transportador de metales divalentes 1 (DMT1)	
2.3.2. Receptor para transferrina	
2.3.3. Proteína HFE	
2.3.4. Transportador Ireg1	
2.3.5. Hefestina	
2.3.6. Hefcidina	
2.4. Modelo de homeostasis del hierro	
2.5. Biosíntesis del Hem	
3. Deficiencia de hierro	141
3.1. Cambios con el desarrollo y requerimientos de hierro	
3.2. Etiopatogenia de la deficiencia de hierro	
3.3. Cuadro clínico y consecuencias	
3.4. Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de hierro	
3.5. Prevención y tratamiento de la deficiencia de hierro	
4. Sobrecarga de hierro	146
4.1. Hemocromatosis	
4.1.1. Hemocromatosis hereditaria tipo 1 (clásica)	
4.1.2. Hemocromatosis hereditaria tipo 2 (juvenil)	
4.1.3. Hemocromatosis hereditaria tipo 3 (mediterránea)	
4.1.4. Hemocromatosis hereditaria tipo 4	
4.2. Aceruloplasminemia	
4.3. Atransferrinemia	
4.4. Hemocromatosis neonatal	
4.5. Sobrecarga de hierro africana (Siderosis Bantu)	
4.6. Manifestaciones clínicas de la Hemocromatosis Hereditaria (HH)	
4.7. Diagnóstico de la Hemocromatosis Hereditaria	
4.8. Tratamiento de la Hemocromatosis Hereditaria	
5. Anemia de enfermedades crónicas y de la inflamación aguda	151
6. Anemia sideroblástica	152
6.1. Anemia sideroblástica hereditaria (ASH)	
6.2. Anemia Sideroblástica Adquirida (ASA)	
7. Porfirias	156
Capítulo 7	161
ANEMIAS MEGALOBLÁSTICAS	
<i>Gonzalo Pombo V. e Iván Palomo G.</i>	
1. Introducción	162
2. Eritropoyesis megaloblástica	162

3. Laboratorio	163
4. Metabolismo de la cobalamina	163
4.1. Estructura	
4.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales	
4.3. Absorción, transporte y almacenamiento	
4.4. Funciones	
5. Déficit de vitamina B ₁₂	165
5.1. Etiologías	
5.2. Anemia perniciosa	
6. Metabolismo del ácido fólico	170
6.1. Estructura	
6.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales	
6.3. Absorción, transporte y almacenamiento	
6.4. Funciones	
7. Déficit de ácido fólico	171
7.1. Etiología	
7.2. Manifestaciones clínicas	
7.3. Diagnóstico	
8. Diagnósticos diferenciales	173
Capítulo 8	175
ANEMIAS HEMOLÍTICAS	
<i>Iván Palomo G., Marcela Vásquez R., Leonor Armanet B., Guillermo Ruiz R., Victor Muñoz F., Patricia Dal Borgo A. y Ricardo Hojas B.</i>	
Introducción	176
Síndrome hemolítico	176
1. Clasificación de las anemias hemolíticas	176
2. Mecanismos de destrucción de los hematíes	177
2.1. Hemólisis extravascular	
2.2. Hemólisis intravascular	
3. Aspectos clínicos	179
3.1. Síndrome hemolítico agudo	
3.2. Síndrome hemolítico crónico	
4. Laboratorio	180
Anemias hemolíticas intracorporales	181
1. Membranopatías	181
1.1. Membranopatías hereditarias	
1.1.1. Esferocitosis hereditaria	
1.1.2. Eliptocitosis hereditaria	
1.1.3. Piropoiquilocitosis hereditaria	
1.1.4. Estomacitosis hereditaria	
1.1.5. Xerocitosis hereditaria	
1.2. Membranopatía adquirida	
1.2.1. Hemoglobinuria paroxística nocturna	

2. Enzimopatías	188
2.1. Déficit de enzimas de la glucólisis anaerobia	
2.1.1. Déficit de Piruvatoquinasa	
2.1.2. Déficit de la Glucosafosfato isomerasa (GPI)	
2.1.3. Déficit de la Triosafosfato isomerasa (TPI)	
2.1.4. Déficit de Hexoquinasa (HK)	
2.1.5. Déficit de Fosfofructoquinasa (PFK)	
2.1.6. Déficit de Fosfogliceratoquinasa (PGK)	
2.2. Enzimopatías del metabolismo óxidorreductor	
2.2.1. Déficit de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	
2.2.2. Déficit de Glutación sintetasa (GS)	
2.2.3. Déficit de Gamma-glutamilcisteín sintetasa (GGS)	
2.2.4. Déficit Glutación reductasa (GR)	
2.2.5. Déficit de Glutación peroxidasa (GP)	
2.3. Enzimopatías del metabolismo nucleotídico	
3. Hemoglobinopatías	194
3.1. Talasemias	
3.3.1. Talasemia α	
3.3.2. Talasemia β	
3.3.3. Talasemia $\delta \beta$	
3.3.4. Talasemia $\gamma \delta \beta$	
3.3.5. Síndromes hemoglobina Lepore	
3.2. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal	
3.3. Hemoglobinopatías estructurales	
3.3.1. Nomenclatura	
3.3.2. Base genética de las hemoglobinopatías estructurales	
3.3.3. Clasificación	
3.3.4. Variantes de hemoglobina más comunes	
Anemias hemolíticas extracorpúsculares	213
1. Anemias hemolíticas inmunes	213
1.1. Antigénicos eritrocitarios	
1.2. Anemias hemolíticas aloinmunes	
1.2.1. Enfermedad hemolítica del recién nacido	
1.2.2. Reacción hemolítica transfusional	
1.3. Anemias hemolíticas autoinmunes	
1.3.1. AHAI por anticuerpos calientes	
1.3.2. AHAI por anticuerpos fríos	
a) Enfermedad de las aglutininas frías	
b) Hemoglobinuria paroxística <i>a frigore</i>	
1.3.3. AHAI por mezcla de autoanticuerpos fríos y calientes, o tipo mixto	
1.3.4. AHAI inducida por fármacos	
2. Anemias hemolíticas no inmunes	227
2.1. Agentes infecciosos	
2.1.1. Parasitosis	
2.1.2. Infección bacteriana	
2.2. Venenos	
2.2.1. Veneno de arañas	

2.2.2. Veneno de serpientes	
2.2.3. Veneno de abejas	
2.3. Fármacos oxidantes	
2.4. Agentes físicos	
2.4.1. Quemaduras	
2.4.2. Radiaciones ionizantes	
2.5. Productos químicos	
2.5.1. Arsénico	
2.5.2. Cobre	
2.5.3. Anhídrido trimetílico	
Capítulo 9	237
ANEMIAS POR HEMORRAGIA AGUDA	
<i>Milton Larrondo L.</i>	
1. Introducción	238
2. Epidemiología	238
3. Fisiopatología	238
3.1. Transporte de oxígeno	
3.2. Concentración de hemoglobina y saturación	
3.3. Gasto cardíaco (GC)	
3.4. Respuesta fisiológica a la hemorragia	
4. Tratamiento	240
4.1. Conducta clínica inicial	
4.2. Hemorragia aguda y transfusión	
4.3. Alternativas a transfusión alogénica	
SECCIÓN III. GLÓBULOS BLANCOS	243
Capítulo 10	245
LEUCOCITOS Y SISTEMA INMUNE	
<i>Iván Palomo G., Jaime Pereira G. y Ulises Vergara C.</i>	
1. Introducción	246
2. Leucocitos	246
2.1. Generalidades sobre hematopoyesis	
2.2. Linfocitos	
2.2.1. Características generales	
2.2.2. Diferenciación de linfocitos	
2.2.3. Reconocimiento antigénico	
2.2.4. Activación de los linfocitos	
2.3. Sistema fagocítico mononuclear	
2.3.1. Monocitos	
2.3.2. Macrófagos	
2.3.3. Células dendríticas	

2.4. Granulocitos	
2.4.1. Neutrófilos	
2.4.2. Eosinófilos	
2.4.3. Basófilos	
3. Órganos linfoides	266
3.1 Órganos linfoides primarios	
3.1.1. Médula ósea	
3.1.2. Timo	
3.2. Órganos linfoides secundarios	
3.2.1. Ganglios linfáticos	
3.2.2. Bazo	
3.2.3. Tejido linfoide asociado a mucosa	
3.2.4. Amígdalas	
4. Tránsito linfocitario	272
Capítulo 11	275
ALTERACIONES NO MALIGNAS DE LOS LEUCOCITOS	
<i>Iván Palomo G., Flavio Carrión A. y Alejandra King D.</i>	
1. Introducción	276
2. Alteraciones cuantitativas de los leucocitos	276
2.1. Neutrófilos	
2.1.1. Neutrofilias	
2.1.2. Neutropenias	
2.2. Eosinófilos	
2.2.1. Eosinofilias	
2.3. Basófilos	
2.3.1. Basofilia	
2.4. Monocitos	
2.4.1. Monocitosis	
2.5. Linfocitos	
2.5.1. Linfocitosis	
2.5.2. Linfopenia	
3. Alteraciones funcionales de los leucocitos	288
3.1. Alteraciones funcionales de los granulocitos	
3.1.1. Defectos de la adhesión	
3.1.2. Defectos de la quimiotaxis	
3.1.3. Defectos del metabolismo oxidativo	
3.1.4. Defecto de los gránulos de los lisosomas	
3.2. Alteraciones funcionales de los linfocitos	
3.2.1. Defectos en la expresión de moléculas MHC	
3.2.2. Defectos de activación y función de células T	
3.2.3. Síndrome hiper IgM ligado al sexo	
3.2.4. Inmunodeficiencia común variable	
3.2.5. Deficiencia selectiva de IgA	
3.2.6. Deficiencia selectiva de subclases de IgG	

- 3.3. Alteraciones funcionales secundarias de los leucocitos y en situaciones especiales
 - 3.3.1. Sistema inmune fetal y neonatal
 - 3.3.2. Envejecimiento y sistema inmune
 - 3.3.3. Inmunidad y nutrición
 - 3.3.4. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades crónicas
 - 3.3.5. Inmunodeficiencia secundarias a enfermedades infiltrativas y tumorales
 - 3.3.6. Inmunodeficiencia secundaria a terapia inmunosupresora

Capítulo 12	299
LEUCEMIAS AGUDAS	
<i>Miriam Campbell B. y Jorge Alfaro L.</i>	
Introducción	300
Leucemia linfoblástica aguda	300
1. Introducción	300
2. Patogénesis	301
3. Cuadro clínico	301
3.1. Aspectos generales	
3.2. Órganos comprometidos	
4. Laboratorio	303
5. Diagnóstico diferencial	303
6. Clasificación	304
7. Factores pronósticos	305
8. Tratamiento de LLA	306
8.1. Quimioterapia	
8.2. Tratamiento de soporte	
8.3. Resultados de tratamiento de LLA	
8.4. Complicaciones del tratamiento de la LLA	
Leucemias mieloides agudas	310
1. Introducción	310
2. Epidemiología	310
3. Etiología	311
4. Presentación clínica	311
5. Clasificación de las LMA	311
5.1. Clasificación según criterios FAB	
5.1.1. Leucemia mieloides aguda con mínima diferenciación (M0)	
5.1.2. Leucemia mieloides aguda sin maduración (M1)	
5.1.3. Leucemia mieloides aguda sin maduración (M2)	
5.1.4. Leucemia promielocítica aguda (M3)	
5.1.5. Leucemia mielomonocítica aguda (M4)	
5.1.6. Leucemia monoblástica aguda (M5)	
5.1.7. Eritroleucemia (M6)	
5.1.8. Leucemia megacarioblástica aguda (M7)	

5.2. Clasificación según criterios OMS	
5.2.1. LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes	
5.2.2. LMA con displasia multilineal	
5.2.3. LMA y síndromes mielodisplásicos relacionados a tratamiento	
5.2.4. LMA no categorizada	
6. Fisiopatología	315
6.1. Citogenética de las LMA	
6.2. Marcadores moleculares en las LMA	
7. Tratamiento	317
7.1. Quimioterapia	
7.1.1. Quimioterapia de inducción	
7.1.2. Consolidación/intensificación	
7.1.3. Mantención	
7.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)	
Capítulo 13	321
SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS	
<i>Guillermo J. Ruiz-Argüelles, Guillermo J. Ruiz-Delgado y Guillermo Ruiz-Reyes</i>	
1. Introducción	322
2. Leucemia granulocítica crónica	323
2.1. Anatomía patológica	
2.2. Etiopatogenia	
2.3. Fisiopatología y cuadro clínico	
2.4. Diagnóstico	
2.5. Curso, tratamiento y pronóstico	
2.6. Pronóstico	
3. Policitemia vera	325
3.1. Patogenia	
3.2. Epidemiología	
3.3. Datos clínicos	
3.4. Estudios de laboratorio	
3.5. Diagnóstico	
3.6. Tratamiento	
4. Trombocitosis primaria	327
4.1. Patogenia	
4.2. Datos clínicos	
4.3. Estudios de laboratorio	
4.4. Tratamiento	
5. Mielofibrosis con metaplasia mieloide agnogénica	328
5.1. Patogénesis	
5.2. Epidemiología	
5.3. Datos clínicos	
5.4. Estudios de laboratorio	
5.5. Tratamiento	

Capítulo 14	333
SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS	
<i>Pablo Bertin C-M., Mauricio Ocqueteau T., Alejandro Majlis L. y Carmen Salgado M.</i>	
Introducción	334
Leucemia linfática crónica	334
1. Introducción	334
2. Fisiopatología	334
3. Clínica	335
4. Laboratorio	336
5. Tratamiento	337
5.1. Tratamiento según estados de la clasificación de Rai y Binet	
5.2. Estrategias terapéuticas	
5.3. Criterios de respuesta a tratamiento	
Linfomas	340
Linfoma de Hodgkin	340
1. Introducción	340
2. Patología	341
3. Etapificación	342
4. Tratamiento	343
4.1. Tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, etapa precoz	
4.2. Tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, etapa avanzada	
5. Valoración de las masas residuales en la enfermedad de Hodgkin	345
Linfomas no Hodgkin del adulto	348
1. Introducción	348
2. Patogenia	348
3. Patología	350
4. Historia Natural	353
4.1. Linfomas de bajo grado	
4.2. Linfomas de grado intermedio	
4.3. Linfomas de alto grado	
5. Diagnóstico	355
5.1. Anatomía patológica	
5.2. Citogenética, biología molecular y citometría de flujo	
6. Diagnóstico de extensión	356
7. Tratamiento	356
7.1. Manejo de los linfomas de bajo grado (LBG)	
7.2. Manejo de los linfomas de grado intermedio	
7.3. Manejo de los linfomas de alto grado	
Linfoma no Hodgkin Pediátrico	366
1. Introducción	366
2. Epidemiología	366
3. Etiología	366
4. Clasificación	367

5. Clínica	368
6. Diagnóstico y etapificación	369
7. Factores pronósticos	370
8. Tratamiento	370
8.1. Terapia de apoyo	
8.2. Tratamiento específico	
 Gammapatías monoclonales	 372
1. Introducción	372
2. Estudio inmunológico de las gammapatías monoclonales	373
2.1. Pesquisa de una proteína monoclonal	
2.2. Identificación de una proteína monoclonal	
2.3. Cuantificación de inmunoglobulinas	
2.4. Viscosidad sérica	
2.5. Beta-2 microglobulina	
2.6. Proteína C reactiva	
2.7. Interleuquina-6	
2.8. Estudios inmunológicos en orina	
3. Gammapatía monoclonal de significado incierto	375
3.1. Aspectos generales	
3.2. Evolución de las MGUS en el tiempo	
4. Mieloma múltiple	376
4.1. Conceptos preliminares	
a) Incidencia	
b) Patogenia	
c) Manifestaciones clínicas	
d) Pronóstico	
5. Variedades infrecuentes de mieloma múltiple y otras gammapatías	381
5.1. Mieloma “indolente”	
5.2. Leucemia de células plasmáticas	
5.3. Mieloma osteoesclerótico	
5.4. Plasmocitoma extramedular	
5.5. Plasmocitoma óseo solitario	
5.6. Macroglobulinemia de Waldenstrom (MW)	
5.7. Enfermedad de cadenas livianas	
5.8. Amiloidosis primaria	
5.9. Enfermedad por cadenas pesadas	
6. Diagnóstico diferencial entre MGUS y MM	383
7. Tratamiento	385
7.1. Terapia de apoyo	
7.2. Tratamiento citotóxico	
 Capítulo 15	 389
SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICOS	
<i>Juan Tordecilla C. e Iván Palomo G.</i>	
 1. Introducción	 390
2. Clasificación de los SMD	390

3. Patogénesis de los síndromes mielodisplásticos	391
4. Diagnóstico	392
4.1. Alteraciones morfológicas	
4.1.1. Alteraciones citológicas generales	
4.1.2. Alteraciones morfológicas en los diferentes tipos de SMD	
4.2. Alteraciones citogenéticas	
4.3. Alteración molecular	
4.4. Alteraciones inmunológicas	
4.5. Alteraciones enzimáticas	
4.6. Cultivos de médula ósea	
5. Síndromes mielodisplásticos en pediatría	396
6. Evaluación diagnóstica de mielodisplasia	399
7. Tratamiento de los SMD	400
7.1. Estrategias generales de tratamiento	
7.2. Tratamiento de los SMD en pediatría	
 Capítulo 16	 405
GENERALIDADES SOBRE TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	
<i>Julia Palma B. y Óscar González R.</i>	
1. Introducción	406
2. Fundamento y objetivos del TPH	407
3. Tipos de TPH	407
3.1. TPH alogénico	
3.2. TPH autólogo	
4. Fuente de precursores hematopoyéticos	408
4.1. Progenitores obtenidos de la médula ósea	
4.2. Progenitores obtenidos de la sangre periférica	
4.3. Progenitores obtenidos de la sangre de cordón	
5. Etapas del TPH	409
5.1. Planificación	
5.2. Preparación	
5.3. Acondicionamiento	
5.4. Trasplante	
5.5. Implante	
5.6. Recuperación a corto plazo	
5.7. Recuperación a largo plazo	
6. Indicaciones del TPH	412
 Capítulo 17	 417
TRASPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	
DE DONANTES NO RELACIONADOS: TECNOLOGÍA Y RESULTADOS CLÍNICOS	
<i>Pablo Rubinstein</i>	
1. Introducción	418
2. Ventajas hipotéticas del trasplante de sangre de cordón de donantes no relacionados con el receptor	419

3. Métodos	420
3.1. Recolección de sangre de cordón	
3.2. Consentimiento informado de la madre	
3.3. Identificación de unidades y especímenes	
3.4. Reducción de volumen	
3.5. Exámenes	
3.6. Congelamiento y descongelamiento de la sangre de cordón	
4. Estudios clínicos	421
4.1. Datos sobre los pacientes y selección de trasplantes	
4.2. Análisis estadísticos	
4.3. Prendimiento de los trasplantes de sangre de cordón	
4.4. Histocompatibilidad	
4.5. Enfermedad Trasplante contra Huésped	
4.6. Eventos Relacionados al Trasplante	
4.7. Recidiva leucémica	
4.8. Sobrevida sin eventos negativos	
4.9. Avances recientes para mejorar el pronóstico, especialmente en adultos	
5. Conclusiones	430
 Capítulo 18	 433
ENFERMEDADES LISOSOMALES E HISTIOCITOSIS	
<i>Erna Raimann B., J. Francisco Cabello A., Claudio Cruzat C., Carlos Rodríguez-Galindo e Iván Palomo G.</i>	
 ENFERMEDADES LISOSOMALES	 434
1. Introducción	434
2. Enfermedades lisosomales	434
2.1. Esfingolipidosis	
2.1.1. Antecedentes generales	
2.1.2. Enfermedad de Gaucher	
2.1.3. Enfermedad de Niemann Pick	
2.2. Otras Enfermedades lisosomales	
 HISTIOCITOSIS	 443
1. Introducción	443
2. Etiología y epidemiología de la histiocitosis	443
3. Ontogenia y fisiopatología de las células histiocíticas y dendríticas	443
4. Morfología, localización e inmunofenotipo de células dendríticas e histiocíticas	444
5. Clasificación de la histiocitosis	445
6. Afecciones relacionadas con las células dendríticas	445
6.1. Histiocitosis de células de Langerhans	
6.2. Proceso de células dendríticas secundario	
6.3. Xantogranuloma juvenil y afecciones asociadas	
6.4. Histiocitomas solitarios de células dendríticas con fenotipos variables, dendrocitomas.	

7. Afecciones relacionadas con los macrófagos	450
7.1. Síndromes hemofagocíticos	
7.2. Retículoendoteliohistiocitoma y retículoendoteliohistiocitosis multicéntrica	
7.3. Enfermedad de Rosai-Dorfman	
SECCIÓN IV. HEMOSTASIA Y TROMBOSIS	457
Capítulo 19	459
HEMOSTASIA PRIMARIA	
<i>María Teresa Santos D., Eduardo Aranda L., Juana Vallés G. e Iván Palomo G.</i>	
1. Introducción	460
2. Aspectos generales de la Trombopoyesis	461
3. Estructura de las plaquetas	462
3.1. Membrana de las plaquetas	
3.1.1. Glicoproteínas	
3.1.2. Receptores no glicoprotéicos	
3.2. Gránulos plaquetarios	
3.2.1. Gránulos alfa	
3.2.2. Gránulos densos	
3.3. Citoesqueleto plaquetario	
3.4. Sistema de membrana interno	
3.4.1. Sistema canicular abierto	
3.4.2. Sistema tubular denso	
4. Envejecimiento y remoción plaquetaria	472
4.1. Fenómenos asociados con el envejecimiento de las plaquetas en la circulación	
4.1.1. Densidad	
4.1.2. Contenido granular	
4.1.3. Membrana plaquetaria	
4.2. Remoción fisiológica de plaquetas	
4.2.1. Mecanismo inmune de remoción plaquetaria	
4.2.2. Mecanismos no inmunes de remoción plaquetaria	
5. Formación del trombo plaquetario	475
5.1. Adhesión y extensión de las plaquetas	
5.2. Agregación plaquetaria	
5.3. Secreción y reclutamiento	
5.4. Consolidación del trombo	
6. Secuencia bioquímica de activación plaquetaria	478
6.1. Receptores plaquetarios que participan en la transducción de señales	
6.2. Proteínas G	
6.3. Fosfolipasa C	
6.4. Calcio	
6.5. Fosfolipasa A ₂	
6.6. Fosforilación de proteínas en las plaquetas	
6.6.1. Proteína quinasa C	
6.6.2. MAP kinasas	
6.6.3. Tirosina kinasas	
6.6.4. Fosforilación en tirosina y función plaquetaria	

- 6.6.5. Señalización a través de GPIIb/IIIa
- 6.7. Cinasas lipídicas
- 6.8. Fosforilación de proteínas e inhibición plaquetaria
- 6.9. Reorganización del citoesqueleto.

Capítulo 20 493

SISTEMA DE LA COAGULACIÓN Y SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Iván Palomo G., Patricia Fardella B. y Jaime Pereira G.

- 1. Introducción 494
- 2. Sistema de la coagulación 495
 - 2.1. Nomenclatura
 - 2.2. Secuencia clásica de las reacciones
 - 2.2.1. Vía intrínseca
 - 2.2.2. Vía extrínseca
 - 2.3. Estructura, síntesis y función de los factores de la coagulación
 - 2.3.1. Estructura genérica de las enzimas de la coagulación
 - 2.3.2. Estructura y activación de los factores del sistema de contacto
 - 2.3.3. Factores vitamina K dependientes
 - 2.3.4. Factor tisular
 - 2.3.5. Cofactores V y VIII
 - 2.3.6. Complejos macromoleculares
 - 2.3.7. Fibrinógeno, trombina, factor XIII y formación de fibrina
 - 2.4. Vida media de los factores
 - 2.5. Sistema de la coagulación *in vivo*
 - 2.6. Regulación del sistema de la coagulación
 - 2.6.1. Sistema antitrombina III
 - 2.6.2. Sistema de la proteína C
 - 2.6.3. Inhibidor de la vía extrínseca
 - 2.6.4. Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z
 - 2.6.5. Anexinas
- 3. Sistema fibrinolítico 511
 - 3.1. Componentes del sistema fibrinolítico
 - 3.1.1. Plasminógeno
 - 3.1.2. Activadores del plasminógeno
 - 3.1.3. Plasmina
 - 3.2. Regulación del sistema fibrinolítico
 - 3.2.1. PAI-1 y PAI-2
 - 3.2.2. Alfa 2 antiplasmina
 - 3.2.3. Inhibidor fibrinolítico dependiente de trombina

Capítulo 21 515

TROMBOCITOPENIAS Y TROMBOCITOPATÍAS

Jaime Pereira G., Diego Mezzano A. y Vicente Vicente G.

- 1. Introducción 516
- 2. Trombocitopenias 516
 - 2.1. Trombocitopenias hereditarias

- 2.1.1. Generalidades
 - 2.1.2. Trombocitopenias amegacariocíticas
 - 2.1.3. Trombocitopenia y radio ausente
 - 2.1.4. Síndrome de Wiskott-Aldrich y Trombocitopenia ligada a X
 - 2.1.5. Síndrome velocardiofacial
 - 2.1.6. Enfermedades relacionadas a MYH9
 - 2.2. Trombocitopenias adquiridas
 - 2.2.1. Trombocitopenias por disminución de la producción
 - a) Hipoplasia megacariocítica inducida por drogas
 - b) Hipoplasia megacariocítica asociada a infección viral
 - 2.2.2. Trombocitopenias por aumento de la destrucción
 - a) Trombocitopenias inmunes
 - a1) Trombocitopenias autoinmunes primarias
 - Púrpura trombocitopénico inmunológico agudo
 - Púrpura trombocitopénico inmunológico crónico
 - a2) Trombocitopenias autoinmunes secundarias
 - Trombocitopenias asociadas al uso de drogas
 - Trombocitopenia inducida por heparina
 - a3) Trombocitopenias aloinmunes
 - Púrpura aloinmune neonatal
 - Púrpura postransfusional
 - b) Trombocitopenias no inmunes
 - b1) Púrpura trombótica trombocitopénica/síndrome hemolítico urémico
 - b2) Trombocitopenia del embarazo
 - b3) Preeclampsia/eclampsia
 - b4) Trombocitopenia asociada a infección
 - b5) Trombocitopenia asociada a exposición a superficies no biológicas
 - 2.2.3 Trombocitopenia por secuestro esplénico
 - 2.2.4 Trombocitopenia dilucional
3. Trombocitopatías 531
 - 3.1. Trombocitopatías hereditarias
 - 3.1.1. Defectos hereditarios de la adhesión plaquetaria
 - a) Patología del complejo glicoproteico Ib-IX-V: Síndrome de Bernard-Soulier y pseudo-von Willebrand.
 - a1) Síndrome de Bernard-Soulier (SBS)
 - a2) Síndrome de pseudo-von Willebrand
 - b) Patología de los receptores plaquetarios del colágeno: complejo glicoproteico Ia-IIa, GPVI, GPIV.
 - b1) Patología del complejo GPIa-IIA
 - b2) Patología de la GPVI
 - b3) Patología de la GPIV
 - 3.1.2. Defectos hereditarios de la agregación plaquetaria: Tromboastenia de Glanzmann
 - 3.1.3. Defectos congénitos de la secreción plaquetaria: Anormalidades granulares
 - a) Síndrome de las plaquetas grises
 - b) Deficiencia en el almacenamiento de gránulos δ
 - c) Deficiencia combinada de gránulos α y δ

- d) Alteración plaquetaria tipo Quebec
- 3.1.4. Defectos hereditarios en los mecanismos implicados en la transmisión de señales de activación plaquetaria.
 - a) Defectos en los receptores para agonistas
 - b) Defectos en otros elementos intraplaquetarios implicados en la activación: proteínas G, enzimas efectoras, segundos mensajeros, fosforilación de proteínas.
 - c) Defectos en el metabolismo del ácido araquidónico y/o en la producción de tromboxano A₂
- 3.1.5. Alteraciones congénitas de la actividad procoagulante de las plaquetas
- 3.1.6. Otras trombocitopatías
- 3.2. Trombocitopatías adquiridas
 - 3.2.1. Asociadas a enfermedades sistémicas
 - a1) Trombocitopatía urémica
 - a2) Anomalía funcional de las plaquetas en insuficiencia hepática
 - a3) Alteraciones plaquetarias inducidas por la cirugía con circulación extracorpórea
 - a4) Disfunción plaquetaria en leucemias, mielodisplasias y disproteinemias
 - 3.2.2. Disfunciones plaquetarias inducidas por drogas y alimentos
 - b1) Aspirina y antiinflamatorios no esteroideos (AINE)
 - b2) Antibióticos β-lactámicos
 - b3) Heparina y fibrinolíticos
 - b4) Drogas que aumentan la concentración de cAMP y Cgmp en plaquetas
 - b5) Expansores de volumen
 - b6) Otras sustancias y fármacos

Capítulo 22

563

HEMOFILIAS, ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND Y OTRAS ALTERACIONES HEREDITARIAS DE LA COAGULACIÓN

Mario Donoso S., Iván Palomo G., Carmen Gloria Artigas A. y Jaime Pereira G.

- 1. Introducción 564
- 2. Hemofilia 564
 - 2.1. Hemofilia clásica o tipo A
 - 2.2. Hemofilia tipo B
 - 2.3. Diagnóstico
 - 2.4. Cuadro clínico y conducta
 - 2.4.1. Conceptos generales
 - 2.4.2. Sangrado en sitios especiales
 - 2.4.3. Rehabilitación
 - 2.4.4. Procedimientos diagnósticos y terapéuticos
 - 2.4.5. Inhibidores
 - 2.5. Terapia de reemplazo
 - 2.5.1. Tipos de terapia de reemplazo
 - 2.5.2. Cálculo de dosis del factor a administrar
 - 2.5.3. Forma de administrar el factor deficitario

2.6. Terapia génica	
2.7. Terapia asociada	
3. Enfermedad de von Willebrand	571
3.1. Factor von Willebrand	
3.1.1. Estructura	
3.1.2. Biosíntesis y secreción	
3.1.3. Función	
3.1.4. Regulación de los niveles sanguíneos	
3.2. Clasificación y patología molecular de la enfermedad de von Willebrand	
3.2.1. EvW tipo 1	
3.2.2. EvW tipo 2	
3.2.3. EvW tipo 3	
3.3. Clínica	
3.4. Diagnóstico	
3.4.1. Pruebas de «screening»	
3.4.2. Pruebas específicas	
3.4.3. Pruebas para diagnóstico de subtipos	
3.5. Tratamiento	
4. Otras alteraciones hereditarias de la coagulación	577
4.1. Alteraciones de fibrinógeno	
4.1.1. Afibrinogenemia	
4.1.2. Disfibrinogenemia	
4.2. Déficit de factor XIII	
4.3. Déficit de protrombina	
4.4. Déficit de factor V	
4.5. Déficit de factor VII	
4.6. Déficit de factor X	
4.7. Déficit de factor XI	
4.8. Déficit de factor XII	
4.9. Déficit de precalicreína	
4.10. Déficit de kininógeno de alto peso molecular (HMWK)	
4.11. Deficiencia de α_2 antiplasmina	

Capítulo 23	585
-------------	-----

ALTERACIONES HEMORRAGÍPARAS ADQUIRIDAS DE LA COAGULACIÓN

Patricia Fardella B. e Iván Palomo G.

1. Introducción	586
2. Coagulación intravascular diseminada	586
2.1. Tipos de CID	
2.2. Etiologías	
2.3. Elementos que gatillan la CID	
2.4. Eventos fisiopatológicos	
2.5. Características clínicas	
2.6. Laboratorio	
2.7. Criterios diagnósticos	
2.8. Tratamiento	

3. Deficiencia de vitamina K	592
3.1. Causas de deficiencia de vitamina K	
3.2. Diagnóstico	
3.3. Tratamiento	
4. Alteraciones hemostáticas en enfermedades hepáticas	592
4.1. Enfermedades hepáticas y fisiopatología de la hemostasia	
4.1.1. Hepatitis aguda	
4.1.2. Enfermedad hepática crónica	
4.1.3. Colestasia	
4.1.4. Enfermedad hepática neoplásica	
4.1.5. Cirugías	
4.1.6. Trasplante hepático	
4.2. Laboratorio	
4.3. Tratamiento	
5. Inhibidores adquiridos de la coagulación	596
5.1. Inhibidores de factor VIII	
5.1.1. Clasificación	
5.1.2. Características	
5.1.3. Detección	
5.1.4. Tratamiento	
5.2. Inhibidores de factor IX	
5.3. Inhibidores de factor XI	
5.4. Inhibidores de factor V	
Capítulo 24	601
TROMBOFILIAS	
<i>Jaime Pereira G., Guillermo Conte L. e Iván Palomo G.</i>	
1. Introducción	602
2. Trombofilias hereditarias	603
2.1. Deficiencia de antitrombina III	
2.2. Deficiencia de proteína C	
2.3. Deficiencia de proteína S	
2.4. Factor V Leiden y resistencia a la proteína C activada	
2.5. Mutación G20210A del gen de la protrombina	
2.6. Disfibrinogenemias hereditarias	
2.7. Deficiencia hereditaria de factor XII	
3. Trombofilias adquiridas	609
3.1. Síndrome antifosfolípidos (SAF)	
3.1.1. Anticuerpos antifosfolípidos	
3.1.2. Antígenos	
3.1.3. Patogénesis	
3.1.4. Clínica	
3.1.5. Diagnóstico	
3.1.6. Tratamiento	

3.2. Cáncer	
3.2.1. Moléculas procoagulantes	
3.2.2. Sistema fibrinolítico	
3.2.3. Citoquinas	
3.2.4. Interacciones celulares	
3.3. Síndromes mieloproliferativos	
3.4. Hemoglobinuria paroxística nocturna	
3.5. Síndrome nefrótico	
4. Trombofilias por mecanismo mixto	620
4.1. Hiperhomocisteinemia	
4.1.1. Patogenia	
4.1.2. Diagnóstico	
4.2. Aumento de los niveles de factores de la coagulación	
5. Estrategia diagnóstica	623
Capítulo 25	625
TRATAMIENTO ANTITROMBÓTICO	
<i>Jorge Aldunate O. y María Jesús Vial C.</i>	
1. Introducción	626
2. Fármacos antiplaquetarios	628
2.1. Mecanismo de acción de los antiplaquetarios	
2.2. Uso de pruebas de laboratorio para el control del tratamiento con antiplaquetarios	
2.3. Bases farmacológicas de los fármacos antiplaquetarios	
2.3.1. Ácido acetilsalicílico	
2.3.2. Clopidogrel	
2.3.3. Dipyridamol	
2.3.4. Eptifibatide	
2.3.5. Ticlopidina	
2.3.6. Tirofiban	
3. Anticoagulantes	632
3.1. Anticoagulantes parenterales: heparinas	
3.1.1. Historia de las heparinas	
3.1.2. Composición química de la heparina	
3.1.3. Mecanismo de acción de la heparina: Efecto sobre la AT-III	
3.1.4. Uso de pruebas de laboratorio para el control del tratamiento con heparina	
3.1.5. Farmacocinética de las heparinas	
3.1.6. Efectos secundarios y reacciones adversas del uso de heparinas	
3.1.7. Contraindicaciones	
3.1.8. Indicaciones terapéuticas	
3.2. Anticoagulantes orales	
3.2.1. Generalidades	
3.2.2. Mecanismos de acción de los anticoagulantes orales	
3.2.3. Fármacos anticoagulantes orales disponibles en Chile	
3.2.4. Interacciones de los anticoagulantes orales	

3.2.5. Mecanismos de interacción farmacológica	
3.2.6. Efectos secundarios de los anticoagulantes orales	
3.2.7. Monitorización del tratamiento anticoagulante oral	
3.2.8. Indicaciones clínicas de la terapia anticoagulante oral	
3.2.9. Contraindicaciones de terapia anticoagulante oral	
3.2.10. Resistencia a los anticoagulantes orales	
4. Fármacos fibrinolíticos	645
4.1. Proceso fibrinolítico	
4.2. Uso médico del proceso fibrinolítico	
4.3. Fármacos anticoagulantes fibrinolíticos disponibles en Chile.	
5. El futuro en el tratamiento antitrombótico	646

SECCIÓN V. LABORATORIO 649

Capítulo 26 651

SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA: MUESTRAS Y VALORES DE REFERENCIA

Iván Palomo G., Marcelo Alarcón L., Claudio Cruzat C. y Eduardo Retamales C.

1. Introducción	652
2. Anticoagulantes	652
2.1. Ácido etilendiaminotetracético	
2.2. Citrato de sodio	
2.3. Heparina	
3. Recolección de sangre periférica	653
3.1. Sistemas de recolección de muestras	
3.2. Tipos de punción	
3.2.1. Punción venosa	
3.2.2. Punción capilar	
3.3. Almacenaje y transporte	
3.4. Frotis sanguíneo	
4. Obtención de médula ósea	655
4.1. Aspirado de médula ósea	
4.2. Biopsia de médula ósea	
5. Tinción de May-Grünwald Giemsa	655
6. Unidades hematológicas internacionales	656
7. Valores de referencia normal	659

Capítulo 27 663

HEMOGRAMA, MIELOGRAMA Y BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA

Iván Palomo G., Claudio Cruzat C., Marcelo Alarcón L., Marianela Agurto O. y Eduardo Retamales C.

1. Introducción	664
2. Hemograma	664
2.1. Glóbulos rojos	
2.1.1. Análisis cuantitativo	

- a) Hematocrito
 - b) Hemoglobina
 - c) Recuento de glóbulos rojos
 - d) Constantes hematológicas
 - e) Recuentos de reticulocitos
 - f) Índice icterico
 - g) Velocidad de eritrosedimentación
- 2.1.2. Análisis citológico
- a) Alteraciones del tamaño
 - b) Alteraciones del color
 - c) Alteraciones en la forma
 - d) Inclusiones intraeritrocitarias
- 2.2. Glóbulos blancos
- 2.2.1. Análisis cuantitativos
- a) Recuento de leucocitos
 - b) Fórmula leucocitaria
- 2.2.2. Análisis cualitativo
- a) Neutrófilos
 - b) Linfocitos
- 2.3. Plaquetas
- 2.3.1. Análisis cuantitativo
- a) Recuento de plaquetas
- 2.3.2. Análisis citológico
- 2.4. Contadores celulares
- 2.4.1. Principio de los contadores celulares
- 2.4.2. Tipos de contadores
- 2.4.3. Muestra de sangre
- 2.4.4. Aseguramiento de la calidad
- 2.4.5. Procedimientos e instrucciones
- 2.4.6. Fuentes de error
- 2.4.7. Limitaciones del sistema
- 2.4.8. Confiabilidad de los resultados
- 2.4.9. Correlación con frotis sanguíneo
- 2.5. Recomendaciones para la interpretación del hemograma
3. Estudio de médula ósea 680
- 3.1. Mielograma
- 3.2. Biopsia de médula ósea
- 3.2.1. Aspectos generales
- 3.2.2. Médula ósea normal
- a) Distribución de la médula hematopoyética y celularidad
 - b) Células hematopoyéticas normales
 - c) Composición celular de la médula ósea y relación mieloide/eritroide
- 3.2.3. Alteraciones estructurales y anomalías morfológicas en la biopsia de médula ósea
- a) Alteraciones generales
 - b) Biopsia de médula ósea en enfermedades hematológicas específicas

Capítulo 28	691
ESTUDIO DE LABORATORIO DE ANEMIAS NUTRICIONALES.	
<i>Iván Palomo G., Fernando Pizarro A., Manuel Olivares G., Miguel Arredondo O., Marcelo Alarcón L. y Gonzalo Pombo V.</i>	
1. Introducción	692
2. Métodos de laboratorio para estudio de las anemias hipocromas	692
2.1. Etapas de la deficiencia de hierro	
2.2. Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de hierro	
2.3. Diagnóstico diferencial	
3. Estudio de laboratorio de las anemias megaloblásticas	697
3.1. Estudio de anemia megaloblástica	
3.1.1. Hemograma	
3.1.2. Mielograma	
3.1.3. Bioquímica sérica	
3.1.4. Vitamina B ₁₂ y ácido fólico	
3.1.5. Prueba terapéutica	
3.2. Pruebas para diagnóstico de anemia perniciosa	
3.2.1. Endoscopía con biopsia duodenal	
3.2.2. Anticuerpos anti-factor intrínseco	
3.2.3. Pruebas de Shilling	
3.3. Otras pruebas	
Capítulo 29	701
ESTUDIO DE LABORATORIO DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS.	
<i>Iván Palomo G., Marcela Vásquez R., Marcelo Alarcón A., Mónica Maldonado R. y Leonor Armanet B.</i>	
1. Introducción	702
2. Anemias hemolíticas intracorporales	702
2.1. Membranopatías	
2.1.1. Esferocitosis Hereditaria	
2.1.2. Hemoglobinuria paroxística nocturna	
2.2. Enzimopatías	
2.2.1. Déficit de Glucosa fosfato deshidrogenasa (G6PD)	
2.2.2. Déficit de Piruvato kinasa (PK)	
2.3. Globinopatías	
3. Anemias hemolíticas extracorporales	705
3.1. Anemias hemolíticas inmunes	
3.1.1. Anemias hemolíticas aloinmunes	
3.1.2. Anemias hemolíticas autoinmunes	
3.2. Anemias hemolíticas no inmunes	
Capítulo 30	717
ESTUDIO DE LABORATORIO DE ENFERMEDADES ONCOHEMATOLÓGICAS	
<i>María Eugenia Legues S., Concepción Risueño A., Juan Luis Castillo N., Elba Leiva M. e Iván Palomo G.</i>	
1. Introducción	718

2. Citoquímica	718
2.1. Antecedentes generales	
2.2. Selección de métodos citoquímicos	
2.2.1. Peroxidasas	
2.2.2. Esterasas	
2.2.3. Fosfatasas ácidas	
2.2.4. Fosfatasas alcalinas de los neutrófilos	
2.2.5. Tinción de Perls para hierro	
2.3. Aspectos especiales	
3. Estudio citogenético	720
3.1. Citogenética clásica	
3.1.1. Antecedentes generales	
3.1.2. Análisis citogenético	
a) Fotografía y cariotipo	
b) Leucemia aguda	
c) Síndromes mielodisplásicos	
d) Anemia aplásica	
e) Leucemia mieloide crónica y otros síndromes mieloproliferativos	
f) Síndromes linfoproliferativos	
3.1.3. Aspectos prácticos	
3.2. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia	
3.2.1. Antecedentes generales	
3.2.2. Aspectos metodológicos	
3.2.3. FISH interfásico	
3.2.4. FISH en el seguimiento de una enfermedad	
3.2.5. Avances relacionados con FISH	
4. Biología molecular	726
4.1. PCR y modificaciones	
4.1.1. PCR	
4.1.2. RT-PCR	
4.1.3. Q-PCR	
4.2. Aplicaciones de las PCR en oncohematología	
4.2.1. Leucemias Agudas	
4.2.2. Leucemia mieloide crónica	
4.2.3. Linfomas no Hodgkin	
4.3. Consideraciones	
5. Citometría de flujo	732
5.1. Generalidades	
5.2. Aplicaciones en el estudio de Leucemias, linfomas y gammapatías monoclonales	
5.2.1. Indicaciones médicas	
5.2.2. Toma de muestras para estudios inmunofenotípicos	
5.2.3. Almacenamiento y transporte de muestras para estudios inmunofenotípicos	
5.2.4. Preparación de la muestra para un estudio inmunofenotípico	
5.2.5. Análisis según cuadro clínico	
5.2.6. Informe de resultados	
6. Inmunoquímica aplicada a Gammapatías monoclonales	737
6.1. Pesquisa y estudio de la proteína monoclonal	

- 6.2. Viscosidad sérica
- 6.3. Beta 2 microglobulinemia
- 6.4. Inhibidor 1 del activador de Plasminógeno (PAI-1), Fibrinógeno, Proteína C reactiva (PCR) e Interleuquina 6 (IL-6).
- 6.5. Nuevos marcadores

Capítulo 31 745

ESTUDIO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES HEMORRAGÍPARAS.

Iván Palomo G., Blanca Muñoz V., Eduardo Retamales C., Olga Panes B., Carmen Gloria Artigas A. y Patricia Hidalgo P.

- 1. Introducción 746
- 2. Estudio de alteraciones de la coagulación 746
 - 2.1. Pruebas de coagulación
 - 2.1.1. Pruebas de “screening”
 - 2.1.2. Dosificación de factores
 - 2.2. Coagulómetros
 - 2.2.1. Tecnologías de coagulómetros
 - 2.3. Control de calidad interno en coagulación
 - 2.3.1. Fase pre-analítica
 - 2.3.2. Fase analítica
 - 2.3.3. Fase post-analítica
 - 2.4. Control de calidad externo
- 3. Estudio de la enfermedad de von Willebrand 753
 - 3.1. Factor von Willebrand (FVW)
 - 3.2. Clasificación de la Enfermedad de von Willebrand
 - 3.2.1. EvW tipo 1
 - 3.2.2. EvW tipo 2
 - 3.2.3. EvW tipo 3
 - 3.3. Laboratorio
 - 3.3.1. Exámenes básicos de hemostasia
 - 3.3.2. Exámenes para identificar el tipo EvW
 - 3.3.3. Exámenes para identificar el subtipo de EvW
 - 3.3.4. Exámenes adicionales
- 4. Estudio de laboratorio de las trombocitopenias inmunes 755
 - 4.1. Métodos generales
 - 4.2. Métodos de pesquisa de Anticuerpos antiplaquetarios
 - 4.2.1. Métodos de fase I
 - 4.2.2. Métodos de fase II
 - 4.2.3. Métodos de fase III
 - 4.2.4. Métodos para estudiar las trombocitopenias inducidas por drogas
 - 4.3. Biología Molecular aplicada a las trombocitopenias inmunes
- 5. Estudio de la función plaquetaria 760
 - 5.1. Principales disfunciones plaquetarias
 - 5.1.1. Desórdenes adquiridos
 - 5.1.2. Desórdenes hereditarios

- 5.2. Estudios de laboratorio
 - 5.2.1. Pruebas de “screening”
 - 5.2.2. Estudios para determinar la causa de la alteración
 - 5.2.3. Estudio de agregación plaquetaria
 - 5.2.4. Estudio de secreción plaquetaria
 - 5.2.5. Estudio de glicoproteínas plaquetarias específicas

Capítulo 32 767
 ESTUDIO DE LABORATORIO DE LAS TROMBOFILIAS
Iván Palomo G., Ricardo Forastiero V., Silvia Pierangeli y Jaime Pereira G.

- 1. Introducción 768
- 2. Trombofilias hereditarias 768
 - 2.1. Principios de la metodología aplicada al estudio de trombofilias
 - 2.1.1. Ensayos funcionales
 - 2.1.2. Ensayos inmunológicos
 - 2.1.3. Ensayos genéticos por PCR
 - 2.2. Trombofilias hereditarias
 - 2.2.1. Antitrombina III
 - 2.2.2. Proteína C
 - 2.2.3. Proteína S
 - 2.2.4. Resistencia a la PC activada
 - 2.2.5. Factor V Leiden
 - 2.2.6. Polimorfismo G20210A del gen de la protrombina
 - 2.2.7. Homocisteína plasmática
- 3. Anticuerpos antifosfolípidos 773
 - 3.1. Anticuerpos anticardiolipina
 - 3.2. Anticoagulante lúpico
 - 3.3. Otras pruebas de laboratorio

ÍNDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS 779

PREFACIO

*Al igual que otras ciencias biomédicas, en la última década la hematología ha presentado importantes avances, tanto en el campo de la fisiopatología y diagnóstico, como también en las estrategias de tratamiento. Con el propósito de poner esta información al alcance de los alumnos de pregrado, postgrado y profesionales, el primer semestre de 2003 iniciamos la edición del libro docente **Hematología: Fisiopatología y Diagnóstico**.*

En esta iniciativa participan, como autores de capítulos, 65 profesionales que trabajan, ya sea como médicos hematólogos o en importantes laboratorios de hematología; muchos de ellos son profesores de cátedras de hematología. Si bien la mayoría de los autores son chilenos, doce académicos son de Estados Unidos, España, México y Argentina.

El libro, constituido por 32 capítulos, 782 páginas, 127 figuras y 181 tablas, está estructurado en cinco secciones: Hematopoyesis, Glóbulos rojos, Glóbulos blancos, Hemostasia y Trombosis, y Laboratorio. La sección I trata, en dos capítulos, la Hematopoyesis; la sección II se refiere a los eritrocitos, tanto sus aspectos estructurales y funcionales, como a los diferentes tipos de anemia; la sección III trata los aspectos normales y patológicos (no malignos y malignos) de los leucocitos; la sección IV se refiere a los aspectos normales de la hemostasia primaria y secundaria y a las patologías (síndromes hemorrágicos y trombosis) tanto hereditarias como adquiridas; finalmente, en la sección V se presentan los principios y aplicaciones más relevantes de los métodos de laboratorios utilizados en el diagnóstico de las diferentes patologías hematológicas. Para dar al libro una estructura simple y hacerlo más comprensible al alumno de pregrado, algunos temas están agrupados en un solo capítulo, a modo de ejemplo en el capítulo 12, Leucemias agudas incluye a la Leucemia linfática aguda y las Leucemias mieloides agudas. Adicionalmente el lector podrá encontrar 36 casos clínicos de diferentes enfermedades hematológicas, preparados por autores de este libro en: <ftp://colbun.utralca.cl/CasosClinicosHematologia/CCHematologia.pdf>.

*Por tratarse de un texto docente, con el propósito de facilitar la lectura, en los capítulos se han numerado los subtítulos, y en cada uno de ellos se ha incluido, al comienzo, un **Índice de capítulo** y un **Resumen**; y al final las **Lecturas Sugeridas**. Con el mismo objetivo, se incluye un **Índice alfabético general de materias**.*

Si bien el texto está escrito en castellano, se usarán algunos términos y siglas en inglés por lo difundido de su uso, como por ejemplo DNA, RNA y LT “helper”.

Damos las gracias al Prof. Dr. Camilo Larraín A., por haber escrito el Prólogo y al Prof. Dr. Arnaldo Toradori C., por presentar el libro en la ceremonia de lanzamiento del mismo.

Agradecemos a las personas que colaboraron en la edición del libro: a la correctora de textos, Profesora María Cecilia Tapia Castro, por su excelente trabajo profesional; a la alumna de Tecnología Médica de la Universidad de Talca, Srta. Bárbara Fuentes Y., quien realizó las figuras del libro; a la Diseñadora Gráfica y Directora de la Editorial, Sra. Marcela Albornoz D., y a la secretaria Haydée Álvarez A., nuestro reconocimiento por su destacada colaboración en el trabajo de preedición.

Agradecemos también a las instituciones que respaldaron nuestro trabajo con su patrocinio: la Sociedad Chilena de Hematología. También agradecemos a la Universidad de Talca, Pontificia Universidad Católica de Chile, Universidad de Chile, Universidad de La Frontera, Universidad de Antofagasta, Universidad Andrés Bello, e Instituto de Salud Pública de Chile.

Damos las gracias a la Universidad de Talca, en la persona de su Rector, Prof. Dr. Álvaro Rojas Marín, y a la Editorial de esta institución en la persona del Vicerrector de Extensión y Comunicaciones, Prof. Dr. Pedro Zamorano Pérez, por el apoyo otorgado durante el desarrollo de esta obra.

Finalmente, expresamos nuestro deseo que este libro sea de utilidad e interés para alumnos y profesionales que deseen conocer algo más sobre la fisiopatología y diagnóstico de las enfermedades hematológicas.

*Iván Palomo G.
Jaime Pereira G.
Julia Palma B.*

PRÓLOGO

Los problemas hematológicos que afectan al país han sido estudiados por diversos grupos de hematólogos, a lo largo de los últimos 60 años del siglo XX, en investigaciones fundamentalmente clínicas, que han sido publicadas principalmente en la Revista Médica de Chile y en la Revista Chilena de Pediatría. En dichas publicaciones se ha aplicado el método científico, que es el que permite entender las modificaciones que la enfermedad produce en el organismo afectado por ella; esto ha permitido realizar avances formidables, que un observador situado a comienzos del siglo no hubiera podido imaginar.

Conocer, a través de la investigación, los mecanismos que llevan a la enfermedad, parece ser el mejor camino que conduce a realizar un diagnóstico y terapéutica correctos. Esto es lo que ha llevado a Iván Palomo, de la Unidad de Hematología e Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunoematología, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca; a Jaime Pereira, del Departamento de Hematología y Oncología, Facultad de Medicina de la Pontificia Univesidad Católica de Chile y a Julia Palma, del Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y médica especializada en trasplantes de médula ósea, del Hospital Luis Calvo Mackenna, a editar este hermoso libro, que trata de la fisiopatología y diagnóstico en hematología.

A lo largo de la obra se suceden en forma ordenada, sistemática y profunda las descripciones de las modificaciones fisiopatológicas de la hematopoyesis, de los eritrocitos, de los leucocitos, de la hemostasis y, finalmente, de los métodos de estudio más útiles en la evaluación y diagnóstico de las diferentes enfermedades hematológicas, completando en total 32 capítulos.

La primera de las 5 secciones del libro está dedicada a la hematopoyesis y en ella se destaca el rol de la célula troncal hematopoyética ubicada, en el adulto, en la médula ósea y la responsable de la diferenciación de las diversas estirpes de células sanguíneas maduras. Se analiza también la posibilidad de utilizarla en terapias de reemplazo celular en tejidos que han perdido su funcionalidad o son asiento de neoplasias malignas. La descripción abarca no sólo el uso de la célula troncal hematopoyética, sino también el de la célula troncal mesenquimática.

En la segunda sección, dedicada al eritrocito, se revisa su estructura, fisiología y metabolismo normales, las características de la hemoglobina y sus variantes; se describe la anemia y sus consecuencias, también los procesos fisiopatológicos que explican la gran variedad de anemias, su sintomatología y la manera de diagnosticarlas.

La fisiopatología de los leucocitos ocupa la tercera sección de la obra, que se inicia con una descripción de éstos y del sistema inmune en la que se revisan los diversos tipos de leucocitos, la función diferente de los linfocitos, de los granulocitos, del sistema fagocítico mononuclear (monocitos, macrófagos y células dendríticas) y el rol de los órganos linfáticos primarios y secundarios. Se enumeran, a continuación, las alteraciones fisiopatológicas de las afecciones benignas y luego de las malignas, seguidas de una información sobre el trasplante de progenitores hematopoyéticos y su utilización en los procesos hematológicos tumorales (leucemias y linfomas) y su indicación en defectos hematológicos congénitos y adquiridos como la anemia aplásica. La sección se cierra con una referencia respecto del empleo de las células troncales del cordón umbilical y una nota sobre las enfermedades lisosomales e histiocitosis.

La cuarta sección, dedicada a la hemostasis se abre con una exposición de lo que es la hemostasis primaria y se sigue con el análisis de la coagulación sanguínea y luego de la fibrinólisis, tal como funcionan en condiciones normales, adentrándose posteriormente en la fisiopatología de las trombocitopenias, de las trombocitopatías, de la hemofilia, de la enfermedad de von Willebrand y de las enfermedades adquiridas de la coagulación sanguínea. Completan la sección un análisis de la trombo-sis y sus variantes: trombofilias hereditarias y adquiridas y del uso en ellas de la terapia anticoagulante.

Crucial en el diagnóstico de las enfermedades hematológicas es el empleo de los métodos tecnológicos de laboratorio. La quinta sección trae una detallada mención de éstos, en la que se exponen las características citológicas de la sangre y de la médula ósea y el aporte diagnóstico de las diversas técnicas hematológicas en la patología eritrocitaria y leucocitaria, en las enfermedades hemorrágicas y en la trombosis.

Lo anterior hace que este libro sea de la mayor utilidad en el mejor conocimiento de la fisiopatología de los órganos hematopoyéticos; entrega un enorme caudal de información respecto de lo mucho que ahora se sabe en hematología. Está escrito por especialistas en los temas abordados y, hecho interesante, la mayoría de ellos se ha formado y trabaja en nuestro medio, lo que habla del alto grado de desarrollo que alcanza la hematología en el país. Digna también de encomio es la contribución que entregan los especialistas latinoamericanos, a quienes se ha pedido colaboración.

La obra es un texto de consulta indispensable en esta materia para estudiantes, médicos, tecnólogos médicos y también para hematólogos. Es, ciertamente, el producto de un esfuerzo loable de sus editores y de la Universidad de Talca, que merece ser destacado en lo mucho que vale.

Prof. Dr. Camilo Larraín Aguirre

*Profesor titular
Facultad de Medicina
Universidad de Chile*

HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico

Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.
Editorial Universidad de Talca, 2005



SECCIÓN I

HEMATOPOYESIS

HEMATOPOYESIS

Claudia Sáez S. e Iván Palomo G.

1. Introducción

2. Médula ósea

2.1. Histología

3. Células troncales hematopoyéticas

3.1. Definición de célula troncal hematopoyética

3.2. Estudio de la célula troncal hematopoyética

3.3. Identificación y aislamiento de las células troncales hematopoyéticas

3.4. Heterogeneidad de las células troncales hematopoyéticas

3.5. División de las células troncales hematopoyéticas

3.6. Ontogenia de la célula troncal hematopoyética

3.7. Influencia de factores de crecimiento involucrados en la decisión de linaje

3.8. Genes involucrados en la decisión de linaje

4. El microambiente de la médula ósea

5. Granulomonopoyesis

5.1. Estadios madurativos

5.2. Factores de maduración

6. Eritropoyesis

6.1. Estadios madurativos

6.2. Eritropoyetina

6.3. Gen de EPO

7. Megacariopoyesis

7.1. Estadios madurativos

7.2. Regulación

8. Linfopoyesis

8.1. Células B

8.2. Células T

9. Estudio de la hematopoyesis

RESUMEN

Las células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) se forman en la médula ósea a partir de células pluripotentes, a través de un proceso finamente regulado.

Una característica distintiva del sistema hematopoyético es que las células maduras poseen una vida media corta, de modo que la hematopoyesis es, necesariamente, un proceso continuo durante la vida. En mamíferos, el sistema hematopoyético comprende una jerarquía de células en donde la célula troncal hematopoyética o "stem cell", es la base. En un individuo adulto, la célula troncal hematopoyética (CTH) reside en la médula ósea y es responsable del desarrollo de todos los linajes de células sanguíneas maduras, reflejando su pluripotencialidad, su capacidad de diferenciación, de proliferación y de auto-renovación. Estudios destinados a entender cómo la célula troncal pluripotencial es capaz de auto-renovarse, de desarrollar la capacidad de restricción de linaje y de adquirir las características de una célula terminalmente diferenciada, han permitido identificar un gran número de factores y genes los que interactúan en forma controlada y coordinada con la finalidad de mantener el desarrollo normal de la hematopoyesis. El microambiente en el cual las CTH y células progenitoras residen, otorga un entorno adecuado para el desarrollo de la hematopoyesis, proveyendo los factores y moléculas necesarias para la diferenciación, maduración y eventual emigración de las células a la circulación.

Además de entender la regulación del sistema hematopoyético, el conocimiento de la biología de las CTH es de crucial importancia médica, debido a su enorme potencial en reemplazos o reparación de tejidos y eventualmente como vehículo en terapias génicas.

En este capítulo se revisan los aspectos más importantes de la CTH, eritropoyesis, granulopoyesis, linfopoyesis y megacariopoyesis.

1. INTRODUCCIÓN

Las células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) se originan en la médula ósea mediante un complejo proceso de diferenciación y maduración celular. En este proceso denominado hematopoyesis participan varios factores de maduración. También es fundamental la participación de las moléculas de adhesión celular, presentes en las células hematopoyéticas, en las células del estroma y en la matriz extracelular.

Este capítulo describirá los aspectos fisiológicos fundamentales de la hematopoyesis y de cada una de las líneas celulares en particular.

2. MÉDULA ÓSEA

La hematopoyesis ocurre en la médula ósea a partir de la segunda mitad del embarazo y en el resto de la vida.

La médula ósea se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos (principalmente en las epifisis) y en los espacios existentes entre las trabéculas de los huesos esponjosos.

2.1. Histología

La médula ósea está formada por dos importantes compartimientos: vascular y hematopoyético (figura 1-1).

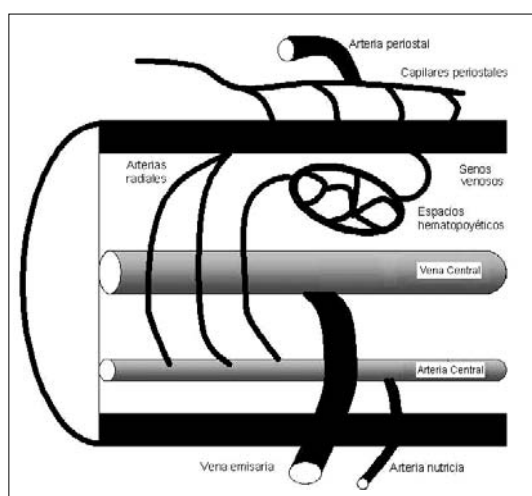


Figura 1-1. Estructura general de la médula ósea. Se destaca el compartimiento vascular (arterias, venas y sinusoides) y el compartimiento hematopoyético.

Los vasos sanguíneos del **compartimiento vascular** forman un esqueleto estructural en la médula ósea. La sangre que ingresa a la médula ósea lo hace por las arterias nutricias que perforan la diáfisis a través de los agujeros nutricios. Estas arterias entran en la cavidad medular y dan origen a la arteria longitudinal central, desde la cual se generan pequeños vasos que irrigan tanto la médula como el hueso cortical. Las ramas dirigidas a la médula descargan su sangre a capilares, los cuales vacían en una extensa red de sinusoides. Los sinusoides (45 a 80 μm de diámetro) están compuestos por células endoteliales, una lámina basal y una capa externa de células reticulares; estas últimas cubren aproximadamente el 50% de la superficie endotelial. Estos sinusoides drenan en una vena longitudinal central, que a su vez descarga su contenido en venas que salen del hueso por el conducto nutricional.

El pasaje transendotelial de células maduras, desde el compartimiento hematopoyético a la sangre ocurre directamente a través de poros

de migración transitorios ($<4 \mu\text{m}$ de diámetro) que se forman en las células endoteliales de los sinusoides.

El **compartimiento hematopoyético** está formado por los islotes de células hematopoyéticas de las diferentes líneas celulares (serie eritroblástica, serie granulocítica, serie monocítica serie linfocítica y serie megacariocítica), en sus distintos estadios madurativos. En células se ubican entre los sinusoides, y entre éstos y la cortical del hueso.

Además de las células hematopoyéticas en la médula ósea también existen otras células que forman parte del denominado estroma medular. Entre ellas destacan: macrófagos, células reticulares y algunas células adiposas (figura 1-2). Estas células participan activamente en la regulación de la hematopoyesis secretando citoquinas y factores de maduración. Adicionalmente los macrófagos fagocitan núcleos expulsados por los eritroblastos ortocromáticos al madurar a reticulocitos, células alteradas y células muertas.

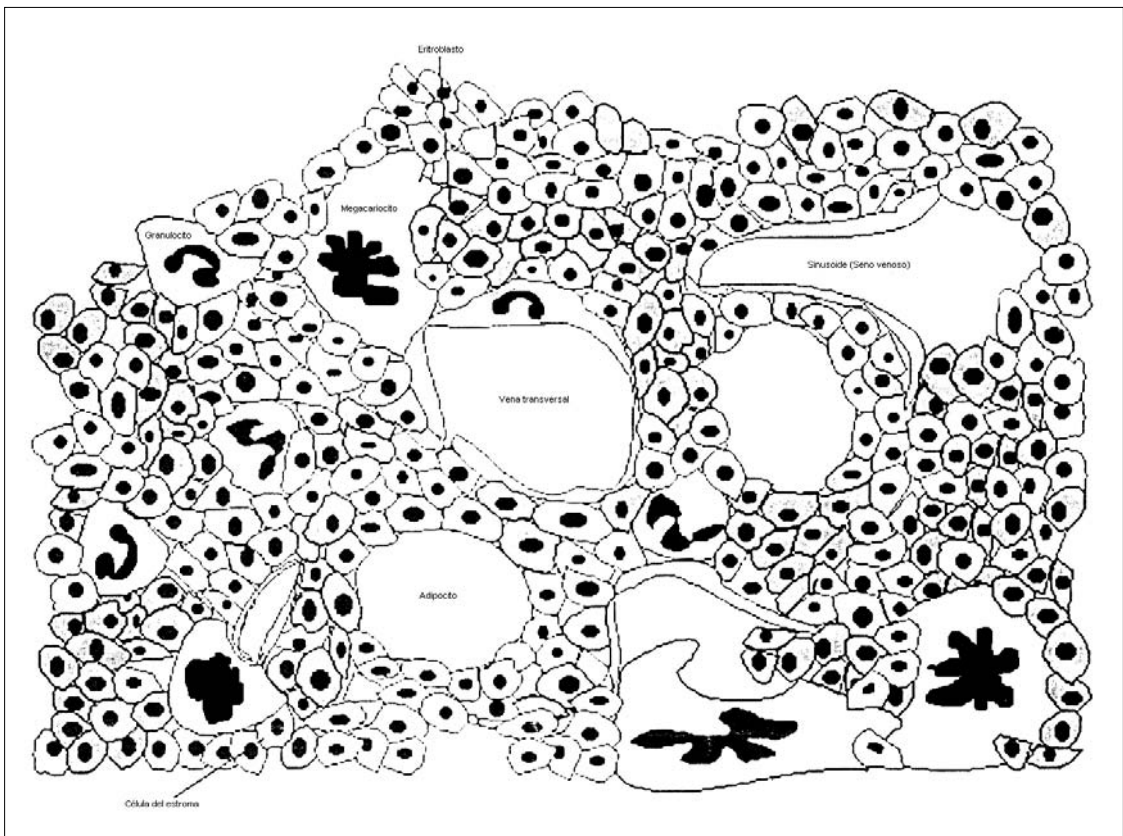


Figura 1-2. Estructura histológica de la médula ósea. La médula ósea está formada por vasos sanguíneos, sinusoides, células del estroma y células hematopoyéticas. Los distintos tipos de células se desarrollan en islotes hematopoyéticos ubicados a diferente distancia de la pared de los sinusoides, según el linaje celular.

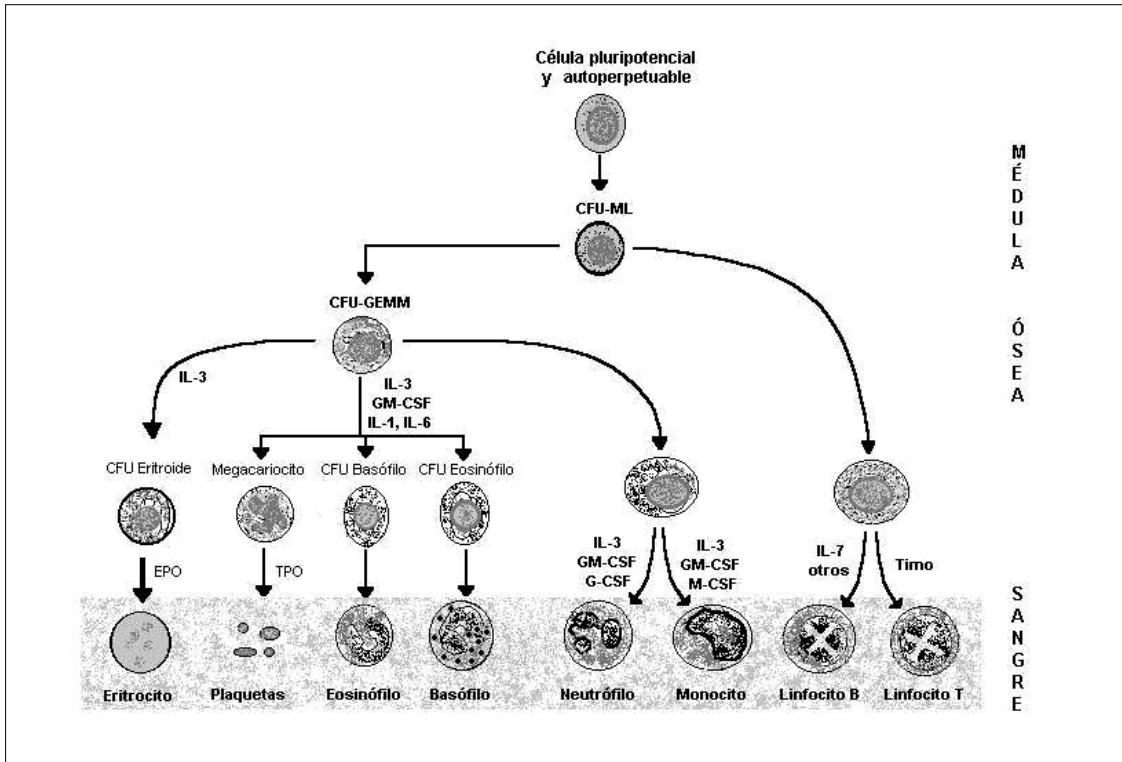


Figura 1-3. Esquema de la Hematopoyesis. La célula madre pluripotencial auto-perpetuable, da origen a una célula pluripotencial, también denominada CFU-ML (Unidad formadora de colonias mieloideas y linfocíticas), de la que se originan: a) el progenitor mieloide (CFU-GEMM), a partir del cual por procesos de maduración y diferenciación se originan los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, eritrocitos y plaquetas; y b) el progenitor linfocítico (CFU-L), que después de un proceso de maduración y diferenciación, da origen a los linfocitos T y linfocitos B. Se muestra los puntos de acción de las citoquinas (IL-1, IL-3, IL-6 e IL-7) y factores estimuladores de colonias (CSF) específicos, que participan como factores reguladores de la granulopoyesis y linfopoyesis. EPO, eritropoyetina; TPO, trombopoyetina.

Compartimiento de células madres. Las células madres o troncales (“stem cells”) representan menos del 1% de las células de la médula ósea. No son identificables morfológicamente, por lo que deben ser identificadas por el inmunofenotipo (CD34+, CD38-) y adicionalmente (CD90+, CD117+ y HLA-DR-), o ser estudiadas en cultivos *in vitro*.

Las CTH (“stem cells”) también denominadas CFU-ML (Unidad formadora de colonias mieloideas y linfocíticas) dan origen a dos líneas celulares principales, mieloide y linfocítica (figura 1-3). En la línea mieloide, a partir de la CFU-GEMM (granulocítica, eritroide, monocítica y megacariocítica) se producen dos diferentes CFU “encomendadas”, CFU-GM (granulocito, monocito) y CFU-MegE (megacariocito, eritroide); posteriormente se generan las CFU-G, CFU-M, CFU-E, CFU-Meg.

Entre los mecanismos de control que regulan las células troncales, destacan: células del estroma medular, matriz extracelular (fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno), moléculas de adhesión (integrinas, superfamilia de las inmunoglobulinas, selectinas), y citoquinas y factores de crecimiento.

Actualmente existen varias fuentes de «stem cells»: médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, hígado fetal y sistemas *in vitro*, siendo la sangre periférica y de cordón umbilical las más utilizadas actualmente en el tratamiento con células progenitoras.

Compartimiento mitótico. A partir de las CFU de las líneas celulares específicas antes mencionadas, se generan las primeras células reconocibles morfológicamente de cada línea celular: mieloblasto en el caso de los

granulocitos, que posteriormente madurará a promielocito y luego a mielocito etapa en la cual se diferencian las tres líneas específicas de los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos).

Comportamiento de maduración - almacenamiento. Las etapas posteriores de maduración de los granulocitos corresponden a juveniles, baciliformes y segmentados. Por su parte, la serie monocítica madura en las etapas de monoblasto y monocito.

De la CFU-Meg, la línea megacariocítica se reconoce las etapas de megacarioblasto, megacariocito y plaquetas. En la serie eritroblástica se reconocen las etapas, proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policomatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y glóbulo rojo.

En la línea linfoide, a partir de la CFU-L, después de un proceso de diferenciación y maduración se originan los linfocitos B y linfocitos T; estos últimos requieren una etapa posterior de maduración en el Timo.

3. CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS

3.1. Definición de célula troncal hematopoyética

Décadas de estudios funcionales realizados en ratones y últimamente en humanos, han contribuido a la definición conceptual de la célula troncal hematopoyética (CTH) como una población celular que reside en la médula ósea de un individuo adulto y que es responsable del origen de todo el espectro de células sanguíneas maduras.

Tres propiedades características de la CTH son, su multi-potencialidad, su capacidad de auto-renovación y de proliferación. Por lo tanto, una célula troncal hematopoyética puede ser definida como células clonogénicas que poseen la propiedad de renovarse a sí mismas, de proliferar y de diferenciarse hacia todos los tipos de células sanguíneas.

3.2. Estudio de la célula troncal hematopoyética

Con el propósito de comprender la biología de las CTH, se han desarrollado diversos ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. La mayoría de estos sistemas permiten estudiar la potencialidad de

las CTH para diferenciarse a células sanguíneas maduras o a sus precursores. En general, los ensayos *in vitro* miden la actividad de células más maduras, y los *in vivo*, generalmente detectan la actividad de células más primitivas, siendo necesario el trasplante o injerto de las células a un ambiente adecuado para producir la progenie.

Ensayos *in vitro*

Los sistemas de cultivo *in vitro* se pueden agrupar en dos categorías generales: los independientes de estroma y los dependientes de estroma:

a) Cultivo *in vitro* independiente de estroma.

Entre los cultivos de este tipo está el ensayo de unidades de formación de colonias en cultivo (CFU-C) el cual detecta el crecimiento de células hacia una población más madura, comprometida al linaje eritroide o mieloides. Las colonias emergen luego de 5 a 14 días de cultivo en un medio semi-sólido, en presencia de uno o más factores de crecimiento. Una célula primitiva que posea potencialidad de multilineaje y un alto grado proliferativo en cultivo, es denominada una "célula formadora de colonias de alto potencial proliferativo" ("high proliferative potential colony-forming cell": HPP-CFC). En este caso, es posible observar colonias que se caracterizan por alcanzar un tamaño mayor a 0,5 mm de diámetro y por contener varias células de la línea mieloides.

Cultivo *in vitro* dependiente de estroma. Un ensayo que se correlaciona mejor con la actividad de las CTH, es el cultivo dependiente de estroma por largos períodos de tiempo o "long-term culture initiating cell" (LTC-IC). Las células primitivas, cultivadas sobre una capa de células estromales generan progenie aproximadamente a las 12 semanas de cultivo, teniendo la precaución de remover células semanalmente para evitar su sobrecrecimiento. Esta alta capacidad de crecimiento es indicativa de la habilidad de auto-renovación continua que poseen las células primitivas.

Ensayos *in vivo*

Uno de los ensayos *in vivo* ampliamente utilizado, es el de formación de unidades de colonias en bazo o "colony-forming unit-spleen assay (CFU-S), desarrollado en 1961 por Till y McCulloch, el cual se basa en el trasplante de células de médula ósea o de bazo en ratones irradiados letalmente. Luego de 8 ó 12 días,

los bazos de estos ratones se analizan para la detección de colonias, llamadas CFU-S₈ y CFU-S₁₂, respectivamente. Estas colonias representan dos poblaciones diferentes de células, las que generaron las CFU-S₈ son predominantemente uni-potenciales y están compuestas primordialmente de células del linaje eritroide y las CFU-S₁₂ están compuestas por varios tipos de células mieloides, incluyendo eritrocitos, megacariocitos, macrófagos y granulocitos.

Un ensayo más riguroso para evaluar actividad de CTH es el ensayo de repoblación por largos períodos de tiempo o “long term repopulation assay” (LTRA), ya que requiere que las células a analizar posean los criterios que definen una CTH. Las células donantes son multipotenciales si generan células del linaje linfocítico (B y T) además del mieloide; poseen capacidad de auto-renovación si son capaces de mantener su actividad por periodos de tiempo prolongados y además, poseen la habilidad de proliferar.

En este ensayo, las células troncales se trasplantan en ratones que han sido irradiados letalmente para depletar las células hematopoyéticas endógenas y se evalúan a las 8 a 10 semanas post-trasplante. Luego de este periodo se espera que haya ocurrido un reestablecimiento de la hematopoyesis con células provenientes de las CTH trasplantadas. La incorporación de marcadores celulares en las CTH donantes comprueba que las células hematopoyéticas generadas en el ratón receptor son efectivamente progenie de las células trasplantadas.

El ensayo de re-trasplante de las CTH en un segundo animal puede ilustrar y cuantificar el proceso de auto-renovación, propiedad de CTH verdaderas.

3.3. Identificación y aislamiento de las células troncales hematopoyéticas

Una de las primeras aproximaciones utilizadas para aislar CTH de médula ósea se basó en técnicas de separación por densidad y tamaño. Ensayos de velocidad de sedimentación y centrifugación por gradientes de equilibrio demostraron que las células de CFU-S proliferantes poseen un tamaño que varía entre 7,3 a 9,2 μm de diámetro, en tanto que las células no proliferantes son de 7,0 μm de diámetro.

Enriquecer la obtención de CTH es requisito para su estudio e identificación. Una de las estrategias empleadas utiliza drogas que intervienen en el ciclo celular (vinblastina, 5-Fluorouracil, etc.) que

depletan las células proliferantes de la médula ósea y enriquecen la población de células no proliferantes. A pesar de que esta estrategia enriquece la población de CTH y la actividad de CFU-S, la calidad de las células se ve afectada.

Un avance importante para la separación de CTH se logró mediante la utilización de la citometría de flujo o “fluorescence-activated cell sorter” (FACS). Este método utiliza un flujo citométrico que separa células en base a sus características físicas tales como tamaño o granularidad y además, por la presencia de marcadores de superficie celular. Anticuerpos específicos, marcados con moléculas fluorescentes, diseñados a reconocer proteínas de la superficie celular generan un patrón de fluorescencia por la incidencia de un rayo láser, permitiendo su identificación y subsiguiente separación.

Para la utilización de esta técnica fue necesario la identificación de proteínas que fueran expresadas específicamente en la superficie de la CTH. Uno de los primeros antígenos descubierto fue Thy-1 que se expresa en la superficie de las CFU-S de médula ósea de rata, hígado fetal y, en bajos niveles, en la médula ósea de ratón. En 1982, Muller-Sieburg y colaboradores desarrollaron una estrategia para la separación de CTH de ratón por FACS basados en un protocolo de selección negativa, en el cual utilizaron una mezcla de antígenos expresados en células B y T maduras, macrófagos y granulocitos. Combinando esta estrategia y la selección de células negativas para el antígeno de linaje (Lin^{neg}) y con baja expresión de Thy-1 (Thy-1^{low}), se obtuvieron CFU-S enriquecidas 200 veces.

En la actualidad, en ratón se aíslan CTH en base a fenotipos Sca-1^{pos}, c-kit^{pos}, Thy-1.1^{low}, lin^{neg}, obteniéndose un enriquecimiento de 2000 veces para actividad de CTH.

Células troncales hematopoyéticas humanas se aíslan comúnmente en base a los marcadores de superficie CD34, CD38, HLA-DR y bajos niveles de Thy-1 y la ausencia del marcador de linaje Lin. Estas células poseen la capacidad de multilínea en ensayos *in vivo* e *in vitro* (LTC-IC) y son capaces de mantener su propiedad de auto-renovación en ensayos de repoblación celular en un segundo huésped.

Funcionalmente, CD34 es importante en la adhesión de las células hematopoyéticas al estroma de la médula ósea y en la interacción entre progenitores. El antígeno c-kit es un

miembro de la familia de los receptores de tirosinas kinasas y el antígeno Sca-1 (“stem cell activator”) y aunque su función no está totalmente esclarecida, aparentemente tendría una función en activación celular.

Aunque estos marcadores son útiles para la identificación y purificación de CTH humanas y murinas, no se ha encontrado una molécula cuya expresión sea definitiva de célula troncal, como lo es por ejemplo, la expresión de globina en células rojas. Es así como la expresión de CD34, además de encontrarse en células troncales, se encuentra en endotelio vascular y en algunos fibroblastos y c-kit se expresa en algunas células hematopoyéticas maduras, tales como mastocitos, megacariocitos, linfocitos pre-B, melanocitos, algunas células germinales, cerebro, estómago y testículo.

3.4. Heterogeneidad de las células troncales hematopoyéticas

Las técnicas de aislamiento de CTH actuales no han permitido aún la obtención de células de suficiente pureza de modo que cada una de ellas sea capaz de repoblar el sistema hematopoyético de un ratón. Debido a esto, se ha incorporado el concepto de un compartimiento de células troncales que contiene CTH y además, una población de células multipotentes que pueden carecer de la propiedad de auto-renovación en forma permanente o continua.

Utilizando un colorante fluorescente mitocondrial, rodamina-123 (Rho-123), se han identificado CTH con diferentes grados de fluorescencia que corresponden a células con distintas actividades de auto-renovación en ensayos *in vivo* e *in vitro*, pero capaces de mantener un cierto grado de multilinaje.

De estos estudios se deduce que las CTH que mantienen una extensa capacidad de regeneración constituyen, probablemente, menos de un 0,01% de las células de la médula ósea, con una frecuencia de aproximadamente 1 CTH por 10.000 células de la médula. La habilidad de estas células de regenerarse en forma prolongada estaría dado por la gran capacidad proliferante de ellas. Esta capacidad permitiría que la CTH cumpla con la extraordinaria función de producir células sanguíneas durante toda la vida de un individuo.

En trasplantes de médula ósea, para propósitos terapéuticos, es preciso determinar lo que constituye una CTH verdadera, sin embargo, es

quizás más útil funcionalmente considerar la célula troncal como aquella que es capaz de renovarse a sí misma y de diferenciarse en células hematopoyéticas maduras independiente de su grado de pureza. Este concepto de compartimiento de células troncales involucra una jerarquía de CTH con capacidad de auto-renovación y de multilinaje.

3.5. División de las células troncales hematopoyéticas

La generación continua de células sanguíneas maduras desde el “pool” de células troncales multipotentes, sin alteración del tamaño de éste, puede lograrse por división celular simétrica, asimétrica o ambas en cualquier nivel de la jerarquía hematopoyética.

Una de las preguntas es cómo logra la CTH dividirse produciendo dos células hijas con diferentes destinos, y si es así, cómo regula esta asimetría. La asimetría puede resultar por procesos extrínsecos o intrínsecos (figura 1-4). En el modelo extrínseco, las células hijas son originalmente idénticas, pero adoptan diferentes destinos debido a factores ambientales como por ejemplo, citoquinas (figura 1-4A). En el modelo intrínseco, la célula hija difiere al momento de la división debido a una partición desigual de los determinantes del destino celular, tales como factores de transcripción, receptores celulares o RNA (figura 1-4B). En mamíferos, hay pocos ejemplos de

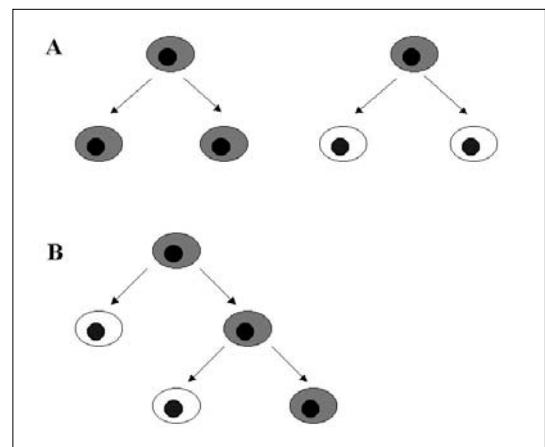


Figura 1-4. Modelos de división simétrica versus asimétrica en células troncales hematopoyéticas. División celular simétrica (A), la cual puede dar como resultado dos células troncales hijas (gris) o dos progenitores de linaje restringido (blanco). En este modelo, la célula progenitora debe poseer la capacidad de auto-renovación para permitir la expansión de un linaje determinado (B) Modelo en que todas las divisiones son asimétricas; este modelo no permite un aumento del tamaño del “pool” de células troncales.

división celular asimétrica, siendo la corteza cerebral de la marta un ejemplo. En estos, las células progenitoras del tubo neural, pueden dividirse ya sea verticalmente y producir dos células hijas idénticas, u horizontalmente para producir una célula hija que permanece en la zona ventricular y una neurona migratoria. En la célula progenitora, el receptor Notch-1 se localiza en la superficie basal de tal modo que en la división vertical se segrega solamente a la que se diferenciará a neurona migratoria.

En células hematopoyéticas humanas, mediante la utilización de un colorante fluorescente de membrana (PKH26) se ha podido evidenciar división celular asimétrica en una CTH proveniente de hígado fetal. Aproximadamente el 30% de las CTH-CD34⁺ generan una célula hija que permanece sin dividirse (fuertemente fluorescente con PKH26), en tanto que la otra célula hija se divide en forma exponencial perdiendo intensidad de fluorescencia. Experimentos de re-cultivo de las células fuertemente fluorescentes, demostraron capacidad de auto-renovación en un porcentaje similar al del cultivo primario con lo que se puede concluir que las células CD34⁺ obtenidas se comportarían como CTH o células progenitoras tempranas con capacidad de auto-renovación por división celular asimétrica.

La búsqueda de mecanismos moleculares que expliquen la división celular asimétrica ha llevado a la identificación de los genes “notch” como cruciales en la regulación de la auto-renovación celular versus diferenciación celular. El producto proteico del gen “notch” funciona como receptor de superficie celular y además como factor de regulación de la transcripción, con la función de transmitir señales del medio ambiente hacia el núcleo de la célula. La activación de “notch” inhibe la diferenciación celular y variaciones en los niveles de expresión del mismo dan como resultado una heterogeneidad de respuesta a la diferenciación celular.

En mamíferos, se han identificado cuatro genes homólogos a “notch” (notch 1-4) y en vertebrados su expresión se ha observado en tejido neuro-epitelial, epidermis, epitelio intestinal y dentario, endotelio, precursores hematopoyéticos y estroma.

La participación de “notch” en hematopoyesis ha sido ampliamente investigada desde su detección en células CD34⁺ de médula ósea y en células hematopoyéticas precursoras. De

hecho, algunas leucemias linfoblásticas T involucran una mutación en el gen “notch”-1 resultando en una activación constitutiva de la proteína lo que contribuiría a la enfermedad. Estudios recientes han demostrado que las señales a través de “notch” pueden inhibir apoptosis, lo que sugiere la posibilidad de que una alteración de la actividad proteica de “notch” pueda contribuir a la leucemia por inhibición de muerte celular, además o en vez del aumento de proliferación celular.

Las señales de “notch” pueden ser reguladas a diferentes niveles y un sinnúmero de evidencias experimentales involucran a los productos proteicos de los diferentes genes “notch” en diversas respuestas, no solamente en la capacidad de auto-renovación celular sino además en la decisión de linajes de diferenciación hematopoyética, lo cual dependería de la señal extracelular o ligandos tales como citoquinas o factores de crecimiento.

3.6. Ontogenia de la célula troncal hematopoyética

Desde el desarrollo de un animal, el cual comienza con la fertilización del ovocito, las células se comprometen, progresivamente, a un tipo celular específico. Las células generadas a partir de las primeras divisiones celulares post-fertilización tienen la capacidad de formar un animal completo, por lo que se les denomina “totipotentes”. En mamíferos, esta capacidad se pierde durante el pre-implante, en la formación de la blástula en la que se distinguen una capa externa, una capa interna y una masa celular interna de la cual se pueden obtener células troncales embrionicas pluripotentes (ES). Durante la gastrulación se establecen las tres capas germinales, el ecto-, endo- y mesodermo con el consecuente grado de compromiso celular, lo que dará como resultado células maduras con funciones específicas con una vida media limitada y baja capacidad de proliferación, necesitando ser renovadas constantemente. Sin embargo, no todas las células maduran a etapas terminales y es posible encontrar células en tejidos diferenciados con capacidad proliferativa y de auto-renovación, las que se denominan células multipotentes (figura 1-5).

Células hematopoyéticas (CH) y células endoteliales vasculares (CE) son los tejidos que maduran más tempranamente durante embriogénesis y es ampliamente aceptado que ambos tipos celulares comparten precursores

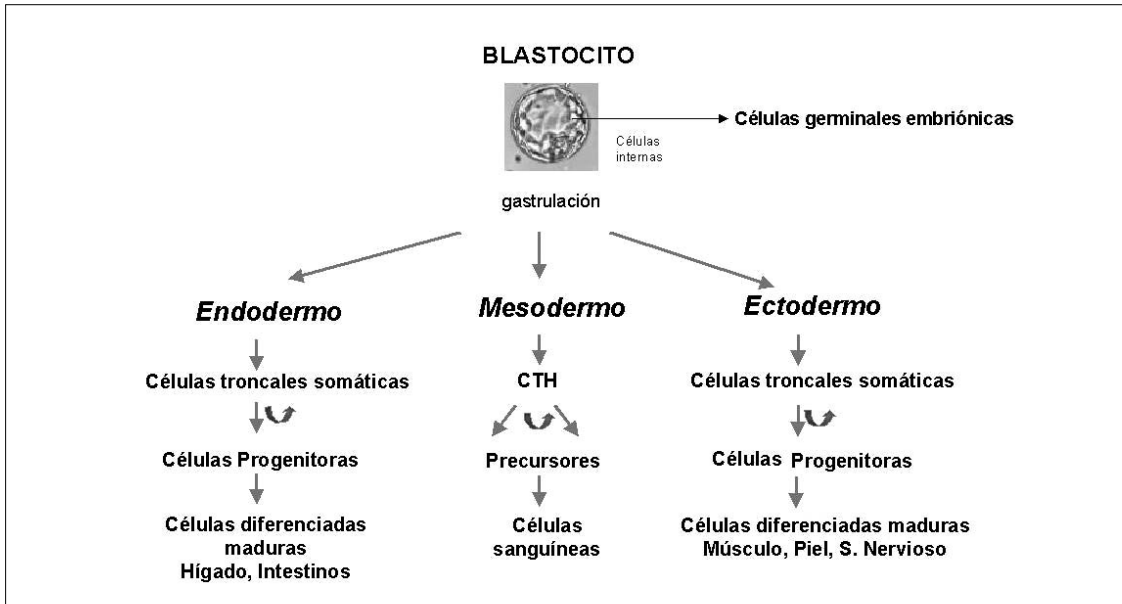


Figura 1-5. Ontogenia de la célula troncal. Células pluripotentes provenientes del endodermo, mesodermo o ectodermo, formados durante la embriogénesis, evolucionan a tejidos específicos, células terminalmente diferenciadas y células troncales multipotentes.

comunes. Durante la embriogénesis temprana, estos linajes se forman desde el mesodermo próximo-lateral y evidencias histológicas sugieren que tanto las CH como las CE se diferencian desde un precursor bi-potente llamado hemangioblasto. Inmediatamente luego de la generación del mesodermo, las células de la región interna se diferencian a CH y las de la región externa a CE vasculares. Estudios inmuo-histológicos han demostrado la expresión de marcadores de células endoteliales tales como CD31 y cadherina (Cadherina-EV) en las células de la capa externa y la ausencia de éstos en las células de la región interna. Ambos tipos celulares expresan CD34 observándose la aparición de marcadores específicos para CE y para CH a medida que el proceso de diferenciación ocurre.

Estudios recientes en varias especies de vertebrados sugieren que el sitio primario de hematopoyesis es el mesodermo del saco embrionario. Aunque las células troncales hematopoyéticas definitivas y primitivas se generan durante embriogénesis, aún es controversial si la producción de CTH definitivas ocurre en el mesoderma del saco embrionario o más tarde durante la embriogénesis.

Las señales moleculares necesarias para la generación del sistema hematopoyético en el embrión y en adulto involucran a genes tales como *bmp-4* que actúa tempranamente

afectando la formación del mesodermo, al gen para el receptor de tirosina kinasa, *flk-1*, al gen para el factor de crecimiento transformante, *tgf-β1* y al gen para el factor de crecimiento "Stem Cell Leukemia", *scl*.

Un gran número de genes parecen participar en la regulación del desarrollo de la hematopoyesis a diferentes niveles, ya sea a nivel embriogénico o en la hematopoyesis definitiva. Sin embargo, las evidencias sugieren que la hematopoyesis primitiva embrionaria no requiere de CTH definitivas, en tanto que para la hematopoyesis adulta su existencia es crucial. El funcionamiento de la jerarquía hematopoyética adulta requiere de señales adicionales de regulación que confieran otras propiedades, tales como un alto grado de proliferación celular, capacidad de auto-renovación y señales relacionadas con la integración de las células a otros tejidos.

3.7. Influencia de factores de crecimiento involucrados en la decisión de linaje

La supervivencia y proliferación de la CTH y de progenitores más diferenciados está ampliamente influenciada por la acción de diferentes tipos de mediadores, tales como citoquinas, factores de crecimiento, péptidos, moléculas de adhesión y la expresión de sus respectivos receptores. Estos cumplen un rol importante en la especificación de linaje y en la

determinación del destino de las células precursoras. En general, tres modelos podrían explicar la acción de factores extrínsecos sobre el destino de células precursoras (figura 1-6). Es posible que células funcionalmente equivalentes, las cuales poseen al menos dos potenciales de linaje, reciban diferentes señales externas y respondan de acuerdo al linaje especificado por la señal (figura 1-6A). Otro modelo propone que la adquisición de linaje ocurre independiente de las señales extrínsecas

pero que los factores de crecimiento y citoquinas son esenciales para la supervivencia, proliferación o apoptosis de la célula comprometida (figura 1-6B). Un tercer modelo combina los dos anteriores dando como resultado diversas posibilidades. Por ejemplo, la CTH pluripotente genera células multipotentes, las cuales son influenciadas por factores externos para comprometer linaje o para proliferar y madurar en células ya comprometidas (figura 1-6C).

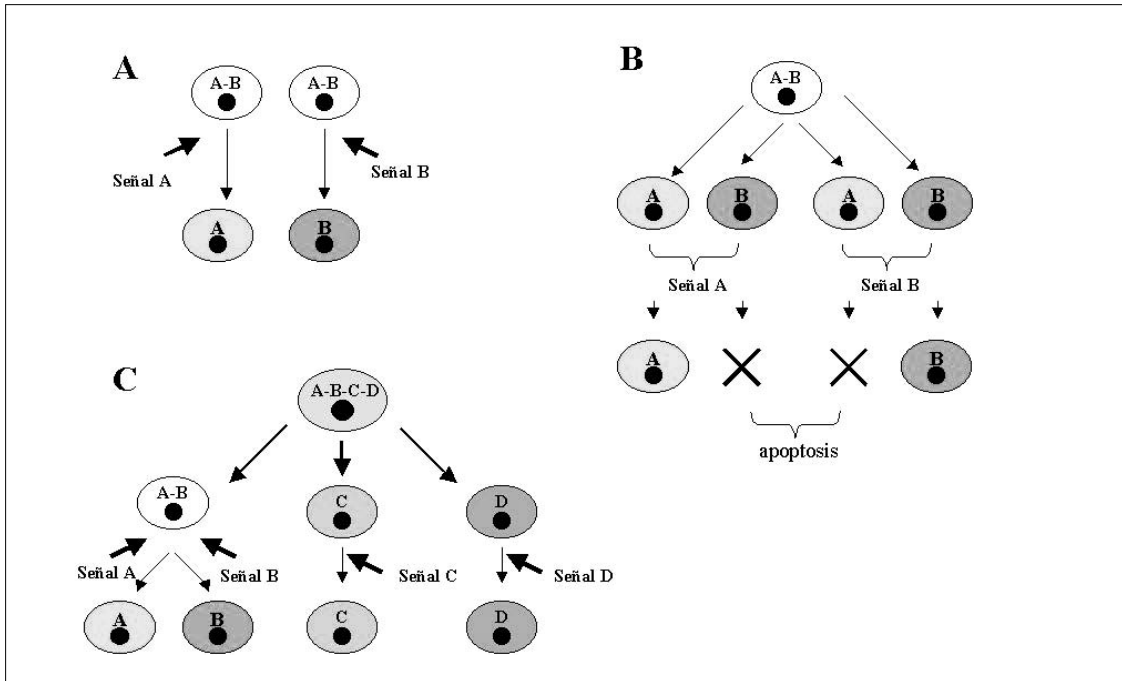


Figura 1-6. Modelos de la acción de factores externos sobre la elección de linaje celular. El modelo (A) representa la elección de linaje de acuerdo a la especificación de la señal recibida. En el modelo (B), las señales no determinan el compromiso de linaje pero afectan el destino de la célula comprometida. En el modelo (C) las señales externas afectan a células multipotentes determinando su linaje y además, actúan sobre células ya comprometidas afectando su maduración.

Una de las evidencias más impactantes de la influencia de factores extrínsecos sobre la elección de linaje, proviene de experimentos en células bi-potenciales obtenidas de colonias de macrófago-granulocitos o “granulocyte-macrophage colony forming cells” (GM-CFC). Al cultivar las GM-CFC en presencia del factor de crecimiento de célula troncal (“stem cell factor”: SCF), las células se diferencian en granulocitos. Sin embargo, al ser cultivadas en presencia de factor estimulador de colonias macrófagico (M-CSF) o de interleuquina-4 (IL-4), las células se diferencian a macrófagos.

Numerosos diseños experimentales destinados a elucidar el rol de factores de crecimiento y citoquinas en el compromiso de linaje pueden

ser encontrados en la literatura, destacándose entre ellos los estudios con animales transgénicos. Un ejemplo, son los experimentos en donde se han alterado los genes que codifican para eritropoyetina (EPO) o su receptor (EPO-R) mediante recombinación homóloga. Al utilizar esta estrategia se obtuvieron ratones con anemia severa carentes de células rojas maduras, indicando que las señales dependientes de EPO son requeridas para la diferenciación y maduración de células eritroides. Sin embargo, en estos ratones no se observa una disminución significativa de células eritroides progenitoras, lo que sugiere que el compromiso eritroide no se ve afectado por la ausencia de EPO y que la acción de este factor sería sobre células ya comprometidas.

Experimentos similares con otras citoquinas relacionadas a linajes y sus receptores, arrojan resultados equivalentes, apoyando el postulado que el compromiso de linaje puede ocurrir en ausencia de las señales particulares. Sin embargo, al igual que en todos los experimentos que utilizan animales transgénicos, no es posible descartar la existencia y la influencia de señales adicionales compensatorias a las específicas, o algún grado de participación de señales específicas en la decisión de linaje, considerando que las estrategias experimentales no necesariamente reflejan la situación *in vivo* en su totalidad.

Ejemplos de factores y citoquinas necesarias para la maduración de ciertos linajes celulares son:

- Interleuquina-7, crucial en la diferenciación linfoide, ya sea células B o T.
- Trombopoyetina (TPO), secretada en el hígado, determina el linaje megacariocítico y eritroide.
- Eritropoyetina (EPO), producida en los riñones, aumenta la producción de eritrocitos.
- Interleuquina-11 y TPO estimulan la producción de megacariocitos y su fragmentación en plaquetas.
- Factor estimulante de colonias granulocítica-monocítica (GM-CSF), determinante del linaje granulocito-monocito. Con la participación del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF), las células se diferencian en neutrófilos, en tanto que en presencia de interleuquina-5 se diferencian en eosinófilos.
- Interleuquina-3 participa en la diferenciación de la mayoría de las células blancas, pero tiene un rol prominente en la formación de basófilos.
- Factor de estimulación macrofágico (M-CSF), participa en la diferenciación a monocito a partir de células progenitoras granulocíticas/macrofágicas.

3.8. Genes involucrados en la decisión de linaje

Estudios en humanos destinados a la determinación de la función específica de factores de crecimiento en la hematopoyesis humana, han empleado técnicas de manipulación génica, ya sea sobre-expresando o disminuyendo la expresión de genes.

Un gran número de genes se han descrito como reguladores de la decisión y maduración de un

linaje celular específico, por lo que a continuación se describirán aquellos que han arrojado resultados de mayor consistencia.

Familia de genes *hox*

Las proteínas HOX pertenecen a una gran familia de factores de transcripción que comparten una secuencia de unión a DNA altamente conservada (“homeodomain”). Fueron descubiertos en *Drosophila* y resultaron ser cruciales en la regulación del desarrollo embrionario normal, encontrándose posteriormente que sus análogos en humanos participan en el desarrollo de una hematopoyesis normal. En mamíferos, se han descubierto 39 genes que se agrupan en cuatro grupos, A, B, C y D, conteniendo cada uno de ellos entre 8-11 genes.

Aunque la función de las proteínas HOX en hematopoyesis es en extremo compleja, las evidencias experimentales indican que los genes *hoxb4* están asociados con la diferenciación mieloide y los del grupo *hoxc* con el linaje linfoide.

Evidencias *in vitro* e *in vivo* indican que HOXB3, HOXB4 y HOXB5 actúan sobre progenitores tempranos, probablemente antes de que ocurra la diferenciación de linaje mieloide y eritroide, y que probablemente HOXB4 es además importante en la auto-renovación celular. Por otro lado, HOXB6 y HOXB7 parecen tener una función más tardía en la jerarquía hematopoyética, afectando la diferenciación granulocito vs monocito.

El grupo de genes *hoxc* participa en eventos relacionados con la diferenciación linfoide temprana y tardía. *Hoxc4*, por ejemplo, está presente tanto en progenitores como en linfocitos T y B terminalmente diferenciados, en tanto que *hoxc6* está expresado en células maduras del linaje T pero no en sus progenitoras.

Familia de genes *gata*

Es una familia de factores de transcripción con dominio de unión al DNA. De ellos, tres miembros de la familia *gata* han sido identificados como reguladores de la expresión génica en células hematopoyéticas. GATA-1 está altamente expresado en células eritropoyéticas, mastocitos y megacariocitos y su expresión es crucial para eritropoyesis primitiva y definitiva. La pérdida de *gata-1* causa anemia embrionaria

fatal, debido al bloqueo de la maduración eritroide. GATA-2 también se expresa en células eritroides tempranas, mastocitos y megacariocitos, pero además, se han observado niveles particularmente elevados en células pluripotentes (CTH) y su expresión disminuye a medida que las células maduran. La alteración de los genes *gata-2* causa letalidad en útero debido a un defecto en la hematopoyesis temprana, implicándolo en la mantención de la función de la CTH. La expresión de *gata-3* es importante en la hematopoyesis de hígado fetal y se requiere para el desarrollo de linfocitos T.

Familia de genes pax

La familia de genes *pax* codifica para un grupo de factores de crecimiento que han sido conservados a través de millones de años de evolución y tienen un rol en desarrollo temprano. Las proteínas PAX participan en la regulación de la organogénesis y son un factor clave en la mantención de la pluripotencialidad de las células troncales durante el desarrollo. Mutaciones en los genes *pax* causan defectos importantes en organismos tan diversos como moscas, ratones y humanos.

Uno de estos genes, *pax-5*, ha sido ampliamente estudiado en hematopoyesis, encontrándose que su expresión es crucial para la determinación del linaje linfoide B. La inactivación del gen *pax-5* convierte a los linfocitos B comprometidos en progenitores hematopoyéticos tempranos multipotenciales, sugiriendo que su expresión es necesaria en forma continua para mantener el linaje linfoide B. A nivel molecular, *pax-5* cumple un rol ambivalente, activando la expresión de genes específicos del linaje linfoide B y reprimiendo la transcripción de genes de un linaje inapropiado.

Proteínas morfogénicas óseas

Las proteínas morfogénicas óseas o “Bone morphogenetic proteins” (BMPs) son miembros de la familia de factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Estas citoquinas regulan la proliferación celular, diferenciación, morfogénesis y apoptosis celular. Durante embriogénesis, estas proteínas participan en el desarrollo de tejidos y órganos, en tanto que en tejidos maduros, mantienen la homeostasis tisular.

En relación a hematopoyesis, se ha observado que BMP-4 induce la formación de tejido embrionario hematopoyético, en tanto que la

presencia de BMP-2 induce un microambiente hematopoyético que contribuye el crecimiento clonogénico de progenitores mieloides y linfoides. Además de los mencionados, otros miembros de la familia TGF- β también participan con funciones específicas en las diferentes etapas de la hematopoyesis.

El continuo interés por entender la regulación de la hematopoyesis normal, ha llevado a los investigadores a estudiar y descubrir múltiples genes que actúan regulando los procesos celulares en los diversos niveles de la jerarquía hematopoyética. Un foco esencial de las investigaciones ha sido la identificación de genes relacionados con la capacidad de auto-renovación de la CTH. Aunque los estudios realizados no han arrojado aún resultados concluyentes, se han postulado algunos genes como esenciales para la función de auto-renovación, habilidad particular de las células troncales. Un ejemplo es el gen *foxd3* necesario para la pluripotencialidad celular. Una mutación en el gen *foxd3* produce embriones de corta supervivencia, en los cuales, se forma parte del saco embrionario pero la masa interna que contiene las células que formarán el cuerpo del embrión no se expande lo suficiente como para generar el embrión. Interesantemente, la adición del gen normal de *foxd3* restaura el desarrollo embrionario normal. El gen *foxd3*, en conjunto con otros identificados anteriormente, *oct4*, *fgf4* y *sox2* parecen controlar la pluripotencialidad de las células troncales en estadios tempranos de la embriogénesis. La participación de estos genes sobre la capacidad de auto-renovación de CTH adultas, está aún siendo investigada.

4. EL MICROAMBIENTE DE LA MÉDULA ÓSEA

El microambiente de la médula ósea está formado por un endotelio particular y un tejido conectivo estromal, combinado con citoquinas que regulan la compartimentalización, proliferación y diferenciación de las CTH. Una forma en que el estroma medular contribuye a la hematopoyesis es debido a su alto contenido de matriz extracelular rica en glicosamino-glicanos que une y distribuye factores de crecimientos, tales como el factor estimulante de colonias granulocítica-mielocítica y diversas citoquinas.

En humanos, células de la médula encontradas en relación al ambiente hematopoyético que no tienen origen hematopoyético son:

a) **Células vasculares de la médula ósea, que incluye células endoteliales, abluminales de**

la musculatura lisa, pericitos y células parasinusoidales. La hematopoyesis ocurre en los espacios inter-sinusoidales y las células sanguíneas entran en la circulación sistémica pasando a través de las células endoteliales y la delgada capa de la membrana basal presente en el lado abluminal. Esto implica una interacción cercana entre células sanguíneas y células endoteliales, en donde el endotelio participaría en la retención de células inmaduras o defectuosas y en la secreción de factores que afecten el comportamiento de las células hematopoyéticas. Estas células endoteliales, presentes en los espacios inter-sinusoidales, llamadas también reticulocitos poseen extensiones citoplasmáticas en íntimo contacto con células hematopoyéticas y con procesos o extensiones de células reticulares presentes en los espacios inter-sinusoidales adyacentes. Las células reticulares están en contacto además con las células de la membrana basal y se ha propuesto que el grado de migración celular a los sinusoides estaría en relación con esta interacción. El endotelio, en conjunto con la cubierta reticular, es lo que se conoce como la barrera hemato-medular la que se ha implicado en el flujo de mediadores solubles producidos en otras zonas de la cavidad medular, además de la regulación de la migración celular.

b) Células del endósteo que incluye fibroblastos. Algunos reportes indican que los primeros intentos de cultivo *in vitro* de células estromales, llamados unidad formadoras de colonias de fibroblastos (“fibroblast colony forming units”: CFU-F) detectaban células del endósteo. Sin embargo, no es claro que este ensayo detecte siempre la misma población o

que la célula formadora de colonia sea fibroblasto. Interesantemente, el cultivo de estas células en condiciones adecuadas puede generar células óseas.

c) Adipositos o médula amarilla no hematopoyética. No está totalmente dilucidado si las células adiposas son una población distinta o son derivadas de fibroblastos y células reticulares que han acumulado lípidos. Su función en la médula ósea es aún especulativa.

Trentin y colaboradores, fueron uno de los primeros en discutir microambientes y proponer que las células estromales están organizadas en compartimentos. La organización de las células estromales en estos compartimentos estarían determinando vías de inducción específicas a través de la cual una célula pluripotente hematopoyética se diferencia. Aunque estos sitios de restricción de linaje no han sido evidenciado en médula ósea de mamíferos, se ha observado un cierto grado de localización o gradiente de células inmaduras del linaje B en la región del sub-endósteo.

Estudios en ratón, primates y humanos han detectado la producción de varios tipos de citoquinas en células estromales, las cuales pueden ser permanecer unidas a proteínas de la matriz extracelular o en componentes de la membrana de células estromales de la médula ósea, tales como heparan sulfato, otorgando en el microambiente concentraciones suficientes como para influir en la maduración y proliferación de células hematopoyéticas. Un resumen de la producción y efecto de citoquinas se expone en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Citoquinas expresadas en cultivo de células estromales

Citoquina	Expresión constitutiva	Expresión inducible
GM-SCF	+/-	+
G-CSF	+/-	+
M-CSF	+	-
IL-6	+	+
IL-11	+	+
IL-7	+	?
IL-8	+	+
IL-1	?	+
SCF	+	?
TPO	+	+
SDF-1	+	+
MIP-1 α	+	+
TGF- β	+	-
TNF- α	-	+

SDF-1: “stromal cell-derived factor”. MIP-1 α : “macrophage inflammatory protein”. LIF: “Leukemia inhibitory factor”. FL: “flt3 ligand”.

Estudios recientes realizados en preparaciones de médula ósea de ratón, rata y humano, han detectado la presencia de células mesenquimáticas troncales (“MSC”) o precursores tempranos: célula progenitora adulta multipotente (“MAPC”) con capacidad pluripotente de diferenciación. Estas células, generalmente positivas para el marcador endotelial/hematopoyético, CD34+ y negativas para el marcador hematopoyético CD45-, al ser cultivadas en forma apropiada son capaces de diferenciarse en células neuronales, y tienen la potencialidad de contribuir a la formación de múltiples tejidos al ser inyectadas en blastocitos para ser utilizados en la generación de ratones quiméricos.

Las evidencias actuales resumen la participación del microambiente medular en hematopoyesis, otorgando a las células del sinusoide endotelial un rol en la transmigración de células hematopoyéticas maduras hacia la circulación, en tanto que células parasinusoidales con extensiones citoplasmáticas regularían la conducta celular, proveyendo citoquinas como mediadores y sitios de anclaje.

Estudios recientes indican que células de la médula ósea adulta poseen la capacidad de diferenciarse en células maduras específicas de diferentes tejidos no-hematopoyéticos, incluyendo, hepatocitos, células de riñón, de pulmón, piel, del tracto gastrintestinal y en miocitos cardiacos y de tejido esquelético. El conocimiento de las señales que regulan esta plasticidad celular, podría permitir el manejo controlado de la diferenciación de células de la médula ósea hacia células terminalmente diferenciadas tejido-específicas lo que otorgaría

una herramienta valiosa con un enorme potencial terapéutico.

5. GRANULOMONOPOYESIS

La granulomonopoyesis es el proceso por el cual se forman, diferencian y maduran los granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos).

Tanto los granulocitos como los monocitos y macrófagos, derivan de células llamadas GM-CFU.

Los granulocitos siguen un patrón similar en su desarrollo en la médula ósea y en su liberación a la circulación.

5.1. Estadios madurativos

Durante el proceso de maduración y diferenciación de los granulocitos se observan las siguientes características citológicas: (i) reducción del tamaño celular, (ii) adquisición de granulación específica y (iii) segmentación nuclear.

En la médula ósea el compartimiento mitótico está formado por células que tienen la capacidad de división, compuesto por mieloblastos, promielocitos y mielocitos. El compartimiento de maduración comprende metamielocitos, baciliformes y segmentados, siendo ésta la célula más madura correspondiente a eosinófilos, neutrófilos o basófilos (figura 1-7).

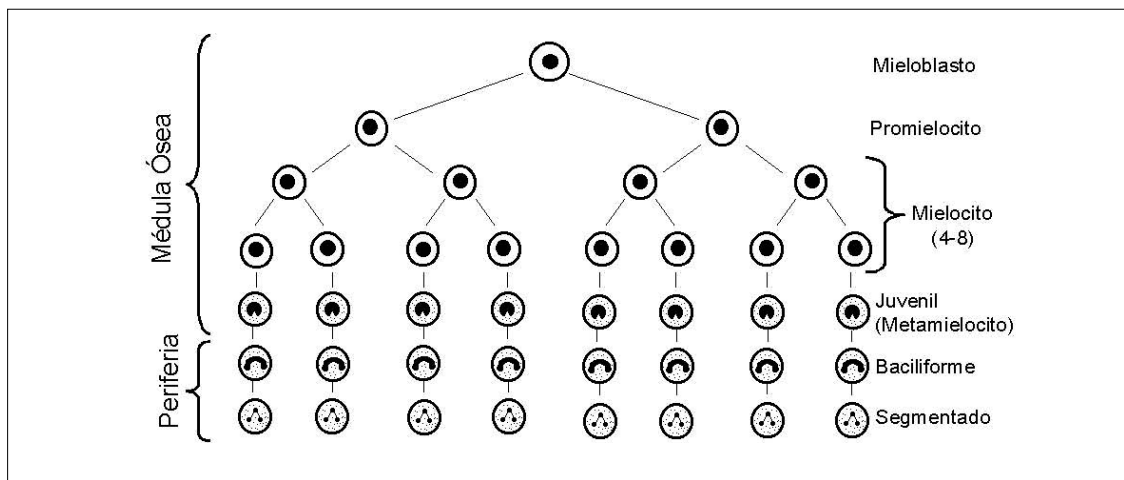


Figura 1-7. Estadios madurativos de la granulomonopoyesis.

Los monocitos y macrófagos derivan de la maduración de las CFU a monoblastos, promonocitos y monocitos, los cuales son liberados a circulación donde permanecen alrededor de 12 horas, para luego migrar a los tejidos, donde reciben el nombre de macrófagos.

5.2. Factores de maduración

Las CFU tienen la capacidad de formar y desarrollar colonias *in vitro* en medios de cultivos semisólidos, para lo cual requieren la presencia de moléculas regulatorias específicas, entre las que destacan citoquinas que actúan sobre distintas células, dependiendo de la presencia de receptores en la superficie celular.

Las principales acciones de estas citoquinas son: (a) mejorar la supervivencia y proliferación celular, (b) inducir la diferenciación celular y (c) activar las células maduras. El proceso de proliferación sería estimulado por la participación de estos factores en el paso de G_0 a G_1 en el ciclo celular. En cultivos celulares, en los cuales se suprime la adición exógena de estos factores y se bloquea la síntesis endógena de éstos, se acelera el proceso de apoptosis, y sería de esta manera como influyen en la supervivencia celular.

Entre los CSF involucrados en la granulomonopoyesis se encuentran:

Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Es secretado por linfocitos T, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y una variedad de células neoplásicas. Es un factor estimulador de colonias multilínea, que promueve el crecimiento de células progenitoras pertenecientes a los linajes de neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos.

Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Es secretado por células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, y células neoplásicas. Es un estimulador primario de la proliferación y diferenciación de las CFU comprometidas en el linaje de neutrófilos. Además es un potente activador de neutrófilos maduros, favoreciendo la fagocitosis y quimiotaxis.

Factor estimulador de colonias de monocitos-macrófagos (M-CSF). Es un factor de linaje específico para células progenitoras y células maduras pertenecientes al linaje monocitos-macrófagos. Tiene efectos sobre la función de

monocitos maduros. Mejora la actividad antitumoral de los monocitos. Existe una forma soluble y una forma biológicamente activa unida a la membrana.

IL-3. Es producida por linfocitos T activados, pero también por mastocitos. Estimula el crecimiento y diferenciación de múltiples linajes, incluyendo granulocitos, macrófagos, megacariocitos, eritrocitos y mastocitos. Promueve el crecimiento de células relativamente primitivas. También potencia la actividad funcional de eosinófilos, basófilos y monocitos.

«Stem cell factor». Es una citoquina altamente pleiotrópica con múltiples actividades sobre células mieloides y linfoides; también sobre células no hematopoyéticas. Se expresa en una variedad de órganos (hígado, pulmón, riñón) y especialmente en cerebelo. Sobre las células hematopoyéticas, preferencialmente promueve el crecimiento de progenitores celulares relativamente primitivos. Este factor es producido en una forma unida a la membrana y en una forma soluble. Como factor soluble, tiene actividad limitada sobre la formación de colonias mieloides.

«Flt-3 ligand». La identificación de este factor, deriva del reconocimiento de su receptor Flt-3 en humanos. El Flt-3 se expresa en monocitos, pero no en granulocitos. Como factor aislado tiene un modesto efecto proliferativo. El papel Flt-3 es ser un factor sinérgico para las células hematopoyéticas progenitoras primitivas.

Los factores de crecimiento, en forma individual, actúan sobre múltiples linajes hematopoyéticos y cada linaje puede ser regulado por varios factores. Otra propiedad de muchos factores de crecimiento, es su interacción sinérgica. Por ejemplo, la máxima producción de eosinófilos *in vitro*, requiere la presencia combinada de IL-3 y GM-CSF e IL-5.

6. ERITROPOYESIS

La eritropoyesis es el proceso de maduración de la serie eritropoyética desde proeritroblasto hasta glóbulo rojo.

6.1. Estadios madurativos

Los estadios madurativos con capacidad de mitosis son: proeritroblasto, eritroblasto basófilo y eritroblasto policromático (doble mitosis). Le siguen los estadios de eritroblasto

ortocromático, reticulocito y glóbulo rojo. A partir de 1 proeritroblasto se obtienen 16 eritrocitos (figura 1-8). El proceso de maduración y diferenciación eritroblástica se

caracteriza por: (i) hemoglobinización progresiva y (ii) reducción del tamaño nuclear, hasta picnosis y expulsión.

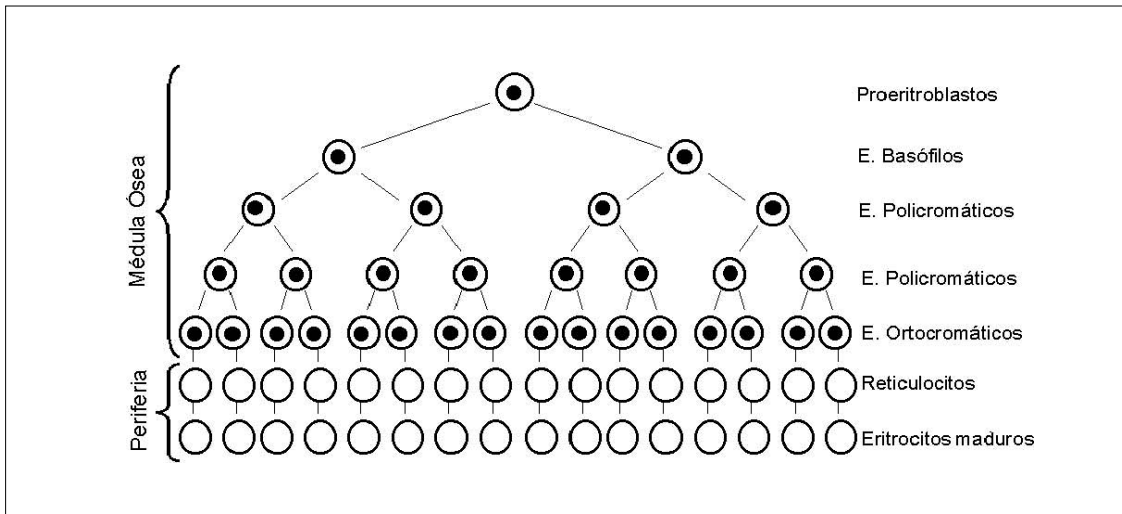


Figura 1-8. Estadios madurativos de la eritropoyesis

6.2. Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoproteica de aproximadamente 34 kDa identificada como el regulador humoral de la eritropoyesis. La disminución del oxígeno en los tejidos (hipoxia) modula los niveles de EPO por un incremento en la expresión del respectivo gen.

Normalmente la eritropoyesis ocurre a nivel basal, para reemplazar glóbulos rojos envejecidos. Se ve estimulada por disminución de la tensión de oxígeno en el ambiente, por aumento de la afinidad del oxígeno por la hemoglobina y otros estímulos que disminuyen la liberación de oxígeno a los tejidos. La EPO es un factor de crecimiento obligatorio desde la etapa de CFU-E hasta el estado eritroblasto basófilo. La producción de esta hormona aparece primariamente regulada por la demanda de oxigenación de los tejidos. En adulto la EPO se produce en gran parte por las células peritubulares localizadas en la corteza renal, aunque un informe también implica las células tubulares renales. La hipoxia renal conduce a la liberación de prostanglandinas, produciendo un incremento en los niveles de AMPc renal que conduce a una reducción en los niveles de calcio intracelular, lo que intensifica.

En estados de hipoxia severa la producción de EPO aumenta sobre 1000 veces. La secreción de hormona circulante en sangre y unida a receptores expresados específicamente en células progenitoras eritroides fomentan la viabilidad, proliferación y diferenciación terminal de precursores eritroides, resultando un aumento de la masa de los eritrocitos.

Señales específicas limitan la expresión del gen EPO a ciertos tejidos; en el feto la EPO es producida principalmente en el hígado y en el riñón en una pequeña proporción; en el adulto existe mayor producción de EPO en el riñón y una mínima cantidad en el hígado.

Receptor EPO (EPO-R). Se ha demostrado su presencia solamente en células eritroides, incluidas CFU-E, BFU-E y levemente en glóbulos rojos. Aparecen en una densidad de 200 a 1000 copias por célula, principalmente durante el estadio CFU-E. El receptor EPO-R es una proteína de membrana de 55 ≈ Da (≈ 301 aminoácidos). Es codificado por un gen localizado en el cromosoma 19.

6.3. Gen de EPO

El gen que codifica para EPO posee 5 exones y se ubica en el cromosoma 7. Además de especificidad tisular y señales, la expresión del gen EPO es modulada por agentes fisiológicos

y farmacológicos. La regulación del gen EPO por hipoxia y otros estímulos ocurre a nivel del mRNA.

Tres segmentos no traducidos del gen EPO son altamente conservados en el DNA humano y murino:

Promotor. Éste contribuye a la inducibilidad del gen EPO por hipoxia. El promotor actúa sinérgicamente con la secuencia del enhancer 3' otorgando una inducción de 40 veces en respuesta a hipoxia. Este promotor se encuentra 117 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

«Enhancer» 3'. Es un sitio para DNAsa hipersensitiva, hígado específica. Se ubica en el extremo 3' del gen. La caracterización detallada del enhancer 3' de EPO permitió definir tres sitios que son críticos para la regulación de la hipoxia: (a) Secuencia

CACGTGGT, ubicada al lado 5' del «enhancer»; a ésta se une factor de transcripción, Factor-1 inducible por a hipoxia (HIF-1), (b) sitio de 7 pb en el enhancer 3' que tiene secuencia CACA el gen humano, y (c) sitio DR-2. La secuencia del tercer sitio en el enhancer EPO es una repetición de dos sitios y medio del receptor de hormona eritroide separado por 2 pb. Mutaciones en el «enhancer» inhiben la inducción hipóxica de gen EPO.

HIF-1. El sitio HIF-1 en el enhancer 3' es el primer elemento en el gen EPO que responde a hipoxia mediante la transcripción. La hipoxia estimula la unión del factor de transcripción HIF-1 al DNA. HIF-1 es un heterodímero compuesto de una subunidad α y una β . Bajo condiciones de normoxia la subunidad α es rápidamente degradada por la proteosoma ubiquinona. El HIF-1 α interacciona con coactivadores transcripcionales como p30 o CBP. (figura 1-9).

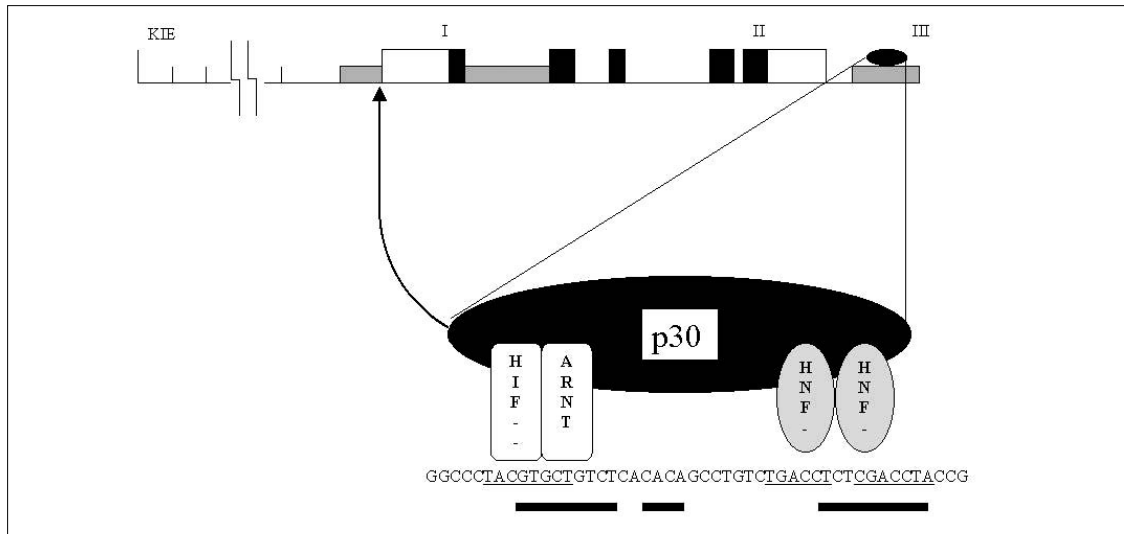


Figura 1-9. Regulación del gen de la eritropoyetina. La figura muestra la estructura del gen EPO el cual posee el “enhancer” constituido por secuencias que unen proteínas tales como HIF-1 y HNF4, las que forman un complejo con una proteína de mayor tamaño, p30. Posee además el promotor que es activado por el “enhancer” cuando existe hipoxia.

La activación de HIF-1 es modulada por un complejo mecanismo que involucra fosforilación y localización nuclear. Luego de la unión del HIF-1 a secuencias Cis - activas análogas, se requiere la interacción con un factor transcripcional adyacente y proteínas coactivadoras para la inducción hipóxica de la transcripción.

7. MEGACARIOPOYESIS

Las plaquetas circulantes se originan a partir de

los megacariocitos de la médula ósea. Una forma para estudiar la maduración megacariocítica es bajo el criterio de la microscopia de luz, según: razón núcleo/citoplasma, forma nuclear, basofilia y gránulos citoplasmáticos.

7.1. Estadios madurativos

El proceso de maduración megacariocítica, citológicamente se caracteriza por: (i) poliploidía con gigantismo nuclear y (ii) acidificación del citoplasma.

Precusores megacariocíticos. Se encuentran en 1-4/1000 células nucleadas en la médula ósea. Estas no pueden ser distinguidas morfológicamente de otras células diploides.

- **BFU: MK.** Requiere 21 días para dar origen a varias colonias con alta celularidad. Es estimulada por IL-1, IL-3 y trombopoyetina (TPO) para originar CFU-MK.
- **CFU-MK.** Es un estadio más maduro; requiere de 10 a 12 días para formar colonias con baja celularidad (LD-CFU-MK)

(figura 1-10).

- **LD-CFU-MK.** Da origen a algunas colonias con baja celularidad y alto contenido de DNA, es decir, ha disminuido la multiplicación celular junto al aumento del proceso de endomitosis.

Las células de los estadios BFU-MK y CFU-MK son CD34+, no así las células del estadio LD-CFU-MK

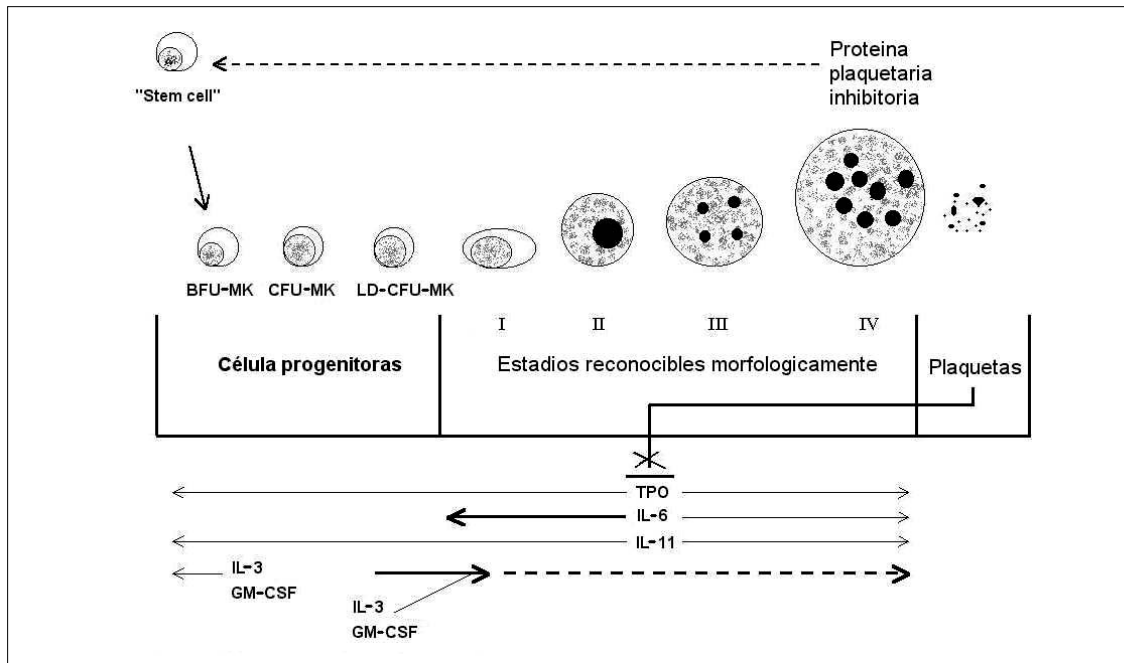


Figura 1-10. Estadios madurativos de la megacariopoyesis y regulación. Durante el proceso de trombopoyesis, participan varias citoquinas, como por ejemplo IL-1, IL-3, además los factores de crecimiento de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF y G-CSF) sobre las células progenitoras. A nivel de los estadios reconocibles morfológicamente actúan otras citoquinas como IL-6, IL-11 y TPO, esta última responsable de la estimulación de los megacariocitos maduros para liberar plaquetas a la circulación.

Megacariocitos. Se distinguen varias etapas de maduración de los megacariocitos:

- **Megacarioblasto o megacariocito 1.** Es la célula de transición entre los precursores y las células reconocibles morfológicamente. Representa el 5 a 20% de la población megacariocítica en la médula ósea. Es una célula pequeña de 18 µm de diámetro, mononuclear, expresa marcadores específicos, pero aún no es reconocible morfológicamente; posee acetilcolinesterasa. En su citoplasma hiperbasófilo se encuentran proteínas como FvW, PF4 y GPIIb. Una forma de reconocer esta célula es a través de la peroxidasa ubicada en el retículo endoplasmático (RE).

- **Promegacariocito o megacariocito II.** Esta célula es de mayor tamaño (20 µm de diámetro). Se observa el sistema de demarcación de membrana (SDM) poco desarrollado, presenta abundantes ribosomas y el núcleo comienza a lobularse. El núcleo en algunos casos se observa en forma de herradura, el citoplasma es basófilo y abundante. Representa el 25% de la población megacariocítica en la médula ósea.
- **Megacariocito granular o megacariocito III.** Presenta mayor tamaño que el estadio anterior (35 µm de diámetro). Representa el 56% de la población megacariocítica de la médula ósea.
- **Megacariocito maduro o megacariocito**

IV. Es la célula más grande de la médula ósea (50-80 μm de diámetro), presenta núcleo multilobulado y poliploide, citoplasma acidófilo, con pocas mitocondrias, SDM desarrollado y presencia de gránulos citoplasmáticos.

La maduración completa de los megacariocitos demora 10 días en humanos. Los megacariocitos maduros representan el 0.02-0.05% del total de células de la médula ósea. El número normal de megacariocitos maduros es de $6.1 \times 10^6/\text{Kg}$.

En el feto, se han encontrado megacariocitos en hígado, bazo y médula ósea. En adulto los megacariocitos se pueden detectar en todos los órganos mayores pero preferentemente en la médula ósea.

Durante la maduración el desarrollo de la ploidía está dada por divisiones nucleares sucesivas sin división celular (endomitosis); el núcleo se divide a razón de múltiplos de 2 (2N, 4N, 6N, etc.). En el humano, el modelo clásico de ploidía es 16N, con tres ciclos endomitóticos. Desde el segundo estado madurativo, con un contenido de 8N, los megacariocitos son capaces de dar origen a plaquetas; dependiendo de la ploidía dan origen a plaquetas con distinta forma y densidad.

Un megacariocito es capaz de producir entre 1000 y 5000 plaquetas (producción proporcional a la ploidía); el núcleo y citoplasma restante son fagocitados por macrófagos cercanos.

La liberación de plaquetas a la circulación está explicada por dos modelos: (a) el modelo de "proplaquetas" en el cual SDM organizaría el citoplasma de tal manera que formaría un pseudopodio, que a través de los sinusoides se extiende a la circulación y por efecto de la misma se fragmentaría y liberaría plaquetas a la sangre y (b) en el segundo modelo, el SDM no organiza el citoplasma pero es igualmente importante, ya que se fragmenta la membrana redundante y se liberan plaquetas.

7.2. Regulación

La regulación del proceso megacariocítico se realiza por un mecanismo humoral en el que se responde al número de plaquetas en circulación. En este proceso participan varias citoquinas, siendo la más importante la TPO (o c-MPL ligand), una glicoproteína de 15-48 kDa. Se ha

encontrado mRNA para TPO en el hígado y riñones, siendo el primero el lugar de mayor producción.

La TPO es sintetizada en forma constitutiva y liberada a la circulación según la unión a su receptor (c-MPL). La TPO presenta un 75% de homología en la secuencia aminoacídica, con la eritropoyetina, lo que ha permitido postular que se originaron en un gen común, encontrado en el cromosoma 3.

La TPO se une a su receptor c-MPL ubicado en los megacariocitos, estimulando así la maduración megacariocítica con el consiguiente aumento de ploidía y maduración citoplasmática. El c-MPL estimula segundos mensajeros que activan la tirosina quinasa JAK2 y la fosforilación de proteínas que activan la transcripción STAT. Las JAKs tirosinas quinasas de la familia de las JANUS quinasa no tienen actividad tirosina quinasa intrínseca por lo que deben unirse a otras proteínas quinasas (PTK). Se ha demostrado que la activación de JAK lleva a la fosforilación de proteínas estimuladoras y activadoras de la transcripción (factores de transcripción), las llamadas STAT; éstas una vez fosforiladas pueden translocarse al núcleo de la célula y activar la transcripción.

8. LINFOPOYESIS

8.1. Células B

Las células B y células T presentan un proceso de diferenciación y maduración diferente, en el caso de los LB éstos maduran en la médula ósea y en el caso de los LT el proceso ocurre en el Timo, ambos llamados órganos linfoides primarios.

El proceso de maduración de los linfocitos B involucra dos etapas, una antígeno-independiente, que ocurre en la médula ósea y otra antígeno-dependiente que ocurre, fundamentalmente, en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo y otros tejidos linfoides), lugar en el cual los linfocitos B específicos para un determinado antígeno, toman contacto con éste. En este capítulo no referiremos a la primera etapa.

Se ha identificado una célula progenitora (linfoide) capaz de diferenciarse específicamente hacia el linaje de las células linfoides (células B, T y NK). Esta célula progenitora linfoide correspondería al estado más temprano de diferenciación linfocitaria, que se caracteriza por una alta actividad mitótica. Se requiere en esta

etapa de alta proliferación. Posteriormente, y debido a la activación de un programa genético específico las células progenitoras linfoides son conducidas hacia la diferenciación del linaje B. La clasificación de los siguientes estados de diferenciación de las células B está definido, principalmente, por el rearrreglo de los genes de cadena liviana y pesada de las inmunoglobulinas y por la ausencia o presencia de marcadores de superficie celular.

Estadio pro-B. No producen inmunoglobulinas y se distinguen por la expresión de los marcadores CD19, CD43 y B220.

Estadio pre-B. Ocurre la recombinación de los genes V-D-J de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y la síntesis y expresión citoplasmática de la cadena pesada μ . Estas células no expresan inmunoglobulinas en su membrana, ya que aún no sintetizan la cadena liviana (L), y por lo tanto son incapaces de reconocer o responder a antígeno. Posteriormente, algunas de las cadenas H se asocian a una «cadena L de reemplazo», molécula estructuralmente similar a la cadena L normal pero que no posee la región variable de ésta. La combinación de la cadena H con la cadena L de reemplazo constituyen el receptor de células pre-B (pre-BCR), el que regularía la síntesis ulterior de las cadenas L y la consiguiente maduración de los linfocitos B.

Linfocitos B inmaduros. Ocurre la recombinación de los genes VJ de las cadenas livianas y por tanto la síntesis de las cadenas livianas (κ ó λ las cuales se asocian con la cadena pesada μ para generar una molécula de IgM en el citoplasma. Estos linfocitos B no pueden generar nuevas regiones variables (de cadenas L o H) en la médula ósea y se les considera funcionalmente inmaduros. De hecho, su encuentro con antígenos propios puede llevarlos a un estado anérgico (inactivación funcional) o de muerte celular más que a una activación. Sin embargo, esta es una importante etapa de selección negativa de linfocitos B autorreactivos que eventualmente podrían ocasionar enfermedades autoinmunes.

Linfocitos B maduros. Los linfocitos B son capaces de co-expresar moléculas de IgM y de IgD en la membrana celular, las cuales pueden actuar como receptores específicos para antígeno. En esta etapa los linfocitos adquieren competencia funcional (figura 1-11). Además de la regulación génica mediada por diversos factores de transcripción y de IL-7, se conoce

que proteínas tirosina quinasa de la familia Src y ciertos procesos adhesivos entre los linfocitos B en desarrollo y los elementos del estroma de la médula ósea actúan como factores inductores de la diferenciación de células B.

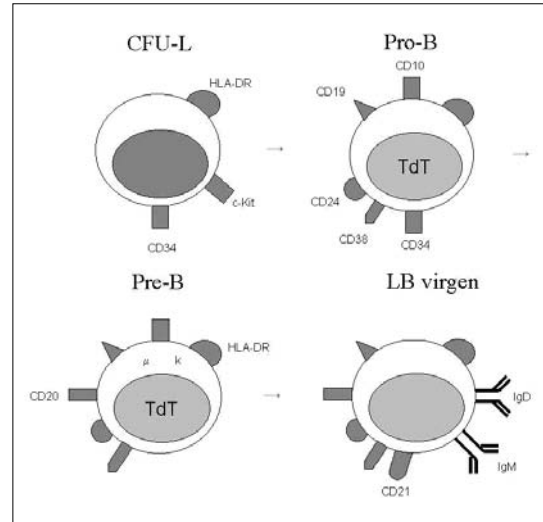


Figura 1-11. Etapas en la maduración de los linfocitos B.

Los linfocitos B virgen que expresan en su membrana receptores específicos para un determinado antígeno, salen de la médula ósea y entran en la circulación periférica. A partir del estado de células B inmaduras los linfocitos experimentarían una disminución en su respuesta a la quimioquina CXCL12 lo que les permitiría escapar a la acción reclutadora de este factor y abandonar la médula ósea. En la periferia, los linfocitos B vírgenes migran a los órganos linfoides secundarios donde completarán su proceso de diferenciación.

8.2. Células T

Los linfocitos T se originan en la médula ósea a partir de un precursor capaz de migrar al timo, el principal órgano donde se lleva a cabo la diferenciación de los linfocitos T. Este proceso de maduración de los linfocitos T en el timo (denominados timocitos en oposición a los linfocitos T maduros que se encuentran en circulación), y la generación del repertorio de receptores de LT puede dividirse en tres etapas: (a) la migración de los progenitores de la médula ósea al timo, (b) la diferenciación de estas células progenitoras y (c) un proceso de selección.

Migración de los precursores de linfocitos T

Se postula, que los precursores de células T originados en la médula ósea expresarían en su

superficie receptores de adhesión que se ligarían selectivamente al endotelio tímico permitiendo su entrada al interior del órgano. Uno de estos receptores podría ser la molécula CD34 la interactuaría con la molécula L-Selectina presente en el estroma del Timo.

Una vez en el timo los precursores de los linfocitos T mantienen una alta capacidad proliferativa.

Diferenciación. Los precursores T ingresan al Timo ubicándose en la zona cortical de éste. A medida que los timocitos migran hacia zonas más internas de la corteza éstos van avanzando en su proceso de maduración los linfocitos T pasan desde la corteza hacia la médula y finalmente salen del timo a la periferia a través de las vías linfáticas o venas. El ambiente tímico representado por las interacciones físicas que se establecen entre los timocitos y los diferentes tipos celulares que allí se encuentran (células epiteliales, dendríticas y macrófagos) y los factores solubles que son liberados al medio externo son claves en los procesos de maduración y selección. El patrón diferencial de expresión de ciertas quimioquinas y de sus receptores, en particular CXCL12, CCL17, CCL19, CCL21, CCL22 y CCL25, estaría relacionado con la migración de los timocitos a través de los diferentes subcompartimentos tímicos. Entre las diferentes citoquinas que las células estromales tímicas secretan, se ha identificado a IL-7 como un modulador directo de la supervivencia, diferenciación, transcripción y rearreglo génico del receptor de células (TCR). Además, la diferenciación de linfocitos T está sometida a un estricto control de expresión génica mediada por factores transcripcionales tales como GATA-3, E12, E47, HEB, NF- κ B, Ikaros y Notch.

En base a la expresión de CD4 y/o CD8, la población de linfocitos T en un individuo adulto puede ser dividida en cuatro grupos: los linfocitos T dobles negativos (CD4⁻ CD8⁻), los dobles positivos (CD4⁺ CD8⁺) que representan poblaciones más o menos inmaduras de linfocitos T y los simples positivos (CD4⁺ CD8⁻, LT «helper» y CD4⁻ CD8⁺, LT citotóxicos) que corresponden a las poblaciones más maduras de linfocitos T.

Selección tímica. En el timo ocurren dos importantes eventos de selección que son centrales en la generación del repertorio de linfocitos T maduros circulantes. Uno de estos procesos permite la generación de autotolerancia eliminando o silenciando aquellos linfocitos T que poseen una alta afinidad por antígenos propios (Selección negativa). El

otro proceso de selección deriva en la generación de linfocitos T maduros con un TCR capaz de reconocer el MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad) propio asegurando que la respuesta inmune sea restringida por MHC (Selección positiva). Estos eventos de selección, que llevan a la producción de linfocitos T «efectivos» ocurren en el timo luego de la expresión del TCR, CD4 y CD8 y antes que estas células salgan a la periferia.

9. ESTUDIO DE LA HEMATOPOYESIS

Varios procedimientos pueden ser utilizados para evaluar la hematopoyesis:

Hemograma. El estudio cuali y cualitativo de las células de la sangre periférica (hemograma) es un primer e importante procedimiento para estudiar el estado de la hematopoyesis (ver capítulo 27).

Mielograma. El mielograma es el estudio citológico series: eritroblástica, granulocítica, agranulocítica y megacariocítica) de un aspirado de médula ósea (ver capítulo 27).

Biopsia de médula ósea. A diferencia del mielograma, en este caso se trata de un estudio histológico y por tanto puede evaluar también la arquitectura medular, pero no puede estudiar los aspectos citológicos.

Ferrocínética. Básicamente se trata de administración de Fe⁵⁹-transferrina y medida de desaparición del plasma, aparición de eritrocitos marcadas.

Cultivo *in vitro* de células troncales. El estudio de las CTH ha sido descrito en el punto 3.2 y además también se hace mención en el capítulo 2.

LECTURAS SUGERIDAS

Bokoch, G., "Chemoattractant signaling and leucocyte activation", *Blood* 86(5):1649-1660, 1995.

Bono, M.R. "Citoquinas" en **Fundamentos de inmunología básica y clínica**, Palomo, I., Ferreira, A., Roseblatt, M., Sepúlveda, C. y Vergara, U. (Eds). Editorial Universidad de Talca. Capítulo 10, 1998.

Broudy, V. "Stem Cell Factor and Hematopoiesis", *Blood* 90 (4): 1345-1364, 1997.

Bruno, L., Hoffmann, R., McBlane, F., Brown, J., Gupta, R., Joshi, C., Pearson, S., Seidl, T.,

Heyworth, C., and Enver, T. "Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro". *Mol. Cell. Biol.* 24(2): 741-756, 2004.

Corey, S., Anderson, S. "Src-Related Protein Tyrosine Kinases in Hematopoiesis". *Blood*, 93 (1): 1-14, 1999.

Cytokines web. Cytokines web 3-D structures of cytokines. "http://www.psynix.co.uk/cytweb/cyt_struct/index.html"

Cytokines on the web. COPE cytokines online Pathfinder Encyclopaedia. "http://www.copewhitcytokines.de"

Deficiencia de plaquetas: trombocitopenia. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/hih/voll2_2_99/

Dorshkind, K. "Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products". *Annu. Rev. Immunol.* 8: 111-137, 1990.

Dzierzak, E. "Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships". *Immunological Reviews* 187:126-138, 2002.

Ebel B., Franklin B. "Regulación del gen de la eritropoyetina", *Blood* 6: 1864-1877, 1999.

Expresión selectiva del receptor para trombopoyetina en tejidos humanos. Disponible en: «<http://www.staf.org/tto/beatesopanol>»

Geneser, F. **Histología: bases moleculares.** Capítulos 10, 11 y 16, Editorial Panamericana, 2001.

Giles, F.J., Keating, A., Goldstone, A. H., Avivi, I., Willman, C.L., and Kantarjian, H.M. "Acute Myeloid Leukemia" *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*:73-110. 2002

Graf, T. "Differentiation plasticity of hematopoietic cells", *Blood* 99(9): 3089-3101, 2002.

Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. "Plasticity of marrow-derived stem cells". *Blood* 102(10): 3483-3493, 2003.

Ivanova N. B., Dimos, J. T., Schaniel, C., Hackney, J. A., Moore, K. A., Lemischka, I. R. "A stem cell molecular signature". *Science* 298(5593):601-604, 2002

Lee, R.; Foerter, J.; Lukeng, J.; Pareskevas, F.; Greer, J.; Rodgers, G., Editors, **Wintrobe's clinical hematology**, Chapters 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, Lippincott Williams E. Wilkins, Philadelphia, 1998.

Lemischka, I. R. "Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells". *Stem Cells* 1:63-68, 1997.

Lévesque, J., Haylock, D., Simmons, P. "Cytokine Regulation of Proliferation and Cell Adhesion are Correlated Events in Human CD 34⁺ Hemopoietic Progenitors". *Blood* 88 (4); 1168-1176, 1996.

Palomo, I., Pereira, J., Koenig, C. "Células y órganos del Sistema Inmune" en **Fundamentos de Inmunología básica y clínica.** Palomo, I., Ferreira, A, Sepúlveda, C., Roseblatt, M., Vergara, U. (Eds). Cap. 3 Editorial Universidad de Talca, 2002.

Parise L., Boudignon-Proudhon C., Keely, P., Naik, U. "Platelets in hemostasis and thrombosis" en **Wintrobes Clinical Hematology.** Lee R., Foerter, J., Lekens J. (Eds.) 10 ed. Vol. 1, chapter 23, Editorial Lippincott Williams y Wilkins, 1999.

Payne, K.L., and Crooks, G.M. "Human hematopoietic lineage commitment". *Immunological Reviews* 187: 9-11, 2002.

Pereira, J., "Producción, cinética y función de los granulocitos" en **Fisiología de la sangre** Mezzano, D. y Pereira, J., (Eds.), capítulo 7, Editorial Universitaria, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 1993.

Pereira, J. "Estructura, producción, cinética y función de las plaquetas" en **Fisiología de la sangre.** Mezzano D., Pereira J., (Eds.) Cap. 9, Editorial Universitaria, P. Universidad Católica, 1993.

Ramesh, A., Shivdasani, Stuart H., Orkin. "The Transcriptional Control of Hematopoiesis". *Blood* 87 (10): 4025-4033, 1996.

Robert, M. "The Megacariocyte-Platelet sistem" en **Clinical Hematology.** Stiene- Marrin Lotspeich- Steininger, Ch. Koepke, J. (Eds.) 2 ed. Vol 2 chapter 55 Editorial Lippincott, 1998.

Shivdasani, R.A., and Orkin, S.H. "The transcriptional control of hematopoyesis". *Blood* 87(10): 4025-4039, 1996.

Zon, L., I. Ed., **Hematopoiesis. A Developmental Approach.** Oxford University Press. 2001.

CÉLULAS TRONCALES EN LA MÉDULA ÓSEA

José J. Minguell U. y Alejandro A. Erices O.

- 1. Introducción**
- 2. Propiedades de las células troncales adultas**
- 3. Célula troncal hematopoyética**
- 4. Células troncales mesenquimáticas**
- 5. Células troncales de la médula ósea y su potencial uso clínico**

RESUMEN

El mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que controlan la autorrenovación y diferenciación de las células troncales, tanto de origen embrionario como de tejidos adultos, ha permitido profundizar sobre la biología de este tipo celular tan especial. Pero asociado a esto, se ha visualizado la opción de su utilización en terapias celulares dirigidas a la regeneración de tejidos u órganos dañados o al reemplazo anticipado de tejidos en vías de envejecimiento o con pérdida de funcionalidad. Las células troncales que existen en la médula ósea, tanto la hematopoyética como la mesenquimática, son hoy en día objeto de un sinnúmero de estudios, tanto a nivel experimental como clínico. Lo anterior debido a su capacidad de multidiferenciación a varios linajes celulares y además por expresar una aparente plasticidad, que les permitiría la generación de linajes celulares no convencionales.

1. INTRODUCCIÓN

No sólo los tejidos embrionarios, cualquiera sea su estado de desarrollo, sino que también los tejidos de un organismo adulto (post-nacimiento) presentan células troncales. En una condición de funcionamiento fisiológico (normal, estado estable) de un organismo adulto, las células troncales cumplen la importante función de reemplazar la dotación de células diferenciadas que en cada tejido, se pierden por uso o por envejecimiento celular.

La capacidad de una célula troncal adulta de diferenciarse a uno o a varios linajes celulares, es el mecanismo por el cual la célula troncal “alimenta” de células especializadas y maduras a los tejidos, órganos y sistemas de un organismo adulto.

La médula ósea es el sitio de residencia de al menos dos tipos de células troncales multipotentes. La célula troncal hematopoyética origina todas las células de la sangre (mieloides/linfoides, eritrocitos y plaquetas). A su vez, la célula troncal mesenquimática ubicada en el estroma de la médula ósea,

origina tanto linajes considerados mesenquimáticos (óseo, cartílago, músculo, adiposo y de soporte hematopoyético), como no-mesenquimáticos, según evidencias en modelos experimentales (neural, hepático).

La abundante literatura acerca de las propiedades biológicas de estas células troncales de la médula ósea, como la relacionada con las células troncales embrionarias, ha sugerido su uso en terapias celulares dirigidas al tratamiento de un vasto repertorio de enfermedades. Es indudable que el intenso trabajo científico en curso, en diferentes laboratorios tanto académicos como de empresas de biotecnología, permitirá dentro del corto plazo decidir, ajeno a la fuente de obtención de las células troncales (embrionarias o adultas), cuál es el tipo más adecuado para desarrollar una terapia dirigida contra una particular enfermedad. El uso terapéutico de la célula troncal hematopoyética no es nuevo, dado que desde la década de los 50^o viene siendo utilizada exitosamente en la clínica hematológica. A su vez, estudios preclínicos efectuados en los últimos 3-4 años han señalado promisorios resultados con la utilización de células troncales mesenquimáticas en varias

enfermedades. Si embargo, la necesidad de profundizar sobre una serie de aspectos de la biología de estas células troncales, permitirá su utilización clínica bajo condiciones de máxima seguridad y eficiencia.

2. PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS TRONCALES ADULTAS

No sólo los tejidos embrionarios, cualquiera sea su estado de desarrollo, sino también los tejidos de un organismo adulto contienen células troncales (CT). Bajo condiciones de estado estable, las células troncales cumplen en un organismo adulto la importante función de reemplazar la dotación de células diferenciadas que en cada tejido se pierde por uso o por envejecimiento. Igualmente, en condiciones de daño la regeneración de un tejido depende de la dotación de células troncales que existen en dicho tejido.

De las propiedades de una célula troncal adulta, las más relevantes son:

a) Su capacidad de autogenerarse («self-renewal») está fuertemente asociada a su condición de salir del ciclo celular (proliferativo) y permanecer en un estado no proliferativo (G0). Bajo circunstancias de alto requerimiento de células maduras (envejecimiento o daño), se generan señales mitogénicas y de diferenciación con lo cual la CT abandona su estado quiescente y reinicia su ciclo celular. Es probable que una de las células hijas que han completado el ciclo, regrese a una condición G0 de modo de mantener y asegurar una dotación fija de CT durante la vida de la especie, incluso en

condiciones de alta demanda.

b) Su capacidad de comprometerse, diferenciarse y madurar hacia uno o varios linajes, para así producir células maduras especializadas que “alimentan” a los tejidos, órganos y sistemas de un organismo adulto. Una propiedad adicional de las células troncales adultas, recientemente descrita, se desprende del análisis referente al “dogma”, que señala que una célula troncal solo produce las células diferenciadas y maduras propias del tejido de residencia. Esto implica, por ejemplo, que la célula troncal hematopoyética que indiscutiblemente reside en la médula ósea solo producirá los distintos tipos de linajes celulares que se encuentran en la sangre. Numerosas evidencias generadas en los últimos 3 años, han desafiado este dogma al mostrar que el potencial de diferenciación de una célula troncal es más vasto y permite la formación de linajes celulares diferentes a los del tejido de residencia. Este concepto llamado “plasticidad de las células troncales adultas”, sugiere que estas pueden cambiar su “destino” y “comprometerse” en la producción de células de otro (s) tejido (s). Aunque la mayoría de los estudios sobre plasticidad se han realizado con células troncales murinas, es evidente que la extensión de estos estudios a las células troncales humanas contribuirán a hacer más atractivo aún, el potencial uso terapéutico de estas células. Sin embargo, numerosas evidencias han demostrado que la plasticidad de células troncales adultas no posee relevancia funcional. Evidencias de plasticidad de las células troncales adultas se resumen en la tabla 2-1.

Tabla 2-1. Células troncales adultas: algunas evidencias de plasticidad*

Célula troncal	Tejido “convencional” que forma	Tejido “no convencional” que puede formar	Referencias
Hematopoyética	Células de la sangre	Nervioso, epitelial, hepático, músculo esquelético y cardiaco	Petersen, 1999; Krausse, 2001
Neuronal	Nervioso	Sangre, músculo	Bjornson, 1999; Galli, 2000
Muscular	Muscular	Nervioso, sangre	Gussoni, 1999; Jackson, 1999
Mesenquimática	Óseo, cartílago, adiposo, músculo, nervioso, pulmón, estroma hematopoyético, renal		Koppen, 1999; Ito, 2001

*: revisiones generales sobre el tema: Wulf, 2001; Herzog, 2003; Prockop, 2003.

3. CÉLULA TRONCAL HEMATOPOYÉTICA

El inicio de todos los estudios sobre la célula troncal hematopoyética (HSC), lo constituyó la demostración que en la médula ósea de animales adultos existe una célula precursora con capacidad de autorrenovarse y un potencial de diferenciación hacia todos los linajes celulares de la sangre. Esta célula troncal que existe en pequeñas cantidades, se divide, se compromete hacia un linaje particular de diferenciación y finalmente genera las células maduras de la sangre. Esta ordenada secuencia permite mantener la homeostasis y suplir en forma eficiente y rápida la demanda que se produce en situaciones de daño o estrés fisiológico, como pérdida de sangre, infecciones, etc.

Las células troncales hematopoyéticas que presentan las propiedades de autorrenovación y diferenciación, no forman una población homogénea sino un conjunto de subpoblaciones («stem cell pool»). Así, se han descrito las siguientes subpoblaciones: (a) la llamada LT-HSC («long-term reconstituting HSC») está formada por células que tienen el mayor potencial de autorrenovación, diferenciación y de reconstitución por largos períodos de una hematopoyesis suprimida, (b) la llamada ST-HSC («short-term reconstituting»), que es una población intermedia y que sólo difiere de la anterior en que las células que la forman reconstituyen la hematopoyesis solo por períodos cortos, y (c) un grupo de células con baja capacidad de autorrenovación y con un potencial de diferenciación restringido a un solo linaje (linfoide, mieloide, eritroide, etc.)

A pesar que el mejor ensayo para evaluar la calidad y características de una HSC es su capacidad de reiniciar la hematopoyesis en un huésped mieloablado (trasplante de médula ósea), existen otras opciones para separar y luego evaluar las propiedades de una HSC. Esquemas de aislamiento utilizando esferas magnéticas asociadas con anticuerpos monoclonales y posterior inmunotipificación para determinar la expresión o no de ciertos «clusters de diferenciación» (CD's), permitieron seleccionar células que entre otros, no expresan antígenos de linajes maduros (Lin-), pero que sí expresan el antígeno mieloide CD45 y el troncal hematopoyético CD34. Estas células Lin⁻/CD45⁺/CD34⁺/CD38⁻ representan una selecta población de HSC. Con el uso de otras metodologías se ha obtenido una población celular altamente enriquecida en HSC primitivas, equivalentes a LT-HSC. Estas células, son

llamadas «side population» (SP) por su habilidad única de excluir colorantes específicos y por demostrar en citometría de flujo (FACS) un espectro de emisión único. Además de estar presentes en la médula ósea, células tipo SP se han encontrado en otros tejidos (músculo, cerebro), lo que ha permitido especular acerca si estas células troncales son tejido-específicas o son células troncales propias de la médula ósea y que se han «anidado» («lodgement») en otros tejidos. Utilizando modelos de hematopoyesis animal se ha establecido que una sola HSC, «purificada» por los métodos antes indicados, puede ser capaz de reiniciar una hematopoyesis suprimida en un receptor irradiado letalmente y mantenerla durante la vida del animal.

Al momento de la división de una HSC, se plantea para las células hijas resultantes la toma de decisión entre generar progenitores que mantengan el depósito («pool») de HSC (autorrenovación) o de generar células comprometidas ocurre una división simétrica y de este modo se generan dos células hijas idénticas que mantengan el depósito de HSC y luego en algún momento de demanda de células ocurren divisiones asimétricas que originan células capaces de iniciar procesos de compromiso y maduración. El tema de si las divisiones de una HSC son simétricas, asimétricas o con alternancia simetría/asimetría está abierto y existe evidencia experimental de apoyo a las diferentes opciones.

Un rol central en la determinación de destino (autorrenovación vs diferenciación) de una HSC, lo juega el microambiente (nicho) donde esta célula se aloja. Este microambiente es una citoarquitectura dinámica formada por diversas citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de matriz extracelular altamente organizadas y varios tipos de células estromales de la médula ósea. Estos nichos ofrecen a la HSC los factores de sobrevivencia y de autorrenovación, ya sea por contactos célula-célula, célula-matriz extracelular o indirectos que implican la producción y secreción de factores diversos. En la decisión de una HSC hacia autorrenovación o diferenciación, la participación del microambiente como tal y en particular de citoquinas, no ocurre a nivel de la decisión de cuál camino seguir sino a nivel de favorecer la sobrevivencia y la proliferación de las células que se originan. Por otro lado, existen evidencias *in vitro* que SLF, Flt3L, IL-3, IL-6 o trombopoyetina pueden ser las señales exógenas que gatillen en una HSC el inicio de un ciclo de

autorrenovación durante dos o tres mitosis a fin de mantener un número óptimo de HSC. Por otro lado, los mecanismos asociados con muerte celular programada (apoptosis), también tienen un papel central en regular el destino y muy especialmente el número de HSC en la médula ósea. A nivel molecular, un aumento en autorrenovación de HSC está asociado con una sobreexpresión de HoxB4 y con inducción de mecanismos de señalización, vía Wnt, Notch o Sonic hedgehog.

Las interacciones entre la HSC y el microambiente estromal de la médula ósea son muy dinámicas y necesariamente implican eventos adhesivos y des-adhesivos. La HSC mientras está adherida, particularmente a moléculas que forman la matriz extracelular, expresa su potencial de autorrenovación y/o de diferenciación y se «mueve» o migra por la fina citoarquitectura del estroma. Una célula diferenciada y madura «pierde» interés por permanecer adherida y por el contrario «gana» interés en migrar y acercarse al torrente sanguíneo. Por lo tanto, asociado al proceso de diferenciación ocurren procesos de migración y modulación de la expresión de receptores o ligandos adhesivos o bien de señales de des-adhesión, que finalmente permitirán el egreso de un célula madura desde el espacio estromal hacia el lumen capilar y alcanzar así la circulación.

Sin embargo, la HSC como tal puede migrar desde la médula ósea e ingresar a la circulación sin que medien decisiones de diferenciación. Así ocurre durante el desarrollo de la hematopoyesis (migración secuencial desde el saco vitelino a la médula ósea del recién nacido) y también ocurre en condiciones en las cuales se altera el estado estable hematopoyético por drogas mielosupresivas o por infusión de altas dosis de citoquinas o factores de crecimiento. En estos casos los niveles de HSC en sangre aumentan en tiempos relativamente cortos (3-6 días) desde valores mínimos (pre-estimulación) hasta niveles muy elevados. Este fenómeno se utiliza a diario en las clínicas de trasplante para obtener HSC desde la sangre periférica («peripheral blood stem cells») y ser usadas en trasplantes de células troncales hematopoyéticas («trasplantes de médula ósea»). La capacidad de las HSC de migrar por el estroma, de hacer movimientos transendoteliales y de circular en condiciones fisiológicas parece ser un evento fisiológico bastante frecuente, sin embargo, minimizado por el corto tiempo de permanencia de las HSC

en la sangre. Esta última característica de las HSC, explica la alta eficiencia del trasplante de células troncales hematopoyéticas y también el eventual alojamiento y residencia de una HSC en un microambiente diferente al de la médula ósea, desde donde esta célula troncal «itinerante» pueden contribuir a la formación de células y tejidos no hematopoyéticos (¿plasticidad?).

4. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS

La médula ósea contiene una segunda población de células troncales denominadas células troncales mesenquimáticas (MSC, «mesenchymal stem cells»). La MSC, reconocida originalmente como «fibroblasto» de estroma, fue identificada como una célula con capacidad de diferenciarse a células del tejido óseo. Estudios posteriores demostraron que estas células son multipotentes dado que pueden diferenciarse a células correspondientes a tejidos mesenquimáticos tales como hueso, cartílago, tendón, músculo, tejido adiposo y estroma hematopoyético. De este modo se ha demostrado que, en el organismo adulto, las MSC participan en la homeostasis celular de tejidos mesenquimáticos y además en los procesos de regeneración/reparación frente a situaciones de daño. Las MSC no solo se encuentran en el estroma de la médula ósea, sino que también en sangre periférica, hígado fetal y sangre de cordón umbilical.

En cultivo, las MSC crecen como células adherentes, tienen una morfología fibroblastoide y requieren de suero fetal para crecer. La capacidad de estas células de crecer *in vitro* y de poder ser subcultivadas (expansión) es muy alta y depende de factores tales como la edad o condición de la médula ósea del donante de la cual fueron. Las MSC, después de moderados ($\leq 5-7$) ciclos de subcultivo mantienen su cariotipo, actividad telomerasa y potencial de diferenciación, sin embargo después de ser exhaustivamente subcultivadas muestran evidentes signos de senescencia, apoptosis y una pérdida en la capacidad de diferenciación. Las MSC no tienen un perfil antigénico exclusivo y su caracterización se realiza sobre la base de la expresión de un conjunto de marcadores los cuales son compartidos con otros tipos celulares (linajes mesenquimáticos maduros, células endoteliales, células epiteliales). Dentro de los marcadores más representativos y utilizados se destaca la expresión de los antígenos mesenquimáticos

SH2, SH3, SH4, α -actina de músculo esquelético (ASMA) y STRO-1, como también la ausencia de marcadores hematopoyéticos CD34, CD14 y CD45.

Al examinar la progresión de las MSC por el ciclo celular, se ha encontrado que sobre el 90% de estas células se encuentran en fase G0/G1 y solo un (10%) en fases S+G2/M. Dentro de la población en G0/G1, se ha determinado que entre un 10-20% de las células se encuentran en el estado de quiescencia o G0. Estas células corresponden a progenitores mesenquimáticos tempranos y no-comprometidos en diferenciación a los diversos linajes mesenquimáticos (¿“real” célula troncal mesenquimática?). Por otro lado, la mayoría de las MSC que están en ciclo celular corresponden a progenitores mesenquimáticos tardíos y que han adquirido un compromiso de diferenciación en alguno de los linajes (figura 2-1).

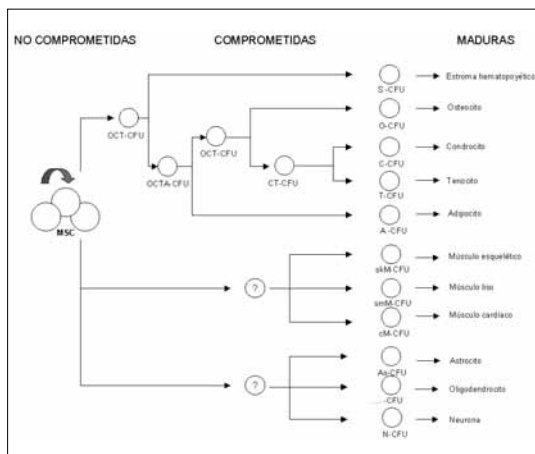


Figura 2-1. Jerarquía proliferativa y de diferenciación de la célula troncal mesenquimática. En este esquema de diferenciación los progenitores mesenquimáticos se encuentran subdivididos en tres subpoblaciones: células troncales mesenquimáticas correspondientes a MSC no comprometidas, progenitores mesenquimáticos comprometidos con un linaje mesenquimático y células maduras. Los progenitores comprometidos han sido denominados como unidades formadoras de colonias (CFU) y su potencial de diferenciación por S, estroma hematopoyético; O, osteoblastos; C, condrocitos; T, tenocitos; A, adipocitos; skM, células de músculo esquelético; smM, células de músculo liso; cM, células de músculo cardíaco; As, astrocitos; Ol, oligodendrocitos y N, neuronas. El esquema ha sido estructurado en base a estudios con cultivos expandidos de células progenitoras mesenquimáticas de la médula ósea adulta (Adaptado de Minguell 2001).

La proliferación o mantención de las MSC, según sea su grado de compromiso, es regulada por varios factores de crecimiento como PDGF, TGF β 1, EGF y FGFs. El compromiso de una MSC a seguir un camino particular de diferenciación

implica la expresión y/o activación de factores de transcripción determinados, tales como Cbfa-1 o PPAR γ para los linajes osteogénico y adipogénico, respectivamente. A su vez un progenitor comprometido, progresa por esa vía de diferenciación hasta generar el fenotipo maduro debido a que se expresan y/o activan genes y proteínas asociadas a la función del tejido maduro que la célula diferenciada formará. Así, para el linaje osteogénico se producirán osteocalcina y osteopontina y para el adiposo se sintetizará la enzima lipoprotein lipasa. A pesar que se conocen muchos inductores para el compromiso y diferenciación *in vitro* de las MSC, los factores que operan *in vivo* no han sido identificados aún. Por otro lado, numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que éstas células además de diferenciarse a los tejidos mesenquimáticos ya señalados, también pueden diferenciarse a células de linajes no mesenquimáticos (tabla 2-1). Así, estas células troncales adultas también presentan plasticidad y pareciera por lo tanto que su potencial de diferenciación es más amplio que lo inicialmente supuesto.

El alto poder expansivo *ex vivo* de las MSC, junto a su capacidad de ser les confiere un enorme atractivo para ser usadas en terapias biológicas. Como componente celular del estroma de la médula ósea, la MSC forma parte del proceso hematopoyético. Desde esta perspectiva la MSC contribuye a la conformación del microambiente hematopoyético, a través de la producción tanto de citoquinas y factores de crecimiento (señales solubles) como de moléculas de adhesión y matriz extracelular (tabla 2-2). Por lo tanto, se ha planteado que la MSC puede ser un blanco celular atractivo para regular, en forma indirecta la hematopoyesis, como por ejemplo en acelerar y hacer más eficiente la reconstitución hematopoyética post-trasplante de HSCH. Otra propiedad muy interesante de las MSC es su capacidad de establecer interacciones con progenitores específicos de células efectoras del sistema inmune y modular así su función. En el contexto de estas interacciones, la MSC expresa antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA: “Human leucocyte antigen”) de clase I, pero no de clase II, los que sí pueden ser expresados frente a estímulos como IFN- γ . A pesar de la expresión de los antígenos de HLA, las MSC escapan al reconocimiento y no activan linfocitos T alorreactivos en cultivo. Por otro lado las MSC tienen propiedades inmunosupresoras mediadas por citoquinas, son capaces de inhibir

la proliferación de linfocitos T activados y de reducir la incidencia de enfermedad injerto contra huésped. Estas observaciones apoyan el

uso de MSC alogeneicas, con fines inmunomoduladores en pacientes no compatibles.

Tabla 2-2. Células troncales; mesenquimáticas: expresión de citoquinas y sus receptores y de componentes de matriz extracelular

Tipo de proteína	Componente específico
Citoquinas y factores de crecimiento	IL-1a, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-27, LIF, SCF, Flt-3 ligando, GM-CSF, G-CSF, M-CSF.
Receptores	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, IL-10R, IL-13R, IL-17R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN- γ R, TNFIR, TNFIIR, TGF β IR, TGF β IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR.
Moléculas de adhesión	α v β 3, α v β 5, α 1, α 2, α 3, α 5, α v, β 1, β 3, β 4, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selectina, endoglina, CD44.
Matriz extracelular	Colágenos I, II, IV, V, VI, fibronectina, laminina, proteoglicanos, hialuronato.

*: revisiones generales sobre el tema: Prockop, 1997, Minguell, 2001

5. CÉLULAS TRONCALES DE LA MÉDULA ÓSEA Y SU POTENCIAL USO CLÍNICO

La abundante literatura acerca de las propiedades biológicas de las células troncales, ajeno a su origen embrionario o adulto, demuestra que algunas de estas propiedades han sido utilizadas para el desarrollo de estrategias de terapias celulares, muchas de las cuales ya están en avanzadas etapas de estudios clínicos. Así, el uso de CT adultas se visualiza en el desarrollo de terapias celulares dirigidas

al tratamiento de procesos regenerativos, de un vasto repertorio de enfermedades y muy probablemente en ofrecer al paciente una mejor calidad de vida con una más prologada expectativa de subsistencia libre de enfermedad. En la tabla 2-3, se indican algunas de las opciones terapéuticas asignadas a las células troncales adultas. Es interesante destacar que en la mayoría de las terapias indicadas, la célula troncal asociada es una célula residente de la médula ósea.

Tabla 2-3. Posibles usos terapéuticos de células troncales adultas

Célula troncal o progenitores relacionados	Enfermedad "blanco"	Referencias
Neuronal	Parkinson, Alzheimer, daño médula espinal, esclerosis múltiple, apoplejía	Schwarz, 1999; Magavi, 2000; Kondo T, 2000
Musculares cardíacas	Infarto miocárdio, fallas cardíacas congestivas	Beltrami, 2001; Rosenthat, 2001, Siminiak, 2003
Productoras de insulina	Diabetes	Serup, 2001
Mesenquimáticas	Osteoartritis, distrofia muscular, osteoporosis	Young, 1998; Cancedda, 2003
Hematopoyéticas	Cáncer, inmunodeficiencias, leucemias, enfermedades hematológicas hereditarias	Ikehara, 2001
Hepáticas	Hepatitis, cirrosis	Shafritz, 2000; Starin, 2000; Muraca, 2003
Epiteliales (piel)	Quemaduras severas, cicatrizaciones, folículo piloso	Toma, 2001; Oshima, 2001
Retina	Degeneración mácula	Tropepe, 2002
Dentales	Estructuras dentales	Gronthos, 2000
Sangre cordón umbilical	Terapias <i>in útero</i>	Ende, 2001

*: revisiones generales sobre el tema: Johansson, 2003; Burt, 2003; Marty, 2003; Byrne, 2003; Hirani, 2002.

Si bien es cierto que aún falta mucha información sobre la biología de las CT, no cabe duda que el intenso trabajo científico en curso permitirá dentro del corto plazo identificar aquellos aspectos celulares o moleculares que aún son contradictorios o desconocidos. Por otro lado, dada la notable velocidad con que la información generada en los laboratorios científicos se ha trasladado a la clínica médica, en muchos se ha decidido meter en una “caja negra” aquellos datos básicos no definitivamente establecidos y avanzar con la implementación de una terapia en particular, en beneficio de los pacientes que puedan recibirla. Entre aquellos aspectos, aún no totalmente establecidos, se mencionan los siguientes: (a) determinar para cada caso la vía más adecuada para hacer ingresar la CT al paciente (implante vs trasplante), (b) determinar el perfil de histocompatibilidad y las respuestas inmunogénicas que genera una CT alogénea, (c) las CT están normalmente presentes en bajas cantidades en los diferentes tejidos u órganos, por lo tanto será necesario perfeccionar los sistemas de expansión *ex vivo* manteniendo sus propiedades de no comprometidas y no diferenciadas, (d) definir opciones para su uso en enfermedades agudas, donde probablemente no se dispondrá de tiempo suficiente para efectuar las manipulaciones tendientes a su obtención y expansión, (e) definir estrategias para el uso de CT en enfermedades genéticas, (f) determinar la “calidad biológica” de CT de pacientes adultos en cuanto a acumulación de daño o de evidencias de senescencia (largo de telómeros) y finalmente, (g) ¿será la utilización de CT en terapias celulares un privilegio único de pacientes de países desarrollados o será factible implementar o transferir tecnologías para que pacientes de países en desarrollo también se beneficien?

LECTURAS SUGERIDAS

Ailhaud, G. “Extracellular factors, signalling pathways and differentiation of adipose precursor cells”. *Curr Opin Cell Biol.*, 2:1043-1049, 1990.

Angelopoulou, M., Novelli, E., Grove, J.E., Rinder, H.M., Civin, C., Cheng, L., Krause, D.S. “Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice”. *Exp Hematol.*, 31:413-420, 2003.

Beltrami, A.P., Urbanck, K., Jajstura, J., *et al.* “Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction”. *N. Engl J Med.*, 344: 1750-7, 2001.

Benavente, C.A., Sierralta, W.D., Conget, P.A., Minguell, J.J. “Subcellular distribution and mitogenic effect of basic fibroblast growth factor in mesenchymal uncommitted stem cells”. *Growth Factors* 21:87-94, 2003.

Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker D.P., Williams K.P., Chadwick K., Ling L.E., Karanu F.N., “Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation”. *Nat Immunol.*, 2:172-180, 2001.

Bjornson, C.R., Rietze, R.L, Reynolds, B.A. *et al.* « Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo”. *Science* 283:534-537, 1999.

Burt, R.K., Arnold, R., Emmons, R., Oyama, Y., Marmont A. “Stem cell therapy for autoimmune disease: overview of concepts from the Byrne E, Howells DW. Stem cell therapies: a tale of caution”. *Med J Aust.*, 179 :164-6, 2003.

Campagnoli, C., Roberts, I.A., Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., “Bellantuono I and Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow”. *Blood.*, 98:2396-2402, 2001.

Cancedda R., Bianchi G., Derubeis A., Quarto R. “Cell therapy for bone disease: a review of current status”. *Stem Cells.*, 21: 610- 6199, 2003.

Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer H.E. and Moore M.A. “Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny”. *Blood.*, 56:289-301, 1980.

Conget, P.A. and Minguell, J.J. “Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells”. *Journal of Cellular Physiology.*, 181:67-73, 1999.

Conget, P.A., Allers, C., Minguell, J.J. “Identification of a discrete population of human bone marrow-derived mesenchymal cells exhibiting properties of uncommitted progenitors”. *J Hematother Stem Cell Res.*, 10(6):749-58, 2001.

- Deans, R.J., Moseley, A.B. "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses". *Exp Hematol.*, 28 :875-884, 2000.
- Digirolamo, C.M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D.G., Class, R., Prockop, D.J. "Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate". *Br J Haematol*, 107:275-81, 1999.
- Djouad, F., Plence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noel, D., Jorgensen, C. "Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals". *Blood.*, 102:3837-44, 2003.
- Domen, J., Cheshier, S.H., Weissman, IL. "The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential". *J Exp Med.*, 191:253-264, 2000.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridal, A.L. and Karsenty, G. "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation". *Cell.*, 89: 747-754, 1997.
- Ema H., Takano H., Sudo K., Nakauchi H. "In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells". *J Exp Med.*; 192:1281-1288, 2000.
- Ende, N., Chen, R. "Human umbilical cord blood cells ameliorate Huntington's disease in transgenic mice". *J Med.*, 32, 231-240, 2001.
- Enver, T., Heyworth, C.M., Dexter, T.M. "Do stem cells play dice?" *Blood.*, 92: 348-351, 1998.
- Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood". *Br J Haematol.*, 109: 235-242, 2000.
- Erices, A., Conget, P., Rojas, C., Minguell, J.J. "Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells". *Exp Cell Res.*, 280:24-32, 2002.
- Erices, A.A., Allers, C.I., Conget, P.A., Rojas, C.V., Minguell, J.J. "Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion". *Cell Transplant.*, 12:555-61, 2003.
- Fernández, M., Minguell, J.J. "Adhesive interactions in the hematopoietic system: regulation by cytokines". *Proc Soc Exp Biol Med.*, 212: 313-323, 1996.
- Fernández, M., Simon V., Herrera, G., Cao C., Del Favero, H. and Minguell, J.J. "Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients". *Bone Marrow Transplant.*, 20:265-271, 1997.
- Friedenstein, A.J., Gorsaka, J.F. and Kulagina, N.N. "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs". *Exp Hematol.*, 4:267-274, 1976.
- Fruehauf, S., Seggewiss, R. "It's moving day: factors affecting peripheral blood stem mobilization and strategies for improvement". *Br J Haematol.*, 122:360-375, 2003.
- Galli, R., Borello, U., Gritti, A. et al. "Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells". *Nat. Neurosci.*, 3: 986-991, 2000.
- Galmiche, M.C., Koteliansky, V.E., Briere, J., Herve, P. and Charrbord, P. "Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway". *Blood.*, 82: 66-76, 1993.
- Gori, F., Thomas, T., Hicok, K.C., Spelsberg, T.C. and Riggs, B.L. "Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation". *J Bone Miner Res.*, 14:1522-1535, 1999.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J. et. al. "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*". *Proc Natl Acad Sci USA.*, 97: 13625-13630, 2000.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D. et al. "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation". *Nature.*, 401:390-39, 1999.
- Hall, AK. "Stem cell is a stem cell is a stem cell". *Cell.*, 33:11-12, 1983.
- Herzog, EL, Chai, L, Krause, DS. "Plasticity of marrow-derived stem cells". *Blood.*, 102:3483-3493, 2003.

- Hirai, H. "Stem cells and regenerative medicine". *Hum Cell.*, 15:190-198, 2002.
- Huang, S., Law, P., Francis, K., Palsson, B.O., Ho, A.D. "Symmetry of initial cell divisions among primitive hematopoietic progenitors is independent of ontogenic age and regulatory molecules" *Blood.*, 94:2595-2604, 1999.
- Ikehara, S., "Treatment of autoimmune diseases by hematopoietic stem cells transplantation". *Exp. Hematol.*, 29: 661-669, 2001.
- Ito, T., Suzuki, A., Imai, E., Okabe, M., Hori, M. "Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling". *J Am Soc Nephrol.*, 12:2625-35, 2001.
- Jackson, K.A., Mi, T., Goodell, M.A. "Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 14482- 14486, 1999.
- Johansson, C.B. "Mechanism of stem cells in the central nervous system". *J Cell Physiol.*, 96:409-418, 2003.
- Knoblich, J.A. "Asymmetric cell division during animal development". *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2:11-20, 2001.
- Koc, O.N., Gerson, S.L., Cooper, B.W., Dyhouse SM, Haynesworth, S.E., Caplan, AI and Lazarus HM. "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy". *Journal of Clinical Oncology.*, 18: 307-316, 2000.
- Kondo, M., Scherer, D.C., Miyamoto, T., King, A.G., Akashi, K., Sugamura, K., Weissman, IL. "Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines". *Nature.*, 407:383-386, 2000.
- Kondo, T., Raff, M. "Oligodendrocyte precursor cells reprogramme to become multipotent CNS stem cells". *Science.*; 289, 1754-1757, 2000.
- Kopen, G.C., Prockop, D.J., Phinney, D.G. "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains". *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96:10711-10716, 1999.
- Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, S.J. "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell". *Cell.*,105:369-377, 2001.
- Kuznetsov, S.A., Friedenstein, A.J. and Robey, P.G. "Factors required for bone marrow fibroblast colony formation in vitro". *Br J Haematol.*, 97: 561-570, 1997.
- Lazarus, H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L., Rosenthal, N.S. and Caplan, AI. "Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use". *Bone Marrow Transplantation.*, 16: 557-564, 1995.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringden, O. "HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells". *Exp Hematol.*, 31:890-6, 2003.
- Magavi, S.S, Leavitt, B.R., Macklis, J.D. "Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice". *Nature.*, 405: 951-955, 2000.
- Marty, P.J., Sanberg, P.R., Daugherty, R.M. "Cell therapy and homeland security: funding opportunities for biomedical research". *Cell Transplant.*,12: 553-554, 2003.
- Miller, J.S., McCullar, V., Punzel, M., Lemischka, I.R., Moore, K.A. "Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells". *Blood.*, 93:96-106, 1999.
- Minguell, J.J., Erices, A., Conget, P. "Mesenchymal stem cells". *Exp Biol Med.*, 226: 507-520, 2001.
- Minguell J.J., Conget, P., Erices, A. "Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells". *Braz J Med Biol Res.*, 33: 881-887, 2000.
- Minguell, J.J., Erices, A. "Células troncales adultas". *Revista Médica Clínica Las Condes*, 13: 123-130, 2002.
- Morrison, S.J., Wandycz A.M., Hemmati, H.D., Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development.*,124:1929-1939, 1997.

- Muller-Sieburg, C.E., Deryugina, E. "The stromal cells' guide to the stem cell universe". *Stem Cells.*,13: 477-486, 1995.
- Muraca M. "Cell therapy as support or alternative to liver transplantation". *Transplant Proc.* 35:1047-1048, 2003.
- Nuttall, M.E., Patton, A.J., Olivera, D.L., Nadeau, D.P. and Gowen. M. "Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders". *J Bone Miner Res.*, 13: 371-382, 1998.
- Olavarria, E., Kanfer, E.J. "Selection and use of chemotherapy with hematopoietic growth factors for mobilization of peripheral blood progenitor cells". *Curr Opin Hematol.*, 7:191-196, 2000.
- Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., et al. "Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells". *Cell.*, 104: 233-245, 2001.
- Palis, J., Yoder, MC. "Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man". *Exp Hematol.*, 29: 927-936, 2001.
- Papayannopoulou, T. "Hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. A continuing quest for etiologic mechanisms". *Ann N Y Acad Sci.*, 872, 187-197, 1999.
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., "Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells". *Science.*, 284:1168-1170, 1999.
- Pitterger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C et al. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science.*, 284: 143-147, 1999.
- Prockop, D. "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues". *Science.*, 276:71-74, 1997.
- Prockop, D.J. "Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair". *J Cell Biol.*,160: 807-809, 2003.
- Punzel, M., Liu, D., Zhang, T., Eckstein, V., Miesala, K., Ho, A.D. "The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment". *Exp Hematol.*, 31: 339-347, 2003.
- Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B., Le Blanc, K. "Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells". *Transplantation.*, 76: 1208-13, 2003.
- Rosenthal, N. "High hopes for the heart". *N Engl J Med.*, 344: 1785-7, 2001.
- Scharenberg, C.W., Harkey, M.A., Torok-Storb, B. "The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors". *Blood.*, 99:507-512, 2002.
- Schwarz, E.J., Alexander, G.M., Prockop, D.J. et al. "Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease". *Hum Gene Ther.*, 10: 2539-2549, 1999.
- Seale, P., Asakura, A., Rudnicki, M.A. "The potential of muscle stem cells". *Dev Cell.*, 1:333-342, 2001.
- Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.G., Prockop, D.J. "Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality". *Stem Cells.*, 20: 530-541, 2002.
- Serup, P., Madsen, O.D., Mandrup-Poulsen, T. "Islet and stem cell transplantation for treating diabetes". *British Medical J.* 322: 29-32, 2001.
- Shafritz, D.A. "Rat liver stem cells: Prospects for the future". *Hepatology.*, 32: 1399-1400, 2000.
- Siminiak, T., Kurpisz, M. "Myocardial replacement therapy". *Circulation.* 2003,108:1167-1171
- Simmons, P.J. and Torok-Storb, B. "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1". *Blood.*, 78: 55-62, 1991.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., Kai, T. "Stem cells find their niche". *Nature.* 2001, 414:98-104.
- Starin, A.J., Crosby, H.A. "Hepatic stem cells". *Gut.*, 46: 743-745, 2000.

Stein, G.S., Lian, J.B. "Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype". *Endocr Rev.*, 14:424-442, 1993.

Tavassoli, M., Minguell, J.J. "Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow". *Proc Soc Exp Biol Med.*, 196: 367-373, 1991.

Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., Humphries, R.K. "Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4 transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size". *Blood.*, 94:2605-2612, 1999.

Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandez, K.J., et al. "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin". *Nature Cell Biology.*, 3:778-784, 2001.

Tropepe, V., Coles, B.L., Chiasson, B.J., et al. "Retinal stem cells in the adult mammalian eye". *Science.*, 287: 2032- 2036, 2000.

Van der Kooy, D., Weiss, S. "Why stem cells". *Science.*, 287: 1439-1441, 2000.

Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S., "Bernstein ID. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling". *Nat Med.*, 6:1278-1281, 2000.

Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L., Weissman, I.L. "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells". *Science.*, 297: 2256-2259, 2002.

Weissman, I.L. "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution". *Cell.*, 100:157-168, 2000.

Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., Weissman, I.L. "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells". *Science.*, 294:1933-1936, 2001.

Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L., McCulloch, E.A. "Cytological evidence for a relationship between normal hemotopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system". *J Exp Med.*, 127:455-464, 1968.

Wulf, G.G., Kathyjo, A.J., Goodell, M.A. "Somatic stem cell plasticity: Current evidences and emerging concepts". *Exp. Hematol.*, 29, 1361-1370, 2001.

Young, R.G., Butler, D.L., Weber, W., Caplan, A.I., Gordon, S.L. and Fink, D.J. "Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair". *J Orthop Res* 16: 406-413, 1998.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con financiamiento de los proyectos Fondecyt # 1010566 y # 1030304.

HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico

Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.
Editorial Universidad de Talca, 2005



SECCIÓN II

GLÓBULOS ROJOS

GLÓBULOS ROJOS Y HEMOGLOBINA

Iván Palomo G., Santiago Orizola G., Jaime Rodríguez C. y Ricardo Hojas B.

1. Introducción

2. Estructura de los glóbulos rojos

- 2.1. Membrana eritrocitaria
 - 2.1.1. Proteínas integrales
 - 2.1.2. Proteínas periféricas
 - 2.1.3. Moléculas de adhesión

3. Metabolismo de los hematíes

- 3.1. Glucólisis anaerobia
- 3.2. Metabolismo óxido-reductor (vía de las pentosas o hexosamonofosfato)
- 3.3. Metabolismo nucleotídico
- 3.4. Sistema de diaforasas

4. Hemoglobina

- 4.1. Estructura de la Hb
 - 4.1.1. Estructura primaria a cuaternaria
 - 4.1.2. Hemo
 - 4.1.3. Tipos de hemoglobinas
 - 4.1.4. Ontogenia de la hemoglobina humana
- 4.2. Función de la hemoglobina
 - 4.2.1. Transporte de oxígeno
 - 4.2.2. Descarga de oxígeno a los tejidos
 - 4.2.3. Mecanismo de carga de oxígeno
 - 4.2.4. Interacción hemo-hemo
 - 4.2.5. Sistema tampón
 - 4.2.6. Transporte de CO₂
 - 4.2.7. Interacción con aniones inorgánicos
 - 4.2.8. Interacción con fosfatos orgánicos

5. Destrucción de los hematíes

RESUMEN

Los glóbulos rojos son células anucleadas que se forman en la médula ósea a partir de «stem cells». Una vez en la circulación tienen como principal función transportar oxígeno a los tejidos, tarea que desarrollan por aproximadamente 120 días, hasta que el sistema fagocítico mononuclear los retira de la circulación.

En este capítulo se revisa la estructura de los eritrocitos (especialmente de su membrana), sus principales vías metabólicas, y la estructura y función de la hemoglobina (Hb).

El conocimiento sobre la estructura de la membrana, enzimas y Hb de los hematíes es necesario, entre otros aspectos, para entender las anemias hemolíticas intracorpúsculares (ver capítulo 8).

1. INTRODUCCIÓN

Los glóbulos rojos tienen como función principal y utilizando su proteína más abundante, la Hb, transportar el oxígeno desde los pulmones a los tejidos. Dicho de otra manera la misión de los hematíes es proteger y transportar la Hb para que ésta pueda realizar su función respiratoria. Para ello, tanto el núcleo como las estructuras citoplasmáticas han sido reemplazadas por una solución concentrada de Hb, en la que también se encuentran enzimas, encargadas de mantener un reducido metabolismo celular.

Este capítulo describe los aspectos más importantes de la estructura de los eritrocitos (proteínas de membrana y Hb), su metabolismo y destrucción. Conocer lo anterior es muy importante para comprender la fisiopatología de algunas anemias, intra y extracorpúsculares.

2. ESTRUCTURA DE LOS GLÓBULOS ROJOS

La misión de los glóbulos rojos (GR) es proteger y transportar la Hb para que ésta pueda realizar su función respiratoria. Para ello, tanto el núcleo como las estructuras citoplasmáticas han sido reemplazados por una solución altamente concentrada de Hb, en la que también se encuentran diversas enzimas, imprescindibles para mantener un reducido metabolismo celular. Al no tener núcleo, esta célula no puede replicarse ni sintetizar proteínas. Algunas funciones de los hematíes son:

- Transportan Hb (la cual lleva el oxígeno

desde los pulmones a los tejidos).

- Transportan el CO₂ desde los tejidos a los pulmones. Esto, en parte, lo consiguen porque contiene gran cantidad de anhidrasa carbónica, la que cataliza la reacción entre el dióxido de carbono y el agua, formando ión bicarbonato (HCO₃⁻).
- Son un excelente amortiguador ácido-base.

Los sistemas metabólicos de los hematíes se hacen progresivamente menos activos con el tiempo, y las células se hacen más frágiles, probablemente porque sus procesos vitales se desgastan.

Los glóbulos rojos por dentro de la membrana celular presentan el citoesqueleto, llamado esqueleto de membrana eritrocitaria; es una red de proteínas que tapiza la membrana plasmática. En el interior de la célula se encuentra la Hb como solución concentrada.

La estructura de los hematíes les permite adquirir forma de disco bicóncavo; esto les confiere más superficie que volumen y les facilita la deformabilidad y transporte de oxígeno.

Los eritrocitos de frente tienen un diámetro de 7 - 8 micras y de perfil 2,5 micras y 1,2 micras de espesor. Esta conformación les permite pasar por los capilares (2-3 micras) y llegar al bazo, el cual actúa como filtro, ya que, a medida que los GR envejecen, pierden la capacidad de deformarse debido a que van adquiriendo rigidez en la membrana, producto de la

disminución en el aporte de ATP y otros eventos en su superficie, lo que impide un paso normal por los capilares del bazo. Este proceso lleva a la destrucción de aquellos GR que quedan retenidos en este órgano por un proceso denominado hemocateresis.

2.1. Membrana eritrocitaria

La membrana es responsable de la característica forma discoide de los GR y contribuye a mantener su deformabilidad y elasticidad; su permeabilidad le permite regular también el volumen. Al igual que otras membranas celulares posee un modelo de mosaico fluido y está constituida por lípidos, proteínas e hidratos de carbono (figura 3-1).

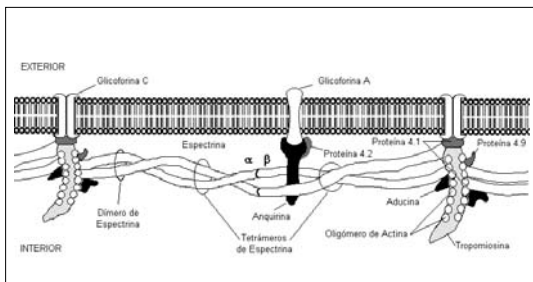


Figura 3-1. Estructura de la membrana de los glóbulos rojos. La membrana del eritrocito se compone principalmente de lípidos y proteínas que la atraviesan y que además se encuentran formando una malla interna que tiene características de citoesqueleto. La distribución y las interacciones verticales y horizontales de estas proteínas permiten la estabilidad y deformabilidad del eritrocito y el movimiento de las mismas en la membrana.

Los **lípidos** se disponen en doble capa, en la que se hallan total o parcialmente sumergidas diversas proteínas, llamadas proteínas integrales, y su superficie interna está recubierta por una estructura fibrilar de proteínas (citoesqueleto). La interacción entre proteínas integrales y proteínas del esqueleto y lípidos condiciona la forma eritrocitaria, caracterizada por un exceso de superficie con relación al volumen, la relación sup/vol es decisiva para garantizar la deformabilidad eritrocitaria.

Los lípidos, que constituyen un 40% del peso seco de la membrana son, principalmente, fosfolípidos y colesterol y en menor proporción, ácidos grasos libres y glucolípidos. Al disponerse en doble capa permiten que los grupos polares queden al exterior y los apolares se unan entre sí. Esta estructura es fluida por el carácter insaturable de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos.

Las **proteínas** constituyen aproximadamente el 50% del peso seco de la membrana y pueden hallarse total o parcialmente sumergidas en la doble capa lipídica. Su estudio se puede realizar a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), que las separa por peso molecular (tabla 3-1). Las proteínas integrales forman estructuras de la membrana y las proteínas periféricas forman el citoesqueleto.

Los carbohidratos representan alrededor del 10% de las macromoléculas de la membrana del GR.

Tabla 3-1. Distribución de las proteínas de membrana eritrocitaria en PAGE

Número de banda electroforética	Proteína	Peso molecular (kDa)	Numero de sitios por célula	Relación con la membrana
1	Espectrina (cadena a)	240	200.000	Periférica
2	Espectrina (cadena b)	220	200.000	Periférica
2.1	Anquirina	215	100.000	Periférica
3	Banda 3	90-105	1.200.000	Integral
4.1	Banda 4.1	80	200.000	Periférica
4.2	Proteína kinasa	72	-	Periférica
4.5	Transportador glucosa	45 – 75	-	Integral
4.9	Dematina	48	100.000	Periférica
5	Actina	43	500.000	Periférica
6	G-3PD	35	-	Periférica
7	Tropomiosina	29	-	Periférica
Región PAS 1*	Glicoforinas A, B, C y D	39	≈1.000.000	Integral
Región PAS 2*	Monómero Glicoforina A	39	-	Integral
Región PAS 3*	Monómero Glicoforina B	-	-	Integral

* Corresponde a la detección de proteínas altamente glicosiladas teñidas con PAS.

2.1.1. Proteínas integrales

Las moléculas integrales forman parte estructural de la doble capa lipídica, hallándose total o parcialmente incluidas en el espesor de la bicapa, de forma que muchas pueden desplazarse a lo largo y a lo ancho de ella, confiriéndole gran fluidez. A continuación se indican estas proteínas con las características más relevantes:

Banda 3 o Canal aniónico. Es la proteína integral más abundante. Posee elevado PM (95 kDa) y está codificada por un gen situado en el cromosoma 17. Su fragmento oligosacárido es responsable de la antigenicidad de los grupos sanguíneos li y ABH. Sus funciones son: (a) contribuir al intercambio de iones Cl^- y HCO_3^- entre el interior y el exterior de los GR, y (b) contribuir a fijar el citoesqueleto a la bicapa lipídica.

Glicoforinas. Las glicoforinas son ricas en ácido siálico. Las de mayor importancia son cuatro (A, B, C y D) y constituyen el 2% de las proteínas de membrana. Los fragmentos glucídicos de estas proteínas afloran a la superficie externa de diversos grupos sanguíneos. La glicoforina C además, desempeña un papel importante en la unión del citoesqueleto a la bicapa lipídica.

Bomba Na, K ATPasa. La bomba Na, K que es dependiente de ATP, regula el intercambio de Na^+ y K^+ .

GLUT 1. Es una proteína estructurada como un homotetrámero, que realiza el transporte de glucosa a través de la membrana eritrocitaria. Este sistema de transporte es del tipo difusión facilitada y presenta una Km de 1-2 mM (Km es la concentración de glucosa con la que se alcanza la mitad del transporte máximo). El transportador GLUT 1 también ha sido identificado en placenta, barrera hematoencefálica, cerebro, riñones, colon, etc. Este transportador no depende de la acción de la insulina.

Otras proteínas transportadoras. Se ha reportado la existencia de varias otras proteínas transportadoras en la membrana de los glóbulos rojos humanos. Entre ellas se puede mencionar al cotransportador de glicina y sodio, que permite la incorporación del aminoácido a las células. El transportador de colina, que incorpora a esta molécula nitrogenada fundamental para la síntesis del fosfolípido de membrana fosfatidilcolina. El transportador de uridina, otra de las proteínas transportadoras reportadas para la membrana de los eritrocitos, permite el

movimiento de la base nitrogenada a favor de su potencial químico de difusión. También se ha observado la presencia de un intercambiador sodio-proton y transportadores de tirosina, fenilalanina, triptofano, valina, leucina, lisina, arginina, adenosina, AMPc, glicerol, piruvato, lactato, ácido úrico, creatina, etc.

2.1.2. Proteínas periféricas

Las proteínas periféricas conforman el citoesqueleto; son muy diversas. Mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida se identifican y cuantifican fácilmente. Estas proteínas periféricas son:

Espectrina (Bandas 1 y 2). Es la proteína más abundante del citoesqueleto. Resulta de la unión de 2 dímeros cada uno formado por una cadena alfa y una cadena beta. La alfa es codificada en el cromosoma 1 y la beta en el cromosoma 14. La espectrina establece interacciones funcionales con otras proteínas del esqueleto, en especial con la actina, la proteína 4,1 y la Ankirina.

Proteína 4,1. Contribuye a la estabilidad de la unión entre la espectrina y la actina y al anclaje del esqueleto a la bicapa lipídica.

Proteína 2,1 o Ankirina. Constituye un importante punto de anclaje del esqueleto a la bicapa lipídica, especialmente a la banda 3.

Actina. Se une a la espectrina.

Proteína 4,9. Necesaria para la configuración molecular de la actina.

Aducina, Tropomiosina y Palidina. Los dímeros de espectrina se unen cabeza a cabeza formando tetrámeros y estableciendo interacciones funcionales con otras proteínas del esqueleto, en especial con la actina, la proteína 4,1 y la ankirina, de forma que 6 unidades de espectrina se unen a un oligómero de actina, formando una red de estructura hexagonal altamente organizada. Cada unión espectrina-actina se estabiliza por la formación de un complejo ternario («junctional complex») con la proteína 4,1 que además fija la red a la membrana por su interacción con la glicoforina C. Este complejo es estabilizado por la tropomiosina, la cual se asienta en el canal de los filamentos de actina, la proteína 4,9 se une a la actina envolviéndola, en tanto la aducina permite la unión de dos heterodímeros de espectrina, la ankirina une la red al lado interno de la doble

capa de lípidos a través de su unión con la banda 3, esta unión es estabilizada con la adición de la banda 4.2.

La relación funcional de las proteínas del citoesqueleto entre sí y con la doble capa lipídica, se ha establecido a partir del modelo que considera dos tipos de interacciones:

a) Interacciones horizontales. Mantienen la estabilidad global del esqueleto:

- Dímeros de espectrina (sp-sp)
- Espectrina (beta) y actina, estabilizada por la proteína 4,1 (sp-actina-4,1)

b) Interacciones verticales: Unen el citoesqueleto a la bicapa lipídica (membrana): Espectrina (beta) y Banda 3 estabilizada por ankirina (sp-ank-3) Proteína 4,1, glicoforina, banda 3 (4,1-glicoforina-3).

2.1.3. Moléculas de adhesión

Los eritrocitos expresan una gran cantidad de moléculas de adhesión (tabla 3-2), entre las proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) y que median la adhesión de los glóbulos rojos, varias de ellas son bien conocidas, CD47 que es un receptor para trombospondina y se puede encontrar también en otras células, CD239 que corresponde al antígeno Lutheran funciona como receptor para laminina tanto en células Drepanocíticas como en diversos epitelios neoplásicos, CD242 que corresponde al antígeno LW y es capaz de unir varias formas de integrinas comúnmente expresadas por leucocitos y otros tejidos, CD147 molécula necesaria para que el glóbulo rojo pueda atravesar el Bazo y regresar a la circulación, CD44 coopera con VLA-4 como receptor para fibronectina y CD99 que media las interacciones GR-linfocitos, aunque este rol fisiológico todavía no es bien conocido.

Tabla 3-2. Moléculas de adhesión expresadas por los eritrocitos circulantes

Moléculas de adhesión y nombre alterno	Ligando/ Función adhesiva
CD36 (solo reticulocitos), GP IV plaquetaria	Trombospondina (plaquetas)
VLA-4 (solo reticulocitos), Integrina $\alpha_4 \beta_1$	Trombospondina, VCAM-1, posiblemente fibronectina
CD44, Indian (In ^a / In ^b)	Hyalurona, posiblemente fibronectina
CD47, Proteína asociada a Integrina (IAP)	Trombospondina
CD58, LFA-3	CD2
CD99, producto del gen MIC2	Formación de rosetas de células T
CD108, JMH, Semaforina K1 (SEMA7A)	Posible rol en la adhesión de linfocitos activados
CD147, Neurotelina, Ok ^a	Colágeno tipo IV, fibronectina, laminina en otros tejidos.
CD242, ICAM-4, LW	Integrinas de leucocitos ($\alpha_4 \beta_1$, $\alpha_4 \beta_3$, $\alpha_v \beta_1$)
CD239, Lutheran, B-CAM/LU	Laminina, posiblemente alguna integrinas

3. METABOLISMO DE LOS HEMATÍES

Los hematíes maduros no tienen núcleo, mitocondrias ni retículo endoplásmico; sin embargo, sí poseen enzimas citoplasmáticas que son capaces de metabolizar la glucosa y formar pequeñas cantidades de adenosín trifosfato (ATP) y la forma reducida de la nicotín-

amida-dinucleótido fosfato, NADPH.

La glucosa es prácticamente el único combustible utilizado por los hematíes. Penetra en ellos rápidamente por difusión facilitada, para convertirse en glucosa-6-fosfato (G₆P). Ésta puede seguir dos vías (figura 3-2).

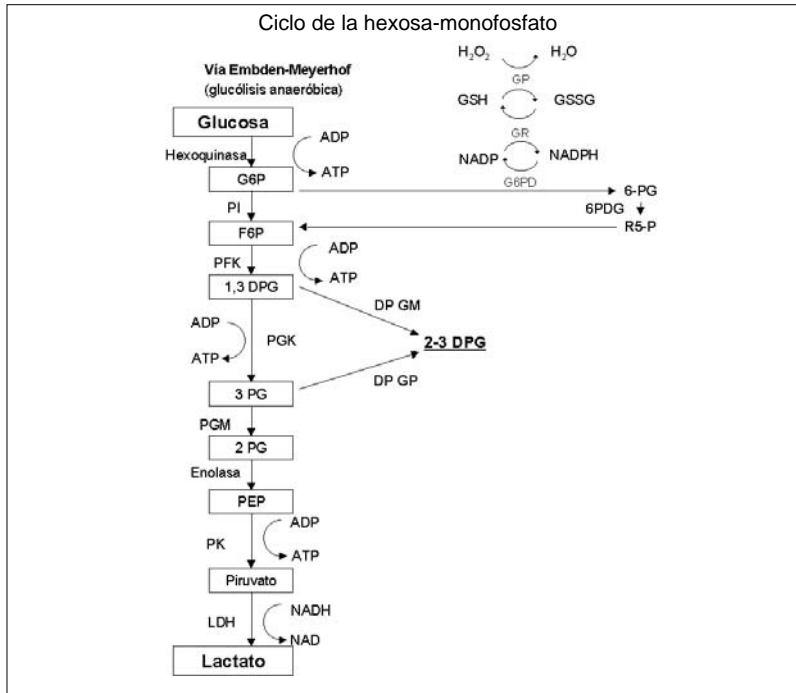


Figura 3-2. Vía metabólica de la glicólisis en el eritrocito. Se encuentra la vía anaeróbica o de Embden-Meyerhof, la vía aeróbica o vía de las pentosas, el “shunt” de Rapaport (indispensable en la formación de 2,3-DPG) y la vía de las diaforasas o metahemoglobinreductasa.

El 80-90% se convierte en lactato mediante la vía glucolítica. A partir de una reacción colateral (“shunt” de Rapaport) se obtiene el mediador de la afinidad de la Hb por el O_2 , el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG).

El 10% de la glucosa es sometida a oxidación por medio de un cortocircuito de la hexosa-monofosfato. Esta vía mantiene el glutatión en forma reducida para proteger a la Hb y la membrana del eritrocito de la oxidación por radicales libres (peróxidos y superóxidos) y por oxidantes exógenos (fármacos y toxinas).

El NADPH sirve a los hematíes de muchas e importantes formas:

- Mantiene la flexibilidad de la membrana celular.
- Mantiene el transporte de iones a través de la membrana. Permite regenerar el ATP que proporciona la energía necesaria para que la membrana del hematíe mantenga útil la bomba de sodio-potasio, evitando así que el sodio y el agua penetren en su interior, lo que provocaría su destrucción. Es decir, contribuye a mantener la forma del hematíe.
- Mantiene el hierro de la Hb en forma ferrosa

(Fe^{+2}), en lugar de férrica (Fe^{+3}) que provoca la formación de metahemoglobina que no transporta oxígeno.

- Evita la oxidación de las proteínas de los hematíes.

La maduración eritroblástica conlleva la desaparición de prácticamente todas las vías presentes en cualquier otra célula. El eritrocito maduro es incapaz de sintetizar lípidos o proteínas y obtener energía a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Su única fuente energética es la glucólisis anaerobia, cuyo rendimiento neto es de 2 ATP por cada molécula de glucosa oxidada. Esta fuente energética es suficiente para que desarrolle funciones que permiten su supervivencia en circulación. El eritrocito presenta 4 vías metabólicas: glucólisis anaerobia (vía de Embden-Meyerhof), metabolismo óxido-reductor (vía de pentosas fosfato y síntesis de glutatión), metabolismo nucleotídico, y sistema diaforásico.

3.1. Glucólisis anaerobia

La glucosa que difunde hacia el interior de los eritrocitos es oxidada a piruvato mediante un proceso de glicólisis sin consumo de O_2

(anaerobio), en un proceso que consta de 2 etapas (figura 3-2): (a) Transformación de glucosa en Gliceraldehído-3-P (GA3P) y Dihidroxiacetona-P (DHAP) con consumo de 2 ATP, y (b) Oxidación de ambos compuestos a piruvato y lactato con formación de 2 ATP por cada molécula de GA3P (total 4 ATP/glucosa); el piruvato se transforma en lactato por la acción de la LDH (lactato deshidrogenasa) eritrocitaria.

La glucólisis anaerobia posee 3 enzimas que al catalizar reacciones irreversibles constituyen etapas limitantes: Hexoquinasa (HK) que transforma glucosa en Glucosa-6-P (G6P), fosfofructoquinasa (PFK) que transforma Fructosa-6-P (F6P) en Fructosa-1,6-diP (F1,6DP), y piruvatoquinasa (PK) que transforma el Fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato.

Debido a que la vía de Embden-Meyerhof es la única fuente de energía del eritrocito, el déficit de una de estas enzimas es suficiente para bloquear su funcionamiento y ser causa de anemia hemolítica produciendo un aumento en los niveles de LDH plasmático.

Una derivación importante de la glucólisis anaerobia es el ciclo de Rapaport-Luebering, que transforma 1,3 difosfoglicerato (1,3 DPG) en 2,3 DPG. El 2,3 DPG mediante fosforilación se transforma en 3-Pglicerato y con ello cierra el ciclo. Ambas reacciones son catalizadas por una misma enzima, con doble función: mutasa y fosfatasa. Aunque la importancia de este ciclo deriva de la función reguladora del 2,3 DPG sobre la función hemoglobínica, es probable que este metabolito constituya un reservorio energético frente a situaciones, como una disminución de pH intraeritrocitario que disminuye la actividad glucolítica.

El 2,3 DPG es un anión altamente cargado que se une a las cadenas de la Hb, favoreciendo la liberación del O₂. El aumento de la concentración de 2,3 DPG en los glóbulos rojos, desplaza la curva de disociación de la oxihemoglobina hacia la derecha. Entre los factores que se sabe que elevan la concentración de 2,3 DPG en los eritrocitos humanos se cuentan la disminución del pH citosólico, las hormonas tiroideas, la hormona del crecimiento y los andrógenos.

Otra reacción importante de la glucólisis anaerobia es catalizada por la enzima gliceraldehído-3-P-DH, ya que mantiene el NADH en estado reducido, imprescindible para mantener al Fe de la Hb en estado reducido, a

través de la reacción catalizada por NADH diaforasa o citocromo B5-reductasa.

3.2. Metabolismo óxido-reductor (vía de las pentosas o hexosamonofosfato)

Una vía alternativa a la glucólisis anaerobia es el ciclo de la hexosa monofosfato (vía de las pentosas), que en condiciones normales deriva entre 5-10% del catabolismo de la glucosa. Esta vía funciona sin el consumo de oxígeno, de forma que su actividad puede aumentar 20-30 veces si se produce un brusco aumento de la oxidación intracelular.

El principal factor limitante es el cociente NADP⁺/NADPH y la enzima Glucosa-6P-DH, que precisa del cofactor NADP⁺, pero que a la vez es intensamente inhibida por NADPH (reducido).

En el desarrollo de su función, el eritrocito suele hallarse sometido a agresiones oxidantes y el NADPH es por sí mismo insuficiente para amortiguarlas. La célula dispone de un compuesto, el Glutatión, que en estado reducido (GSH) realiza esta función. El glutatión es un tripéptido sintetizado por 2 enzimas que precisan consumo de ATP. Bajo forma reducida y mediante una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa, elimina el exceso de peróxido. El nivel de GSH generalmente elevado, se mantiene gracias a NADPH (de la vía de las pentosas) y a la actividad de la glutatión reductasa. El poder reductor del eritrocito reside en su capacidad de regenerar NADPH, necesario a su vez, para mantener el nivel de GSH.

El déficit congénito de glucosa-6-P-DH implica una gran disminución del poder reductor eritrocitario.

Dado que el glutatión no difunde a través de membranas eritrocitarias, su concentración se mantiene gracias a un sistema en el que intervienen 2 enzimas: delta-glutamylcisteinasintetasa y glutatión sintetasa.

3.3. Metabolismo nucleotídico

Junto a las enzimas glucolíticas, el eritrocito dispone de otras enzimas que también contribuyen al mantenimiento del ATP, y que actúan sobre la llamada mezcla de nucleótidos adenílicos (ATP y en mucho menor proporción ADP y AMP). Entre ellos se destacan la adenilatoquinasa (AK), la ATPasa, la

adenosindiaminasa (ADA) y la pirimidina-5-nucleotidasa. AK y ATPasa contribuyen a reciclar el ADP a partir de ATP generado en la glucólisis. La ADA transforma adenosina en inosina y contribuye a su eliminación o reciclaje. AK y ADA utilizan el mismo sustrato (adenosina), lo que explica que tanto el déficit de AK como un exceso de ADA tengan una expresividad clínica similar, derivada del insuficiente reciclaje de AMP y la disminución de la concentración de ATP.

La pirimidina 5 nucleotidasa interviene en la degradación del RNA, y su déficit produce acumulación intraeritrocitaria de nucleótidos, que interfiere, tanto en la degradación normal del RNA como en la actividad de las enzimas clave de la glucólisis, disminuyendo la producción de ATP.

3.4. Sistema de diaforasas

El mantenimiento de la función respiratoria de la Hb, requiere que el Fe hemínico se halle en estado reducido. A ello contribuye la enzima diaforasa o metaHb reductasa (citocromo B5 reductasa). El GR normal posee 2 sistemas diaforásicos, el principal y el secundario. En el principal interviene la citocromo B5 reductasa, que utiliza el NADH y el secundario permanece inactivo.

La citocromo-B5-reductasa está presente en gran número de células del organismo y cataliza la transferencia de electrones desde el NADH al citocromo B5, que los cede directamente al Fe hemínico, manteniendo su estado reducido. La diaforasa que usa NADPH como sustrato, carece de aceptor fisiológico de electrones, por lo que permanece inactiva en condiciones normales. Ciertos colorantes como el azul de metileno son aceptores no fisiológicos de electrones, de tal forma que en caso de déficit del sistema diaforásico principal, pueden emplearse como tratamiento para disminuir el exceso de metaHb y eliminar la cianosis.

4. HEMOGLOBINA

4.1. Estructura de la Hb

La molécula de Hb es el resultado final de un largo proceso evolutivo, con perfecta adaptación a la función que desarrollan las células animales, esto es: transportar O_2 desde los pulmones a los tejidos del cuerpo y facilitar el regreso de CO_2 desde los tejidos a los pulmones.

Las características funcionales de la Hb como un transportador de gases fueron determinadas

más de medio siglo antes de que se formulara su estructura proteica, la cual ha tenido que esperar el desarrollo de técnicas de laboratorio más complejas como son la cristalografía por rayos X y el advenimiento de la biología molecular moderna. El conocimiento de su estructura y función es fundamental para entender y comprender el comportamiento de las hemoglobinas anormales y valorar la importancia que su déficit o ausencia origina.

La Hb fundamentalmente, aunque no en forma exclusiva, es una proteína transportadora de O_2 . Se localiza en el interior de los glóbulos rojos. En la mayor parte de los invertebrados, el pigmento que transporta O_2 circula libremente en el plasma más que dentro de células, lo cual es bastante ineficiente. La Hb como una proteína libre en el plasma ejerce una presión osmótica de alrededor de cinco veces más que la producida por las proteínas plasmáticas solas. Al estar este pigmento en corpúsculos (eritrocitos), la viscosidad de la sangre puede ser mantenida a un bajo nivel no provocando deshidratación de los tejidos. En cada hematíe hay alrededor de 280 millones de moléculas de Hb, cada una con un peso molecular de 64.458 daltons, tiene forma elipsoide y unas dimensiones de $64 \times 55 \times 60 \text{ \AA}$, (2 subunidades α de 15.750 daltons y 2 subunidades β de 16.500 daltons).

La Hb es una proteína conjugada cuya parte no aminoacídica o grupo protésico se conoce con el nombre de hemo, el cual está formado por la unión de una protoporfirina IX y un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{+2}). La porción proteica se denomina globina, es una proteína globular formada por un tetrámero integrado por cuatro subunidades iguales dos a dos, siendo cada subunidad una cadena polipeptídica. Aunque lo más probable es que originalmente haya sido una proteína monomérica similar a la mioglobina.

Las cadenas de Hb humana se han denominado de acuerdo a las letras del alfabeto griego: alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) y zeta (ζ). De las combinaciones dos a dos de las diferentes cadenas de globina se van a formar las diferentes hemoglobinas en los períodos embrionario, fetal, neonatal y adulto.

En condiciones normales se forman seis variantes de Hb: Tres son hemoglobinas embrionarias transitorias, con gran afinidad por el O_2 : Gower 1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$), y Portland ($\zeta_2 \gamma_2$).

La Hb fetal (F_0 : $\alpha_2 \gamma_2$) y (F_1 : $\alpha_2 A\gamma_2$) presentes

al nacimiento en una proporción de 7:1 respectivamente, es la Hb más importante del feto y neonato (65%-95%), produciéndose solamente como trazas en la vida adulta en condiciones normales (<1%). En ciertas situaciones que pueden ser adquiridas o hereditarias se encuentra aumento de la Hb fetal y fundamentalmente en base a F_1 ($\alpha_2 A\gamma_2^1$).

Las hemoglobinas encontradas después del nacimiento son: A_0 : $\alpha_2 \beta_2$ y A_2 : $\alpha_2 \delta_2$.

La Hb A_0 representa aproximadamente el 97% de la Hb del adulto. La Hb A_2 es una pequeña fracción que existe en los individuos normales en una cantidad de aproximadamente 2,5%.

Existen tres condiciones imprescindibles que deben ser satisfechas para que la globina funcione en forma adecuada:

- Libre acceso del agua a la superficie de la globina para mantenerla en solución, para ello el exterior molecular debe ser rico en cadenas laterales hidrofílicas polares.
- El interior de la molécula debe seguir siendo hidrofóbico, resultado de su alto contenido en aminoácidos repelentes al agua.
- La molécula de globina debe mantenerse lo suficientemente rígida, lo que se logra con una proporción extraordinariamente alta de aminoácidos en disposición helicoidal.

4.1.1. Estructura primaria a cuaternaria

a) Estructura primaria

Con este término se designa al esqueleto de la cadena polipeptídica de globina y establece específicamente la secuencia de sus aminoácidos.

Las proteínas están compuestas por unidades

estructurales denominadas aminoácidos unidos por un fuerte enlace covalente denominado enlace peptídico, el cual se establece entre los grupos carboxilos y amino de los aminoácidos. De los 20 aminoácidos que forman las proteínas, la Hb incorpora a la estructura de su molécula 17 de ellos.

Cada aminoácido posee 2 grupos, un grupo amino cargado positivamente y un grupo carboxilo que lo está negativamente, neutralizándose estas cargas al establecerse el enlace peptídico, permaneciendo sólo cargados sus residuos N-terminal y C-terminal. Quedan cargadas también las cadenas laterales (grupos R), pudiéndose dividir los aminoácidos según la naturaleza de sus grupos laterales en hidrofílicos o polares que se disponen en la superficie de la molécula o formando la cavidad central de la misma, e hidrofóbicos situados en el interior molecular y tapizando el bolsillo del hemo.

Los residuos aminoacídicos más numerosos son los hidrófobos (alanina, valina, leucina), siendo también muy abundante la histidina, cuyo grupo imidazol es responsable en forma importante de las propiedades funcionales de la molécula: el poder tampón y el efecto Bohr.

Muchas posiciones en las diferentes cadenas de globina están ocupadas por el mismo aminoácido, este fenómeno se conoce como "homología secuencial", siendo muy importante para el funcionamiento de la molécula.

La secuencia aminoacídica de las cadenas globínicas, se conocen en muchas especies. Existen nueve posiciones en la secuencia que contienen el mismo aminoácido, en prácticamente todas las especies estudiadas hasta ahora (tabla 3-3).

Tabla 3-3. Residuos aminoacídicos permanentes en la Hb

Posición	Aminoácido	Función
F8	Histidina	Histidina proximal ligada al hemo
E7	Histidina	Histidina distal próxima al hemo
CD1	Fenilalanina	Contacto con el hemo
F4	Leucina	Contacto con el hemo
B6	Glicina	Permite máxima aproximación de hélices B y E
C2	Prolina	Término de la hélice
HC2	Tirosina	Enlaces cruzados de las hélices H y F
C4	Treonina	Desconocida
H10	Lisina	Desconocida

Cadena α

La cadena de α -globina humana consiste de 141 aminoácidos en secuencia lineal. El grupo hemo está unido covalentemente por un enlace entre el hierro del hemo y el grupo imidazol de un residuo de histidina en la posición 87 (contando desde la región N-terminal del polipéptido). Esta es la denominada histidina proximal.

Cadena β

La cadena β es ligeramente más larga que la cadena α (146 residuos). El hemo se une a la histidina 92 de la cadena β globina. A diferencia de muchas otras proteínas no hay puentes disulfuro sea dentro o entre las subunidades de Hb. El residuo de cisteína en posición 93 de la cadena β es altamente reactivo y fácilmente se oxida para formar disulfuros mixtos y otros tioésteres. Este fenómeno puede estar involucrado en el catabolismo de la Hb.

Cadenas δ , γ , ϵ y ζ

Existe una considerable homología estructural entre las cadenas δ , γ , ϵ y las cadenas β . En realidad estas cadenas son sintetizadas a partir de un grupo de genes localizados en el cromosoma 11. De igual manera la cadena ζ es homóloga con la cadena α , siendo ambos productos de un grupo de genes localizados en el cromosoma 16.

b) Estructura secundaria

La estructura secundaria está determinada por la relación espacial entre residuos que están cercanos uno de otro en la secuencia lineal.

Las subunidades de Hb son muy buenos ejemplos de un patrón de hélice α y dextrogiro, consistiendo de 3,6 aminoácidos por vuelta. Esta hélice se establece por enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo de cada residuo y el grupo amino de cuatro residuos antes (enlaces intracatenarios).

En su estado nativo, aproximadamente el 75% de la molécula de Hb es una hélice α . Este relativamente alto contenido helicoidal en comparación con otras proteínas globulares simplifica la solución de su estructura tridimensional. En ciertas localizaciones específicas de las subunidades de Hb, la hélice es interrumpida por segmentos que pierden la configuración helicoidal, adoptando así una disposición lineal por donde la cadena suele angularse.

Los segmentos helicoidales se denominan con letras que van desde la A a la H, comenzando por el extremo N-terminal de la molécula, los no helicoidales reciben su denominación a partir de las hélices entre los que están situados, es decir: NA, AB, CD, EF y así hasta GH. Los dos pequeños segmentos lineales situados en los extremos se denominan NA y HC.

La subunidad β ha demostrado tener 8 segmentos helicoidales, desde la A hasta la H. Los segmentos helicoidales de la cadena α son comparables a los de la cadena β , con excepción de los residuos que constituyen la hélice D de la cadena β que están ausentes en la cadena α .

Dado que el número de aminoácidos en las distintas cadenas es diferente, 141 en la α y 146 en la β , y con el fin de lograr una máxima homología entre subunidades, cada aminoácido se numera de acuerdo con su posición en la cadena lineal y con el lugar que ocupa en cada segmento, de este modo la histidina F8 en la α 87 y β 92.

La homología entre subunidades de Hb de diferentes especies se mantiene, de tal forma que residuos que son importantes para la función de la molécula se conservan a través de la evolución de las especies. Así por ejemplo todas las hemoglobinas cuya estructura es conocida tienen un residuo de histidina en la posición F8, excepto dos metahemoglobinas: la M-Iwate y la M-Hyde Park.

c) Estructura terciaria

La estructura terciaria se refiere a como está plegada tridimensionalmente cada cadena polipeptídica, y está determinada por la situación en el espacio de los residuos aminoácidos que forman parte de la estructura lineal, lo que facilita la comprensión de las propiedades funcionales de la proteína.

Hoy en día existen evidencias claras de que la secuencia primaria de los aminoácidos es la que determina fundamentalmente los plegamientos de la proteína en el espacio tridimensional, y que solamente esta secuencia primaria es la que está determinada genéticamente, definiéndose posteriormente las estructuras secundaria y terciaria por uniones entre los radicales de los aminoácidos que forman la misma (figura 3-3).

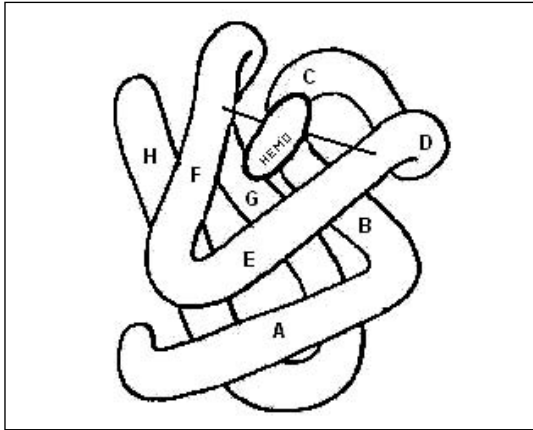


Figura 3-3. Estructura terciaria de la Hemoglobina. La figura muestra una cadena de globina con su respectivo hemo.

Los plegamientos hacen que dentro de la forma esferoide que adopta la molécula se cree una cavidad donde se alojará el hemo, denominada “bolsillo”, limitada por las hélices B, G, H en el fondo, por la E y F en sus paredes y con una apertura próxima a la superficie tapada en parte por la hélice C y D.

Esta cavidad está esencialmente tapizada por residuos cuyas cadenas laterales, fuertemente hidrófobas, evitan la presencia de agua y por tanto la oxidación del átomo de hierro, permitiendo el transporte reversible del O_2 .

Existen además numerosos puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals que mantienen la cohesión externa de la estructura terciaria.

d) Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria está referida a la forma como se articulan las cuatro subunidades de globina, la cual se realiza por uniones débiles como son los enlaces iónicos y fuerzas no covalentes tipo Van der Waals y no por fuertes enlaces covalentes (figura 3-4).

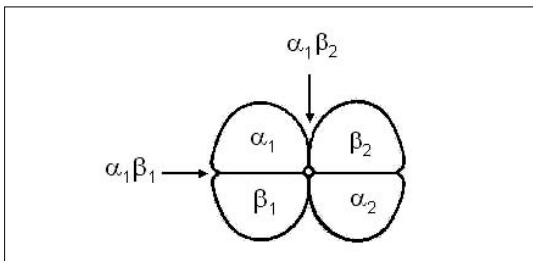


Figura 3-4. Diagrama del tetrámero de Hb ilustrando los diferentes puntos de contacto $\alpha\beta$.

La combinación de las cadenas α y β ó α y γ para formar el tetrámero de forma elipsoide $\alpha_2\beta_2$ y $\alpha_2\gamma_2$ es esencial para que la Hb realice las funciones que le son propias: curva sigmoidea de disociación de la oxihemoglobina, interacción hemo-hemo y efecto Bohr.

Las diferencias físicas y químicas que se producen entre la forma oxi y desoxi se manifiestan por cambios en la estructura cuaternaria de la molécula.

En un tetrámero de Hb del adulto (Hb A_0) se aprecia que cada cadena α contacta con las dos cadenas β a lo largo de dos diferentes superficies (figura 3-4) de aquí que si las subunidades son designadas $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1$ y β_2 , pueden definirse dos interfases entre distintas subunidades: $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_1\beta_2$ que son estructuralmente idénticas a las $\alpha_2\beta_2$ y $\alpha_2\beta_1$, respectivamente.

La interfase $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$ permanecen relativamente fijas durante la oxigenación. La unión entre estos dímeros es muy estrecha debido a los 40 contactos entre residuos que en esta interfase se producen, incluyendo 9 puentes de hidrógeno, por lo que no hay diferencias entre la forma oxi y desoxihemoglobina, permitiéndose movimientos de tan sólo 1 Å.

El contacto en la interfase $\alpha_1\beta_2$ y $\alpha_2\beta_1$, al contrario del previamente señalado, permite un desplazamiento y rotación considerable durante la oxigenación y desoxigenación del tetrámero de hasta 7 Å. Debido a que el contacto del tipo $\alpha_1\beta_2$ y $\alpha_2\beta_1$ está cerca del hemo, cualquier movimiento de la histidina proximal en la oxigenación y desoxigenación podría esperarse que tenga un efecto en esta interfase y viceversa. En realidad la disposición de los dos dímeros a lo largo de este contacto $\alpha_1\beta_2$ es una característica fundamental de la interacción hemo-hemo. Solamente 19 residuos están comprometidos en el contacto $\alpha_1\beta_2$, 10 en la cadena α y 9 en la cadena β .

Las fuerzas involucradas son principalmente no polares del tipo Van der Waals. Debido a la importancia del movimiento a través de este contacto, muchos de los aminoácidos comprometidos se mantendrán invariables en la evolución y al comparar las hemoglobinas de las distintas especies vertebradas.

El contacto entre cadenas similares ($\alpha_1\alpha_2$ y $\beta_1\beta_2$) son mínimos. Una cavidad interna tapizada por aminoácidos polares y llena con agua separa en forma parcial las cadenas similares una de otra.

Contacto $\alpha_1\alpha_2$

La unión entre las dos cadenas, aunque escasa, es de importancia fisiológica. Ocurre sólo en la molécula de desoxihemoglobina y juega un importante papel en la interacción hemo-hemo, efecto Bohr y transporte de CO_2 .

Contacto $\beta_1\beta_2$

Las cadenas β están más ampliamente separadas que las cadenas α . El hueco dejado en la conformación desoxigenada es capaz de acomodar una molécula de 2-3 difosfoglicerato (2-3 DPG). En la conformación oxigenada, cuando las cadenas β se mueven en conjunto, este hueco se hace más estrecho expulsando a la molécula de 2-3 DPG.

4.1.2. Hemo

a) Estructura del hemo

El hemo es el grupo protésico de la Hb. Está constituido por una ferroprotoporfirina IX, esto es un esqueleto formado por la protoporfirina IX con el hierro en estado ferroso (Fe^{+2}). Es un compuesto tetrapirrólico con un átomo de hierro hexacovalente en el centro unido a los nitrógenos de los pirroles (figura 3-5).

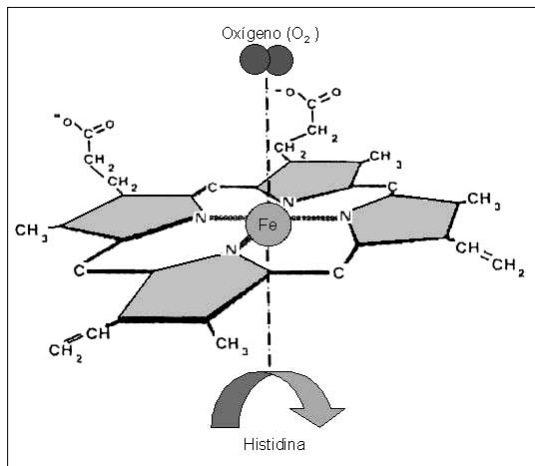


Figura 3-5. Estructura del hemo. El hemo está formado por una estructura de protoporfirina IX más el hierro.

El hemo es fundamental para la función de todas las células aeróbicas. Además de ser el grupo protésico de la Hb lo es de los citocromos mitocondriales que realizan el transporte de electrones, de los citocromos microsomales comprometidos en una variedad de reacciones que metabolizan drogas, de la catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno, de la peroxidasa que activa al peróxido, y finalmente de la triptofano pirrolasa que cataliza la

oxidación del triptofano.

b) Biosíntesis del Hemo

La mayor parte de los organismos pueden sintetizar el hemo y las apohemoproteínas.

Aproximadamente el 85% del hemo se sintetiza en la médula eritropoyética, y el resto fundamentalmente en el hígado. En el hígado la mayoría del hemo sintetizado se incorpora al citocromo P_{450} microsomal, que realiza importante biotransformación de una gran variedad de químicos, carcinógenos, esteroides, vitaminas, ácidos grasos y prostaglandinas.

La vía de biosíntesis del hemo involucra 8 enzimas, 4 de ellas se encuentran en el citoplasma y las otras 4 en las mitocondrias (figura 3-6). El proceso de síntesis se inicia en la mitocondria con la condensación de glicina con succinil CoA para formar el ácido δ -5 aminolevulínico (ALA), reacción catalizada por la enzima aminolevulínico sintetasa (ALAS). Los siguientes 4 pasos de la vía tienen lugar en el citoplasma, la ALA deshidratasa (ALAD) convierte a 2 moléculas de ALA en porfobilinógeno (PBG). Los dos pasos enzimáticos siguientes convierten a cuatro moléculas de PBG en una estructura cíclica llamada tetrapirroli uroporfirinógeno III el cual es descarboxilado formando el coproporfirinógeno III. El tercer paso final incluye la inserción de una molécula de Fe^{+2} en la protoporfirina IX por la ferroquelatasa etapa que ocurre en la mitocondria.

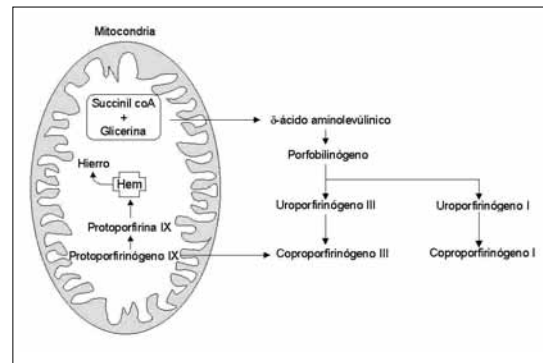


Figura 3-6. Biosíntesis del Hemo. Parte del proceso ocurre en el interior de la mitocondria y otra en el citosol. (ver texto).

A continuación se mencionan las enzimas que participan en la biosíntesis del hemo:

Ácido aminolevulínico sintetasa (ALAS). Es un homodímero que reside en la matriz de la membrana mitocondrial interna con absoluta

especificidad por la glicina, aun así esta enzima se une a este aminoácido con baja afinidad. El segundo sustrato, succinil CoA, es un intermediario del ciclo de Krebs y es el que provee la energía para la compleja vía de la biosíntesis de porfirina. La enzima requiere de piridoxal fosfato (vitamina B₆) como cofactor. Las evidencias indican que el hemo regula a la ALAS por disminución de la vida media del mRNA y por bloqueo en la translocación del precursor proteico de ALAS dentro de la mitocondria. El hemo regularía la síntesis eritrocitaria del hemo en un «feedback» negativo, sin embargo existe controversia acerca del mecanismo.

Ácido aminolevulinico deshidratasa (ALAD). Está compuesta por 8 subunidades de 36 kDa y contiene 4 sitios catalíticos. La enzima requiere zinc (un átomo por subunidad) y grupos sulfhidrilos intactos para la actividad. Es la enzima más abundante en la síntesis del hemo y por lo tanto incapaz de jugar un rol regulador.

Porfobilinógeno desaminasa (PBG-D). Cataliza el paso de desaminación y condensación de las 4 moléculas de PBG formando el intermediario tetrapirrólico pre-uroporfirinógeno. La enzima tiene 35-40 kDa. En humanos el gen de PBG-D tiene dos isoformas, uno exclusivo de células eritroides.

Uroporfirinógeno isomerasa (URO-S) y uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D). La URO-S cataliza la única reacción en que el anillo del Pseudoporfirinógeno es invertido y la cadena es ciclada proporcionando el isómero tipo III. La URO-D cataliza la descarboxilación secuencial de 4 moléculas de acetato de las cadenas laterales del uroporfirinógeno III formando el coproporfirinógeno III, esta enzima no requiere cofactor pero sí necesita grupos tioles para la actividad enzimática.

Coproporfirinógeno oxidasa (CPO). Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa de dos grupos propiónicos en la posición 2 y 4 del coproporfirinógeno III y dos grupos vinílicos. La CPO es localizada en el espacio intermembranoso mitocondrial probablemente en asociación con la cara externa de la membrana interna pero existe poca información sobre el mecanismo por el cual el coproporfirinógeno III atraviesa la membrana externa.

Protoporfirinógeno oxidasa (PPO). Es una proteína integral de la membrana mitocondrial interna con el sitio activo en el espacio

intermembranoso. La PPO cataliza el último paso en la vía del hemo removiendo 6 átomos de hidrógeno del anillo porfirinógeno.

Ferroquelatasa. Esta enzima también llamada hemsintetasa tiene 2 sustratos protoporfirina IX y hierro férrico y dos productos el hemo y 2H⁺. La proteína madura está sujeta a la membrana mitocondrial interna con el sitio activo localizado en la matriz. La enzima activa es probablemente un monómero aunque se ha sugerido que funciona como un homodímero 80 kDa.

c) Interacciones del hemo con la globina

Estudios de Rayos X de alta resolución han suministrado información precisa acerca de los detalles de la interacción entre el hemo y la globina. El hemo se encuentra insertado en una hendidura entre la hélices E y F. El hierro está ligado covalentemente al nitrógeno imidazólico de la histidina proximal F8 y con la E7, también llamada histidina distal. Estos residuos de histidina son una característica invariable de todas las globinas de los vertebrados normales. Hemoglobinopatías estructurales encontradas hasta la fecha por mutación de la histidina proximal incluyen: Hb Mozhaisk ($\beta 92$, His→Arg), Hb M-Hyde Park ($\beta 92$ His→Tyr), Hb New Castle ($\beta 92$ His→Pro), Hb Saint Etienne ($\beta 92$ His→Gln), Hb J-Altgeld Gardens ($\beta 92$ His→Asp). Las hemoglobinopatías estructurales encontradas por mutación de la histidina distal incluyen: Hb Zurich ($\beta 63$ His→Arg), Hb M-Saskatoon ($\beta 63$ His→Tyr), Hb Bicêtre ($\beta 63$ His→Pro).

El residuo de valina β E11 parece guardar el acceso del O₂ al bolsillo del hemo. Este también corresponde a un residuo que es considerado invariable y que aparece sustituido en algunas hemoglobinopatías inestables y metahemoglobinas, como son: Hb M-Milwaukee-I ($\beta 67$ Val→Glu), Hb Bristol ($\beta 67$ Val→Asp), Hb Alesha ($\beta 67$ Val→Met), Hb Sydney ($\beta 67$ Val→Ala), Hb Manakau ($\beta 67$ Val→Gly).

Además de las uniones descritas el hemo está ligado a la globina por dos puentes de hidrógeno que unen los grupos propiónicos de las cadenas laterales de la porfirina a los segmentos FG y GD y a la hélice H, pero la unión más fuerte está asegurada por un gran número (aproximadamente 80) de enlaces hidrofóbicos. Con la unión a la globina, el hemo logra hacerse soluble asegurándose además un ambiente hidrofóbico, el cual es necesario para captar de forma reversible el O₂.

Como se desprende del análisis estructural señalado, la incorporación del O_2 a la molécula de Hb desencadena una profunda alteración en la conformación de la molécula, lo que implica una cooperatividad entre las subunidades. Es decir la transición de la estructura cuaternaria desoxigenada a la oxigenada afecta al medio ambiente de los hemo no ligados, de tal forma que la afinidad por el O_2 se incrementa.

4.1.3. Tipos de hemoglobinas

a) Hemoglobinas normales del adulto y neonato

Hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$)

Tanto las hemoglobinas A como la A_2 son las hemoglobinas más intensamente estudiadas. La Hb A constituye aproximadamente el 97% de toda la Hb del adulto, mientras que en el recién nacido su cuantía es del 20-40%. Su estructura ha sido descrita en los puntos 4-1 y 4-2.

Hemoglobina A_2 : ($\alpha_2\delta_2$)

En el neonato representa menos del 0,5% del total de Hb, mientras que en el adulto representa el 0,3% a 2,6%, dichos valores dependen en parte del método empleado para su cuantificación.

Su estructura es muy homogénea debido a que las cadenas α y δ de la Hb tan sólo difieren en 10 de los 146 aminoácidos que componen la secuencia primaria de la cadena β .

En vista de su baja cantidad en los glóbulos rojos, la Hb A_2 es poco probable que tenga algún papel fisiológico en el transporte de O_2 . Sus propiedades de unión al O_2 simulan aquellas de la Hb A. Las dos hemoglobinas tienen similar afinidad por el O_2 , cooperatividad entre subunidades, efecto Bohr y respuesta al 2-3 DPG. La Hb A_2 es más resistente a la desnaturalización térmica que la Hb A. Esto puede explicarse por un contacto adicional en la interfase $\alpha_1\delta_1$, lo cual confiere aumento de la estabilidad al dímero $\alpha\delta$. La aparente falta de un papel fisiológico para la Hb A_2 es compatible con mayores diferencias en la estructura primaria entre las cadenas δ de primates comparado con las cadenas β . Así ciertas mutaciones que en forma significativa alteran la función o estabilidad de la Hb podría ser tolerado en la Hb A_2 pero no en el componente responsable del transporte de la mayor parte del O_2 .

Puede encontrarse aumentada en forma congénita en las β -talasemias, en pacientes con S/ β -talasemia, así como S/S y A/S y en forma adquirida en la anemia megaloblástica, hipertiroidismo y malaria. Por otra parte se encuentra disminuida en estados de carencia de hierro, anemias sideroblásticas, α -talasemias, $\delta\beta$ -talasemias, δ -talasemias y persistencia hereditaria de Hb fetal (PHHF).

Lo único que explica estas alteraciones es que las cadenas α se combinan más fácilmente con las cadenas β que con las δ , por lo que tendrán más posibilidad de formarse unión α/δ en las β -talasemias y homocigotos S/S y menos en las α -talasemias.

b) Hemoglobinas fetales

El descubrimiento por Körber, en 1866, de que los hemolizados de glóbulos rojos de recién nacidos eran resistentes a la desnaturalización por álcali, sugería que estas células contenían una Hb estructuralmente distinta. Esta conclusión fue reforzada por la demostración que la Hb de un neonato tiene aumento de la absorbancia en el espectro ultravioleta, un hallazgo que hoy en día se sabe que se debe a un residuo adicional de triptofano en la cadena γ . El desarrollo de técnicas cromatográficas y electroforéticas permitió el aislamiento y caracterización de la Hb F humana. Análisis más precisos de la Hb fetal purificada sugirieron que era un tetrámero con dos subunidades idénticas en común con la Hb A (cadenas α). Sin embargo las otras dos subunidades tienen una estructura común diferente de las subunidades de la Hb A.

La estructura primaria de la cadena γ humana fue determinada por Walter Schroeder y colaboradores. La secuencia aminoacídica de la cadena γ de la Hb humana es muy similar a la de la cadena β . Las secuencias de las dos proteínas difieren en 39 de 146 residuos. De éstos, 22 residuos están en la superficie externa de la molécula, y es por lo tanto muy improbable que tengan otro efecto significativo sobre las propiedades de la Hb F fuera de la diferente carga eléctrica. Las sustituciones internas son conservadoras involucrando a aminoácidos de polaridad similar. Cuatro sustituciones ocurren en la interfase $\alpha_1\gamma_1$, las que probablemente explican el aumento de la estabilidad de la Hb F y la disminución de la disociación en monómeros.

En contraste ninguna sustitución ocurre en la interfase $\alpha_1\gamma_2$ que es tan importante para el

efecto de cooperatividad entre subunidades.

La Hb F tiene dos tipos de heterogeneidad estructural: genética y post-traduccion. La heterogeneidad química de la Hb F humana fue descubierta en 1968 cuando se observó que la Hb F contenía una mezcla de dos tipos de cadenas γ que diferían solamente en la presencia de un residuo de glicina (cadena $G\gamma$) o un residuo de alanina ($A\gamma^1$) en la posición 136. Las cadenas $G\gamma$ (75%) y $A\gamma^1$ (25%) son los productos de genes no alélicos, los cuales están relacionados a los genes δ y β . La disposición del "cluster" del gen de las cadenas no α es: $5' - \epsilon - G\gamma - A - \delta - \beta - 3'$, en el cual representa el gen que produce la cadena embrionaria ϵ . Así los niños recién nacidos producen una mezcla de dos tipos de Hb F. El componente mayor también denominado F_0 son tetrámeros del tipo $\alpha_2G\gamma_2$, que comprende la mayoría de la Hb total. Una porción de Hb F menos abundante (F_1) y con un punto isoeléctrico menor (carga más negativa) difiere de la Hb F principal en que el tetrámero está compuesto por $\alpha_2A\gamma^1_2$. Un segundo y más importante tipo de heterogeneidad estructural de la Hb fetal se origina de la presencia de diferentes genes que codifican para la cadena γ .

La proporción de $G\gamma/A\gamma$ (de 3/1) es constante a través del desarrollo fetal. En contraste a esto, la pequeña cantidad de Hb F en los glóbulos rojos del individuo adulto contienen alrededor de 40% de $G\gamma$ y 60% de $A\gamma^1$. La transición del cociente fetal de $G\gamma/A\gamma$ al del adulto ocurre en los primeros diez meses de vida. Mas recientemente se ha documentado otra importante heterogeneidad de cadena γ ; en la Hb F de alrededor de 30% de los recién nacidos blancos y 20% de los negros, una minoría de cadenas $A\gamma^1$ (aproximadamente 18%) tienen treonina en vez de isoleucina en la posición 75. En un número pequeño de homocigotos, esta subunidad γ compone alrededor del 30% del total de la Hb fetal del recién nacido. Esta sustitución reside exclusivamente en la cadena $A\gamma$, de tal forma que esta subunidad ha sido designada como $A\gamma^1$, y es en términos estrictos una variante estructural de $A\gamma$.

Desde el punto de vista funcional la Hb F tiene una mayor afinidad por el O_2 que la Hb A. Esto es fundamentalmente consecuencia de la incapacidad de la Hb F para unirse al 2-3 DPG con la misma intensidad que la Hb A, lo que le confiere una ventaja funcional en la captación de O_2 a presiones bajas (pO_2 de 45 mm Hg) como sucede en el intercambio placentario.

Los niveles de Hb F en el adulto se sitúan por debajo del 2%. Sin embargo el desarrollo de métodos más sensibles y específicos como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), han demostrado que dichos niveles son ligeramente superiores en adultos aparentemente normales. Estos niveles se ven incrementados en algunos trastornos hereditarios tales como: β -Talasemias, PHHF y en las hemoglobinopatías S, E y C homocigotas y en trastornos adquiridos como en la anemia megaloblástica, aplasia medular, algunas leucemias y tumores y durante el embarazo fisiológico.

Los niveles de Hb F pueden también verse afectados por diferencias en la atracción para el ensamblaje de unas cadenas con otras, sugiriéndose que las subunidades α se combinan con menor facilidad con las γ que con las β , observándose Hb F más baja en recién nacidos con α -talasemia que en aquellos recién nacidos normales o con deficiencia de hierro.

Hemoglobina de Bart (γ^4)

Se encuentra en cantidades menores del 2% en los neonatos normales. Es un tetrámero (γ^4) funcionalmente anómalo, mostrando una afinidad por el O_2 aumentado, ausencia de interacción hemo-hemo y efecto Bohr. Se encuentra ligeramente aumentado en los recién nacidos con α -talasemia y excepcionalmente en el adulto.

c) Hemoglobinas embrionarias

En 1961, Huehns y colaboradores descubrieron dos hemoglobinas en la sangre de embriones humanos y diferentes a la Hb A y a la Hb F. Estos componentes migraban más lentamente que la Hb A_2 al ser estudiados con electroforesis a pH alcalino (8.6). Se las designó como Hb Gower 1 y Gower 2.

Posteriormente Capp y colaboradores describen una tercera Hb embrionaria, la cual tiene un movimiento electroforético similar a la Hb A a pH de 8.6, pero se separa de ésta a pH ácido y que denominaron Hemoglobina Portland I. Mientras los componentes menores de ésta, Portland II y III fueron descubiertas más tardíamente. La estructura de las hemoglobinas embrionarias es la siguiente:

Gower 1. Es un tetrámero compuesto completamente de subunidades embrionarias, $\zeta_2\epsilon_2$. Corresponde al componente mayor de las hemoglobinas embrionarias.

Gower 2. Es un tetrámero compuesto de dos cadenas α y dos cadenas ϵ ($\alpha_2\epsilon_2$). Las cadenas ϵ son codificadas por un gen localizado en el complejo génico de β -globina en el cromosoma 11. El gen ϵ está localizado en el lado 5' del gen $G\gamma^{20}$. Corresponde al componente menor de las hemoglobinas embrionarias.

Hemoglobina Portland I. Es un tetrámero compuesto de dos cadenas γ y dos cadenas ζ . La cadena ζ muestra una fuerte homología estructural con la cadena α . El gen que la codifica se encuentra situado en el lado 5' de los genes de la cadena α en el cromosoma 16. Respecto a la Hb A, la Hb Portland I tiene una mayor afinidad por el O_2 que la Hb A, menor cooperatividad entre subunidades y un efecto Bohr de aproximadamente la mitad.

Estas tres hemoglobinas embrionarias recién señaladas: $\alpha_2\epsilon_2$, $\zeta_2\epsilon_2$ y $\zeta_2\gamma_2$ funcionan también como transportadores fisiológicos de O_2 . Los glóbulos rojos de los embriones en los cuales estas tres hemoglobinas predominan tienen una afinidad por el O_2 similar a la de los eritrocitos de la sangre de cordón, y una curva de disociación de O_2 sigmoidea indicativa de que también existe el fenómeno de cooperatividad entre las subunidades. El efecto Bohr en los glóbulos rojos embrionarios es similar al de los fetales.

Las hemoglobinas embrionarias pueden ser fácilmente detectadas por isoelectroenfoque y por técnicas cromatográficas, aunque la separación de la Hb Portland I y Hb A es difícil.

4.1.4. Ontogenia de la hemoglobina humana

En la figura 3-7 se esquematiza el control genético de la síntesis de las hemoglobinas humanas.

Las hemoglobinas que predominan durante el período embrionario son las Gower 1, Gower 2 y Portland. Se ha visto en los embriones más jóvenes (examinados a los 37 días de gestación) que la proporción de hemoglobinas Gower 1 y 2 son del 42% y 24%, respectivamente del total, y el resto Hb F. En etapas posteriores la proporción de Hb Gower disminuye hasta casi ser indetectable en la 10^a-12^a semana de gestación.

El período en el cual aparece y desaparece la Hb Portland ha sido más difícil de determinar, ya que su migración en gel de almidón es muy similar a la Hb A, siendo observada en

electroforesis de agar citrato. En los fetos normales a la 10^a semana de gestación se observa un 20% de Hb Portland del total de la Hb.

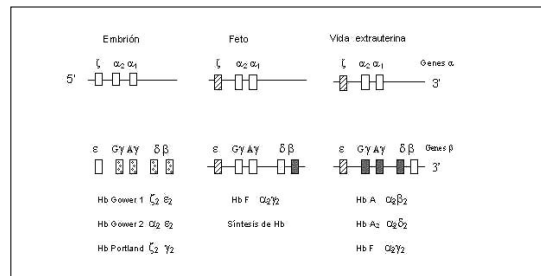


Figura 3-7. Control genético de la síntesis de Hb humana. En blanco se señalan los genes activos; en punteado los genes poco activos; en sombreado, los genes que todavía no son activos, y en rayado los genes que han pasado de activos a no funcionales.

La Hb F aparece precozmente durante la gestación, siendo el 30% del total a los 37 días de gestación y del 90% hacia la 8^a-10^a semanas, permaneciendo así hasta poco antes del parto. Ambas cadenas tanto γ como α se sintetizan desde el principio del embarazo y su relación es de aproximadamente 3/1, permaneciendo de esta manera de forma constante.

A los seis meses de vida extrauterina la cantidad de Hb F es menor del 1% aunque en niños normales pueda encontrarse con frecuencia niveles del 2-5%, para posteriormente situarse al año en valores menores del 1%, que mantendrá durante toda la vida.

La Hb A en cuantía del 5-10% se detecta en fetos normales desde la 6^a semana de gestación en adelante, aunque electroforéticamente no sea demostrable hasta la 12^a semana de vida. Pequeñas cantidades de cadena β pueden comprobarse por el estudio de síntesis de globinas antes de la 6^a semana de gestación; posteriormente se observa un ligero incremento en la síntesis de la cadena β (hacia la 12^a-20^a semana), proporción que permanece constante hasta iniciarse la síntesis de Hb A.

La Hb A₂ aparece en último lugar, se comienza a producir en el tercer trimestre de la gestación, detectándose solamente trazas de Hb A₂ en la sangre del cordón umbilical en el momento del nacimiento. Su síntesis se va incrementando a lo largo de los 6-12 primeros meses de vida hasta alcanzar los niveles definitivos.

Por todo lo anteriormente señalado se entiende que el déficit o anomalía de las cadenas α se

manifiesta mejor en el período neonatal. Después del parto la síntesis de cadenas β va aumentando y, puesto que la afinidad de las cadenas α es mayor por las cadenas β que por las γ , es por lo que las cantidades de Hb Bart (γ^4) se cuantifican mejor en el neonato que en el adulto. Además, como la cadena α forma parte también de las hemoglobinas Gower 2, F, A y A₂, la síntesis defectuosa de la cadena α se va a manifestar en todas las etapas del desarrollo.

En cuanto a las variantes estructurales de cadena α que pueden aparecer, van a tener el mismo porcentaje de Hb anómala en el período neonatal que en el adulto, mientras que las de cadena β se van a manifestar más claramente durante el período de adulto, y por último las variantes de Hb F (cadena γ) se detectan mejor en el período neonatal, desapareciendo en la vida adulta.

4.2. Función de la hemoglobina

La Hb tiene como funciones el transporte del O₂ desde los pulmones a los tejidos, el traslado del CO₂ desde los tejidos a los alvéolos pulmonares y actúa además como sistema tampón.

4.2.1. Transporte de oxígeno

A nivel del mar el aire que respiramos contiene 20,95% de O₂. La tensión de O₂ ambiental (PO₂) es aproximadamente 0,21 x 760 ó 160 mm Hg. A medida que el aire pasa por la vía aérea superior llega a saturarse completamente con agua. Dentro de las vías aéreas y pulmones el aire inspirado se mezcla tanto con el gas del espacio muerto y el gas alveolar que permanentemente está siendo alterado por captación de O₂ y liberación de CO₂ desde la sangre que pasa a través de los capilares pulmonares. Así la pO₂ en el aire alveolar cae hasta alrededor de 95 mm Hg.

La cantidad de O₂ transportado a través de la membrana alveolar por unidad de tiempo es un producto de la capacidad de difusión de la membrana por unidad de tiempo y la diferencia de pO₂ entre el gas alveolar y la sangre del capilar pulmonar. Esta membrana es de alrededor de 0,2 μ m de grosor y consiste de surfactante, epitelio alveolar, membrana basal, tejido intersticial y endotelio capilar. El O₂ es transportado pasivamente a través de la membrana del capilar alveolar. En el tejido pulmonar normal la resistencia al movimiento

del gas a través de esta membrana es prácticamente despreciable, un factor que contribuye levemente a crear un gradiente de O₂ alvéolo-capilar es el tejido pulmonar, incluyendo macrófagos metabólicamente activos que captan O₂ directamente del gas alveolar. La expulsión de CO₂ en la circulación pulmonar resulta en un aumento en el pH intracelular. Debido al efecto Bohr, la afinidad por O₂ de la Hb aumenta, facilitando el transporte de O₂ al glóbulo rojo.

La sangre de los capilares pulmonares se mezcla con sangre de las venas bronquiales, pleurales y de Tebesio. En condiciones normales este "shunt" produce una caída de la pO₂ en las venas pulmonares a 90 mm Hg. Esta presión parcial de O₂ se mantiene hasta que la sangre alcanza las arteriolas.

La difusión de O₂ dentro y fuera del eritrocito es incrementada por la alta concentración intracelular de Hb. La membrana del glóbulo rojo no posee una barrera adicional, pero la capa de agua que circunda a la célula retrasa la tasa de captación y liberación del O₂.

Así, las tasas de oxigenación y desoxigenación de las suspensiones de glóbulos rojos son diez veces menores que una solución equimolar de Hb. Sin embargo los tiempos de tránsito en los capilares pulmonares y periféricos son aproximadamente de cinco veces el tiempo medio que se requiere para realizar la oxigenación y desoxigenación.

En un individuo normal y en reposo el glóbulo rojo tarda alrededor de 0,75 seg. en transitar a través del lecho capilar pulmonar. Se ha estimado que el equilibrio con el gas alveolar se completa en 0,35 seg.

4.2.2. Descarga de oxígeno a los tejidos

El transporte de O₂ a los tejidos está gobernado por tres variables independientes que pueden expresarse cuantitativamente en la ecuación de Fick:

$$VO_2 = 0.139 \times Q \times Hb \times (S_A O_2 - S_V O_2)$$

VO₂ es la cantidad de O₂ liberado (L/min), 1,39 es la cantidad (en mL) de O₂ unido por 1 g de Hb totalmente saturada, Q es el flujo sanguíneo (L/min), y S_AO₂ y S_VO₂ son saturaciones de O₂ arterial y venosa mixta (%). En esta fórmula la pequeña cantidad de O₂ disuelta en sangre no es considerada.

La concentración de Hb de la sangre es la resultante del balance entre eritropoyesis y destrucción de glóbulos rojos.

El flujo sanguíneo a un tejido determinado está controlado por un complejo interjuego de factores locales, neurales y hormonales.

El tercer factor en la ecuación de Fick ($S_A O_2 - S_V O_2$) es una expresión cuantitativa de la descarga fraccional de O_2 de la Hb durante el flujo de sangre desde la arteria a la vena. Este parámetro es dependiente de la curva de disociación del O_2 de la Hb de la sangre. En condiciones fisiológicas la sangre está casi totalmente saturada de O_2 durante la circulación por los pulmones. Durante el flujo a través de los capilares sistémicos la Hb permite una importante descarga de O_2 a pesar de una pequeña caída en la pO_2 . Esto permite que el O_2 sea liberado en el plasma a concentraciones lo suficientemente altas como para mantener un gradiente adecuado al interior de las células.

Además de los tres determinantes importantes expresados en la ecuación de Fick, otras variables a nivel tisular influyen en la descarga de O_2 . En los capilares la tensión de O_2 plasmática es de alrededor de 1 mm Hg menor que dentro del eritrocito.

El gradiente de pO_2 entre el plasma y el interior de las células tisulares depende de diversos factores independientes, incluyendo el patrón y densidad de los capilares como también su flujo relativo. Más aún, este gradiente está afectado por diferencias en la difusión de O_2 entre los tejidos y la afinidad por O_2 de las enzimas que utilizan O_2 .

En la mayor parte de los tejidos, el transporte de O_2 en la célula está limitado por la capacidad de difusión. La transferencia de O_2 a través del protoplasma tisular es más rápida que a través de un grosor equivalente de H_2O . La musculatura cardíaca y esquelética tiene altas concentraciones de mioglobina dentro del citoplasma. Debido a su alta afinidad por O_2 esta proteína almacena O_2 . La mioglobina también facilita el transporte de O_2 dentro de la célula.

La pO_2 dentro de las células musculares del miocardio ha sido estimada en 5 mm Hg. Se requiere una pO_2 de alrededor de 0,5 mm Hg para el proceso de respiración mitocondrial. Si la tensión de O_2 cae bajo de 0,1 mm Hg, la respiración tisular cesa y sobreviene la muerte celular.

4.2.3. Mecanismo de carga de oxígeno

Perutz y colaboradores propusieron la base molecular de los cambios que se producen en la Hb con la llegada del O_2 . (figura 3-8).

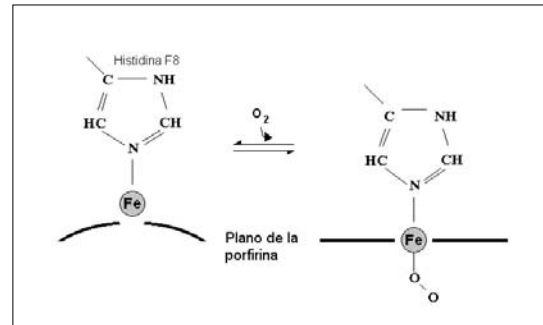


Figura 3-8. Esquema muestra que en la oxigenación el átomo de hierro se desplaza hacia el plano del hemo.

La oxihemoglobina presenta el átomo de hierro en el plano del anillo del hemo, impulsando hacia arriba la histidina F8. El residuo aminoacídico HC_3 rota libremente, insertándose la molécula de O_2 entre el hierro y los residuos E7 y E11. El residuo HC_2 (tirosina) se encuentra libre y puede mantenerse suelto entre las hélices F y H. La hélice E se desplaza hacia adentro si el O_2 es expulsado, y el átomo de hierro sale del plano del hemo al aumentar su tamaño en un 13% con la ganancia de un electrón, desplazándose 0,6 Å hacia F8. La hélice F se aleja de la H dejando una cavidad que será ocupada por el residuo HC_2 .

En la desoxihemoglobina la hélice F se ha desplazado en forma importante, permitiendo que el residuo HC_2 se aloje firmemente entre ella y la hélice H. El residuo HC_3 se sitúa en una posición tal, que forma enlaces iónicos que estabilizan la conformación desoxi.

El cambio de la forma T (tensa) de la desoxihemoglobina a la R (relajada) de la oxihemoglobina comprende una serie bien definida de modificaciones estructurales que incluyen la ruptura de las uniones que estabilizan la forma T, y la rotación relativa de la cadena β sobre la α , con abundancia de movimientos intramoleculares a nivel de la interfase $\alpha_1\beta_2$.

La porción C-terminal de las cadenas α y β contribuye fundamentalmente a la estabilidad de la forma T, pues la penúltima tirosina de ambas cadenas (α 140 y β 145) está anclada en una hendidura entre las hélices F y H.

En la cadena α la arginina C-terminal participa en dos uniones salinas, en una el grupo guanido está unido a un aspartato (residuo 126) de la misma cadena α , y en otra el grupo carboxilo puede unirse al grupo amino N-terminal de la otra cadena α .

El extremo C-terminal de la cadena β juega un papel igualmente importante, así la histidina C-terminal (β 146) constituye dos uniones salinas: su grupo carboxilo se liga al grupo ϵ -amino de la lisina α 40, y su grupo imidazol forma una unión intra-subunidad con el carboxilo del aspartato β 94, así por ejemplo en la Hb Barcelona [β 94 (FG1) Asp \rightarrow His] al romper esta unión salina, la estructura desoxi es menos estable, produciendo una afinidad aumentada y un efecto Bohr reducido.

La estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina es mucho más estable que la forma oxi, debido a uniones iónicas inter o intra-subunidad cuya alta energía es liberada cuando el átomo de hierro realiza su desplazamiento de 0,6 Å hacia el plano del hemo al entrar el O₂ en la cavidad.

Dado que el hemo de la cadena α es más accesible para el O₂ que los de las β , las α son oxigenadas primero, iniciándose en ellas los cambios conformacionales que conducen a la oxigenación de la molécula completa, rompiendo las cadenas β posteriormente sus uniones con el 2-3 DPG, y aproximándose éstas tras la expulsión del fosfato orgánico.

4.2.4. Interacción hemo-hemo

La entrada de O₂ en el interior del tetrámero de Hb permite una captación más fácil de las siguientes moléculas de este gas, es decir la incorporación de O₂ a una cadena aumenta la afinidad que por este gas tienen el resto de las cadenas que todavía no han reaccionado con él, esta es la base del denominado efecto hemo-hemo o de cooperatividad.

Este mecanismo tan eficiente de transporte de O₂ no podría ser posible si no fuera por la forma sigmoide de la curva de disociación entre el O₂ y la Hb, producto del fenómeno de cooperatividad recién señalado. Si cada uno de los cuatro grupos hemo de la molécula de Hb se unieran a O₂ independientemente de los otros, la curva de disociación del O₂ sería de forma hiperbólica como la de la mioglobina.

Como se muestra en la figura 3-9, tal curva hiperbólica que presenta la mioglobina no es buena para el transporte de O₂, ya que al no existir cooperación hemo-hemo se aprecia una

gran afinidad por el O₂, lo que le incapacita para transportarlo, favoreciendo lo que realmente es su función, que en el caso de la mioglobina es el almacenamiento de O₂ en los tejidos.

Para que la Hb cumpla con su papel fisiológico debe ligar O₂ con una afinidad apropiada. Si la ligazón O₂-Hb fuera demasiado débil la sangre no podría oxigenarse en la circulación pulmonar, si fuera muy fuerte sólo una escasa cantidad de O₂ sería descargada a los tejidos.

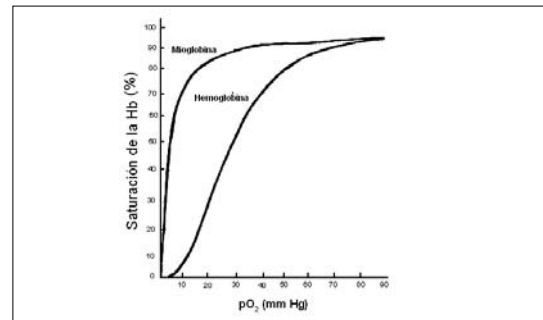


Figura 3-9. Curva de disociación de oxígeno de Hb y mioglobina a 37°C y pH 7,4.

La afinidad del O₂ por la Hb es convenientemente expresada en términos de P₅₀, y corresponde a aquella tensión de O₂ en la cual la Hb está saturada al 50%. A mayor afinidad de la Hb por O₂ menor será la P₅₀ y viceversa. De este modo la P₅₀ está inversamente relacionada a la afinidad por O₂. La P₅₀ normal para la sangre humana en condiciones fisiológicas a pH de 7,4 y temperatura de 37°C es de 26 ± 1 mm Hg.

Existe un gran número de factores genéticos y medioambientales que afectan la afinidad por O₂ de la sangre humana (figura 3-10). Los tres determinantes primarios de la afinidad de la sangre completa son: temperatura, pH y 2,3 DPG intraeritrocitario.

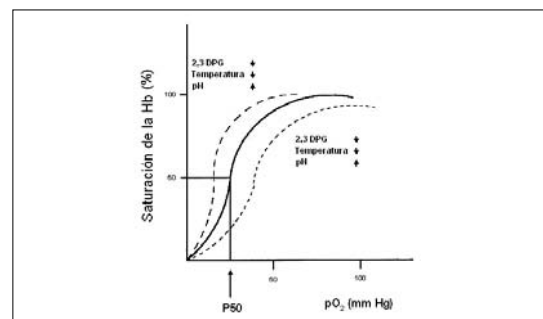


Figura 3-10. Curva de disociación de la Hb A. Se indican los desplazamientos hacia la izquierda o hacia la derecha en relación con los cambios de pH, la concentración de 2,3 DPG y la temperatura.

a) Temperatura

La relación entre temperatura y afinidad por O_2 es un fenómeno apropiado desde el punto de vista fisiológico. De este modo, en condiciones de hipotermia relativa, las demandas metabólicas son comparativamente más bajas. Debido a la desviación a la izquierda en la curva de disociación del O_2 , menos cantidad de O_2 es liberado a los tejidos. A la inversa, si la temperatura aumenta sobre lo normal, la desviación de la curva a la derecha resulta en una disminución de la afinidad por O_2 y así mayor descarga de O_2 .

En individuos homeotermos, como es el caso del hombre, solamente se permiten leves variaciones en la temperatura corporal, y para que este fenómeno ($\Delta P_{50}/\Delta T$) sea fisiológicamente importante debe ser pronunciado.

El efecto del pH y del 2,3 DPG intraeritrocitario será descrito más adelante, por ahora baste decir que el aumento del pH y la disminución del 2,3 DPG desvían la curva de saturación hacia la izquierda, es decir aumentan la afinidad de la Hb por O_2 . Un efecto contrario, es decir desviación hacia la derecha y disminución de la afinidad por el O_2 , se produce si disminuye el pH y aumenta el 2,3 DPG intraeritrocitario.

b) Efecto Bohr

Bohr, Hasselbach y Krogh, descubrieron que la afinidad de la Hb por el O_2 disminuye al aumentar las cantidades de CO_2 . Estudios posteriores demostraron que este efecto era debido primariamente a una reducción en el pH.

Los investigadores rápidamente dilucidaron el significado de estas observaciones. Concluyeron que un organismo liga y descarga O_2 y CO_2 recíprocamente: el O_2 es captado por los pulmones a medida que el CO_2 es expelido. En los tejidos ocurre el proceso inverso.

Debido al efecto Bohr, el intercambio de CO_2 facilita el intercambio de O_2 y viceversa. Sobre un rango de pH fisiológico, la P_{50} varía inversamente con el pH. Esto corresponde al denominado efecto Bohr alcalino. A medida que el CO_2 es expelido durante la circulación a través de los pulmones hay un correspondiente aumento en el pH y una disociación a la izquierda en la curva de disociación del O_2 . De este modo el relativo aumento en la afinidad por O_2 favorece la unión del O_2 a la Hb. A la

inversa, a medida que la sangre circula a través de los capilares el CO_2 entra al plasma y glóbulos rojos.

Debido a la abundancia de anhidrasa carbónica en los glóbulos rojos, rápidamente se forma ácido carbónico: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3$. La ionización de este ácido débil ($H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$) provoca una disminución en el pH intracelular.

Debido al efecto Bohr la afinidad de la Hb por el O_2 disminuye, resultando en una mejoría en la descarga de O_2 a los tejidos. Así, el efecto Bohr permite un ciclo fisiológicamente apropiado para el transporte de O_2 y CO_2 en el organismo.

El hecho de que los protones se unan más fácilmente a la estructura desoxi (T) que a la oxi (R), es debido a que hay grupos específicos sobre la molécula en este estado cuando las uniones salinas se han formado, que tienen una mayor afinidad por ellas. Se han identificado tres lugares que contribuyen al efecto Bohr alcalino: el imidazol de la histidina β 146 ($H\beta$), el grupo amino N-terminal de la cadena α , y el imidazol de la histidina α 122 ($H5$).

4.2.5. Sistema tampón

Dependiente del efecto Bohr, la unión de protones a la Hb representa el sistema tampón más importante para mantener neutro el pH intracelular. Es decir, la mayor parte del CO_2 producido en los tejidos pasa a los hematíes donde se hidratan rápidamente gracias a la acción de la anhidrasa carbónica eritrocitaria, se genera H_2CO_3 que se disocia a H^+ y HCO_3^- , siendo la Hb capaz de captar este hidrogenión y equilibrando de este modo el pH intracelular. Así mismo, el bicarbonato formado en los eritrocitos pasa a constituir en el plasma el sistema amortiguador más eficaz de que dispone la sangre.

4.2.6. Transporte de CO_2

El CO_2 es transportado principalmente como ion bicarbonato. En condiciones fisiológicas sólo un 10% del CO_2 producido por la respiración tisular es transportado como complejo carbamino con la Hb. El CO_2 puede combinarse de forma no enzimática con el grupo amino N-terminal de la molécula.

Lo mismo que con la unión a los protones, la carbamino Hb a un determinado pH tiene una

afinidad por el O₂ más baja que lo que pueda tener la Hb en ausencia de CO₂.

Las cadenas α y β difieren en su interacción con el CO₂. En ausencia de fosfatos orgánicos (2-3 DPG) la cadena β de la desoxihemoglobina se une al CO₂ con una afinidad aproximadamente tres veces mayor que la cadena α.

4.2.7. Interacción con aniones inorgánicos

La afinidad de la Hb por el O₂ disminuye progresivamente en la presencia de concentraciones ascendentes de fosfato inorgánico o ion cloruro.

Estos aniones inorgánicos se unen más fuertemente a la desoxihemoglobina que a la oxihemoglobina. Los sitios de enlace a la desoxihemoglobina han sido identificados mediante análisis de rayos-X.

En ausencia de fosfatos orgánicos hay dos sitios en la molécula de desoxihemoglobina que tienen relativamente alta afinidad por el cloruro: los grupos α amino de las cadenas α, y el grupo ε amino del aminoácido lisina de la cadena β 82 (EF6). Ya que este último sitio señalado es un importante lugar de unión del 2-3 DPG, es muy probable que no ligue cantidades significativas de cloruro en condiciones fisiológicas. En contraste a esto, la interacción del cloruro en la región N-terminal de la cadena α es un importante determinante de la función de la Hb. El enlace del cloruro en este sitio estabiliza la hidrogenación de este grupo amino elevando su pKa. Después de la oxigenación tanto el cloruro como el protón son liberados. Así parte de la dependencia del pH del fenómeno de oxigenación (efecto Bohr) está relacionado al enlace del cloruro. De hecho, el efecto Bohr alcalino disminuye a alrededor de la mitad, si la concentración del ion cloruro está reducida desde el nivel fisiológico (0,1 M) hasta cero.

4.2.8. Interacción con fosfatos orgánicos

El glóbulo rojo humano y el de otros mamíferos tiene concentraciones muy altas del intermediario de la vía glicolítica, 2-3 DPG. Aunque es el fosfato orgánico más abundante al interior del glóbulo rojo, está presente sólo en cantidades trazas en otros tejidos. Su concentración dentro del eritrocito es de 5mM por litro de eritrocitos concentrados. Todos los otros fosfatos orgánicos se encuentran en

concentraciones mucho menores.

En el año 1967 dos grupos de investigadores en forma independiente demostraron que el 2-3 DPG es un potente modificador de la función de la Hb. A la Hb que se le ha extraído todos los fosfatos orgánicos intraeritrocitarios tiene una afinidad por O₂ inesperadamente alta, aunque la interacción hemo-hemo y el efecto Bohr permanezcan intactos.

En sentido inverso, la adición de bajas concentraciones de 2-3 DPG resulta en una disminución progresiva en la afinidad por O₂. La potencia relativa de otros fosfatos orgánicos en disminuir la afinidad de la Hb por O₂ es proporcional a su fuerza aniónica.

El 2-3 DPG se une a la desoxihemoglobina en una relación molar de 1:1, y mucho menos fuertemente a la oxihemoglobina y otras formas ligadas como la carboxi o cianmetahemoglobina.

El ATP se une a la Hb competitivamente con el 2-3 DPG, y al igual que éste es en una relación molar de 1:1.

Además de los protones, CO₂ y cloruro, el 2-3 DPG se une a la Hb de una forma recíproca al O₂



Los lugares precisos de la desoxihemoglobina sobre los cuales se une el 2-3 DPG son el grupo amino N-terminal de la cadena β, los imidazoles de la histidina β 143 y el grupo amino de la lisina β 82 (EF6), esto explica que la Hb A_{1c} y la F₁, hemoglobinas que tienen bloqueado el N-terminal de la cadena no α, tengan marcadamente alterada su reactividad con el 2-3 DPG. Además se ha demostrado que el CO₂ compite con el 2-3 DPG en su unión a la Hb.

La alta afinidad de la Hb por el O₂ de la sangre fetal puede explicarse por la elevada reactividad de la Hb F humana con el 2-3 DPG y podría justificarse por las diferencias en la estructura primaria entre las cadenas β y γ en la posición 143 (H21): histidina en la cadena β y serina no cargada en la cadena γ.

En resumen, como se ha dicho, el 2-3 DPG se une firmemente a lugares específicos sobre la desoxihemoglobina, sin embargo los cambios conformacionales inducidos por la oxigenación debilitan esta unión expulsando de una forma definitiva al 2-3 DPG cuando se alcanza la forma R, al incorporarse el tercer O₂ al tetrámero.

5. DESTRUCCIÓN DE LOS HEMATÍES

La vida media de los hematíes cuando pasan de la médula ósea al sistema circulatorio es de aproximadamente 120 días. Una vez que la membrana de los hematíes se hace frágil, la célula puede romperse al pasar a través de algún vaso sanguíneo estrecho de la circulación. Sin embargo, la mayoría de los hematíes se fragmentan en el bazo, donde se estrujan al pasar a través de la pulpa roja y no reciben la cantidad de glucosa adecuada lo que termina alterando su metabolismo, los eritrocitos envejecidos por lo regular tienen un aumento en la permeabilidad de cationes y las células disminuyen rápidamente la concentración de ATP al intentar mantener un equilibrio osmótico mediante el bombeo de estos cationes en exceso fuera de la célula, por tanto, el medio esplénico está bien preparado para eliminar estos eritrocitos. Los espacios entre las trabéculas estructurales de la pulpa roja, por los cuales deben pasar la mayor parte de las células, son sólo de 2-3 μm de ancho, comparados con los 8 μm de diámetro de los hematíes. Cuando se extirpa el bazo, aumenta considerablemente el número de hematíes anormales y de células viejas circulantes.

Normalmente la destrucción de los GR se lleva a cabo preferentemente en el espacio extravascular (90%). Los macrófagos del recubrimiento interno de los vasos, especialmente del bazo y del hígado, fagocitan (ingieren y destruyen) los hematíes envejecidos, anormales o fragmentados. La Hb liberada por la destrucción celular es fagocitada y digerida por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), liberando:

- Hierro. El hierro vuelve a la médula ósea para ser utilizado en la formación de nueva Hb o va al hígado y otros tejidos donde se almacena en forma de ferritina o hemosiderina, pero la mayor parte se une a su proteína de transporte, transferrina.
- Aminoácidos. Los aminoácidos, liberados de las globina de la Hb son utilizados en la síntesis de nuevas proteínas («pool» de aminoácidos).
- Bilirrubina. El grupo Hemo se rompe libera el hierro y en el anillo de protoporfirina IX liberado el puente α -metano del anillo de porfirina se une, produciéndose un mol de monóxido de carbono y biliverdina. El monóxido se libera al torrente sanguíneo y

se transporta como carboxihemoglobina a los pulmones, y se exhala. La biliverdina es rápidamente reducida dentro de la célula a bilirrubina, una vez liberada del macrófago se une a la albúmina plasmática y llevada al hígado, en éste se conjuga volviéndose polar e insoluble de tal forma que se excreta a la bilis para ser convertida a urobilinógeno en el tracto intestinal y ser eliminado a través de las heces y la orina.

LECTURAS SUGERIDAS

Benesch, R., Benesch, R.E., and Enoki, Y. "The interaction of hemoglobin and its subunits with 2-3 DPG". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1968; 61: 1102.

Benesch, R., Benesch, R.E., and Yu, C.I. "The oxygenation of hemoglobin in the presence of DPG. Effect of temperature, pH, and ionic strength and hemoglobin concentration". *Biochemistry* 1969; 8: 2567.

Bissé, E., and Wieland, H. "HPLC of human hemoglobins, a new approach to the study". *J. Chromatogr* 1988; 434: 95.

Bisse, E., Wieland, H. "HPLC separation of Human Haemoglobins". *J Chromatogr* 1988; 434: 95.

Bunn, H. F. and Forget, B. G. **Hemoglobin structure in Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects**. W. B. Saunders; Philadelphia; 1986: 13

Bunn, H.F., and Briehl, R.W. "The interaction of 2-3 DPG with various human hemoglobins". *J. Clin. Invest* 1970; 49: 1088.

Capp, G.L., Rigas, D.A., and Jones, R.T. "Hemoglobin Portland 1: a new human hemoglobin unique in structure". *Science* 1967; 157:65.

Dikerson, R.E., Geis, I. **Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology**. The Benjamin/Cummings Company Inc. Menlo Park 1983:263.

Foradori, A. "Hemoglobina: Metabolismo y Función" en **Fisiología de la sangre**, Mezzano D., Pereira J. Eds. Editorial P. Universidad Católica de Chile, 1993.

Garraty, G., Telen, M.J., Petz, L.D. "Red Cell Antigens as Functional Molecules and Obstacles to Transfusion". *Hematology*, 445-462, 2002

- Huehns, E.R., Flynn, F.V., Buttler, E.A., et al. "Two new haemoglobins variants in the very young human embryo". *Nature* 1961; 189: 496.
- Huisman T.H.J., and Jonxis, J.H.P., "The Fetal Hemoglobins" in **The Hemoglobinopathies, Techniques of Identification, Clinical and Biochemical Analysis**, Marcel Dekker, Inc., New York, 1977; 6: 48.
- Huisman T.H.J., Schroeder, W.A., Reese, A., et al. "J. B. The A¹ of human fetal hemoglobin at birth and in several abnormal hematologic conditions". *Pediatr. Res* 1977; 11: 1102.
- Huisman T.H.J., Schroeder, W.A., Felice, A., et al. "The cluster locus of α chain gene", *Nature* 1977; 265: 63.
- Huisman T.H.J. "The structure and function of normal and abnormal haemoglobins" In **The Haemoglobinopathies**, Higgs, D.R., Weatherall, D.J., Baillière Clin Haematology, W. B. Saunders, London 1993; 6:1.
- Kamuzora, H., Jones, R.T., and Lehmann, H. "The chain, an like chain of human embryonic haemoglobin". *FEBS* 1974; Lett. 46: 195.
- Kilmartin, J.B., Fogg, J.H., Perutz, M.F. "Role of C-terminal Histidine in the alkaline Bohr effect of human hemoglobin". *Biochemistry* 1980; 19: 3189.
- Kutlar F., Kutlar A., Gu Y. C., et al. "Adult hemoglobin levels in newborn babies from different countries and in babies with some significant hemoglobinopathies". *Acta Haematologica* 1987;78: 28.
- Kutlar, A., Kutlar, F., Gu, L-G., et al. "The embryonic hemoglobins". *Hum. Genet* 1990; 85: 106.
- Nagel, R.L., Ranney, D. "Genetic epidemiology of structural mutations of the globin gene". *Seminars in Hematology* 1990; 27: 332.
- Nute, P.E., Pataryas, H.A., and Stamatoyannopoulos, G. "The G and A hemoglobins chains during human fetal development". *Am. J. Hum. Genet* 1973; 25: 271.
- Perrella, M., Bresciani, D., and Rossi-Bernardi, L. "The binding of CO₂ to human hemoglobins". *J. Biol. Chem* 1975; 250: 5413.
- Perutz, M.F., Kilmartin, J.B., Nishikura, K., et al. "Identification of residues contributing to the Bohr effect of human hemoglobin". *J. Mol. Biol* 1980; 138:649.
- Perutz, M. F. "Regulation of oxygen affinity of hemoglobin". *Ann. Rev. Biochem* 1979; 48: 327.
- Righetti, P.G., Gianazza, E., Bianchi-Bosisio A., et al. "Conventional isoelectric focusing and immobilized pH gradients for hemoglobin separation and identification". Huisman, T.H.J., **The Hemoglobinopathies. Methods in Hematology**, Churchill Livingstone. Edinburgh 1986; 15: 47.
- Rodak, Bernadette, **Diagnostic Hematology**, Ed. W.B. Saunders, 1995.
- Schroeder, W.A., Huisman T.H.J., Brown., A. "Postnatal changes in the chemical heterogeneity of human fetal hemoglobin". *Pediatr. Res* 1971; 5: 493.
- Schroeder, W.A., Huisman T.H.J., Shelton, J. R., et al. The chemical heterogeneity of human fetal hemoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1968; 60:537.
- Schroeder, W.A., Shelton, J.R., Shelton J.B. "The aminoacid sequence of the α chain of human fetal hemoglobin". *Biochemistry* 1963; 2: 992.
- Steinberg, M.H., Adams J.G. "Hemoglobin A₂: origin, evolution, and aftermath". *Blood* 1991; 78: 2165.
- Stryer, L. **Bioquímica**, cuarta edición, "Descripción de una proteína Alostérica", capítulo 7, Editorial Reverté, S.A. pp. 148-165, 1995.
- Tuchinda, S., Nagai, K., and Lehmann, H. "Oxygen dissociation curve of haemoglobin Portland". *FEBS* 1975; Lett. 49: 390.
- Vives y Corrons J.L. **Manual de Técnicas de laboratorio en Hematología**. 1er. ed., Salvat, 1994.
- Waltemath, C. "Oxygen uptake, transport and tissue utilization". *Anesth. Analg* 1970; 49: 184.
- Woodson, R.D. "Physiological significance of oxygen dissociation curve shifts". *Crit. Care Med* 1979; 7: 368.

ANEMIA Y SÍNDROME ANÉMICO

Iván Palomo G. y Pablo Lira V.

- 1. Introducción**
- 2. Definición de anemia**
- 3. Estudio de laboratorio**
 - 3.1. Recuento de GR, Hto y Hb
 - 3.2. Índices eritrocitarios
 - 3.3. Recuento de reticulocitos e índice reticulocitario
- 4. Mecanismos de adaptación y sintomatología**
 - 4.1. Mecanismos de adaptación
 - 4.2. Síntomas y signos
- 5. Clasificaciones de las anemias**
 - 5.1. Clasificación morfológica
 - 5.2. Clasificación fisiopatológica
 - 5.2.1. Anemias arregenerativas
 - 5.2.2. Anemias regenerativas

RESUMEN

Las anemias se encuentran entre las patologías hematológicas más frecuentes. Este capítulo introductorio sobre anemias, incluye aspectos como: definición de anemia, estudio de laboratorio, mecanismos de adaptación y sintomatología, y clasificaciones de las anemias. Respecto a este último tema, se describe las clasificaciones morfológica y fisiopatológica.

1. INTRODUCCIÓN

Se denomina síndrome anémico al conjunto de síntomas y signos que aparecen con la anemia. La anemia es un síntoma y no una enfermedad definida, por ello al pesquisar una anemia, ya sea por un examen de laboratorio o por la clínica, se debe avanzar en el diagnóstico y determinar la causa, ya que el tratamiento es diferente en cada caso. Los signos y síntomas que acompañan a la anemia son consecuencia de los mecanismos de adaptación del organismo frente al fenómeno de hipoxia, lo que resulta de la falla en la capacidad de aporte de oxígeno a los tejidos. Dichos cambios son más evidentes en los sistemas respiratorio y cardiovascular, y cuyo desarrollo está en relación directa con la severidad y tiempo de evolución del proceso patológico.

La anemia es la causa más frecuente de consulta hematológica, afecta a un 30% de la población mundial de todas las edades y clases sociales, y es cuatro veces más frecuente en la mujer que en el hombre. Las mujeres presentan un "peak" en la edad fértil. Más de la mitad de las anemias son debidas a deficiencia de hierro y alrededor de un tercio a déficit de folato o vitamina B₁₂.

En este capítulo se revisarán básicamente tres aspectos: definición de anemia, estudio de laboratorio, mecanismos de adaptación y sintomatología, y clasificaciones de las anemias.

2. DEFINICIÓN DE ANEMIA

La definición más aceptada de anemia es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la que se basa en la concentración de hemoglobina (Hb). Se entiende que una persona presenta anemia cuando la concentración de Hb está por debajo de los valores normales. El valor normal de Hb varía según la edad, el sexo, y algunas situaciones especiales como la altura de residencia. Así, los niños de 6 meses a 6 años con concentración de Hb menor de 11 g/dL, y de 6 a 12 años con Hb inferior a 12 g/dL, presentan anemia. Para los adultos el criterio es diferente según se trate de hombres o mujeres; el límite inferior normal es de 13 y 12 g/dL de Hb, respectivamente. En mujeres embarazadas (a nivel del mar) los valores normales de Hb no deben ser inferiores a 11 g/dL.

Además del criterio básico de la OMS, la definición de anemia puede asimismo incluir los valores de hematocrito (Hto) y el recuento de glóbulos rojos (GR). Así, se considera que un hombre presenta anemia cuando tiene un recuento de GR menor de $4.5 \times 10^6/\mu\text{L}$, menos de 13 g/dL de Hb y menos de 42% de Hto. Dichos valores en la mujer son de $4 \times 10^6/\mu\text{L}$, 12 g/dL y 37%, respectivamente. En la tabla 4-1 se muestran valores normales para Hb en adultos y niños.

Tabla 4-1. Valores normales de hemoglobina

		Hemoglobina (g/dL)
Adultos	Mujeres	12-16
	Varones	13-17
Niños	0-2 semanas	13.5-18.5
	2-6 meses	9.5-13.5
	6 meses-6 años	11-14
	6-12 años	12-15.5

El diagnóstico de anemia requiere establecer una buena historia clínica y el hallazgo de parámetros específicos de laboratorio. El establecimiento de la causa subyacente en cada caso de anemia es esencial para el tratamiento adecuado.

La determinación de Hb es una medida de concentración, por lo que se debe tener en cuenta el estado general del individuo y los análisis deben ser considerados en el contexto clínico del paciente ya que, a veces, los valores tomados aisladamente, aunque normales, pueden indicar anemia, por ejemplo un paciente de sexo masculino que acostumbra tener un Hto de 49 a 50%, que baja bruscamente a 42%, puede padecer anemia aunque esta cifra sea normal. De la misma forma, los individuos que viven en zonas de grandes alturas y los fumadores crónicos son normalmente policitémicos, de esta manera en ellos un Hto o Hb «normal» puede significar anemia. Debe considerarse que el Hto y la Hb relacionan los GR con el plasma de modo que si aumenta el volumen plasmático (hemodilución) puede encontrarse un Hto y Hb bajos simulando una falsa anemia como sucede en la hipoproteinemia, insuficiencia cardíaca, hiperesplenismo, etc. Lo opuesto puede suceder en casos de deshidratación en que la disminución del volumen plasmático aumenta artificialmente el número de GR, de modo que los pacientes que realmente son anémicos en condiciones de deshidratación podrían tener valores medidos de GR, Hto y Hb normales.

3. ESTUDIO DE LABORATORIO

3.1. Recuento de GR, Hto y Hb

Actualmente los sistemas analíticos (ver capítulo 27) bien estandarizados y sometidos a un

riguroso control de calidad, ofrecen valores hematológicos de exactitud y reproducibilidad dentro de los límites clínicamente útiles, tanto para el diagnóstico de las anemias como para el seguimiento de su evolución y el control del tratamiento.

El hemograma proporciona información inicial muy importante para el diagnóstico de anemia.

Al nacer el **recuento de GR** es más elevado; luego, a partir de los dos meses siguientes, ocurre una disminución gradual de los mismos. Posteriormente sigue un incremento, también gradual, hasta alcanzar los valores del adulto. En la pubertad se presenta una diferencia según sexo, con recuentos menores en las mujeres en relación con los hombres. Su valor normal es en mujeres: $3,9-5,4 \times 10^6/\mu\text{l}$, hombres: $4,0-6,0 \times 10^6/\mu\text{l}$.

El **hematocrito** es el porcentaje que, del volumen total de la sangre, corresponde a los GR. Es una medición compuesta por el tamaño y número de GR. Como se indicó en el punto 2, los valores normales varían según el sexo y la edad.

La **hemoglobina** es el principal componente de los eritrocitos y su función es transportar el oxígeno y dióxido de carbono. Su valor es más importante que el de los GR ya que la capacidad de la sangre para combinarse con el oxígeno es directamente proporcional a la concentración de Hb. Al igual que el recuento de GR y el Hto, los valores normales dependen de la edad y sexo (ver punto 2).

3.2. Índices eritrocitarios

Los índices eritrocitarios son muy importantes para clasificar las anemias desde el punto de

vista morfológico y, por lo tanto, para iniciar su estudio diagnóstico.

El **volumen corpuscular medio** (VCM) es una expresión, en términos absolutos, del volumen o tamaño promedio de los eritrocitos. Se determina en forma directa con contadores celulares automatizados; cada GR pasa a través de un orificio por donde fluye una corriente eléctrica; la célula produce un pulso de voltaje cuya magnitud es proporcional al volumen celular (ver capítulo 27). Sin embargo, también puede calcularse a partir del Hto y el recuento de GR. El valor normal es de 80-100 fL. Su determinación permite clasificar las anemias en normocíticas, microcíticas y macrocíticas.

La **concentración de Hb corpuscular media** (CHCM), define la concentración de Hb promedio por mL de eritrocitos (ver capítulo 27). En adultos los valores normales son de 32 a 36%. Sobre la base de valores de CHCM, las anemias pueden ser clasificadas como normocromas, o hipocromas (CHCM: < 32%).

La **Hb corpuscular media** (HCM), corresponde al valor promedio de la Hb contenida en cada hematíe. Los valores normales van de 28 a 32 pg. La HCM siempre debe relacionarse con la CHCM y la VCM. Valores menores de 27 pg se observan en las anemias hipocromas.

3.3. Recuento de reticulocitos e Índice reticulocitario

El recuento reticulocitario valora la producción de GR, permitiendo clasificar las anemias en regenerativas o arregenerativas. Se determina por recuento directo en el frotis mediante una tinción con azul de cresil brillante o de forma automática con los contadores electrónicos y se expresa en porcentaje o como número absoluto sobre el número de eritrocitos, siendo normal 0.5-2% y $25 - 85 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente. Si el número absoluto es mayor de $100 \times 10^3/\mu\text{L}$, indica una eritropoyesis aumentada (médula ósea) en respuesta a la anemia; se observa en las anemias regenerativas (ej. anemias hemolíticas). El recuento porcentual de reticulocitos podría dar un valor falsamente elevado en anemias con disminución importante del número de eritrocitos. Para evitar esta distorsión se debe usar el recuento absoluto de reticulocitos o el índice de producción reticulocitaria (IPR) según la fórmula: $\text{IPR} = \text{IR} / 2$, donde IR (índice reticulocitario) se determina con la fórmula: $\text{IR} = \text{porcentaje reticulocitos} \times \text{Hto paciente} \times 100 / \text{Hto normal}$ (Hombres: 45,

Mujeres: 40). Los IPR menores de 2, son propios de las anemias arregenerativas y los mayores de 2-3 de las anemias regenerativas.

4. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN Y SINTOMATOLOGÍA

4.1. Mecanismos de adaptación

La principal función de los eritrocitos es transportar el oxígeno a los tejidos. El adulto normal requiere 250 mL de oxígeno por minuto. La capacidad de transporte de oxígeno por la sangre normal es de 1.34 mL por gramo de hemoglobina o 20 mL de O_2 por 100 mL de sangre.

La consecuencia de la anemia es la hipoxia tisular; si esta alteración se desarrolla en forma paulatina permite el desarrollo de mecanismos de adaptación que tratan de mantener la oxigenación de los tejidos:

a) Aumento del 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) eritrocitario. El aumento del 2,3 DPG se asocia a disminución de la afinidad de la Hb por el oxígeno, por lo que aumenta su liberación a los tejidos. En algunas anemias, como en el déficit de piruvato kinasa que desde el principio presentan aumento de 2,3-DPG, los síntomas son menores para el mismo descenso de la Hb. En algunas hemoglobinopatías que presentan Hb con disminución de la afinidad por el oxígeno, ocurre lo mismo; en estos casos se explica porque la liberación de oxígeno es mayor y, por lo tanto, el síndrome anémico es más leve.

La hipoxia celular estimula el metabolismo anaeróbico y la acumulación de ácido láctico, con lo cual la curva de disociación de la hemoglobina se desplaza a la derecha (efecto Bohr).

b) Aumento de la producción de GR. La disminución de la oxigenación renal conlleva un aumento de la producción de eritropoyetina para aumentar la producción de GR. Este mecanismo es lento y es efectivo si la eritropoyesis es normal. La maduración normal de eritrocitos en la médula ósea demora 7 días, pero el estímulo producido por la eritropoyetina reduce dicho período a 3-4 días.

c) Redistribución sanguínea. Algunos órganos como el cerebro y el corazón necesitan para su funcionamiento una concentración de oxígeno mantenida, por lo que en la anemia se redistribuye el flujo sanguíneo de otros sectores como piel y riñón hacia órganos vitales como los antes mencionados. El organismo produce

una redistribución del flujo sanguíneo con vasoconstricción cutánea y la consiguiente palidez, también debida a la disminución de la Hb. La vasoconstricción esplénica causa anorexia y náuseas y la vasoconstricción renal produce un aumento de la secreción de aldosterona con retención de líquidos y hemodilución.

d) Estimulación cardíaca. Es el mecanismo compensador más importante, aumenta la fuerza de contracción ventricular y la frecuencia de la misma. Además produce una vasodilatación arteriolar a nivel visceral con vasoconstricción cutánea y muscular esquelética. Todo ello produce una hiperkinesia circulatoria que se manifiesta clínicamente (palpitaciones, taquicardia con pulso saltón, soplos cardíacos funcionales, aumento de la presión arterial diferencial, cefaleas pulsátiles) y que sumada a la disnea, mareos y palidez mucocutánea, permiten el diagnóstico de síndrome anémico.

4.2. Síntomas y signos

En la aparición de los síntomas influyen varios factores, entre ellos es importante el tiempo en que se desarrolla la anemia. Una anemia que se instala en forma lenta puede que no presente síntomas o éstos sean muy leves; en cambio frecuentemente los provoca aquella de

instalación brusca. Otros factores que influyen en la aparición de síntomas son la edad y el estado previo de salud.

En la (tabla 4-2) se mencionan las manifestaciones clínicas más importantes del síndrome anémico.

Los signos que suelen apreciarse en la exploración física de los pacientes con anemia son:

- Palidez: secundaria a la disminución de aporte de sangre a la piel para aumentarla en otros órganos más vitales.
- Taquicardia: mecanismo compensador del corazón; a veces también soplo cardíaco funcional.
- Taquipnea: aumento de la frecuencia respiratoria.
- Hipotensión: manifestación de la pérdida de volumen sanguíneo en casos de anemia aguda.
- Signología específica: en los casos de anemia hemolítica es habitual encontrar ictericia (conjuntiva y piel) y esplenomegalia. En los pacientes con déficit de vitamina B₁₂ pueden existir alteraciones en el sistema nervioso.

Tabla 4-2. Manifestaciones clínicas del síndrome anémico

Manifestaciones generales
Astenia
Manifestaciones cardiovasculares
Palpitaciones
Disnea de esfuerzo
Hipotensión
Manifestaciones neurológicas
Cefalea
Mareo, vértigo
Somnolencia, confusión, irritabilidad
Ruidos en los oídos (tinnitus)
Manifestaciones en la piel
Palidez
Fragilidad de las uñas
En casos de anemia severa o de rápida instalación.
Piel fría y húmeda
Disminución del volumen de orina
Dolor precordial (angor)
Otros síntomas y signos dependerán del tipo de anemia y su causa o etiología.

5. CLASIFICACIONES DE LAS ANEMIAS

Las anemias se originan generalmente por uno de los siguientes mecanismos básicos: eritropoyesis deficiente, hemólisis excesiva o hemorragia (aguda o crónica).

En hombres la principal fuente de sangrado es el sistema digestivo, en tanto que en la mujer corresponde a las pérdidas de sangre con la menstruación. En las anemias secundarias a eritropoyesis deficiente, es útil observar las alteraciones morfológicas de los GR, así la presencia de eritrocitos microcíticos pueden sugerir deficiencia de hierro, talasemias, defectos en la síntesis de hemoglobina o anemia asociada a enfermedades crónicas; por el contrario, los GR macrocíticos se relacionan a defectos en la síntesis de DNA, como resultado de la deficiencia de vitamina B₁₂, ácido fólico o de la quimioterapia con metotrexato o hidroxycurea. Por su parte, las anemias normocíticas-normocromicas aparecen como consecuencia de un mecanismo hipoproliferativo de la médula ósea o hemólisis periférica. En cuanto a este último es necesario descartar los mecanismos fisiopatológicos básicos más comúnmente asociados como son el secuestro esplénico y la hemólisis mediada por anticuerpos, y menos frecuentes las causadas por alteraciones propias de los hematíes, como son las membranopatías, enzimatopatías y hemoglobinopatías.

Desde el punto de vista clínico, se utilizan dos clasificaciones: morfológica y fisiopatológica.

5.1. Clasificación morfológica

La clasificación morfológica de las anemias (tabla 4-3) tiene una importante utilidad clínica. Se basa en los cambios que presentan los GR en

el tamaño (VCM) y en el contenido de Hb (CHCM, HCM). Estos cambios son detectados por los contadores celulares y observados con microscopía óptica en los frotis sanguíneos (ver capítulo 27). Considerando que el valor normal del VCM es entre 80 y 100 fL y la CHCM entre 32 y 36%, las anemias se pueden clasificar en tres tipos:

- Microcíticas (VCM < 80 fL). Se asocia a trastornos en la síntesis de la Hb, como por ejemplo anemia ferropriva y talasemias. En general se acompañan de disminución de la CHCM que define la hipocromía.
- Macrocíticas (VCM > 100 fL). Se presentan en anemias con trastornos de la maduración eritroide, como por ejemplo las anemias megaloblásticas.
- Normocíticas-normocromicas. En este grupo de anemias, que presentan VCM y CHCM normal, se incluyen las anemias de las enfermedades crónicas, las anemias hemolíticas, y las anemias de causa medular (Ej. leucemias, mieloma múltiple, aplasia medular).

La clasificación morfológica de las anemias sumada a estudios complementarios, permite en la mayoría de los casos, formular el diagnóstico del tipo de anemia (ver los capítulos específicos de cada tipo de anemia y los capítulos 27, 28 y 29).

5.2. Clasificación fisiopatológica

La clasificación fisiopatológica de las anemias se basa en la respuesta de la médula ósea para compensar la anemia, así se les clasifica en dos grupos: anemias arregenerativas y anemias regenerativas. A continuación se describen algunas características de cada grupo y se indican algunos ejemplos.

Tabla 4-3. Clasificación morfológica de las anemias

<p>Anemias macrocíticas</p> <p>Hematológicas</p> <p> Anemia megaloblástica</p> <p> Anemias hemolíticas</p> <p> Síndromes mielodisplásicos</p> <p>No hematológicas</p> <p> Alcoholismo</p> <p> Hepatopatía crónica</p> <p>Anemias microcíticas</p> <p> Anemia ferropriva</p> <p> Talasemias</p> <p>Anemia normocíticas</p> <p> Anemia aplástica</p> <p> Infiltración medular (Mieloptisis)</p> <p> Anemias secundarias a enfermedad crónica</p>

5.2.1. Anemias arregenerativas

En estas anemias la médula ósea es incapaz de producir GR en forma adecuada para compensar la anemia, ya sea por un defecto de la misma (Ejs. anemia aplástica, leucemias) o por falta de nutrientes (hierro, vitamina B₁₂, etc.). En este tipo de anemias la cifra de reticulocitos es normal o disminuida y el IPR es menor a 2, indicando que el origen de la anemia es a nivel central (médula ósea). A continuación se mencionan las causas más importantes de anemias arregenerativas:

- Disminución de las células progenitoras de GR o de todas las líneas medulares (además granulocitos y plaquetas): Anemia aplástica por tóxicos industriales (benceno), drogas (cloranfenicol, dipirona, antiinflamatorios no esteroideos), citostáticos (antineoplásicos) radiaciones ionizantes y de causa desconocida (anemia aplástica idiopática).
- Infiltración de la médula ósea por células extrañas que reemplazan las células progenitoras: blastos leucémicos, metástasis de carcinomas, tejido conectivo fibroso (mielofibrosis), etc. En conjunto se les denomina anemias mieloptísicas.
- Las células eritropoyéticas son normales pero no reciben los factores nutritivos necesarios para producir eritrocitos. Son las denominadas anemias carenciales. El déficit puede ser de: (a) hierro, por falta de aporte (carencia de hierro) o con aporte normal pero incapacidad de utilizar el hierro (anemia secundaria a enfermedades crónicas), (b) vitamina B₁₂ y/o ácido fólico (anemias megaloblásticas) y (c) hormonas (hipotiroidismo, hipopituitarismo, hiposuprarrenalismo, hipogonadismo masculino, disminución de eritropoyetina en la insuficiencia renal).

Tabla 4-4. Clasificación fisiopatológica de las anemias

Estado de la eritropoyesis	Causa de la anemia	Situaciones clínicas
Anemias arregenerativas		
Por depresión	<p>Infecciones extramedulares Mesenquimopatías Déficit de Hierro</p> <p>Síntesis alterada de DNA</p> <p>Déficit de eritropoyetina</p> <p>Déficit de tiroxina Déficit de transferrina</p>	<p>Subagudas o crónicas Lupus, esclerodermia Carencial, pérdida exagerada, defecto en absorción, transporte o utilización Anemia perniciosa, Ca gástrico, difilobotiasis, diverticulitis intestinal, embarazo, etilismo crónico, cirrosis hepática, tratamientos citostáticos (citosina arabinosa), otras drogas). Nefropatías crónicas difusas, ciertos hipernefomas Mixedema Nefrosis, malabsorción, atranferrinemia congénita</p>
Por agresión	<p>Intoxicaciones endógenas Intoxicaciones exógenas</p> <p>Infecciones intramedulares Procesos autoinmunes</p>	<p>Uremia, cáncer metastásico Benzol, cloranfenicol, fenilbutazona, citostáticos, etc. Hepatitis, micosis diseminada ciertas virosis</p>
Por sustitución	Proliferaciones celulares	Leucemias, linfomas, metástasis neoplásticas difusas mieloesclerosis, osteosclerosis, tesarismosis, sarcoidosis
Anemias regenerativas		
Anemias Hemolíticas		
A. hemolíticas intracorpúsculares	<p>Membranopatías</p> <p>Hemoglobinopatías Enzimopatías</p>	<p>Esfero, elipso, acanto y pirocitosis hereditarias, hemoglobinuria paroxística nocturna HbS, Hb inestables, HbS, HbC y otras; talasemias Déficit de G₆PDH, PK y otras enzimas</p>
A. hemolíticas extracorpúsculares	<p>Autoanticuerpos</p> <p>Aloanticuerpos</p> <p>Traumatismos constantes</p> <p>Microcirculación alterada</p> <p>Grandes hematomas</p> <p>Físicas</p> <p>Químicas Toxi-infecciosas</p> <p>Parasitarias</p>	<p>Linfomas, leucemias, lupus, cepas, virosis, idiopatías Sensibilización anti-Rh y otras, accidentes transfusionales Válvulas cardíacas mal implantadas, marcha exagerada Vasculitis, poliarteritis nodosa, coagul. Intravascular diseminada Cefalohematoma del recién nacido, traumatismos violentos. Congelamiento, quemaduras extensas, irradiación Fenilhidrazina, anilinas, otros oxidantes Clostridium, estrepto y estafilococo, otros microorganismos Crisis maláricas, bartonelosis</p>
Anemias por hemorragia aguda		

5.2.2. Anemias regenerativas

Las anemias regenerativas son aquellas en que existe pérdida de GR por hemorragia o por hemólisis (intravascular o extravascular). Son anemias de causa periférica; la médula ósea intenta compensar la anemia aumentando la producción de hematíes, por lo cual el recuento de reticulocitos aumenta (IPR: > 3).

Anemias hemolíticas

Las anemias hemolíticas pueden deberse a causas propias de los GR (Anemias hemolíticas intracorpúsculares) o ajenas a ellos (Anemias hemolíticas extracorpúsculares) (ver capítulo 8).

Las **anemias hemolíticas intracorpúsculares**, pueden deberse a alteraciones en la membrana (Ej. Esferocitosis hereditaria), defectos enzimáticos (Ej. Déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) y alteraciones en la hemoglobina (Ej. Talasemias).

Las **anemias hemolíticas extracorpúsculares**, pueden tener como causa mecanismos inmunes (alo o autoanticuerpos), agentes tóxicos e infecciosos (plomo, venenos de serpientes, toxinas bacterianas, parásitos), factores mecánicos (anemia hemolítica microangiopática y anemia hemolítica por prótesis cardíacas), y secuestro de hematíes en el bazo (hiperesplenismo).

b) Anemias post-hemorrágicas

La gravedad y síntomas de la anemia están dados por el volumen de sangre perdido y el período de evolución del proceso de base, que puede o no dar tiempo a que el organismo utilice mecanismos compensatorios. Las hemorragias pueden ser agudas o crónicas (ver capítulo 9).

En las anemias por hemorragia aguda, la pérdida de sangre puede ser evidente (hematemesis, melena, ginecorragia, hemoptisis, epistaxis, hematuria) o no serlo (hemoperitoneo, hematoma retroperitoneal, hemotórax, fractura de cadera o pelvis). El aumento de la eritropoyesis puede tardar en manifestarse, de manera que es posible no encontrar reticulocitosis en las primeras horas de la hemorragia. Por otra parte, la Hb liberada de los GR extravasados en los lugares de acumulación de la sangre en las hemorragias ocultas, sufre la transformación que lleva a la producción de bilirrubina no conjugada que al pasar a la sangre produce hiperbilirrubinemia. Ésta, combinada con la anemia y la reticulocitosis puede simular una anemia hemolítica.

En las anemias por hemorragia crónica, la pérdida de GR implica una disminución del hierro (presente en la hemoglobina) lo que produce un agotamiento de sus reservas. Esto explica que se comporte como una anemia arregenerativa (sin reticulocitosis), microcítica e hipocrómica.

El tratamiento adecuado de las anemias requieren establecer previamente los mecanismos subyacentes.

Los niños, las mujeres y los ancianos son los grupos de población en mayor riesgo para desarrollar este tipo de alteraciones, razón por la cual el médico ha de prestar particular atención a su evaluación.

Basándose en una adecuada anamnesis, examen físico minucioso, y en el estudio riguroso del hemograma con recuento de reticulocitos, así como la realización de algunos exámenes complementarios, se puede formular el diagnóstico correcto de la mayoría de las anemias.

LECTURAS SUGERIDAS

Blackall, D.P., Marques, M., "Hemolytic uremic syndrome revisited: Shiga toxin, factor H, and fibrin generation". *Am J Clin Pathol.* 121 Suppl:S81-8, 2004.

Dhaliwal, G.; Cornett, P.A.; Tierney, L.M. Jr. "Hemolytic anemia". *Am Fam Physician;* 69(11):2599-606, 2004.

Gasche, C.; Lomer, M.C.; Cavill, I.; Weiss, G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut;* 53(8):1190-7, 2004.

Gilsanz, F. "Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación", *Medicine;* 7(28):1169-1171, 1996.

Hill, J.; Walsh, R.M.; McHam, S.; Brody F.; Kalaycio, M. "Laparoscopic splenectomy for autoimmune hemolytic anemia in patients with chronic lymphocytic leukemia: a case series and review of the literature". *Am J Hematol.;*75(3):134-8, 2004.

Maciejewski, J.P., Selleri, C. "Evolution of clonal cytogenetic abnormalities in aplastic anemia". *Leuk Lymphoma;* 45(3):433-40, 2004.

Ricard, A. "Protocolo de actitud diagnóstica en las anemias", *Medicine;* 7(28):1220-1222, 1996.

Richard Lee, G., **Wintrobe's Clinical Hematology**, Capítulos 29 y 30, Décima edición, Editorial Williams & Wilkins, Baltimore, 1998.

Shah, S., Vega, R. "Hereditary spherocytosis". *Pediatr Rev.*; 25(5):168-72, 2004.

Testa, U. "Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis". *Leukemia*;18(7):1176-99, 2004.

Wilson, A.; Yu H.T.; Goodnough, L.T.; Nissenson, AR. "Prevalence and outcomes of anemia in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature". *Am J Med.*;116 Suppl 7A:50S-57S, 2004.

Wingard R. "Increased risk of anemia in dialysis patients with comorbid diseases". *Nephrol Nurs J*;31(2):211-4, 2004.

APLASIA MEDULAR

Claudio Mosso Ch., Claudia Paris D. y Rosario Silva C.

1. Introducción

2. Aplasia medular adquirida

- 2.1. Epidemiología
- 2.2. Cuadro clínico
- 2.3. Estudios de laboratorio
 - 2.3.1. Sangre periférica
 - 2.3.2. Otros estudios de laboratorio
 - 2.3.3. Médula ósea
- 2.4. Etiología
- 2.5. Fisiopatología
- 2.6. Tratamiento y evolución de la aplasia medular
 - 2.6.1. Tratamiento de soporte
 - 2.6.2. Tratamiento y respuesta

3. Aplasias medulares hereditarias y/o congénitas

- 3.1. Anemia de Fanconi
- 3.2. Disqueratosis congénita
- 3.3. Síndrome de Shwachman-Diamond
- 3.4. Hipoplasia cartílago-pelo
- 3.5. Síndrome de Pearson
- 3.6. Disgenesia reticular
- 3.7. Trombocitopenia amegacariocítica
- 3.8. Anemia Blackfan-Diamond
- 3.9. Neutropenia congénita severa (síndrome Kostmann)
- 3.10. Trombocitopenia con ausencia de radio

RESUMEN

La aplasia medular es una patología poco frecuente, pero condiciona una alta morbimortalidad asociada. Durante las últimas décadas, en la medida que ha aumentado el conocimiento sobre la fisiología normal de la médula ósea y de los fenómenos inmunológicos involucrados en su fisiopatología se ha logrado desarrollar herramientas terapéuticas que han cambiado el pronóstico. En el presente capítulo se revisan las diferentes formas de aplasia medular, tanto congénitas como adquiridas, las diferentes hipótesis actuales acerca de su fisiopatología y se muestran las diferentes formas de tratamiento y sus resultados.

1. INTRODUCCIÓN

La falla medular está caracterizada, desde el punto de vista clínico y de laboratorio, por una disminución variable en los recuentos periféricos de los elementos sanguíneos (glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas); estas citopenias tienen su origen en una marcada reducción en la producción efectiva de ellos por la médula ósea. Esta alteración puede ser de una serie específica (monocitopenia) o de todas ellas (pancitopenia). La disminución de la entrega de células maduras desde la médula ósea a la circulación puede estar dada por alteraciones en el número de progenitores hematopoyéticos, como en el caso de la aplasia medular adquirida o en la anemia de Blackfan Diamond, donde se observa una médula con celularidad disminuida en forma global o para una línea específica, respectivamente, o por alteraciones en la maduración de estos precursores. En este último caso se encuentra una médula con celularidad aumentada, pero con detención maduracional, llamada hematopoyesis ineficaz.

En este capítulo, se revisan los diferentes tipos de aplasia medular (AM): adquiridas y congénitas, desde el punto de vista clínico, laboratorio y tratamiento.

El primer caso de AM adquirida fue descrito en el año 1888 por Paul Ehrlich en una autopsia de una paciente embarazada quien presentaba anemia severa, hemorragias cutáneas y fiebre. En la autopsia se encontró que la médula ósea se encontraba reemplazada por grasa. Posteriormente, durante el siglo XX se describieron muchos y diferentes cuadros asociados a diferentes grados de aplasia o hipoplasia medular, de diferentes etiologías y cursos clínicos. Se ha avanzado en forma importante en la comprensión de su fisiopatología y su tratamiento, logrando en la actualidad, pese a la severidad de la mayoría de las formas de aplasia, alcanzar tasas de curación importantes y definitivas.

La AM se caracteriza por la presencia de una pancitopenia de mayor o menor severidad asociada a una marcada disminución en el número de progenitores en la médula ósea. Sus causas pueden ser adquiridas, o hereditarias (no necesariamente expresadas al nacimiento) o congénitas (expresadas desde el nacimiento). Las causas de la aplasia medular son múltiples y su curso clínico también es variable. En la tabla 5-1 se describe una clasificación de la AM considerando el momento de aparición de la misma.

Tabla 5-1. Clasificación de la aplasia medular

<p>Hereditarias</p> <ul style="list-style-type: none"> Anemia de Fanconi Disqueratosis congénita Síndrome Schwachman-Diamond Disgenesia reticular Trombocitopenia amegacariocítica Anemia aplástica familiar Síndromes mielodisplásicos Síndromes no hematológicos (S. Down, S. Shekel, S. Dubowitz) <p>Adquiridas</p> <ul style="list-style-type: none"> Secundarias <ul style="list-style-type: none"> Radiación Drogas Virus Enfermedades inmunológicas <ul style="list-style-type: none"> Fascitis eosinofílica Hipogammaglobulinemia Timoma Embarazo Hemoglobinuria paroxística nocturna Preleucémica Idiopática

Desde un punto de vista de la severidad se clasifica en aplasia medular severa cuando se cumplen en sangre periférica al menos dos de los siguientes requisitos: neutrófilos menor a 500/ μ L, recuento de plaquetas menor a 20.000/ μ L e índice reticulocitario menor a 1%.

Además, la biopsia de médula ósea debe tener menos de un 25% de la celularidad normal. Si no se cumplen estos criterios el cuadro se clasifica como aplasia medular leve o moderada, lo que determinará la conducta terapéutica y pronóstico (tabla 5-2).

Tabla 5-2. Definición de severidad en aplasia medular

Aplasia medular severa (Camita <i>et al</i> , 1976)	<ul style="list-style-type: none"> • Médula ósea celularidad menor al 25% ó 25 – 50% con menos de 30% cel. hematopoyéticas • Sangre periférica (dos de los 3 criterios) Neutrófilos menores de 500 Plaquetas menores 20.000 Reticulocitos menores a 1%
Aplasia medular muy severa (Bacigalupo <i>et al</i> , 1988)	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos menores de 200
Hipoplasia o aplasia leve	<ul style="list-style-type: none"> • Paciente con pancitopenia que no cumple requisitos anteriores

2. APLASIA MEDULAR ADQUIRIDA

Esta es la forma más frecuente de aplasia, y en esta denominación se incluyen los pacientes con pancitopenia asociada a hipoplasia o aplasia medular, en los que no existe evidencia de enfermedad hereditaria y se descartan otras causas secundarias de pancitopenia.

2.1. Epidemiología

La incidencia anual de aplasia medular presenta una distribución geográfica característica, con un patrón opuesto a la distribución de leucemia, ya que tiene una mayor incidencia en los países del tercer mundo y menor en Europa y Estados Unidos. Grandes estudios prospectivos muestran que en los países desarrollados, la AM tiene una incidencia de 2 casos por millón de habitantes, sin embargo esta alcanza hasta 6 casos por millón en algunas regiones rurales de Tailandia; en Latinoamérica existen escasos estudios epidemiológicos, en Ciudad de México se ha reportado una incidencia de 3,9 casos por millón de habitantes con una significativa mayor incidencia en la población pediátrica (4,2 casos/10⁶/año). En Chile no se cuenta con estudios de incidencia real, ya que desde el año 1998 que se encuentra en funcionamiento el Registro Nacional de AM cuyos resultados se encuentran pendientes debido al corto tiempo de observación.

Con respecto a la distribución por sexos es de 1:1 y la distribución de la mortalidad, muestra que ésta es uniforme hasta los 55 años, incrementándose sustancialmente desde esa edad.

Los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad parecen ser algo diferentes entre los países desarrollados y en vías de desarrollo, así por ejemplo, si bien la forma predominante en todo el mundo es la aplasia medular adquirida idiopática, porque no se logra establecer un agente causal, en Europa se reporta como uno de los factores de riesgo principales los fármacos, en Asia la mayor incidencia está relacionada a estatus socioeconómico bajo, exposición a solventes y cultivo de arroz.

2.2. Cuadro clínico

Los pacientes con AM se presentan frecuentemente con síntomas de anemia, asociados a hemorragias de piel y mucosas y en los adultos con alteraciones visuales secundarias a hemorragias intrarretinales. La neutropenia se manifiesta con la presencia de

úlceras bucales, infecciones bacterianas y fiebre. Los síntomas de anemia se caracterizan por palidez, decaimiento y taquicardia, en general bien tolerada, ya que su velocidad de instalación es lenta, a no ser que se agregue una hemorragia importante asociada a la trombocitopenia.

La aparición de esta sintomatología depende de la velocidad de instalación de la enfermedad y también de la vida media de los elementos sanguíneos, esto explica que, en general, los pacientes presenten manifestaciones hemorrágicas e infecciosas antes o de mayor cuantía que las manifestaciones anémicas (Vida media de plaquetas 8-10 días, neutrófilos 7-9 horas y eritrocitos 120 días).

2.3. Estudios de laboratorio

2.3.1. Sangre periférica

En la AM, los recuentos celulares están uniformemente disminuidos, comprometiéndose, en general, de manera más severa la serie blanca y las plaquetas (50% de los pacientes presentan menos de 20.000/ μ L al diagnóstico). El frotis muestra habitualmente anemia normocítica o macrocítica y normocrómica. El RDW (plano de distribución del glóbulo rojo), que es un índice de anisocitosis, se encuentra normal y el recuento reticulocitario está disminuido. El tamaño de las plaquetas es normal, sin presencia de macroplaquetas u otros rasgos displásicos. El número de granulocitos está disminuido, pero su función fagocítica y bactericida es normal.

2.3.2. Otros estudios de laboratorio

El estudio de la hemoglobina (Hb) puede exhibir un incremento de la hemoglobina fetal que muestra el estrés medular compensatorio. Existe un incremento en la expresión del antígeno I en los eritrocitos, lo que aumenta su riesgo de lisis por anticuerpos fríos.

Los niveles de folato y vitamina B₁₂ son normales y la eritropoyetina se encuentra elevada en un mayor rango que el esperable para el grado de anemia. El hierro sérico se encuentra normal o aumentado y la capacidad de fijación de la transferrina (TIBC) se halla saturada, y la ferritina sérica se encuentra elevada.

Las pruebas de función hepática se encuentran alteradas en los pacientes en que la aplasia se asocia a hepatitis. Los niveles de inmunoglobulinas están ocasionalmente disminuidos.

Los estudios cromosómicos son habitualmente normales, sin embargo en el último tiempo se han descrito alteraciones genéticas inespecíficas, que no se han asociado a pronóstico ni a respuesta a tratamiento.

2.3.3. Médula ósea

El diagnóstico de AM debe ser hecho a través de mielograma y biopsia de médula ósea, ya que la celularidad debe ser evaluada desde un punto de vista cuantitativo y cualitativo (figura 5-1). Fundamental es la biopsia medular, la que muestra, habitualmente, hipocelularidad con espículas vacías y reemplazo por grasa. La celularidad observada es en base, predominantemente de linfocitos y células plasmáticas (ver capítulo 27).

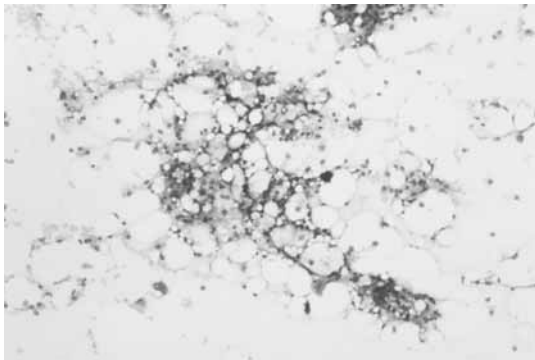


Figura 5-1. Mielograma de paciente con Aplasia medular. Se observa celularidad disminuida en los grumos de médula ósea.

2.4. Etiología

En la gran mayoría de los casos de AM adquirida es difícil establecer un factor causal y por esta razón son catalogadas de “idiopáticas”, existen otros casos en que se puede identificar claramente una causa, y en otros en que podría existir un factor del huésped asociado a una mayor incidencia de la enfermedad, tal es el caso de la alta asociación del antígeno de histocompatibilidad HLA-DR2, que se describe con una frecuencia de dos veces sobre la población normal en pacientes portadores de la enfermedad; su relación etiopatogénica aún no está definida.

Muchos de los pacientes recién diagnosticados han estado expuestos en forma previa a la aparición de los síntomas a fármacos o sustancias potencialmente mielotóxicas las que también se encuentran al interrogar a población sana, sin la enfermedad, por esta razón es difícil encontrar una clara relación causa efecto entre un medicamento y un paciente determinado. Además es necesario considerar que la evolución clínica, manejo y respuesta al tratamiento están relacionados más a la severidad de la enfermedad que al agente causal, de esta forma la aplasia secundaria a fármacos o tóxicos tiene un pronóstico similar a las formas idiopáticas. La otra relación causal es con enfermedades infecciosas virales; está clara y bien definida la aplasia post-hepatitis y su relación causal.

En la tabla 5-3 se detallan los medicamentos y agentes infecciosos asociados a la Aplasia medular.

Tabla 5-3. Clasificación de fármacos y agentes infecciosos asociados a aplasia medular

Fármacos	
	Drogas que habitualmente producen aplasia
	Agentes quimioterápicos
	Benceno
	Reacciones idiosincráticas
	Cloranfenicol
	Antiinflamatorios no esteroidales
	Sulfas
	Antiepilépticos y sicotrópicos
	Drogas antitiroideas
	Sales de oro, alopurinol, penicilamina.
Virus	
	Virus Ebstein Barr
	Virus Hepatitis A, No A, No B, No C, No G
	VIH

2.5. Fisiopatología

Desde el punto de vista teórico, la aplasia medular se debe a una alteración numérica o funcional de las células troncales hematopoyéticas, a alteraciones en el estroma de la médula ósea o a una combinación de ambas.

Las células troncales hematopoyéticas (“*Stem cells*”, SC) se caracterizan por su alta capacidad proliferativa, el potencial para diferenciarse a las diferentes líneas celulares, su propiedad de renovarse a sí mismas (capacidad de generar otras SC por mitosis sin diferenciación) y desde el punto de vista inmunológico marcan para un tipo de antígeno específico, CD34+ (ver capítulos 1 y 2). Estas células se definen además por su capacidad de repoblar el compartimiento hematopoyético de animales letalmente irradiados. Al estudiar esta población celular en los pacientes con AM, a través de citometría de flujo, se ha descrito una marcada disminución en el número de ellas.

Funcionalmente, las células hematopoyéticas diferenciadas, que normalmente son capaces de formar colonias eritroides, mieloides y megacariocíticas están también muy reducidas y los análisis *in vitro* de células hematopoyéticas muy primitivas muestran una marcada disminución.

Los pacientes con aplasia medular presentan pancitopenia cuando los progenitores hematopoyéticos han caído a menos del 1% de los valores normales. Esto indica que las células hematopoyéticas presentan una gran capacidad de compensación.

En condiciones normales, la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas depende de factores de crecimiento específicos y de la indemnidad del estroma medular (ver capítulos 1 y 2) y este podría ser un factor que produce la aplasia medular, sin embargo, se ha demostrado una función celular normal en las células estromales, y niveles circulantes y producción *in vitro* de citoquinas en rangos normales o incluso elevados. Esta evidencia es comprobada desde el punto de vista clínico, si consideramos que al someter a los pacientes a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) (ver punto 2.6.2.a y capítulo 16), las células estromales continúan siendo de origen del huésped y permiten el sostén y posterior repoblamiento de la médula con SC provenientes de un donante sano. Además, la estimulación con factores de crecimiento es

habitualmente ineficaz para mantener una adecuada hematopoyesis. Así se puede entender que la aplasia medular se produce fundamentalmente por un daño directo sobre las células troncales; éste puede producirse en forma directa o a través de un mecanismo inmunológicamente mediado:

Daño directo

La forma más común de aplasia transitoria o definitiva es iatrogénica al uso de drogas citotóxicas o radioterapia como tratamiento antineoplásico, en estos casos los agentes actúan directamente o a través de intermediarios dañando el DNA celular impidiendo la proliferación y/o desencadenando mecanismos apoptóticos (muerte celular programada); los derivados del benceno utilizan el mismo mecanismo. Este mecanismo de daño también puede explicar la presencia de reacciones idiosincráticas de algunos medicamentos, ya que el polimorfismo genético en alguna de las enzimas responsables de su degradación produce metabolitos intermediarios que actúan como tóxicos medulares (figura 5-2).

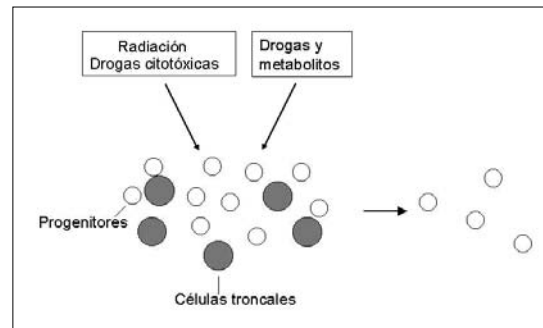


Figura 5-2. Daño a precursores hematopoyéticos por toxicidad directa.

Daño inmunológicamente mediado. El descubrimiento clínico de la mejoría de la pancitopenia en pacientes sometidos TPH que presentaron recuperación autóloga, sugirió que la inmunosupresión a que habían sido sometidos, como parte de su tratamiento de acondicionamiento, permitía la recuperación de la función normal de sus propios progenitores hematopoyéticos, estos hallazgos promovieron el desarrollo del tratamiento inmunosupresor en aplasia medular, además de desarrollar una hipótesis de que el daño de la SC es mediado por activación de una respuesta inmunológicamente mediada. La activación de

linfocitos T (LT) es la responsable del daño a nivel medular, los LT activados producen interferón ($IFN\alpha$), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 2 (IL-2), todas estas citoquinas son capaces de inhibir la proliferación de células hematopoyéticas y SC quiescentes. $IFN\alpha$ y TNF suprimen la hematopoyesis dañando el ciclo mitótico celular, además ambos inducen la expresión del receptor FAS (CD95) en la membrana de la célula $CD34+$, la activación de este receptor y su ligando (FA5-L) activa las vías apoptóticas (figura 5-3).

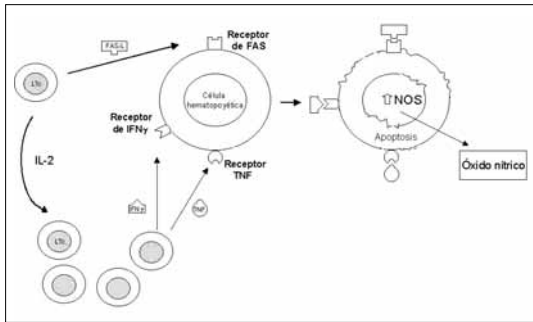


Figura 5-3. Mecanismos inmunes comprometidos en aplasia medular. Linfocitos T citotóxicos (LTc) activados cumplen un importante rol en la destrucción de las células hematopoyéticas, ellos producen citoquinas como interferón γ ($IFN\gamma$) y factor de necrosis tumoral TNF los que por acción directa o por activación de receptor FAS desencadena el daño celular. $IFN\gamma$ a través del factor regulador de interferón 1 (IRF-1) produce la inhibición de la transcripción y detención ciclo celular además de aumentar la producción de óxido nítrico (NO) por activación de óxido nítrico sintetasa inducible, este aumento de óxido nítrico produce daño tóxico en otras células. La activación del receptor FAS a través de FAS ligando desencadena la apoptosis. NOs, NO sintetasa

Sin embargo, aún no está completamente definido, cuáles son los eventos iniciales que

preceden la activación de LT citotóxicos, es posible que exista la participación de LT $CD4+$ en la mantención de la respuesta, pero aún no es claro cuál es el antígeno inicial que gatilla la activación de esta respuesta. Uno de los eventos iniciales mejor documentados es la asociación entre virus de la hepatitis y aplasia medular. La aplasia medular es una complicación infrecuente de la hepatitis, se observa con mayor frecuencia en pacientes con hepatitis por virus no A, no B, no C y no G; en estos casos la infección viral gatilla la producción de proteínas virales y de proteínas normales aberrantes, las que son presentadas por una célula presentadora de antígenos a LT, quienes se activan y proliferan produciendo la eliminación de las células infectadas, en algunas ocasiones esta activación persiste produciendo daño autoinmune. En el caso de la aplasia asociada a fármacos, se ha postulado un mecanismo similar.

2.6. Tratamiento y evolución de la aplasia medular

La evolución del paciente con AM dependerá de la severidad, de la causa de la AM y de la terapia ofrecida. Wolf en 1957 describe una sobrevida de sólo un 3%. En otras series previas a 1965 se describe sobrevida entre 10 y 35%, incluso hay una serie de Shahidi y Diamond que encontró 2 pacientes que respondieron, pero que posteriormente recurrieron. Aunque todas estas series no fueron estrictas con los criterios de gravedad.

Se han hecho esfuerzos por encontrar un criterio que al diagnóstico haga prever la evolución de la enfermedad y de acuerdo a eso ofrecer la terapia más adecuada (ver tabla 5-4).

Tabla 5-4. Resultados del tratamiento de aplasia medular con trasplante de médula ósea de acuerdo a edad del paciente

	Año de reporte	Año de trasplante	nº pacientes	Edad (años) mediana (rango)	Sobrevida %
IBMTR	1997	1996 - 80	186	19 (2-56)	48
		1981 - 87	648	20 (1-57)	61
		1988 - 92	471	20 (1-51)	66
IBMTR	2000	1991 - 97	874	1- 20	75 ± 3
			696	21-40	68± 4
			129	> 40	35± 18

La terapia del paciente se inicia una vez sospechado el diagnóstico, con todas las medidas de soporte y una vez completado el estudio el tratamiento definitivo.

2.6.1. Tratamiento de soporte

a) Nutrición

Es necesario dar un aporte nutricional adecuado, ya que fácilmente se incrementan los requerimientos basales (infecciones especialmente), y de no ser cubiertos rápidamente llevarán al paciente a una desnutrición. De ser necesario se debe precozmente iniciar nutrición parenteral.

b) Soporte transfusional

El apoyo transfusional de plaquetas y de glóbulos rojos ha significado un importante avance en la sobrevivencia de los pacientes, ya que ha cambiado la causa de muerte de hemorragia a infección. A continuación se detallan los requerimientos transfusionales de los pacientes portadores de AM. Debe destacarse que considerando la alta frecuencia con que estos pacientes requieren transfusiones y considerando el tratamiento definitivo de ellos, es que todos los esfuerzos del equipo tratante, deben estar enfocados a disminuir el riesgo de secuelas debido a accidentes hemorrágicos y evitar la sensibilización y disminuir el riesgo de enfermedades transmisibles a través de las transfusiones; por esto, todos los productos deben ser idealmente filtrados e irradiados.

Hemorragia. Se debe transfundir plaquetas si el paciente presenta recuento de 10.000/ μ L o menor, o si presenta algún sangramiento o un cuadro febril no controlado. Es de elección el uso de plaquetas provenientes de aféresis de donante único, ya que disminuye el riesgo de aloinmunización y de refractariedad a la transfusión de plaquetas.

Otras medidas para evitar el sangramiento incluye una buena higiene dental, cepillos suaves, evitar traumas (suspender deportes violentos o de riesgo). Toda punción para extracción de sangre debe ser seguida de compresión firme por 15 minutos. El sangramiento local puede ser manejado con tratamiento tópico y agentes antifibrinolíticos como el ácido tranexámico, pero en caso de sangramientos mayores no es suficiente. También se debe evitar el uso de fármacos que interfieren con la función plaquetaria, como el

ácido acetil salicílico o los antiinflamatorios no esteroideos.

Anemia. La reposición de glóbulos rojos lavados o filtrados para remover los leucocitos y evitar la sensibilización, debe ser efectuada en tanto sea necesario. Inicialmente el paciente puede requerir valores de hemoglobina mayor, alrededor de 9 g/dL, pero posteriormente, como anemia crónica compensada, puede manejarse con valores bajos, incluso de 6 g/dL. La transfusión a largo plazo puede llevar a niveles críticos de sobrecarga de hierro, pudiendo producir daño en el corazón, hígado y sistema endocrino. La desferoxamina debe ser indicada en los pacientes crónicamente transfundidos, antes de que se produzca daño, lo que ocurre habitualmente con alrededor de 50 unidades transfundidas.

c) Infecciones.

El sistema inmune específico se mantiene intacto, lo que contrasta con los pacientes con la aplasia secundaria a quimioterapia. El riesgo de infección bacteriana en los pacientes con aplasia medular va incrementando en la medida que aumenta la neutropenia. Por otro lado la neutropenia evita el desarrollo de respuesta inflamatoria, lo que hace difícil detectar un foco infeccioso. Las bacterias pueden ser tanto gérmenes gram negativos como positivos. El uso de antibióticos profilácticos no tiene indicación. En el contexto de neutropenia y fiebre, se deben realizar los cultivos que correspondan y luego usar un esquema antibiótico de amplio espectro, de acuerdo a la flora y sensibilidad bacteriana que predomine en el lugar donde se encuentra el paciente, de la presencia de un foco clínico evidente y del estado general del paciente al momento de presentarse la infección. El tratamiento debe completarse por 14 días aunque el cultivo sea negativo. Las infecciones por hongos se presentan frecuentemente en los pacientes que han recibido repetidos e intensos esquemas terapéuticos con esquemas inmunosupresores (ver punto 2.6.2) o con neutropenia prolongada; la candidiasis y la aspergilosis son en muchos casos la causa de muerte, por lo que si el paciente persiste febril en el tiempo y no responde al esquema antibiótico debe ser reevaluada esta posibilidad y agregarse terapia antifúngica junto a la readecuación del esquema.

La transfusión de granulocitos no está indicada. Muy importante es la prevención de las infecciones, con una cuidadosa higiene bucal, comidas todas cocidas o procesadas y al

momento de contacto con el paciente un prolijo lavado de manos.

2.6.2. Tratamiento y respuesta

El tratamiento tiene por objetivo restituir la producción de las series hematopoyéticas. Para llegar a esto actualmente existen dos líneas terapéuticas principales, que son el trasplante de médula ósea y la inmunosupresión usando linfoglobulina antitímocítica, ciclosporina y metilprednisolona

a) Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Para el TPH, las células son obtenidas de donantes familiar, con estudio de HLA-A, HLA-B y HLA-DR compatibles. Antes del trasplante al paciente se le hace el acondicionamiento, habitualmente con ciclofosfamida y Timoglobulina, inmunosupresión necesaria para eliminar el factor de autoinmunidad como

elemento etiopatogénico, prevenir el rechazo del trasplante y de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) (ver capítulo 16).

La recuperación de la médula hematopoyética después del trasplante es rápido, completo y estable. Los rangos de sobrevida pueden ser tan altos como 90%, pero los registros varían entre 75 a 80%, (tabla 5-5). Sin embargo, la sobrevida es edad dependiente (75% en los menores de 20 años, 68% entre los 20 y 40 años, y 35 % en los pacientes mayores de 40 años) en un análisis publicado por Horowitz MM., del International Bone Marrow Transplant Registry. Además de las complicaciones cercanas al momento del trasplante, existen las complicaciones a largo plazo, incluyendo enfermedad pulmonar restrictiva u obstructiva (25%), osteoporosis (18%) y tumor sólido (12%). Todas las complicaciones son más frecuentes en los pacientes que presentan GVHD.

Tabla 5-5. Comparación entre diferentes esquemas de tratamiento de aplasia medular

Objetivo del Estudio	Severidad de la AM	% de respuesta (tiempo evaluación)	Sobrevida (1 año)	Referencia (año)
Comparar ATG vs CsA				
ATG vs CsA	severa	6/12 (3 ms)	0.64/0.70	1992
ATG+CsA vs CsA	no severa	74/46*(6 m)	0.93/0.91	1999
ATG+CsA vs CsA+G-CSF	severa	55/23* (4 m)	0.82/0.71	1999
Sinergismo con ATG				
ATGvs ATG+oximetolona	severa	40/56* (4 m)	0.71/0.73 (2 a)	1983
ATG vs ATG+CsA	severa	31/58* (3 m)	0.55/0.80 (2 a)	1991
Rol de factores de crecimiento				
ATG vs ATG+GM-GSF	severa	64/18 (3 m)	no informada	1991
ATG+CsA vs ATG+CsA+G-CSF	severa	45/83* (4 m)	0.82/0.81 (2 a)	1999

(* Estadísticamente significativo)

b) Tratamiento inmunosupresor. La globulina antilinfocítica (ALG) o antitímocítica (ATG) se usó para el acondicionamiento de los TPH en las AM, pero, G. Mathé observó en 2 pacientes que fueron acondicionados, pero no trasplantados que su médula ósea presentó recuperación. Posteriormente otros trabajos confirmaron la actividad terapéutica, Speck mostró una respuesta de 62% en los pacientes tratados con ATG y posteriormente en 1983 se publicó la superioridad de ésta sobre el tratamiento de soporte o de los andrógenos. La respuesta varía entre un 40 y 70%, independiente de la etiología. El mecanismo de acción de este suero sería estimular la producción y liberación de

factores de crecimiento por los linfocitos periféricos, pero éstos siempre están aumentados en los pacientes con AM. La actividad antilinfocítica directa sería el principal mecanismo de acción. La ATG rápidamente descende el recuento de los linfocitos, al 10% de lo que había al inicio de la infusión. Otras drogas han sido probadas, comparando su efecto aislado, como la asociación a la ATG.

c) Corticoides. Como agente único en dosis bajas es inefectivo. La metilprednisolona en dosis muy altas produce remisión, pero con alta toxicidad a corto y largo plazo. Actualmente se usa sólo en periodos cortos, en dosis moderada,

para disminuir el efecto adverso de la ATG, como la anafilaxia y la enfermedad del suero.

d) Ciclofosfamida. Se hizo estudios a dosis baja en 1980, sin respuesta en la mayoría, pero a partir del año 2000 nuevamente se retomaron los estudios, ahora a dosis alta, resultando efectiva, pero con importantes complicaciones, por lo que se suspendió el estudio y se recomendó dejarlo para aquellos pacientes que no respondían a otros esquemas terapéuticos.

e) Anticuerpos monoclonales. Se han estudiado anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos de los linfocitos T. A excepción de reportes anecdóticos, nada ha

probado como tratamiento.

f) Ciclosporina A. La ciclosporina A (CsA) es una potente droga inmunosupresora, inhibe la transcripción de genes para IL2, INF γ , y otras citoquinas, bloqueando las etapas centrales de la respuesta inmune. Induciría o mantendría una remisión por interferencia de la producción de citoquinas inhibitoras o por inhibición de la apoptosis de las células hematopoyéticas. Es la única droga que ha demostrado tener eficacia en la AM comparable a la ATG, pero los estudios han demostrado que su efecto es mayor al asociarla a la ATG. Investigaciones clínicas de las últimas décadas han permitido establecer la mejor terapia para los pacientes con AM (tabla 5-6).

Tabla 5-6. Síndromes de Aplasia Medular Hereditaria por orden de frecuencia

Síndrome	Tipo de herencia
Anemia de Fanconi	Autosómica recesiva
Anemia Blackfan-Diamond	Autosómica dominante Recesiva y esporádica
Disqueratosis congénita	Recesiva ligada Cr X Autosómica recesiva Autosómica dominante
Síndrome Shwachman-Diamond	Autosómica recesiva
Trombocitopenia con ausencia de radio	Autosómica recesiva
Neutropenia congénita severa	Autosómica recesiva
Trombocitopenia amegacariocítica	Autosómica recesiva
Síndrome de Pearson	Mitocondrial

Actualmente el tratamiento inmunosupresor recomendado es el uso de ATG asociado a CsA, metilprednisolona y Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). La Sociedad de Hematooncología pediátrica chilena en el año 1998 propuso un protocolo basado en el protocolo español del tratamiento de la AM, con ATG de origen de caballo (15 mg por kg / día por 5 días), asociado a CsA en dosis de 10 mg/ kg y luego regular según niveles plasmáticos (siempre asociado a modificación por signos de toxicidad), y metilprednisolona 5 mg kg/día durante la administración de la ATG para luego pasar a prednisona oral por 23 días, como prevención de la enfermedad del suero. La CsA se mantiene por doce meses, suspendiendo después de tener una respuesta

completa. El G-CSF se usa en dosis de 10 μ g/kg día subcutánea en 2 dosis, desde el día 6 hasta tener un recuento de neutrófilos mayor de 1000/ μ L en 3 días consecutivos.

Independiente del esquema terapéutico usado, la respuesta es lenta con una recuperación de valores dentro de los 3 meses siguientes, sólo entonces se hablará de falta de respuesta, debiendo efectuarse un segundo ciclo terapéutico con ATG (en este caso se prefiere usar ATG de origen de conejo).

Como complicaciones tardías se deben mencionar la recaída, que es esperable en un tercio de los pacientes, que afortunadamente responde a un nuevo esquema terapéutico y la

dependencia a la CsA, descrita en un 25% de los pacientes que han respondido en primera o segunda cura, pero en la mitad de ellos se puede suspender a largo plazo (5 a 8 años). Las enfermedades hematológicas clonales se presentan en un 25%, como Hemoglobinuria paroxística nocturna, Síndrome mielodisplástico (SMD), Leucemia mieloide aguda y Tumor sólido, que se presentarán a largo plazo.

Finalmente si se comparan los resultados de TPH versus inmunosupresión la sobrevivida a 5 años en algunos trabajos son equivalentes, pero la posibilidad de recaída, la respuesta hematológica a veces es incompleta, los efectos adversos de los fármacos, especialmente renales, dependencia a CsA de algunos pacientes, que es droga de alto costo y el 25% de enfermedad clonal o maligna versus los pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor hace que el TPH sea en los menores de 20 años el tratamiento de elección. Entre los 20 y 40 años de edad la diferencia de beneficio versus riesgo y complicaciones del trasplante no lo hace tan claro, pero si la AM es muy severa se recomienda el TPH, y cuando es moderada la aplasia hacer la inmunosupresión. En pacientes mayores a 40 años, hasta 50 años, en caso de AM muy severa se podría recomendar hacer TPH, pero en los otros casos sobre 40 años hacer inmunosupresión.

En todos los casos los TPH deben ser con donante familiar HLA compatible, porque el no

relacionado se recomienda sólo una vez que haya fracasado la inmunosupresión, por el mayor riesgo de complicaciones del trasplante.

En resumen, si el paciente es menor a 50 años y tiene donante familiar compatible se debe hacer TPH. Si es mayor a 50 años y/o no tiene donante familiar hacer inmunosupresión con ATG + CsA, asociado a metilprednisolona y G-CSF si el paciente tiene una neutropenia muy severa o infección. La ciclofosfamida, otra terapia inmunológica como micofenolato o rapamicina o TPH de donante no relacionado debe ser considerada como última medida en un paciente que no respondió y como experimental mientras no haya estudios en grupo de pacientes con un claro resultado comparable tanto en la respuesta, como en las complicaciones.

3. APLASIAS MEDULARES HEREDITARIAS Y/O CONGÉNITAS

Aproximadamente un 25% de las aplasias en la infancia son de causa hereditaria o congénitas o forman parte del síndrome, Anemia Aplástica Constitucional, definido por O'Gorman Hughes como una falla medular asociada a anomalías familiares congénitas o trombocitopenia al nacer. La aplasia congénita puede estar asociado a malformaciones o al desarrollo de algunas neoplasias. Es importante reconocer los síndromes predisponentes, diagnosticarlos y tratarlos oportunamente. La tabla 5-7 muestra los síndromes más frecuentes y su herencia.

Tabla 5-7. Genes asociados a aplasia medular congénita

Enfermedad	Gen	locus	%
Anemia de Fanconi	FANCA	16q24.3	70
	FANCB*	N/I	raro
	FANCC	9q22.3	10
	FANCD1*	N/I	raro
	FANCD2	3p25.3	raro
	FANCE	6p21.3	10
	FANCF	11p15	raro
	FANCG	9p13	10
Anemia de Blackfan-Diamond	RPS19	19p13.3	25
	N/I	8p23.2-p22	35
	N/I	N/I	40
Disqueratosis congénita	DKC1	Xq28	Lig cr X
	DKC2	3q21-28	Dominante
Síndrome de Shwachman-Diamond	N/I	7q1.1	100
Neutropenia congénita severa	ELA2	19p13.3	90
Trombocitopenia Amegacariocítica	c-Mpl	1p35	100
Trombocitopenia con ausencia de radio	N/I	N/I	N/I
Síndrome de Pearson	DNA mitocondrial		100
	Deleción de 2 a 8 kb		

N/I: no identificado, * aún no ha sido clonado

3.1. Anemia de Fanconi

Fanconi en el año 1927 describió a 3 hermanos con pancitopenia asociado a diversas malformaciones (talla baja, manchas café con leche, malformaciones en los pulgares, renales e hipogonadismo), posteriormente se describieron otros casos similares y así el síndrome adoptó su nombre.

Los pacientes pueden ser diagnosticados desde el nacimiento hasta la 5° década de la vida, con una mediana de edad de presentación de 8 años; todas las razas y grupos étnicos están incluidos. La relación entre hombres y mujeres es 1,2:1.

Las manifestaciones de este síndrome al nacer han sido reportadas en el 70% de los pacientes, y en orden de frecuencia decreciente son: hiperpigmentación cutánea o manchas café con leche, talla baja, hipoplasia o ausencia de pulgar con o sin ausencia de radio, criptorquidea e hipogonadismo en los hombres, microcefalia, microftalmia y estrabismo, malformaciones renales (riñón en herradura), bajo peso de nacimiento, retraso del desarrollo psicomotor,

sordera y otras. Existe un 30% de pacientes con Anemia de Fanconi (AF) que no tienen ninguna manifestación somática y debutan como AM.

La AF es una enfermedad autosómica recesiva compleja, fenotípicamente heterogénea, más frecuente en grupos proclives a endogamia como judíos ashkenazi y africanos (1/90). En 1982 se creó un Registro Internacional de AF en la Universidad Rockefeller y se ha estimado que su frecuencia en EEUU y Europa es de 1 recién nacido entre 300 nacimientos.

Considerando que existe una serie de patologías con expresión fenotípica similar a AF, es necesario realizar estudios de laboratorio que entreguen un diagnóstico de certeza. El estudio que permite un diagnóstico certero, es la búsqueda de quiebres cromosómicos espontáneos o inducidos. Las células de los pacientes con AF muestran tendencia a presentar quiebres cromosómicos espontáneos o provocados por agentes inductores de entrecruzamiento del DNA como son: diepoxibutano (DEB) y mitomicina C (MMC) (figura 5-4).

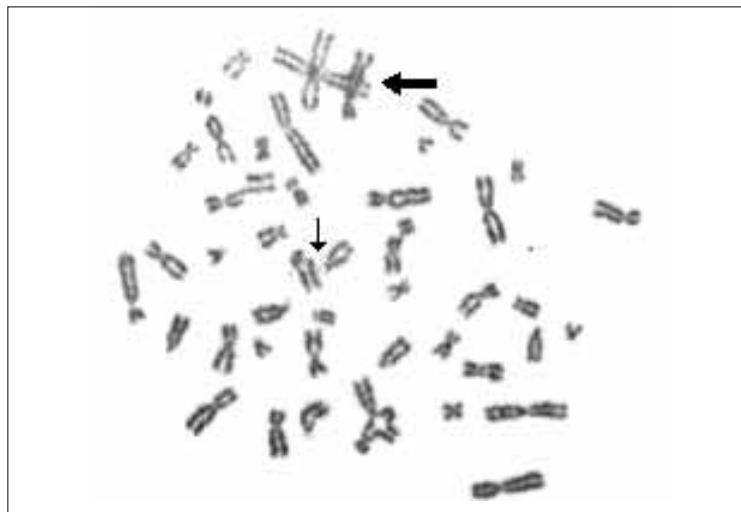


Figura 5-4. Cariograma característico de paciente con anemia de Fanconi. Se observan quiebres cromosómicos (flecha delgada) e imágenes tri y cuadrirradiadas (flecha gruesa).

Las lesiones cromosómicas pueden ser: rupturas, reordenamientos, intercambios y endoreduplicaciones. La fragilidad cromosómica puede efectuarse en linfocitos de sangre periférica, fibroblastos y en células fetales de las vellosidades coriónicas, es una prueba sensible, específica y reproducible que tiene valor diagnóstico incluso en los pacientes en que no se ha desarrollado ninguna citopenia.

Aproximadamente entre un 10-15% puede ser

normal en las AF con mosaicismo somático en que las células hematopoyéticas sufren una corrección génica.

En la actualidad se han reconocido 8 genes de AF y de ellos 7 han sido clonados (tabla 5-7), se denominan FANCA, FANCB, FANCC, FANCD, FANCE, FANCF, FANCG. El gen FANCA, el más frecuente, es altamente polimorfo. Estudios recientes han establecido cierta correlación entre el tipo de mutación y el comportamiento

de la enfermedad. Por este motivo los pacientes FANCA en los que hay ausencia de expresión de una proteína y los pacientes FANCC constituyen un grupo de alto riesgo con peor evolución hematológica y mayor número de malformaciones. La terapia génica aún está en estudio, pero podría ser el futuro del tratamiento de esta enfermedad. Evidencias clínicas sugieren que el producto de los genes A, C, E, F y G forman un complejo nuclear que participa junto a una proteína D2 en la reparación del DNA que es defectuoso produciendo así 2 proteínas BRCA1 y BRCA2, ellas también pueden ser encontradas en otras patologías que se caracterizan por quiebres cromosómicos como: ataxia telangiectasia, síndrome Bloom, Xeroderma Pigmentoso, entre otras (figura 5-5).

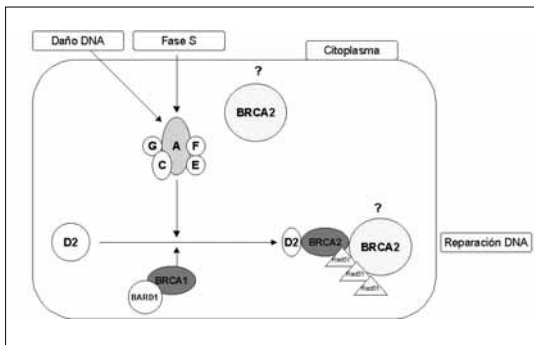


Figura 5-5. Interacción de proteína BRCA en la Anemia de Fanconi.

La complicación más frecuente que compromete la vida es la falla medular que se presenta en el 90% de los pacientes, generalmente aparece en la primera década de la vida, manifestada por trombocitopenia, neutropenia, anemia macrocítica y una médula ósea hipocelular. En la fase previa, aparece macrocitosis y aumento de la hemoglobina fetal. El manejo de la anemia aplásica está indicada cuando la Hb cae bajo 8 g/dL o se hace sintomático, plaquetas menor a 30.000/ μ L, y/o neutrófilos menor a 500/ μ L. El tratamiento de elección es el TPH, sin embargo no previene el desarrollo de tumores sólidos. El acondicionamiento debe ser ajustado por la gran toxicidad al usar dosis habituales debido a su fragilidad cromosómica disminuyendo las dosis de ciclofosfamida y radioterapia, incluso algunos grupos han reemplazado la radioterapia por dosis más altas de ciclofosfamida o busulfan con buenos resultados. La supervivencia con trasplante de médula ósea es mayor a un 70% con donante familiar idéntico y menos de un 40% con donante alternativo. Los pacientes que no

tienen un donante familiar idéntico pueden ser tratados con andrógenos orales, generalmente se usa oximetolona a dosis de 2-5 mg/Kg/día, más del 50% responden a esta terapia, su problema son los efectos adversos como: virilización, disfunción hepática y tumores hepáticos (3% de las AF). Los tumores hepáticos son adenomas y hepatomas, por esto, deben tener un seguimiento y control estricto con estudio de función hepática y ecotomografías periódicas. Si el paciente desarrolla efectos secundarios severos al uso de andrógenos debe ofrecerse un donante alternativo.

Alrededor del 6% de los pacientes con AF desarrollan SMD (ver capítulo 15) caracterizado por: citopenias, dismielopoyesis, diseritropoyesis y megacariocitos anormales, asociado a veces a clones con citogenética anormal. Esto último puede presentarse en pacientes con AF sin manifestaciones de mielodisplasia y no siempre se transforman en leucemia.

El 10% de los portadores desarrollan una leucemia que generalmente es mieloides aguda y de ellas solo un 10% han debutado como SMD y un 25% no tiene antecedentes de aplasia previa ni de AF. Su tratamiento es complicado ya que los esquemas de quimioterapia convencional provocan una alta toxicidad al dañar el DNA y no poder repararlo en forma adecuada en la célula normal, pueden ser tratados con TPH, pero a pesar de esto la mayoría fallece el primer año del debut de la enfermedad.

De los pacientes que no manifiestan una AM, SMD o leucemia, existe el riesgo de desarrollar un tumor sólido, lo que ocurre en un 5% de los casos. Estos tumores comprometen habitualmente cara y cuello, esófago, vulva, cervix uterino, piel (no melanoma), SNC y otros sitios con menos frecuencia. Estos tumores los presentan alrededor de la tercera década de la vida, un 25% no tienen el diagnóstico de AF. En general los pacientes que presentan un tumor sólido viven alrededor de 30 años, debido a la toxicidad de la quimioterapia y radioterapia; solo ayuda la cirugía cuando es posible efectuarla a tiempo.

Los pacientes que desarrollan AM o leucemia y que son curados por un TPH, tienen aumentado el riesgo de un cáncer secundario. En algunas series clínicas ha llegado a ser de un 24% a los 8 años del TPH; los órganos más comprometidos han sido la lengua o piso de la boca.

Las recomendaciones para el control de un paciente con AF son control con hemograma cada 3 meses, mielograma, biopsia de médula ósea y citogenética anual, para pesquisar precozmente SMD, leucemias y aplasia. Las malformaciones deben ser corregidas lo antes posible con apoyo transfusional si fuera necesario. Los pacientes en tratamiento con andrógenos orales deben también controlarse cada 2 a 3 meses con pruebas hepáticas y ecotomografía anual. También deben controlarse en forma dirigida en busca de tumores de cabeza y cuello anualmente todos los pacientes con más de 10 años o todo paciente trasplantado después del primer año de este tratamiento; debe incluirse un examen minucioso de boca y faringe. Endoscopia esofágica en el adulto joven. Examen ginecológico después de la menarquia o 16 años. Debe evitarse el uso de tabaco, alcohol y exposición al sol.

3.2. Disqueratosis congénita

El diagnóstico de la disqueratosis congénita se basa en una triada: (a) **hiperpigmentación** reticulada en cara, cuello, hombros, (b) **uñas distróficas**, que aparecen en la primera década de la vida, y (c) **leucoplaquias** en mucosa oral que se presentan en la segunda década, y además en el 50% de los pacientes aparece AM y un 10% desarrollan una neoplasia entre la tercera y cuarta década de la vida.

La disqueratosis congénita se hereda de 3 formas: recesiva ligada al cromosoma X, autosómica recesiva y dominante, se han descrito en la literatura más de 200 casos clínicos y aproximadamente 50 de ellos son de 7 familias. La triada clásica aparece entre los 5 y 10 años de vida, un 20% de los pacientes desarrollan complicaciones pulmonares con disminución de la capacidad de difusión y defectos restrictivos. Tienen alteraciones oculares que incluyen epifora por bloqueo del conducto lacrimal, blefaritis, pérdidas de pestañas, úlceras, ectropion y conjuntivitis. Son frecuentes las caries y pérdidas dentales. El cabello se cae en forma prematura y se torna grisáceo. Además tienen retardo de crecimiento, talla baja, alteraciones en el aprendizaje y retardo mental, microcefalia, hiperhidrosis, y alteraciones óseas (osteoporosis, necrosis avascular y escoliosis).

La aplasia suele aparecer con una mediana de edad de 11 años, en más del 30% de los pacientes con herencia ligada al cromosoma X

(llegando a un 94% a los 40 años), en más de la mitad de los autosómicos recesivos y rara vez en los autosómicos dominantes.

Los hallazgos de laboratorio son similares a la AF, pero la fragilidad cromosómica es normal, los progenitores hematopoyéticos se encuentran disminuidos o ausentes y los factores estimulantes de colonias no son efectivos. Las diferentes mutaciones pueden verse en la tabla 5-7.

En la disqueratosis congénita en su forma ligada al cromosoma X, se han identificado múltiples mutaciones del gen DKC1, el cual codifica una proteína nucleolar llamada disqueratina, cuyo rol aún no está definido, pero se cree que está relacionado con el ensamblaje del RNA ribosomal. Esta proteína se une a la telomerasa y determina la longitud del telómero, el que se encuentra acortado en esta enfermedad. La AM en la disqueratosis se debe a insuficiencia de la telomerasa.

Esta enfermedad generalmente es mortal por el desarrollo de aplasia, cáncer o las complicaciones de su tratamiento. El 70% de las muertes se deben a la aplasia, 10% a las complicaciones pulmonares, 8% a neoplasias (SMD, leucemia mieloide aguda y carcinomas). No existe ningún tratamiento para esta enfermedad, el TPH, solo mejora a un 30% de los pacientes, independiente del tipo de donante. Puede usarse esteroides anabólicos y factores estimulantes de colonias con efectos transitorios.

3.3. Síndrome de Shwachman-Diamond

Enfermedad hereditaria, autosómica recesiva que cursa con diarrea crónica, neutropenia y condrodisplasia, se han reportado más de 300 casos a través del mundo. Aunque el síndrome de mala absorción está presente precozmente, más del 40% desarrollan una aplasia medular. El diagnóstico se basa en niveles bajos de tripsinógeno, grasa pancreática y disostosis metafisiaria. El gen defectuoso se localiza en el centrómero del cromosoma 7.

El recuento de neutrófilos es inferior a 1500/ μ L, y la evolución de la neutropenia puede ser crónica, intermitente o cíclica, también se puede desarrollar trombocitopenia y anemia. El mielograma es hipocelular con escasa formación de unidades formadoras de colonias. La evaluación citogenética no muestra quiebres cromosómicos.

Entre 5-10% de los pacientes de sexo masculino

pueden presentar leucemia, la mayoría mielóide. También pueden presentar SMD en el 10%, alteraciones citogenéticas con anomalías clonales que involucran al cromosoma 7.

El pronóstico vital es mejor que los pacientes con AF. El tratamiento se hace con reemplazo de enzimas pancreáticas orales. La neutropenia puede mejorar con factor estimulante de colonia de granulocitos. Cuando desarrollan una aplasia severa está indicado el TPH y su éxito es de un 50% con donante no relacionado.

3.4. Hipoplasia cartílago-pelo

Es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por condrodisplasia con disostosis metafisial, extremidades cortas asociadas a manifestaciones hematológicas como neutropenia, anemia macrocítica y linfopenia. Tiene 7 veces más riesgo de desarrollar cáncer. La localización de la enfermedad a nivel genético se encuentra en una mutación localizada en el cromosoma 9 (9p21-p13).

3.5. Síndrome de Pearson

Consiste en una disfunción exocrina del páncreas, acidosis metabólica, neutropenia y anemia refractaria sideroblástica con vacuolización en precursores hematopoyéticos medulares. Su defecto molecular se encuentra en el DNA mitocondrial.

3.6. Disgenesia reticular

Es un desorden muy raro, autosómico recesivo que se caracteriza por ausencia congénita de monocitos y neutrófilos, linfopenia y ausencia de inmunidad celular y humoral. El TPH puede ser efectivo para su mejoría.

3.7. Trombocitopenia amegacariocítica

Esta enfermedad se caracteriza por trombocitopenia de aparición precoz, en periodo de lactante con ausencia de malformaciones o asociación con otros síndromes. Puede tener anemia macrocítica y cerca de la mitad progresan a AM. En el mielograma se puede observar una celularidad normal con disminución o ausencia de megacariocitos, el nivel de trombopoyetina está elevado. El test de fragilidad cromosómica es normal. Esta enfermedad se debe a una mutación en el gen del receptor de la trombopoyetina, (c-mpl) el cual se localiza en brazo corto del cromosoma 1 (1p35). Su

herencia es autosómica recesiva. La aplasia medular aparece alrededor de los 3 años de vida y se corrige con TPH; ocasionalmente pueden presentar leucemia. El diagnóstico prenatal se hace con la detección en sangre fetal de trombocitopenia y el análisis del DNA.

3.8. Anemia Blackfan-Diamond

Es una enfermedad hereditaria caracterizada por el desarrollo muy precoz de anemia macrocítica, normocrómica, hiporregenerativa con hipoplasia medular selectiva de precursores eritroides, asociada en un 50% a anomalías fenotípicas. Esta enfermedad fue descrita en 1930 por Josephs, Diamond y Blackfan como una aplasia congénita pura de glóbulos rojos. Ya se han descrito más de 1000 casos en la literatura. El diagnóstico frecuentemente se efectúa durante los 2 primeros años de vida, un 10% al nacer, 50% a los 3 meses y el 90% antes de los 18 meses, pero puede ser tan tardío como alrededor de los 60 años.

Un 25% presenta herencia autosómica recesiva o dominante, aunque la mayoría son casos esporádicos. Estos casos esporádicos se han descrito como autosómicos dominante con diferente penetrancia.

Las anomalías físicas encontradas en estos pacientes son: fascie típica, paladar ojival, labio leporino, micrognatia, hipertelorismo, estrabismo, ptosis palpebral, epicantus, glaucoma, cataratas, cuello corto, fenotipo turner. En los pulgares puede encontrarse ausencia de ellos, bífidez y triples falanges; menos frecuente es encontrar malformaciones cardíacas, genitourinarias y esqueléticas.

La anemia puede llegar a valores de Hb < 1,5 g/dL, esta anemia es macrocítica con aumento de Hb fetal y antígeno i fetal. El mielograma presenta celularidad conservada con ausencia o marcada reducción de progenitores de la serie roja. Los niveles de eritropoyetina, hierro sérico, ferritina, ácido fólico, y vitamina B₁₂ están en valores elevados. Además de altos niveles de adenosin deaminasa (ADA) en los glóbulos rojos. La fragilidad cromosómica es normal.

La médula ósea muestra un número de progenitores hematopoyéticos reducido aunque las unidades formadoras de colonias pueden estar aumentadas con altos niveles de eritropoyetina; estas células muestran apoptosis acelerada. No se han encontrado mutaciones en c-kit, SCF, ni en genes del receptor de eritropoyetina.

Pacientes con traslocación X, 19 o síndromes de microdeleciones que compromete la zona 19q13,2 que expresa el gen RPS19 y codifica una proteína ribosomal subunidad 19 (tabla 5-7), han sido identificadas en un 25% de los pacientes con Anemia de Blackfan-Diamond El gen RPS19 tiene diferente penetrancia. El rol en la eritropoyesis no ha sido aclarado aún. Un segundo gen encontrado en esta enfermedad es 8p23.2-p22 en el 35% de los pacientes, cuyo rol tampoco está completamente definido.

El tratamiento de primera línea es el uso de corticoides; se utiliza prednisona en dosis de 2 mg/kg/día hasta que la Hb sea mayor a 8 g/dL seguido de una disminución gradual de ella, hasta su uso en días alternos, para disminuir los riesgos de su utilización en forma crónica. Más de un 50% responde a los corticoides, sin embargo, un 25% pueden recaer y requerir dosis crecientes aumentando el riesgo de tener efectos adversos. El 25% restante no responde a ellos, en estos pacientes esteroideos resistentes se requiere de transfusiones de eritrocitos leucorreducidas periódicas cada 3 a 6 semanas y así mantener Hb > 6 g/dL. El riesgo de la transfusión crónica es la sobrecarga de hierro y es necesario usar terapia quelante del mismo como desferroxamina con protocolos similares a la talasemia.

El TPH es una alternativa a los pacientes corticoide resistentes; el éxito del trasplante es de un 75-88% de un donante familiar idéntico y 14-40% con donantes alternativos. La supervivencia promedio llega a los 42 años y se han reportado en la última década hasta los 65 años. Se han reportado transformaciones malignas como: Leucemia mieloide aguda (LMA), SMD y tumores sólidos.

Puede efectuarse diagnóstico prenatal por la determinación con ecodopler de anemia in útero, y obtener muestra por cordocentesis para buscar la mutación RPS19.

El diagnóstico diferencial más importante es con la *Eritroblastopenia transitoria de la infancia*, una enfermedad que aparece después de los 2 años de vida, no se asocia a malformaciones y hasta un 20% puede tener asociación con neutropenia. El ADA de los eritrocitos es normal, de volumen corpuscular (VCM), Hb fetal, antígeno i son normales; el nivel de Hb vuelve a su valor normal entre 1 a 2 meses de su aparición, no se ha encontrado una causa precisa y requiere de transfusión generalmente en una ocasión.

3.9. Neutropenia Congénita Severa (Síndrome Kostmann)

Es una enfermedad autosómica dominante, caracterizada por la presencia de infecciones piógenas recurrentes desde los primeros meses de su vida asociada a recuentos de neutrófilos inferiores a 200/ μ L. La primera descripción de este síndrome fue efectuada en el año 1956 por Kostmann. La alteración genética que conduce a la enfermedad se encuentra localizada en el gen 2 de la elastasa (ELA2) el que sufre una mutación heterocigota. En los precursores mieloides se ha descrito además heterocigocidad para la activación de la mutación ras y mutación del receptor del G-CSF, lo cual se relaciona con el desarrollo de neoplasias hematopoyéticas.

Se caracteriza por una neutropenia marcada, aunque los eosinófilos y monocitos pueden estar aumentados. En la médula ósea se observa una celularidad conservada con ausencia o disminución de progenitores mieloides o una detención de la maduración en los mielocitos o promielocitos. En estudios *in vitro*, la mielopoyesis se corrige al agregar G-CSF, lo que ha permitido el uso terapéutico de este factor. Antes del uso de G-CSF los pacientes fallecían antes de los 3 años de vida debido a infecciones piógenas; desde 1989 ha sido posible su uso en forma rutinaria, la dosis recomendada es entre 5-10 mg/kg/día con un éxito del tratamiento de un 90%. Al aumentar la supervivencia en este grupo de pacientes, se ha encontrado un riesgo mayor de desarrollar neoplasias hematológicas como leucemias mieloides (13%) y SMD (7%), el desarrollo de estas enfermedades se asocia con más frecuencia a la presencia de monosomía 7, la que puede estar desde el diagnóstico, o aparecer en el curso de la enfermedad. El TPH está indicado en los pacientes que no responden al G-CSF o presentan alteraciones citogenéticas. El diagnóstico prenatal se basa en buscar la mutación ELA2.

3.10. Trombocitopenia con ausencia de radio (TAR)

Se han descrito más de 400 casos, generalmente se diagnostican al nacer debido a la trombocitopenia en ausencia o aplasia del radio con pulgares presentes y normales a diferencia de la AF. Otros hallazgos clínicos son: anomalías en los dedos, ausencia o anomalía del cúbito, húmero anormal, extremidades cortas, cardiopatía congénita y alteraciones gonadales.

Un 20% presenta alergia a la proteína de la leche de vaca.

El recuento de plaquetas es $<50.000/\mu\text{L}$ al diagnóstico, anemia por los sangramientos y más de un tercio tienen leucocitosis ($> 40000/\mu\text{L}$) debido a una reacción leucemoide transitoria. Al examen físico se encuentra esplenomegalia por eritropoyesis extramedular. La médula ósea tiene celularidad conservada pero, con ausencia o anormalidad de megacariocitos. Presentan fragilidad cromosómica y cultivos hematopoyéticos normales para la serie eritroide y mieloide con ausencia de colonias de megacariocitos. Los niveles de trombopoyetina están elevados con una trombocitopenia amegacariocítica. Su herencia es autosómica recesiva, y no se han descrito alteraciones genéticas.

El pronóstico es mejor que otros síndromes de falla medular congénita; muchos pacientes mejoran después del primer año de vida, aunque requieren durante este período múltiples transfusiones para mantener el recuento de plaquetas sobre $10000/\mu\text{L}$. Actualmente su supervivencia es del 75% a los 4 años. El trasplante es un tratamiento excepcional en esta patología. Muy rara vez desarrollan alguna neoplasia aunque han sido descritas .

El diagnóstico prenatal se hace con la búsqueda de las malformaciones del radio asociado a trombocitopenia fetal.

LECTURAS SUGERIDAS

Abkowitz, J. "Aplastic anemia: Wich treatment?". *Ann of Intern Med.*;137: 524-526, 2001.

Alter, B. "Bone marrow failure syndromes in children". *The Pediatrics Clinics of North America* 49: 973-988, 2002.

Camita, B.M., Thomas, E.D., *et al.* "Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality". *Blood*; 48:63, 1976.

Dokal, I. "Inherited aplastic anaemia". *Hematol J.*;4(1):3-9, 2003.

Faivre, L., Guardiola, P., Lewis, C., *et al.* "For the EUFAR Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia". *Blood*; 96:4064-70, 2000.

Frickhofen, N., Rosenfeld, S. "Immunosuppressive treatment of aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporine". *Semin Hematol.*; 37: 56-58, 2000.

Keung, Y.K., Penatti, M.J., Cruz, J.M., Powell, B.L. *et al.* "Bone marrow cytogenetic abnormalities of aplastic anemia". *Am J Hematol.*; 66(3): 167-71, 2001.

Maciejewski, J.P., S eller, C., Sato, T., Anderson, S., Young, N.S. "A severe and consistent d eficit in marrow and circulating primitive hematopoietic cells (Long term initiating cells) in acquired aplastic anemia". *Blood*; 88:1983-1991, 1996.

Marsh, J.C. "Haematopoietic growth factors in the pathogenesis and for the treatment of aplastic anemia". *Semin Hematol.*; 37:81-90, 2000

Math e, G, Amiel, J.L., Schwarzenberg, L., *et al.* "Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphocytic serum". *BMJ*; 2:131-6, 1970.

Mu oz, A., Madero, L. **S ındromes de fracaso medular en Hematolog a y Oncolog a Pedi trica.** Ed. Ergon, cap ıtulo 5, 1997, pp 81-95.

Young, N.S., Maciejewski, J. "The pathophysiology of acquired aplastic anemia". *NEJM*; 336: 1365-72, 1997.

Young, N., Barret, J. "The treatment of severe acquired aplastic anemia". *Blood*; 85: 3367-3377, 1995.

Young, N. "Acquired aplastic anemia". *Ann of Intern Med*; 136 : 534-546, 2002.

ALTERACIONES DEL METABOLISMO DEL HIERRO Y DE LA SÍNTESIS DEL GRUPO HEM

Iván Palomo G., Manuel Olivares G., Miguel Arredondo O. y Fernando Pizarro A.

1. Introducción

2. Metabolismo del hierro

- 2.1. Homeostasis del hierro
- 2.2. Absorción intestinal de hierro
- 2.3. Regulación intracelular de los niveles de hierro
 - 2.3.1. Transportador de metales divalentes 1 (DMT1)
 - 2.3.2. Receptor para transferrina
 - 2.3.3. Proteína HFE
 - 2.3.4. Transportador Ireg1
 - 2.3.5. Hefestina
 - 2.3.6. Hpcidina
- 2.4. Modelo de homeostasis del hierro
- 2.5. Biosíntesis del Hem

3. Deficiencia de hierro

- 3.1. Cambios con el desarrollo y requerimientos de hierro
- 3.2. Etiopatogenia de la deficiencia de hierro
- 3.3. Cuadro clínico y consecuencias
- 3.4. Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de hierro
- 3.5. Prevención y tratamiento de la deficiencia de hierro

4. Sobrecarga de hierro

- 4.1. Hemocromatosis
 - 4.1.1. Hemocromatosis hereditaria tipo 1 (clásica)
 - 4.1.2. Hemocromatosis hereditaria tipo 2 (juvenil)
 - 4.1.3. Hemocromatosis hereditaria tipo 3 (mediterránea)
 - 4.1.4. Hemocromatosis hereditaria tipo 4
- 4.2. Aceruloplasminemia
- 4.3. Atransferrinemia
- 4.4. Hemocromatosis neonatal
- 4.5. Sobrecarga de hierro africana (Siderosis Bantu)
- 4.6. Manifestaciones clínicas de la Hemocromatosis Hereditaria (HH)
- 4.7. Diagnóstico de la Hemocromatosis Hereditaria
- 4.8. Tratamiento de la Hemocromatosis Hereditaria

5. Anemia de enfermedades crónicas y de la inflamación aguda

6. Anemia sideroblástica

- 6.1. Anemia sideroblástica hereditaria (ASH)
- 6.2. Anemia Sideroblástica Adquirida (ASA)

7. Porfirias

RESUMEN

El hierro (Fe) es un elemento esencial para el ser humano pero en exceso puede ser tóxico. La homeostasis de Fe es regulada por su absorción a través del enterocito. El Fe se absorbe por dos vías, una para el Fe hemínico (Fe-hem) y la otra para el Fe no-hemínico (Fe no-hem). El Fe-hem parece sólo ser afectado por proteínas animales que facilitan su absorción y por calcio que puede inhibir su absorción. En cambio, el Fe no-hem es influenciado por una gran cantidad de factores que disminuyen su absorción (calcio, fosfato, caseína, polifenoles, fitato) o la favorecen (ácido ascórbico y compuestos derivados de la digestión de las carnes).

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más prevalente y la principal causa de anemia. Además de las manifestaciones propias de la anemia, se han descrito otras manifestaciones tales como: alteraciones de la capacidad de trabajo físico, actividad motora espontánea, conductuales, del desarrollo mental y motor, inmunidad celular, capacidad bactericida de los neutrófilos, velocidad de crecimiento, mayor riesgo de parto prematuro, bajo peso de nacimiento y de morbilidad perinatal, menor transferencia de hierro al feto, velocidad de conducción más lenta de los sistemas sensoriales auditivo y visual. La prevención de la deficiencia de Fe incluye cambios en los hábitos alimentarios, fortificación de los alimentos y la suplementación con hierro.

La sobrecarga de Fe puede deberse a un aumento de la absorción intestinal, como ocurre en la hemocromatosis hereditaria, alteraciones de la movilización del hierro tisular y por transfusiones a repetición en pacientes especialmente en aquellos con anemia aplásica o anemias hemolíticas crónicas. La hemocromatosis hereditaria se caracteriza por un depósito anormal y lesivo de hierro en las células parenquimatosas de diferentes órganos. Esta patología afecta a los homocigotos manifestándose entre la cuarta y quinta década de vida en hombres y algo más tarde en mujeres.

La anemia secundaria a enfermedades crónicas es una de las anemias más frecuentes. En su fisiopatología se reconoce retención de Fe en el estroma de la médula ósea.

Las anemias sideroblásticas son un grupo de desórdenes que se caracterizan por una alteración en la síntesis del grupo Hem y sideroblastos en anillo en la médula ósea.

Las porfirias son un grupo heterogéneo de enfermedades adquiridas o hereditarias caracterizadas todas ellas por una anomalía en la biosíntesis del hem.

1. INTRODUCCIÓN

El hierro es el tercer metal más abundante en la corteza terrestre y se encuentra en 2 estados redox: Fe^{+2} y Fe^{+3} . Este mineral es indispensable para la vida; sirve como cofactor de muchas enzimas, hemoproteínas y proteínas no hem que cumplen funciones biológicas cruciales como síntesis de DNA, síntesis de RNA, transporte de oxígeno (hemoglobina), metabolismo del oxígeno (oxidases, peroxidases, catalasas e hidroxilasas), transporte de electrones (citocromos) y en el ciclo de Krebs. Sin embargo, las mismas propiedades que lo hacen útil le proporcionan características tóxicas cuando se encuentra en exceso. El hierro libre puede generar radicales libres que dañan componentes biológicos esenciales (lípidos, proteínas y DNA). Para regular una posible alteración en los niveles de hierro, el organismo debe ser capaz de estimar cuándo existe un

déficit o un aumento de hierro, el que será controlado principalmente a través de la absorción de hierro, más que a través de su excreción. Una respuesta inapropiada o una carencia de respuesta conducirán a una anemia o a una sobrecarga de hierro.

En medios biológicos el Fe se distribuye principalmente asociado a proteínas (60-70% en hemoglobina, 10% en mioglobina, citocromos y otras enzimas que contienen Fe y 20-30% en proteínas de almacenamiento como ferritina y hemosiderina en el sistema retículoendotelial y células parenquimatosas hepáticas. Los requerimientos en el ser humano son a nivel de elemento traza, diario se absorben desde la dieta 1-2 mg y se excreta la misma cantidad de este ión. Así en el hombre y en la mujer adultos el contenido de Fe es 55 y 45 mg de Fe por kg de peso, respectivamente.

2. METABOLISMO DEL HIERRO

2.1. Homeostasis del hierro

La mayor parte de las necesidades de hierro del organismo son suplidas por la reutilización del hierro proveniente de la destrucción de los glóbulos rojos senescentes. El hierro producto del catabolismo de la hemoglobina, en el sistema reticuloendotelial, se une en el plasma a una proteína transportadora denominada transferrina (Tf), la que lo entrega vía receptor para transferrina (TfR «Tranferrin receptor») a los precursores eritroides de la médula ósea, siendo reutilizado en la producción de hemoglobina. En el adulto el 95% del hierro empleado en la síntesis de hemoglobina proviene de este reciclaje, mientras que en un lactante de 1 año este valor es de sólo un 70%, siendo por tanto este último más dependiente del aporte externo de este mineral.

Las pérdidas de hierro son bastante restringidas y fijas. Estas ocurren principalmente a nivel del intestino por sangramiento fisiológico y descamación celular. Menos importantes son las debidas a la descamación de piel y fanerios, sudoración o eliminación urinaria. En el niño las pérdidas se han estimado en 0.04 mg/Kg de los 0 a 2 años y de 0.03 mg/Kg de los 2 a 8 años de edad. Las pérdidas en el adulto son de alrededor de 0,9 mg diarios (0,5 mg/m²). En la mujer en edad fértil, la menstruación eleva las pérdidas totales a 1,5 mg diarios. Existen importantes variaciones individuales en la pérdida de hierro por la menstruación, sin embargo en una misma mujer esta variación entre diferentes períodos es pequeña. Por otra parte, los métodos anticonceptivos pueden alterar significativamente la pérdida menstrual. La pérdida de hierro es menor a lo normal en mujeres que utilizan tabletas anticonceptivas y mayor que lo normal cuando utilizan dispositivos intrauterinos.

2.2. Absorción intestinal de Fe

El metabolismo del hierro está regulado fundamentalmente por su absorción, proceso que ocurre preferentemente en las primeras porciones del intestino delgado. Los estudios radioisotópicos de absorción han demostrado que el hierro de los alimentos vegetales es pobremente absorbido, no ocurriendo así con los alimentos de origen animal. Esto se debe a que en la dieta existen dos formas de hierro, las que tienen un comportamiento diferente: a) hierro inorgánico o no-hem, que es el presente

en las sales de hierro y los alimentos vegetales, y b) hierro hem proveniente de la carne (mioglobina) y sangre (hemoglobina).

El hierro no-hem se encuentra en los alimentos en forma de complejos férricos. Estos complejos se degradan durante la digestión, integrándose el hierro liberado a un “pool” común de hierro ionizado, quedando por tanto sometido a la interacción con factores intraluminales, provenientes de la dieta o propios del intestino, que van a inhibir o facilitar su absorción. En la dieta habitual hay un predominio de los ligandos inhibidores, los que actúan formando complejos de hierro insolubles. Entre los inhibidores, provenientes de la dieta, uno de los más potentes son los polifenoles especialmente el tanino, los que están presentes en el té, café y algunos alimentos vegetales (legumbres, espinacas, cereales, etc.). La ingestión de té es capaz de reducir marcadamente la absorción del hierro de la dieta, el café presenta un efecto similar pero menos pronunciado. Tienen también un efecto depresor de la absorción los fitatos, calcio, carbonatos, oxalatos, fosfatos, el salvado y la yema de huevo. De los facilitadores de la absorción, el ácido ascórbico es el que tiene el efecto más notable. Su acción pareciera deberse a que forma complejos solubles con el hierro y a que es capaz de reducir el hierro férrico a ferroso, forma que es más absorbible. Esta vitamina en relaciones molares con hierro superiores a 1:1 es capaz de duplicar la absorción del hierro inorgánico de la dieta. Presentan también un efecto favorecedor la carne de vacuno, el pescado, algunos aminoácidos como la cisteína, algunos ácidos orgánicos (láctico, cítrico, málico, tartárico) y azúcares. La secreción ácida gástrica tiene un efecto beneficioso al mantener el hierro en su forma reducida (ferrosa), por el contrario un aumento del pH intestinal, como sucede por la acción del bicarbonato presente en la secreción pancreática, inhibe la absorción del hierro al favorecer la formación de quelatos insolubles.

La absorción de hierro está marcadamente influenciada por factores extraluminales, como son el estado de los depósitos de hierro, la velocidad de la eritropoyesis y la hipoxia. A menores depósitos de hierro o mayor velocidad de eritropoyesis existe un aumento de la absorción. Además, existe una relación inversa entre la cantidad de hierro ingerida y el porcentaje absorbido.

El hierro hemínico es captado por un proceso aún no esclarecido e ingresa como tal al

enterocito, postulándose que esta captación es mediada por un proceso de endocitosis en la que participa un receptor. Una vez en la vesícula endocítica, el grupo porfirínico es degradado por la enzima hem-oxigenasa, y el hierro así liberado queda disponible para ser transportado al interior celular o entregado a la circulación, donde es transportado unido a la transferrina, acoplándose de este modo al circuito interno del hierro. Por esta característica de absorción, el Fe hemínico no es influenciado por las sustancias favorecedoras o inhibitorias de la absorción del hierro, excepto por el calcio, presentando una absorción de un 20 a 25%. Otra peculiaridad es que su absorción es menos influenciada por el estado de los depósitos de hierro.

En los organismos superiores la homeostasis del hierro está centrada a nivel de las células epiteliales del duodeno, las cuales son responsables de los cambios sensibles de la demanda de hierro corporal. En las criptas duodenales existen células precursoras pluripotentes, algunas de las cuales migran hacia las vellosidades y se diferencian en enterocitos, células epiteliales altamente polarizadas. Estas células están especializadas en la absorción y transporte de nutrientes, entre ellos el hierro, mientras que las células precursoras solo tienen una función de sensor de las necesidades de hierro del organismo.

El flujo transepitelial del Fe se divide en 3 fases principales: a) incorporación del Fe desde el lumen del intestino al interior de la célula, b) tránsito intracelular y c) fase de transferencia al plasma. A nivel intracelular, el Fe se encontraría unido principalmente a tres proteínas: mobilferrina, ferritina, y transferrina plasmática incorporada desde el plasma vía receptores para transferrina. La etapa de transferencia de Fe desde la célula al medio basal es la menos caracterizada.

Los enterocitos responden a una baja en los depósitos corporales de Fe incrementando su absorción desde la dieta. Estas células regulan el balance de Fe de manera tal que altos niveles corporales bloquean y bajos niveles incrementan la absorción intestinal de este ión. Por lo tanto, se considera a la absorción intestinal como el paso clave en la regulación de los niveles corporales de Fe. Los enterocitos representan un primer sistema de regulación del contenido de Fe relacionado a la edad de la célula. En la cripta intestinal, las células más jóvenes se ubican en el fondo de la cripta y presentan

menor contenido de Fe y ferritina (Fn; proteína de almacenaje), las células más envejecidas se localizan hacia la punta de la cripta desde donde se descaman. De esta forma, al perder las células con mayor contenido de Fe, los enterocitos regulan el contenido de Fe almacenado en el epitelio intestinal (figura 6-1). Para la mayoría de las células humanas, se ha descrito que el mecanismo de incorporación de Fe, es realizado a través de la endocitosis de transferrina vía receptores para transferrina. Las células del epitelio intestinal expresan TfR en su membrana basal y la captación de Fe es complementada con la captación realizada por el Transportador de metales divalentes (DMT1, «Divalent Metal Transport 1») en la membrana apical de las células del epitelio intestinal.

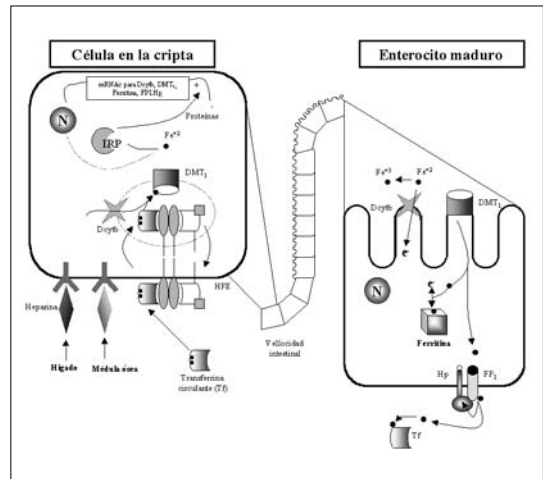


Figura 6-1. Modelo diferencial entre una célula precursora y enterocito maduro. Las células precursoras y los enterocitos maduros se ubican en el fondo y punta de la cripta intestinal, respectivamente. De esta forma, estas células detectan concentraciones diferentes de Fe y por lo tanto la expresión de las proteínas involucradas en el metabolismo intracelular de Fe es distinta.

2.3. Regulación intracelular de los niveles de Fe

La expresión de las proteínas que participan en el metabolismo de Fe es regulada traduccionalmente por el sistema regulador de hierro IRP/IRE. Este sistema de regulación está conformado por: a) los elementos reguladores de hierro: IRE («Iron Responsive Elements») que se encuentran en los extremos 5' ó 3' no codificantes de los mRNA que traducen las proteínas involucradas en el metabolismo de Fe, tales como Ferritina, DMT1, TfR e Ireg1 (transportador de salida en las células de epitelio intestinal). Así, elementos IRE se encuentran en el extremo 5' de los mRNA de la ferritina y de

Ireg1 y en el extremo 3' de los mRNA del RTf y del transportador DMT1; y b) por las proteínas reguladas por hierro: IRP 1 y 2 («Iron Regulatory Proteins»). IRP1 es una proteína de 98 kDa, cuya actividad de unión a los elementos IREs es regulada inversamente por la concentración intracelular de Fe, es decir, a menor concentración intracelular de Fe, mayor actividad de unión a IREs. IRP2 (105 kDa), presenta una actividad de unión constitutiva, es decir, siempre está presente y no depende de la concentración intracelular de Fe. Sin embargo, esta proteína es degradada por ubiquitinación cuando la concentración de Fe aumenta (figura 6-2).

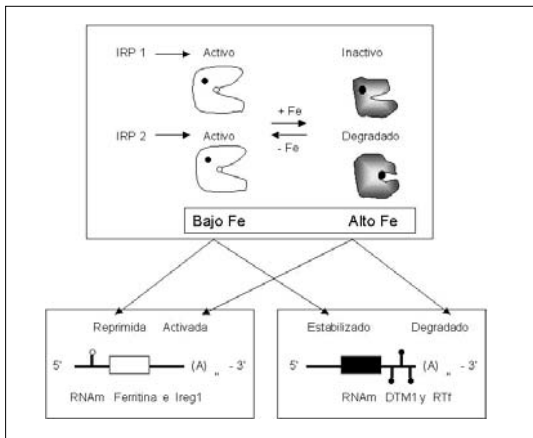


Figura 6-2. Regulación del metabolismo intracelular de Fe: Sistema IRP/IRE. Las proteínas IRP se unen a los elementos IRE, localizados en los extremos 5' ó 3' no traducidos de los RNAm que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de Fe y de esta forma regulan su expresión, ya sea inhibiendo la traducción o estabilizando al RNAm.

Los elementos IRE y las proteínas IRP actúan en conjunto para detectar y responder a los cambios de hierro en el medio intracelular (“pool” de hierro reactivo). Las proteínas IRP contienen un núcleo cubano que les permite detectar el contenido intracelular de Fe. Cuando el contenido del “pool” de Fe reactivo es bajo, el núcleo se encuentra en un estado conformacional 3Fe-4S, es decir abierto. En estas condiciones se puede unir a los elementos IRE de los mRNA y así regular su expresión. Cuando la proteína IRP se une al extremo 5' no codificante del mRNA, inhibe la traducción pues bloquea la entrada de la subunidad mayor del complejo traduccional. Cuando se une al extremo 3' no codificante, estabiliza al mRNA ya que impide la acción de las ARNasas. Por lo tanto cuando el contenido de Fe en el “pool” de Fe reactivo es bajo, las IRPs

se unen a los elementos IREs, e impiden la traducción de la ferritina e Ireg1, lo que se traduce en una disminución del almacenamiento y además, se produce la estabilización de los mensajeros del receptor de transferrina y DMT1, lo que aumenta la captación de Fe. Cuando el Fe intracelular aumenta, el núcleo de las proteínas IRPs cambia de estado conformacional a 4Fe-4S (estado cerrado) perdiendo su capacidad de unirse a los mRNA y se convierte en la enzima aconitasa citosólica. Esto finalmente produce la traducción de los mensajeros de Fn e Ireg1 y desestabilización de los mensajeros del TfR y DMT1, lo que se traduce finalmente en un aumento del almacenamiento y una disminución de la captación de Fe.

2.3.1. Transportador de metales divalentes 1

El DMT1 tiene un amplio rango de sustratos, entre los que se encuentran Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , y Pb^{2+} . Dos mRNA para DMT1 se generan por empalme alternativo, uno con un motivo IRE en la región 3' no traducida y otro sin motivo IRE. Esto resulta en la activación de la síntesis de DMT1-IRE y del transporte apical de hierro a bajos niveles celulares de hierro y en una actividad basal de transporte independiente de la concentración celular de hierro dado por DMT1 sin IRE. DMT1 realiza transporte activo acoplado a protón y depende del potencial de membrana de la célula. La secuencia del gen DMT1 predice una proteína con doce segmentos de transmembrana, de 561 aminoácidos con sus extremos amino y carboxilo terminal ubicados hacia el citoplasma y es expresado ubicuamente. La expresión de DMT1 es estimulada por una dieta deficiente en hierro y representaría un mediador clave de la absorción de hierro intestinal. DMT1 además de localizarse en la membrana apical de las células de epitelio intestinal, también se encuentra localizado en endosomas tardíos y lisosomas, donde DMT1 podría transferir el Fe libre del endosoma al citoplasma durante el ciclo intracelular de la transferrina.

2.3.2. Receptor para Transferrina

El TfR es una macromolécula central para la regulación de la homeostasis del hierro. Es una glicoproteína de transmembrana tipo 2; homodimérica, cada monómero se conforma por 780 aminoácidos, se expresa en los enterocitos de las criptas duodenales, los cuales regulan la absorción del hierro de la dieta; casi todas las células animales expresan el TfR, a

excepción de algunas células como los eritrocitos maduros. La estructura del RTf presenta una región extracelular con 3 dominios; un dominio de unión a proteasas, un dominio apical y un dominio helical; una región transmembrana y una región citoplasmática (extremo amino terminal).

La membrana basolateral participa en dos procesos relacionados con el metabolismo de hierro: a) en la transferencia del hierro desde el enterocito al plasma a través del transportador Ireg1 y la oxidasa hefestina. (figura 6-1). El hierro que no es exportado al plasma es almacenado en la proteína de almacenamiento Fn y posteriormente se pierde por exfoliación de las células intestinales. Las proteínas relacionadas al metabolismo del hierro en esta membrana, tanto en el precursor como en el enterocito maduro, son sensibles a los depósitos de hierro del cuerpo y b) en la captación de Fe sistémico (transferrina-Fe) por el TfR. Cuando el hierro corporal se encuentra normal o aumentado, el TfR une transferrina-Fe (Tf-Fe) formando el complejo ternario TfR-Tf-Fe, en la superficie de la membrana basolateral y lo internaliza a través de un proceso endocítico. El complejo TfR-Tf-Fe una vez en la vesícula endocítica y por efecto del pH (aproximadamente 5,5-6,0) se libera el Fe al lumen de la vesícula. El complejo TfR-Tf es estable a este pH. El complejo TfR-Tf recicla a la membrana y puede realizar un nuevo ciclo. El Fe de la vesícula endocítica es transportado al citosol de la célula intestinal por el transportador DMT1 y pasa a formar parte del "pool" de Fe común de la célula. Este proceso aumenta el contenido intracelular de Fe de la célula y por lo tanto, cambia la actividad de las proteínas reguladoras de Fe. En la célula eritroide, el Fe liberado probablemente forma parte del "pool" de hierro que va al interior de la mitocondria para la síntesis del heme o para la inserción del heme en proteínas, enzimas dependientes del heme o para ser almacenado en la ferritina. Cuando el hierro alcanza la membrana mitocondrial interna es atrapada por ligandos y es transferido a través de la membrana interna por la ferroquelatasa. Sólo la forma reducida del hierro (Fe^{+2}) puede ser procesada por la ferroquelatasa.

El hierro modula la expresión del TfR de una manera «feedback» negativo en células no eritrocíticas, sin embargo en células que sintetizan hemoglobina los niveles de mRNA son solamente afectadas por una alta concentración de hierro. El hem baja los niveles de mRNA del receptor para transferrina. Luego que el hem es formado, este

es transportado rápidamente fuera de la mitocondria para combinarse con las cadenas de la globina en el citosol. Cuando la síntesis del hem es inhibida en las células eritroides, muy poco o ningún hierro es acumulado en el citosol como ferritina, en contraste con células no eritrocitarias en que el exceso de hierro es necesariamente metabolizado formando ferritina. Un defecto en la síntesis del hem explica la formación de sideroblastos en anillo en pacientes con anemia sideroblástica.

Algunos factores que serían los causantes de la acumulación de Fe no hem en las mitocondrias de los eritroblastos son: a) El hierro no puede ser usado por falta de protoporfirina IX, y b) El hierro puede abandonar la mitocondria sólo cuando es incorporado a la protoporfirina IX y forma el hem.

La diferenciación eritrocitaria es activada por la eritropoyetina (EPO) que lleva a una inducción de la transcripción de todas las enzimas de la vía del hem que ocurren coordinadamente con la inducción de los receptores de la transferrina. Además la disponibilidad de transferrina está sujeta a los niveles de hierro en la síntesis eritrocitaria.

2.3.3. Proteína HFE

La proteína HFE es el producto de expresión del gen de la hemocromatosis hereditaria (HH). La proteína HFE es una glicoproteína de transmembrana tipo 1 de 343 aminoácidos, que es codificada por el gen HFE. Esta proteína es homóloga a la molécula MHC clase I; pero existen diferencias, ya que la molécula MHC clase I participa en el sistema inmune presentando el péptido antigénico a las células T, en cambio, la HFE no une péptidos ni realiza funciones inmunes. Estructuralmente la HFE presenta tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), una región transmembrana y una pequeña región citoplasmática. Los superdominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se forman por 8 cadenas beta plegadas y dos alfa hélices, los cuales se ubican en la superficie del dominio $\alpha 3$, el cual se une a través de un puente de disulfuro a la $\beta 2$ -Microglobulina ($\beta 2m$) en la superficie celular.

La proteína HFE interactúa con el complejo TfR-Tf-Fe al pH de la superficie de la célula (pH 7,4). Por lo tanto, se forma un complejo ternario (Fe-Tf, TfR, HFE), el cual es endocitado y al pH endosomal el hierro se libera desde la transferrina; esta última se transforma en apotransferrina unida al TfR, la cual se recicla en

la superficie celular donde el pH básico de la sangre gatilla su disociación. La molécula de HFE se disocia del TfR en el interior del endosoma, se piensa que la HFE induce cambios estructurales que facilitan la liberación del hierro del complejo Fe-Tf a pH ácido.

Además del complejo ternario se puede formar otro complejo; en el cual a cada cadena del homodímero del TfR, se une una molécula de HFE para formar un complejo simétrico doble, donde hay amplios contactos entre las dos cadenas polipeptídicas del dímero TfR, pero no hay contacto entre las dos moléculas de HFE. Los contactos intermoleculares primarios son entre los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de la HFE y las hélices 1 y 3 del dominio helical del TfR formando un centro estable. Los dominios $\alpha 3$ y $\beta 2m$ de la HFE no hacen contacto con el TfR, son más móviles.

La Tf se une a la región correspondiente al dominio helical del TfR; la molécula de HFE se une también a la misma zona, es decir, ambas moléculas compiten por el mismo sitio en el TfR. La evidencia estructural y bioquímica de que la HFE y el complejo Fe-Tf se unen al mismo sitio en el TfR sugiere que este receptor con dos moléculas de Fe-Tf no podría unir HFE. Asimismo, el complejo HFE-TfR con una estequiometría 2:2 no podría unir Fe-Tf; con esto se da a conocer que la HFE puede competir eficazmente con el Fe-Tf a pesar de la gran concentración fisiológica de éste. En solución lo que más predomina es el complejo ternario, con estequiometría 1:2:1 (Fe-Tf, TfR, HFE).

Algunas funciones de la proteína HFE en condiciones normales son: a) participar en la captación del hierro celular, b) en la liberación del hierro intracelular ya sea disminuyendo la afinidad del TfR y c) anulando la endocitosis del receptor del TfR.

La hemocromatosis hereditaria (HH) es un desorden caracterizado por un incremento en la captación de hierro dietético y un incremento de la tasa de transferencia de hierro hacia la sangre, lo que conduce a una sobrecarga de hierro. Esto se debe a una disminución en la expresión de la proteína HFE funcional. Dos mutaciones principales dan cuenta del 90% de la hemocromatosis hereditaria. La primera es la mutación de la cisteína 280 por una tirosina en el dominio $\alpha 3$. Esta mutación impide que la chaperona $\beta 2$ -microglobulina se una a la proteína HFE y por lo tanto ésta no es transportada hasta la membrana basolateral de

la célula del epitelio intestinal, donde realiza su actividad. La segunda mutación corresponde a un cambio de la histidina 63 por un ácido aspártico, en el dominio $\alpha 1$. Esta mutación disminuye la afinidad de la proteína HFE por el receptor para transferrina. Se han postulado tres posibles mecanismos de acción de la proteína HFE: 1) gracias a que la proteína HFE presenta afinidad por el RTf, competiría con la Tf, disminuyendo así la absorción de hierro sistémico; 2) A nivel del endosoma bloquearía al transportador DMT1, inhibiendo así la liberación de Fe desde la vesícula endocítica al citoplasma y 3) por un proceso de transítosis, la proteína HFE llega a la membrana apical y ahí inhibe al transportador DMT1. Esto implicaría que HFE actuaría como una proteína sensible a los niveles de depósitos de hierro del organismo (figura 6-1). Además se señala que las concentraciones relativas de HFE y TfR serían importantes para la carga de hierro, y por lo tanto su relación es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del hierro. También se ha demostrado que la proteína HFE incrementa la actividad de unión IREs-IRPs, lo que ejerce un control universal sobre la regulación de hierro celular.

2.3.4. Transportador Ireg1

Otro elemento que participa en la homeostasis de Fe es el transportador Ireg1, también denominado ferroportina o proteína transportadora de metales (MTP1). La localización de Ireg1 en células y tejidos es consecuente con su función de exportación de hierro desde las células. En el duodeno está presente en los enterocitos maduros y ausente en las criptas (figura 6-1). En el hígado se encuentra preferentemente en las células de Kúpffer, y esto podría explicar porque en individuos con HH las células de Kúpffer contienen bajos niveles de hierro en comparación con el resto de las células del hígado.

El mRNA de Ireg1 posee en su región 5' un sitio de unión para IRPs. Por esto se sugiere que este mRNA sería inhibido en condiciones de hierro intracelular disminuido. En individuos hipotransferrémicos el transportador Ireg1 se encuentra elevado a nivel duodenal, debido a que estos individuos, como presentan una anemia severa, necesitan un aumento rápido en la carga de hierro, que se obtiene mediante la estimulación del transportador por reguladores eritropoyéticos y posiblemente vía hipoxia.

2.3.5. Hefestina

La proteína hefestina (proteína homóloga a la ferroxidasa multicobre ceruloplasmina) se localiza en la membrana basolateral del enterocito, asociada al transportador Ireg1 (figura 6-1) participando en la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} . En esta condición, es decir, Fe^{+3} la transferrina plasmática une al Fe y lo transporta por la circulación, hacia los distintos tejidos. La anemia ligada al sexo (SLA) es un desorden que se caracteriza por una sobrecarga de hierro en el enterocito y una cantidad disminuida en el plasma, producida por una inhibición en la exportación del hierro a través de la membrana basolateral. En la SLA, la hefestina se encuentra mutada (donde ocurre una delección del aminoácido 194 de la proteína) y se inhibe la oxidación del hierro, disminuyendo el Fe disponible para ser transportado por la transferrina.

2.3.6. Hepcidina

Es un péptido catiónico circulante rico en cisteínas, sintetizado en el hígado y excretado por la orina, con actividad anti-microbiana. Existen dos formas predominantes de hepcidina (Hepc), Hepc20 y Hepc25, ambas presentan 8 cisteínas conectadas por enlaces disulfuros intramoleculares. El péptido es sintetizado como un pro-péptido de 84 aminoácidos, pero solamente las formas de 20 y 25 aminoácidos son purificadas a partir de orina. Evidencias en modelos animales sugieren que la hepcidina es un regulador negativo de la absorción del Fe dietario y de la liberación del Fe de reciclaje desde los macrófagos. El RNAm de la hepcidina es inducido por los depósitos de Fe y por la inflamación. Se ha sugerido que la hepcidina sería uno de los mediadores que participan en el desarrollo de la anemia de la inflamación. El mecanismo por el cual la hepcidina ejerce su efecto sobre la absorción intestinal aún no está claramente establecido. Hepcidina podría regular la absorción de Fe a través de la modulación de la expresión de alguna de las moléculas involucradas en la absorción intestinal de Fe. Dos posibles blancos por su función crítica en la captación de Fe son los transportadores DMT1 e Ireg1.

2.4. Modelo de homeostasis del hierro

La regulación de la homeostasis del hierro comienza en las criptas, que presentan el complejo HFE-TfR, pero no DMT1. Debido a esto no son sensibles a los niveles de hierro en el lumen intestinal. Esta regulación es mediada por reguladores de depósito de hierro

corporal y por el regulador eritropoyético, quienes comunicarían a través del plasma el estado de repleción/depleción de hierro y eritropoyesis que presenta el organismo, ayudado por la capacidad del duodeno de aislar las señales que pudiesen confundir, tales como el “pool” de hierro lábil del lumen intestinal o en tránsito en el estrato epitelial. Además estos reguladores tienen la capacidad de estimular, mediante señales externas, a los enterocitos diferenciados.

El nivel del “pool” de hierro reactivo cumple un rol regulador clave en la actividad de unión de las proteínas IRP a los elementos IREs de los mRNA, en la modulación del tráfico post-traducciona dependiente de hierro, y en eventos de degradación. Así la expresión de proteínas que participan en el metabolismo de Fe dependerá en parte del “pool” de hierro lábil que exista en la célula precursora.

Este modelo de homeostasis de hierro puede explicarse mejor utilizando como ejemplo lo que sucede en individuos con HH, en donde se observa un alto nivel de “pool” de hierro lábil producida por un aumento en la captación por DMT1 y un aumento en la exportación por Ireg1 y una disminución de niveles de ferritina. Si la exportación por Ireg1 sobrepasa al de captación por DMT1, los niveles de ferritina y “pool” de hierro lábil se encontrarán disminuidos, estimulando la actividad de unión de los complejos IRP-IREs, lo que conduce a un mayor aumento en la proteína DMT1 (figura 6-2). La disminución del “pool” de hierro lábil puede redistribuir a DMT1 a la membrana apical desde vesículas endocíticas.

Un mejor entendimiento de la homeostasis de hierro en el intestino ocurrirá con la identificación de los reguladores eritroides y depósitos de hierro del cuerpo y los mecanismos por los cuales ellos regulan los transportadores de hierro, y posiblemente otras proteínas relacionadas con hierro tales como HFE y hefestina.

2.5. Biosíntesis del Hem

La vía de biosíntesis del hem es probablemente idéntica en las células de todos los mamíferos, esta vía involucra 8 enzimas, 4 de ellas se encuentran en el citoplasma y las otras 4 en las mitocondrias (ver capítulo 3). Brevemente, el primer paso ocurre en la mitocondria e involucra la condensación de glicina con succinil CoA formando el ácido -5 aminolevulínico (ALA) esta reacción es catalizada por la enzima

aminolevulínico sintetasa (ALAS). Los siguientes 4 pasos de la vía tienen lugar en el citoplasma, la ALA deshidratasa (ALAD) convierte a 2 moléculas de ALA en porfobilinógeno (PBG). Los dos pasos enzimáticos siguientes convierten a cuatro moléculas de PBG en una estructura cíclica llamada tetrapirroli uroporfirinógeno III el cual es descarboxilado formando el coproporfirinógeno III. El tercer paso final incluye la inserción de una molécula de Fe^{+2} en la protoporfirina IX por la ferroquelatasa etapa que ocurre en la mitocondria.

3. DEFICIENCIA DE HIERRO

3.1. Cambios con el desarrollo y requerimientos de hierro

El feto adquiere el hierro en forma activa a través de la placenta. La mayor transferencia de hierro al feto ocurre a las 30 semanas del embarazo, en la cual hay un máximo de traspaso del hierro materno hacia el feto. La transferrina transporta hierro (Tf-Fe) de la circulación materna a TfR localizados en la superficie apical placentaria, la Tf-Fe es endocitada, el hierro se libera y la apotransferrina vuelve a la circulación materna. El hierro libre luego se une a la ferritina en células de la placenta donde es transferida a la apotransferrina que ingresa del lado fetal de la placenta y sale como holotransferrina a la circulación fetal. El contenido de hierro del feto es directamente proporcional a su masa corporal, estimándose en 75 mg/kg. El recién nacido de bajo peso de nacimiento, tiene por tanto un menor contenido total de este nutriente. Al nacer la concentración de hemoglobina es mucho más alta que en otros períodos de la infancia, siendo estimada a nivel del cordón en alrededor de 170 g/L (17.0 g/dL), siendo esta cifra menor en el prematuro y en la ligadura precoz del cordón. Este gran aumento de la masa de hemoglobina constituye una verdadera reserva de hierro. En el período postnatal ocurre un gradual descenso de la concentración de hemoglobina por la frenación de la eritropoyesis, debida al aumento de la saturación de O_2 que ocurre una vez iniciada la respiración y a la sobrevivida disminuida de los eritrocitos fetales. Este descenso llega a su máximo a las 6 a 8 semanas de vida, siendo más pronunciado en el pretérmino, luego de lo cual se reinicia la eritropoyesis. El hierro proveniente del catabolismo de la hemoglobina queda depositado como reserva en el sistema reticuloendotelial y células parenquimatosas hepáticas, siendo reutilizado una vez reiniciada la eritropoyesis. Los depósitos así formados permiten que el recién nacido de término sea

independiente del aporte de hierro exógeno durante los 4 a 6 primeros meses de vida. El recién nacido de bajo peso de nacimiento por tener una reserva de hierro menor y una mayor velocidad de crecimiento, puede ya tener depletados sus depósitos a los 2 a 3 meses de vida.

En el embarazo ocurren cambios en la volemia determinados por variaciones en la masa eritrocitaria y en el volumen plasmático. Ambos componentes son controlados separadamente. La masa eritrocitaria es gobernada por las necesidades de transporte de O_2 , mientras las variaciones del volumen plasmático dependen de la necesidad de llenar el lecho vascular y así mantener la presión sanguínea. Variaciones en las relaciones entre el volumen plasmático y la masa eritrocitaria van a dar lugar a modificaciones en el hematocrito, hemoglobina y ferritina sérica.

En el embarazo se produce un aumento gradual del volumen plasmático (40-60%), siendo este incremento al final de la gestación de alrededor de 2.600 ml. Este aumento es más pronunciado en las múltiparas, aún mayor en los embarazos múltiples, así como también se relaciona con el tamaño fetal. Los mecanismos involucrados en este aumento no se conocen del todo, postulándose como responsable a algunos de los cambios hormonales y a la existencia de "shunts" arteriovenosos en el lecho placentario. Es sabido que en las primeras semanas de gestación existe una reducción de la resistencia vascular periférica debida a una relajación de las fibras musculares lisas probablemente efecto de las prostaglandinas, progesterona y a una reducida sensibilidad a agentes vasoconstrictores como la angiotensina II. Respecto a la masa eritrocitaria, ésta experimenta una reducción en el primer trimestre para luego aumentar progresivamente en el curso de la gestación (20-30%), siendo este aumento al término de la gestación de alrededor de 250 ml. Este incremento es una respuesta a las mayores necesidades de oxígeno de la embarazada. Por otra parte, el descenso inicial ha sido explicado por una secreción inadecuada de eritropoyetina que ha sido explicada por el incremento del flujo renal en el primer trimestre lo que daría una falsa señal a los sensores de oxígeno renal, a un cambio en el umbral (hecho no demostrado) y al aumento de los niveles de 2,3 difosfoglicerato, responsable que modifica la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Todos estos cambios en el volumen plasmático y en la masa eritrocitaria determinan la existencia de una anemia fisiológica del embarazo por

hemodilución. Los valores normales de hemoglobina son de 11.0 g/dl para el primer trimestre, 10.5 g/dl para el segundo y 11.0 g/dl para el tercero.

La necesidad total de hierro de una embarazada es de 1040 mg. De esto, 350 mg es entregado al feto y placenta, y 250 mg se pierden con el sangramiento del parto. Se necesitan 450 mg para cubrir la demanda impuesta por la expansión de la masa eritrocitaria materna y por último continúan las pérdidas basales normales, excepto la pérdida menstrual, lo que suma aproximadamente 240 mg. Sin embargo, la pérdida neta de hierro es de 840 mg (1040 mg - 250 mg perdidos en el parto + 450 mg recuperados en el postparto al contraerse la masa eritrocitaria). Esta pérdida neta es mayor en partos por cesárea, ya que la cantidad de sangre perdida es casi el doble que en un parto normal debido a la hipoxia y un posible aumento del riesgo de infección por alteraciones en la respuesta inmune.

3.2. Etiopatogenia de la deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro es la enfermedad nutricional más prevalente en el mundo, estimándose que afecta a alrededor de 100 millones de personas en Latinoamérica. Los grupos más vulnerables son los lactantes, niños y mujeres en edad fértil.

En la infancia la causa más frecuente de la carencia de hierro es nutricional, originada por la dificultad de cubrir los mayores requerimientos de este mineral por la dieta habitual, predominantemente láctea. El lactante debido a sus elevados requerimientos es particularmente susceptible a la carencia de hierro. Esta predisposición es aún mayor cuando el contenido de hierro al nacer está disminuido como en el prematuro o en embarazos múltiples. Esta susceptibilidad se incrementa en el niño con lactancia artificial, a menos que reciba fórmulas lácteas fortificadas, ya que el hierro de la leche de vaca es pobremente absorbido. Por el contrario el lactante de término alimentado con leche materna exclusiva, pese al bajo contenido de hierro de ésta, se encuentra protegido hasta los 6 meses de vida debido a la excelente biodisponibilidad del hierro de esta leche (50%). En el niño mayor debido a su menor ritmo de crecimiento y a una dieta más variada, la etiología nutricional es menos prevalente, siendo habitualmente la deficiencia una situación que se arrastra desde el período de lactante. En esta etapa de la vida adquieren importancia otras causas,

especialmente las pérdidas sanguíneas aumentadas y el síndrome de malabsorción. De los sangramientos el más frecuente es el digestivo. En los países tropicales una causa común de pérdida crónica de sangre son infestaciones por parásitos intestinales hematófagos, como la ancilostomiasis y la trichocefalosis masiva. En la mujer en edad reproductiva no embarazada la principal causa de deficiencia de hierro es un sangramiento menstrual aumentado asociado a una dieta que tiene cantidades insuficientes de hierro y/o presenta una baja biodisponibilidad de este nutriente (predominante en inhibidores de la absorción de hierro y con un bajo contenido de hierro hemínico). En la embarazada la cantidad promedio de hierro absorbido requerido diariamente es de 0,8 mg en el primer trimestre (menor que mujer no gestante), concentrándose la mayor parte de los requerimientos en los dos últimos trimestres, 4,4 mg en el segundo trimestre y 6,3 mg en el tercer trimestre en mujeres que comienzan su embarazo con depósitos ausentes o mínimos. Por otra parte, la absorción de hierro dietario es baja en el primer trimestre, para luego aumentar progresivamente a medida que declina la nutrición de hierro, llegando a triplicarse alrededor de la semana 36 de gestación. No obstante este aumento, es imposible cubrir los elevados requerimientos sólo con el aporte de hierro de la dieta. Se estima, que a pesar del aumento de la absorción de hierro, se requieren entre 300 a 500 mg de depósitos de hierro para cubrir el déficit neto de hierro impuesto por el embarazo. Esta cuantía de depósitos de hierro es difícil de encontrar aún en sociedades con altos ingresos económicos. En el hombre adulto y mujeres postmenopáusicas la deficiencia de hierro es habitualmente la consecuencia de un sangramiento crónico habitualmente del tracto gastrointestinal.

Cuando el aporte de hierro es incapaz de suplir los requerimientos, se producen etapas progresivas de severidad de la deficiencia de hierro. Inicialmente ocurre un agotamiento de los depósitos de hierro (deficiencia latente), que se evidencia por un descenso de la ferritina sérica bajo el límite normal. Si el balance negativo continúa se pasa a la etapa siguiente en la que se encuentra comprometido el aporte tisular de hierro (eritropoyesis deficiente en hierro) y que se caracteriza inicialmente por un aumento de los receptores de transferrina séricos y posteriormente por una disminución de la saturación de la transferrina y un aumento de la protoporfirina libre eritrocitaria. En caso de

persistir el déficit se llega a la última etapa en la cual existe una anemia, acompañada de microcitosis e hipocromía

3.3. Cuadro clínico y consecuencias

Las manifestaciones son las propias de una anemia, asociada a manifestaciones no hematológicas consecuencia de la mala función de enzimas hierro dependientes. En la carencia de hierro se han descrito alteraciones de la capacidad de trabajo físico y de la actividad motora voluntaria, alteraciones de la inmunidad celular y capacidad bactericida de los neutrófilos, una posible mayor susceptibilidad a las infecciones, alteración de la termogénesis, disminución de la velocidad de crecimiento, alteraciones funcionales e histológicas del tubo digestivo, falla en la movilización de la vitamina A hepática, alteraciones conductuales y del desarrollo mental y motor, alteraciones neurosensoriales como velocidad de conducción más lenta de los sistemas sensoriales auditivo y visual, alteraciones del tono neurovegetativo y ciclo sueño-vigilia. Existen evidencias que estas alteraciones neuro-conductuales no serían del todo recuperables con la terapia con hierro. En embarazadas la anemia severa se asocia a un aumento de la mortalidad materna y fetal. Por otra parte, estudios en los que se ha evaluado el efecto de la anemia ferropriva sobre el embarazo han demostrado que la anemia ferropriva que ocurre tempranamente en el embarazo se asocia a un riesgo 2,7 veces mayor de parto prematuro y 3,1 veces de bajo peso de nacimiento. El riesgo de parto prematuro 5 veces mayor cuando se le añade una metrorragia previa o concurrente. La suplementación con hierro de embarazadas en

poblaciones con una alta prevalencia de anemia ferropriva mejora su nutrición de hierro, aumenta la duración de la gestación y el peso de nacimiento. Hasta hace no mucho tiempo se pensaba que la nutrición de hierro de la madre no tenía ningún impacto sobre la nutrición de hierro del recién nacido y lactante, salvo en casos de una deficiencia materna de hierro severa. Esta falta de relación obedecía más bien a problemas metodológicos. Estudios realizados en países en los que la deficiencia de hierro en la embarazada es alta, han mostrado una asociación entre la nutrición de hierro materna y los niveles de ferritina sérica en el cordón.

3.4. Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de hierro

Para el diagnóstico de la deficiencia de hierro se cuenta con una batería de exámenes. Se dispone de un grupo de análisis sencillos de realizar y de bajo costo los que se utilizan en la pesquisa de esta patología (exámenes de tamizaje o “screening”) y otros más complejos o más caros que se emplean para su confirmación. Entre los primeros se encuentran la medición de la hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y prueba terapéutica. Los exámenes confirmatorios incluyen las mediciones de la saturación de la transferrina, protoporfirina libre eritrocitaria, receptor de transferrina sérico y ferritina sérica. Estos parámetros presentan cambios de los valores normales relacionados con la edad, sexo y algunas condiciones fisiológicas. Los puntos de corte de hemoglobina utilizados para definir anemia se muestran en la tabla 6-1.

Tabla 6-1. Puntos de corte de hemoglobina y hematocrito recomendados por la Organización Mundial de la Salud para el diagnóstico de anemia en una población a nivel del mar.

Grupo	Hemoglobina (g/dL)	Hematocrito (%)
Niños		
6 a 59 meses	11,0	33
5 a 11 años	11,5	34
12 a 14 años	12,0	36
Mujeres no embarazadas (≥15 años)	12,0	36
Embarazadas *	11,0	33
Hombres (≥15 años)	13,0	39

* Puntos de corte utilizados por el Center for Disease Control, USA. Hemoglobina: 1er y 3er trimestre = 11,0 g/dL, 2° trimestre 10,5 g/dL. Hematocrito: 1er y 3er trimestre = 33%, 2° trimestre 32%.

La medición de la concentración de hemoglobina es un examen que se puede realizar en una muestra sanguínea capilar o venosa. Este parámetro mide la última etapa de la carencia de hierro y su especificidad va a depender de la prevalencia de la carencia de este mineral en la población o grupo a estudiar. La superposición que existe entre los valores normales y anormales de hemoglobina es un hecho a considerar en la interpretación de este examen. El hematocrito, si bien es más simple de realizar, es algo menos sensible que la hemoglobina en la detección de anemia.

El volumen corpuscular medio para que tenga valor debe ser medido con un contador electrónico de eritrocitos. Se puede realizar en una muestra sanguínea capilar o venosa. Cabe señalar que en el recién nacido y embarazada existe una macrocitosis fisiológica. La microcitosis no es exclusiva de la deficiencia de hierro, también se puede apreciar en otras condiciones en las que existe un defecto de la hemoglobinización de los precursores eritroides (talasemia, infección o inflamación crónica, intoxicación plúmbica, anemias sideroblásticas, etc.). Al inicio de la reducción de la concentración de hemoglobina en la deficiencia de hierro puede que no se aprecie la microcitosis. En los contadores electrónicos de eritrocitos más avanzados se puede cuantificar el ancho de la distribución del volumen de los eritrocitos (RDW en la sigla en inglés), el que se encuentra aumentado en algunas variedades de anemias entre las cuales se encuentra la anemia ferropriva.

La prueba terapéutica certifica la existencia de la anemia ferropriva. Esta es una prueba fácil de realizar a escala individual, pero difícil en el ámbito poblacional. Consiste en administrar hierro medicinal en una dosis terapéutica (3-5 mg/kg de hierro elemental en niños y 80 mg diarios en adultos, fraccionado en dos dosis) durante un mes. Se considera que la prueba es positiva cuando el aumento de la concentración de hemoglobina es igual o superior a 1 g/dL. Una prueba positiva indica que el sujeto es verdaderamente anémico ferroprivo, incluso a pesar que pueda tener una hemoglobina dentro de los límites normales. Una prueba negativa, siempre que el sujeto haya recibido el hierro en dosis y tiempo adecuados, indica la inexistencia de una anemia ferropriva, no excluyendo una deficiencia de hierro en una etapa previa a la anemia. Otras posibilidades son que el sujeto sea normal a pesar de tener una hemoglobina levemente disminuida (ver más adelante falsa anemia) o corresponder a

una anemia de otro origen.

La protoporfirina libre eritrocitaria aumenta cuando existe una disminución del hierro disponible en el eritroblasto para combinarse con la protoporfirina y formar hem, es por ello que se eleva en la eritropoyesis deficiente en hierro. Al contar con hematofluorómetros esta medición es sencilla de realizar bastando para su determinación una gota de sangre por lo que se puede realizar en una muestra capilar. Valores aumentados se encuentran también en la intoxicación plúmbica y en la anemia de la inflamación/infección aguda y crónica.

Las mediciones del hierro sérico, capacidad total de combinación de hierro (TIBC) y saturación de la transferrina se utilizan frecuentemente como exámenes de confirmación de la deficiencia de hierro. El TIBC constituye una medida de la cantidad de transferrina circulante, proteína que normalmente se encuentra saturada en un tercio de su capacidad. Estos parámetros requieren de una macro muestra sanguínea obtenida en ayunas y en material libre de minerales. Por otra parte, el hierro sérico y saturación de la transferrina presentan una gran variabilidad, existiendo importantes fluctuaciones diarias (ciclo circadiano) e interdías. En la eritropoyesis deficiente en hierro ocurre una disminución del hierro sérico y un aumento de la transferrina, lo que determina que en esta condición exista una reducción de la saturación de la transferrina. En la infección/inflamación aguda o crónica se encuentran disminuidos el hierro sérico, TIBC y saturación de la transferrina. Por otra parte una reducción del TIBC se encuentra en la enfermedad de kwashiorkor, en el síndrome nefrótico y la enteropatía perdedora de proteínas.

Desde hace no mucho tiempo se encuentra disponible la cuantificación del nivel sérico del TfR, parámetro que ya se altera en la deficiencia tisular de hierro incipiente. Estudios en adultos han demostrado que este parámetro tiene una alta sensibilidad y especificidad en la detección de la deficiencia de hierro. Un estudio reciente en lactantes ha demostrado que su sensibilidad no es tan alta como en el adulto si bien posee una gran especificidad. Existen varios "kits" para su medición los que tienen valores que no son comparables hasta que no se disponga de un estándar internacional de referencia. Este parámetro se eleva en la deficiencia de hierro y en la hiperplasia eritroide que es un acompañante de algunas anemias como las hemolíticas, etc. La gran limitación de esta

medición es su elevado costo y su gran ventaja es que no se altera en los procesos infecciosos/inflamatorios agudos o crónicos.

En condiciones normales circula una pequeña cantidad de ferritina en el plasma que se cuantifica por medio de una técnica de ELISA. Su concentración es directamente proporcional al contenido de hierro de los depósitos y sólo se encuentra reducida en la deficiencia de hierro. Sin embargo, la ferritina sérica es un reactante de fase aguda por ello aumenta en la inflamación/infección aguda o crónica. También se encuentra aumentada en la necrosis hepática. Se estima que existe una depleción de los depósitos de hierro cuando la ferritina desciende bajo 10 µg/L en el niño y de 12 µg/L en el adulto. En sujetos con infección/inflamación una ferritina mayor de 50 µg/L descarta la existencia de una depleción de los depósitos de hierro.

Al utilizar estos indicadores de laboratorio se debe considerar las variaciones con el desarrollo que experimentan la hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio, saturación de la transferrina, protoporfirina libre eritrocitaria, ferritina sérica y receptor de transferrina. Por otra parte, la hemoglobina presenta variaciones con el género, embarazo y en la altitud. En sujetos que viven en la altura los valores de referencia se deben incrementar a partir de los 1000 metros. También se debe realizar una corrección en los individuos fumadores.

Las pruebas de laboratorio confirmatorias se emplean para la detección de la deficiencia de hierro antes de la aparición de la anemia, para la confirmación de la etiología ferropriva especialmente en estudios poblacionales, y en el ámbito individual cuando no se obtuvo una respuesta terapéutica satisfactoria o si existen dudas de la etiología ferropriva de la anemia.

Como la sensibilidad y especificidad de los indicadores de laboratorio de la nutrición de hierro difieren considerablemente, el déficit de hierro puede detectarse más precisamente en estudios poblacionales usando una batería de exámenes. Como criterio para el diagnóstico de anemia ferropriva se exige una reducción de la hemoglobina (o hematocrito) junto con una prueba terapéutica positiva, o una reducción de la hemoglobina más uno de los otros exámenes de laboratorio alterados. Para el diagnóstico de deficiencia de hierro sin anemia se exige hemoglobina (o hematocrito) normal, más al menos dos de los otros exámenes de laboratorio alterados. Depleción de los depósitos de hierro

se diagnostica cuando existe sólo una ferritina sérica bajo el límite normal.

3.5. Prevención y tratamiento de la deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro puede prevenirse mediante modificaciones de la dieta, fortificación de los alimentos, suplementación y en los países tropicales además mediante el control de parásitos intestinales hematófagos. Ninguna de estas medidas es excluyente.

Idealmente la deficiencia de hierro debiera prevenirse mediante el consumo de una dieta con un adecuado contenido de hierro de buena biodisponibilidad. Esta condición la cumplen aquellos alimentos de origen animal que contienen preferentemente hierro hem (carnes, sangre). También es aconsejable estimular una lactancia natural de a lo menos 6 meses, dada la excelente absorción del hierro de la leche humana (en lactante de término protege de la deficiencia de hierro hasta los 6 meses, después da protección parcial); promover la ingesta de alimentos favorecedoras de la absorción del hierro no-hem, como son las carnes (vacuno, ave, pescado) y aquellos ricos en ácido ascórbico (jugos, frutas), siendo esta última alternativa una posibilidad barata de mejorar la absorción de hierro. Es fundamental también desincentivar el consumo de preparados ricos en inhibidores: té, café, infusiones de hierbas, yema de huevo etc. Los cambios en la dieta dependen principalmente del factor educación y secundariamente del precio y disponibilidad de los alimentos.

Las principales pérdidas susceptibles de controlar son la infestación intestinal por parásitos hematófagos, el consumo de leche de vaca fresca, especialmente en el primer semestre de vida y las diarreas a repetición. En el control de las enteroparasitosis son fundamentales el tratamiento medicinal de éstas y las medidas de saneamiento ambiental.

El agregado de hierro a los alimentos tiene como objeto reponer las pérdidas de este mineral ocurridas durante el procesamiento (restauración) o aumentar el contenido de hierro del alimento (fortificación). La fortificación de los alimentos con hierro es la forma más práctica de prevenir la carencia de hierro. Tiene la ventaja de ser de un costo relativamente bajo y de no requerir de la cooperación activa de los individuos. Para su implementación se debe seleccionar un vehículo y compuesto de hierro

adecuados. Los programas de fortificación de alimentos pueden ser focalizados a un grupo o ser de tipo universal (dirigidos a la población en general).

La administración de hierro medicinal puede ser de carácter preventivo (suplementación profiláctica) o con fines curativos (suplementación terapéutica). La primera modalidad está indicada cuando la población en riesgo de desarrollar deficiencia de hierro no tiene acceso a alimentos fortificados con este nutriente, o existen requerimientos de hierro muy altos los que deben ser cubiertos en un período corto de tiempo, como ocurre durante el embarazo.

Las dosis de hierro profiláctico son menores a las utilizadas cuando la suplementación tiene un carácter curativo, lo que tiene implicancias en la incidencia de efectos colaterales asociados a la administración de hierro oral. Estos aumentan en proporción geométrica a la dosis utilizada, lo que ha llevado a una progresiva disminución en las dosis de hierro medicinal utilizadas tanto en la prevención o el tratamiento de la deficiencia de hierro. Las manifestaciones adversas ocurren en un 6 a 31% de los casos, siendo los síntomas más comunes náusea, pirosis, dolor abdominal, diarrea o constipación. El mecanismo responsable de estos efectos adversos es un fenómeno de producción de radicales libres, desencadenado por el hierro iónico, lo que produce un daño en la mucosa gastrointestinal. La efectividad de la suplementación preventiva se ve limitada por numerosos factores, siendo el principal la falla en la adherencia a dosis diarias administradas por un período relativamente prolongado, lo que ha sido atribuido a los efectos colaterales del hierro, factores psicológicos, falsas creencias (ejemplo temor en la embarazada de macrosomía fetal con una consiguiente dificultad en el parto) y a la falta de motivación de una persona que o bien no se siente enferma o ignora las consecuencias de experimentar una deficiencia de hierro y tiene que tomar un medicamento durante un lapso relativamente extenso. Existen varias medidas que se pueden realizar para aumentar la adherencia a la suplementación. Una muy importante es la motivación de los sujetos y la educación sobre la importancia de la prevención y tratamiento de la deficiencia de hierro, sus consecuencias sobre la salud, así como de los posibles efectos adversos y su manejo. También es importante considerar que el producto a administrar debe presentar la mejor calidad de envase, así como

unas características físicas y organolépticas adecuadas. Finalmente es necesario implementar estrategias para reducir la incidencia de los efectos colaterales de la administración de hierro. Ultimamente se han desarrollado compuestos de hierro que presentan una baja incidencia de efectos indeseables gastrointestinales. Estos preparados medicinales se caracterizan por proveer una liberación gradual de hierro iónico al intestino. Por otra parte, existen estudios que han demostrado que la administración intermitente de hierro (una o dos veces a la semana) se asocia a una menor frecuencia de efectos colaterales. En un metanálisis de los estudios de suplementación intermitentes, los niveles de hemoglobina alcanzados con la terapia una a dos veces a la semana son menores que en la administración diaria, requiriendo en la primera de un período más largo de suplementación para alcanzar los valores obtenidos con la administración diaria. Este hecho hace que la suplementación intermitente no sea aconsejada para la suplementación de embarazadas y para el tratamiento de la anemia ferropriva.

En la terapia de la anemia ferropriva se utilizan compuestos de hierro de buena biodisponibilidad en una cantidad diaria de 3-5 mg/kg de hierro elemental en el niño y 80 a 120 mg en el adulto fraccionada en 2 dosis, administradas preferentemente alejadas de las comidas, de modo de evitar las interacciones con los ligandos inhibidores presentes en la dieta. La hemoglobina se recupera habitualmente al mes del tratamiento, requiriéndose un tratamiento adicional por 2 a 3 meses para repletar los depósitos de hierro.

4. SOBRECARGA DE HIERRO

La sobrecarga de hierro puede deberse: a) por un aumento de la absorción intestinal, como ocurre en la hemocromatosis hereditaria, alteraciones de la movilización del hierro tisular y b) por transfusiones a repetición en pacientes especialmente en aquellos con anemia aplásica o anemias hemolíticas crónicas.

4.1. Hemocromatosis

La **Hemocromatosis** es una alteración fisiopatológica en la que se produce un depósito anormal y lesivo de hierro en las células parenquimatosas de diferentes órganos. Se conocen dos tipos de hemocromatosis: primaria o hereditaria (HH) y hemocromatosis secundaria (HS).

La HH, es un desorden genético del metabolismo del hierro, existen tres variantes: clásica, juvenil y mediterránea. Su mecanismo de transmisión es autosómico recesivo que da lugar a un aumento de la absorción de hierro por la mucosa gastrointestinal y origina un depósito progresivo de este metal desde el nacimiento en las células parenquimatosas de diferentes órganos (corazón, hígado, órganos endocrinos, piel y articulaciones) que con el tiempo daña los tejidos y da lugar a enfermedades como cardiomiopatía, cirrosis, diabetes mellitus, hipogonadismo, hiperpigmentación cutánea y artropatía, si no se diagnostica y trata precozmente.

La HS se produce como consecuencia de alteraciones patológicas diversas: hepatopatía alcohólica crónica, aumento de la ingesta oral de hierro, porfiria cutánea tarda, atransferrinemia congénita, hemocromatosis perinatal idiopática y sobrecarga de hierro parenteral.

4.1.1. Hemocromatosis hereditaria tipo 1 (clásica)

Se caracteriza por ser un desorden genético del metabolismo del hierro, exclusivo de la raza blanca, afecta a uno de cada 300 individuos, con una incidencia de portadores de uno de cada diez individuos, es 5 veces más frecuente en hombres que en mujeres, tiene carácter recesivo y ligado al HLA; en este sentido es característico encontrar asociación con HLA-A3 y dentro de él, los haplotipos A3,B7 y A3,B14.

En el año 1996, Feder clonó el gen asociado a este tipo de hemocromatosis, denominado HFE, el cual se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) próximo al gen HLA-A, y en él se han detectado dos mutaciones: una a nivel de exon 4 que produce una sustitución de guanina por adenina en la posición 845 del gen, que provoca un cambio aminoacídico de cisteína por tirosina en la posición 282 (C282Y) del dominio $\alpha 3$ de la cadena polipeptídica de la proteína HFE, esta mutación se encuentra en el 85% de los individuos con diagnóstico clínico de la enfermedad. La segunda mutación en importancia es a nivel de exon 2 que produce una sustitución de citosina por guanina en la posición 183 del gen, que provoca un cambio aminoacídico de histidina por ácido aspártico en la posición 63 (H63D) de la proteína; se encuentra solo en un 2.1% de los individuos con hemocromatosis. Cualquiera de estas mutaciones en el gen HFE codificaría una proteína HFE anormal la cual no podría participar

en el mecanismo de la homeostasis del hierro. Se han descrito otras mutaciones menos frecuentes del gen HFE, que habitualmente se asocian a formas leves de la enfermedad.

Las mutaciones mencionadas que afectan a la proteína HFE, provocan cambios a nivel estructural ya que se rompe el puente de disulfuro que une el dominio $\alpha 3$ de la HFE con la $\beta 2m$ en la superficie celular, por lo tanto, la HFE no se puede unir al Tfr; y éste queda en cierta medida libre, lo que favorece el paso rápido de hierro desde el enterocito al capilar sanguíneo. Esto permite comprender la pobreza de hierro en el enterocito de los enfermos con hemocromatosis. Esta pobreza de Fe intracelular condiciona que las IRP y los IRE-NAR sensibles al hierro, no favorezcan la formación de apoferritina pero sí la de producción de DMT1 y Tfr.

En pacientes con HH, se encuentra aumentada la proteína DMT1; esto se debe a que el mRNA de esta proteína también posee en su región 3' no traducida elementos IRE, donde se une con gran afinidad la IRP-1, y de esta manera estabiliza el mRNA de la proteína y aumenta su expresión en la cara apical del enterocito, todo esto sucede cuando hay baja concentración de hierro intracelular.

4.1.2. Hemocromatosis hereditaria tipo 2 (juvenil)

Es un desorden autosómico recesivo en el que existe una mutación que se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 1; las manifestaciones clínicas se presentan antes de los 30 años; en estos pacientes es característico encontrar hipogonadismo hipogonadotrófico, diabetes y cardiomiopatía, pero a diferencia de la hemocromatosis tipo 1 un daño hepático severo es menos frecuente. Recientemente se han descrito dos familias con hemocromatosis tipo 2 asociadas a mutaciones de hepcidina.

4.1.3. Hemocromatosis hereditaria tipo 3 (mediterránea)

Un nuevo tipo de hemocromatosis (tipo 3 o HFE 3) fue recientemente caracterizado en pacientes italianos; es un desorden relacionado con el cromosoma 7 (7q22), exón 6. Estos pacientes son homocigotos por una mutación (Y250X) del Tfr 2, el cual es un miembro de la familia de receptores de transferrina, que muestra una moderada homología con el Tfr, a nivel de su dominio extracelular. Este receptor también capta el hierro celular, pero este mecanismo no

es regulado por el hierro, por lo que se sugiere que el TfR 2 tiene una distinta función en el metabolismo del hierro. La falta de interacción entre TfR 2 y HFE sugiere que TfR 2 tiene un rol independiente en la regulación del hierro, comparado con la vía HFE/TfR.

Existen 2 formas de TfR 2 (a y b), la forma a se expresa mayormente en el hígado, es una proteína de transmembrana, la forma b se expresa en bajos niveles, por no tener dominio extracelular y de transmembrana se piensa que es proteína intracelular. Los pacientes con HFE 3 tienen el receptor de transferrina tipo 2 (a y b) inactivado por la mutación antes descrita.

Mediante técnicas de biología molecular (PCR, Reacción de Polimerasa en cadena), se determinaron dos nuevas mutaciones que inactivan el TfR tipo 2. Una de estas mutaciones es la E60X, en la cual existe una inserción de un residuo de citosina en el exón 2 (84-88 insC). Esta mutación resulta por una prematura detención del codón en el aminoácido 60 en la proteína. La otra mutación se identificó en el exón 4, en el cual ocurría una transversión de timina por adenina (T→A) en la posición 515 del DNA del TfR 2. Este cambio de nucleótidos da como resultado un cambio aminoacídico de metionina por lisina en la posición 172 (M172K) de la proteína.

En relación a la mutación E60X afecta la transcripción del aTfR2 pero no afecta la transcripción del bTfR 2 a diferencia de la mutación Y250X. La mutación M172K produce un aTfR 2 modificado y afecta la iniciación del codón de la variante b. Se especula que la ausencia del bTfR 2 podría estar asociado con el fenotipo severo en Y250X y en M172K homocigotos, por lo tanto, individuos con la mutación E60X homocigotos tendrían una función parcial de la proteína (TfR 2). Se considera que el bTfR 2 tendría una significancia fisiológica.

Los pacientes con HFE 3 presentan todas las manifestaciones clásicas de la hemocromatosis.

4.1.4. Hemocromatosis Hereditaria Tipo 4

Recientemente se ha caracterizado una nueva entidad genética autosómica dominante, en que fenotípicamente se semeja a la hemocromatosis clásica, pero que a diferencia de la anterior presenta una anemia en edades tempranas. En esta patología se han descrito mutaciones en el gen de la ferroportina 1, que determinaría una pérdida de la función de esta proteína

exportadora de hierro, cuya consecuencia es una acumulación de hierro en los macrófagos y una menor disponibilidad de hierro para la transferrina plasmática y tejido eritropoyético, que llevaría a un aumento de la absorción intestinal de hierro con la consiguiente sobrecarga de hierro.

4.2. Aceruloplasminemia

Es un desorden autosómico recesivo extremadamente raro, que ha sido descrito preferentemente en japoneses. En esta afección existen mutaciones del gen de la ceruloplasmina el que está localizado en el cromosoma 3q21-24. Esta proteína por su actividad ferroxidasa cataliza la oxidación del hierro ferroso a férrico, cambio indispensable para la unión del hierro a la transferrina. En hepatocitos y células del sistema reticuloendotelial cooperaría con la ferroportina 1. La ausencia de la ceruloplasmina resulta en una acumulación de hierro en el hígado, páncreas, ganglios basales y núcleo dentado, que lleva a una diabetes mellitus, degeneración retinal, ataxia y demencia. Además se encuentra una anemia leve a moderada (consecuencia de la incapacidad de reciclar el hierro desde el sistema reticuloendotelial) que se acompaña de niveles disminuidos de hierro y una ferritina sérica aumentada.

4.3. Atransferrinemia

Es una rara afección, probablemente autosómica recesiva, en la que existe una alteración de la movilización del hierro que lleva a una menor disponibilidad de este mineral para la eritropoyesis y acumulación de hierro en los tejidos. Esta enfermedad se caracteriza por una deficiencia de transferrina que se acompaña de una anemia microcítica hipocroma severa, refractaria a la terapia con hierro, y alteraciones en diferentes parénquimas (hígado, corazón, páncreas) producto del daño originado por el aumento del contenido de hierro.

4.4. Hemocromatosis neonatal

Este es un síndrome de causa no conocida en que coexiste una enfermedad hepática (cirrosis o hepatitis fulminante) antenatal con un exceso de hierro tisular. La sobrecarga masiva de hierro en el hígado lleva a una falla hepática en el periodo perinatal. Existe también una acumulación de hierro en el miocardio y células pancreáticas acinares. Algunos casos parecen corresponder a una alteración en el manejo del

hierro tisular, mientras otros parecen corresponder a una falla hepática de aparición en el período fetal con una sobrecarga de hierro secundaria. En algunos casos hay sugerencias de una herencia autosómica recesiva. Hasta el momento no ha sido posible demostrar ningún gen alterado.

4.5. Sobrecarga de hierro africana (Siderosis Bantu)

Esta es una patología que se observa en poblaciones africanas que beben en forma excesiva una cerveza producida en vasijas de hierro no galvanizado. A pesar de que en estos casos existe una ingesta de hierro excesiva, no todos los bebedores de esta cerveza desarrollan la enfermedad. Análisis de segregación han dado bases para plantear una susceptibilidad genética, en la que individuos con una alteración en un gen distinto del de la hemocromatosis desarrollarían la enfermedad cuando son expuestos a un consumo elevado de hierro. El patrón de la sobrecarga de hierro es distinto al observado en la hemocromatosis hereditaria, existiendo una sobrecarga marcada de hierro en las células de Kúpfer y en hepatocitos, que más se asemeja a la siderosis transfusional. La manifestación más prominente es la cirrosis hepática, la que en ocasiones se complica de un hepatocarcinoma. La diabetes y cardiomiopatía son menos frecuentes. Si bien la ferritina sérica se encuentra elevada, la saturación de la transferrina no siempre se correlaciona con el grado de sobrecarga de hierro. Estos pacientes son más susceptibles a infecciones, teniendo una mayor incidencia de tuberculosis. Se piensa que en esta patología existiría una alteración en el reciclamiento de hierro.

4.6. Manifestaciones clínicas de la Hemocromatosis Hereditaria

Los síntomas de la (HH) son consecuencia de la sobrecarga de hierro en diferentes tejidos. Esta enfermedad se manifiesta entre la cuarta y quinta década de vida en hombres y algo más tarde en mujeres, debido a las pérdidas de hierro por la menstruación y por los embarazos. La expresión clínica de la enfermedad sólo se observa en homocigotos. Los heterocigotos presentan menos alteraciones de los parámetros del hierro y solo desarrollan una sobrecarga significativa cuando coexisten con otras enfermedades que afecten al metabolismo del

hierro: heterocigotos β -talasemia, esferocitosis hereditaria, porfiria cutánea tarda.

Los órganos y sistemas más afectados por esta enfermedad son el hígado, la piel, el corazón y el sistema endocrino.

El hígado es uno de los órganos más afectados. En el 90% de los casos existe una hepatomegalia que muchas veces se acompaña de dolor en el hipocondrio derecho. En la histología se puede apreciar necrosis y cirrosis. El 70% de los pacientes presenta cirrosis, la que es un factor muy importante de pronóstico desfavorable. Por otra parte, la cirrosis hepática puede llevar al desarrollo de un hepatoma (carcinoma hepatocelular primario). La producción de radicales libres, gatillada por la sobrecarga de hierro, produce una peroxidación lipídica que genera el daño hepático.

La alteración cardíaca más frecuente es una cardiomiopatía que en su evolución se acompaña de una insuficiencia cardíaca congestiva resistente a los fármacos convencionales y que responde al disminuir la sobrecarga de hierro. También se pueden observar arritmias tanto auriculares como ventriculares.

Un 90% de los pacientes presenta una hiperpigmentación de la piel (color pardo grisáceo), especialmente de las zonas expuestas al sol, debido a un incremento de la síntesis de melanina y a la acumulación de hemosiderina en los macrófagos y fibroblastos dérmicos.

En la hemocromatosis hereditaria son prevalentes las alteraciones endocrinológicas. La acumulación de hierro en las células gonadotróficas origina una disfunción hipotálmica con falla hipofisaria e hipogonadismo (atrofia testicular e impotencia en hombres y amenorrea en mujeres). La diabetes mellitus es frecuente (71%) y se debe a la sobrecarga de hierro del páncreas que lleva a una fibrosis de este órgano y a una destrucción las células β -pancreáticas, además se puede presentar un aumento de la resistencia insulínica secundaria a la cirrosis hepática.

Las manifestaciones osteoarticulares son frecuentes en estos pacientes. Un 20 a 25% tiene síntomas articulares, especialmente de manos, rodillas y columna. También se produce un

depósito anormal de pirofosfato cálcico que lesiona el cartílago articular pudiendo llevar incluso a una poliartritis que se le ha denominado pseudogota. Desgraciadamente, los síntomas articulares no mejoran tras la eliminación del exceso de hierro. Osteoporosis se observa en el 45% de los casos y es más frecuente si hay hipogonadismo.

La sobrecarga de hierro favorece el crecimiento bacteriano y por otro lado disminuye la función de los leucocitos polimorfonucleares, por esto los pacientes son más propensos a desarrollar infecciones bacterianas, sobre todo con las especies *Yersenia* y *Vibrio*. Las infecciones por *Yersinia enterocolitica* pueden ser muy graves y originar sepsis y abscesos hepáticos.

4.7. Diagnóstico de la hemocromatosis hereditaria

La determinación bioquímica más sensible para el diagnóstico de la HH la saturación de la transferrina; así que es sugerente de la enfermedad el hallazgo de dos mediciones superiores al 60% en hombres y al 55% en mujeres. Si el paciente tiene la saturación de la transferrina normal, no es necesario ningún seguimiento. Otra prueba útil es la cuantificación de la ferritina sérica. Es sospechoso el encontrar una ferritina sérica $>400 \mu\text{g/L}$ en hombres y $>200 \mu\text{g/L}$ en mujeres, siempre que no existan otras causas posibles del aumento de la ferritina tales como la necrosis hepatocelular en la hepatitis C, enfermedades inflamatorias, hipertiroidismo y neoplasias. Dado que la ferritina sérica es una proteína de fase aguda, la medición conjunta de la proteína C reactiva y VHS, ayuda a descartar otras causas de elevación de la ferritina. Una ferritina sérica por encima de $1000 \mu\text{g/L}$ es el indicador bioquímico más potente de fibrosis hepática. La presencia de una saturación de transferrina y ferritina elevadas tiene una sensibilidad diagnóstica del 93%. En los heterocigotos se pueden encontrar pequeñas diferencias con los sujetos normales en los indicadores de laboratorio de metabolismo de hierro.

Si las pruebas de tamizaje (saturación de la transferrina y/o ferritina sérica) son sugerentes

de hemocromatosis hereditaria es necesario realizar una biopsia hepática cuantificación de los depósitos de hierro, procedimiento que tiene importancia para el diagnóstico y pronóstico de esta patología puesto indica la existencia o no de cirrosis, la intensidad de la fibrosis, etc. El contenido hepático de hierro puede ser evaluada por métodos histoquímicos (azul de Prusia de Perls) y técnicas cuantitativas. En la coloración de Perls, se nota la presencia de gránulos de coloración azulada (hemosiderina) en los hepatocitos, predominando frecuentemente en el área pericanalicular. Basándose en esta coloración se clasifica el contenido de hierro en 4 grados: IV (100% de los hepatocitos afectados), III (75%), II (50%) y I (25%). En la hemocromatosis el contenido de hierro hepático se encuentra entre los grados III y IV, afectando especialmente a los hepatocitos periportales. Por otra parte el contenido de este metal puede ser cuantificado por espectrometría de absorción atómica, siendo sugerente de la enfermedad una concentración de hierro hepático por encima de $80 \mu\text{mol}$ por gramo de tejido seco. También es posible calcular el índice de hierro hepático (micromoles de hierro por gramo de tejido seco/edad en años del paciente). Este índice sirve para diferenciar si el exceso de hierro hepático se debe a una hemocromatosis hereditaria o a una hepatopatía alcohólica; si es ≥ 2 es concluyente de una hemocromatosis hereditaria. Un índice hepático de hierro ≥ 2 puede considerarse diagnóstico, aunque no es igual en varones que en mujeres debido a las pérdidas de hierro por la menstruación y embarazos. La Tomografía Axial computarizada permite detectar aumentos de la densidad hepática compatibles con la sobrecarga de hierro, pero sólo cuando es 5 veces superior al límite máximo normal.

Los exámenes genéticos sirven para confirmar el diagnóstico en pacientes con aumento de los depósitos de hierro y para el tamizaje de sus familiares. La técnica utilizada es la de PCR, la que sirve para detectar las mutaciones C282Y y H63D entre otras y determina si el individuo es de genotipo homocigoto, heterocigoto o doble heterocigoto. La exactitud de este análisis es de más del 99% (tabla 6-2).

Tabla 6-2. Significado del test genético para el diagnóstico de la hemocromatosis hereditaria

Genotipo	Significado
C282Y +/+	Riesgo elevado de desarrollar la enfermedad (50-95%)
C282Y +/-	No la desarrollan, transmiten el gen
C282Y -/-	Libres del gen
C282Y / H63D	Riesgo de desarrollar la HH (0.5-2.0%)
H63D / H63D	Riesgo < 1.0%

4.8. Tratamiento de la Hemocromatosis Hereditaria

La flebotomía es el tratamiento de elección, es simple, bien tolerada y eficaz. Consiste en extraer 500 mL de sangre semanal, lo que elimina de 200-250 mg de hierro. Se debe monitorear los niveles de ferritina y saturación de transferrina, hasta alcanzar una concentración de ferritina <50 µg/L y una saturación de transferrina <50%. La frecuencia de las flebotomías depende de variables como la superficie del individuo, tolerancia y estilo de vida. En los casos de miocardiopatía, este tratamiento mejora la función ventricular izquierda así como la sobriedad. Durante la terapia de flebotomía se recomienda recibir vitamina E y ácido fólico.

Los quelantes de hierro no son tan efectivos como las flebotomías ya que sólo logran eliminar 10-20 mg de Fe por día, pero ellos pueden ser empleados en pacientes con anemia grave, enfermedades hepática y cardíaca severas. También se les puede utilizar en combinación con las flebotomías con la finalidad de lograr una rápida movilización del hierro. El agente quelante de hierro utilizado es la desferrioxamina que forma un complejo con el Fe⁺³ denominado ferrioxamina, que es excretado a través de la orina. La desferrioxamina mejora la función ventricular y suprime las arritmias de la reperfusión post isquémica del miocardio.

El consumo de una dieta pobre en hierro contribuye a reducir la acumulación de hierro. En ese sentido se deben consumir alimentos con un bajo contenido de hierro, ricos en inhibidores de la absorción de hierro y pobres en promotores de la absorción. También se recomienda no consumir alcohol ya que éste aumenta la absorción intestinal de hierro.

Los resultados del trasplante hepático no son tan favorables como en otras enfermedades crónicas del hígado, ya que los pacientes suelen presentar un compromiso orgánico múltiple.

La terapia de esta enfermedad, mediante sangrías y la administración de quelantes, mejora en forma significativa algunas manifestaciones como el dolor abdominal, la pigmentación cutánea, las manifestaciones cardíacas (insuficiencia cardíaca y arritmias) y la alteración del metabolismo de la glucosa. También produce una disminución de tamaño del bazo y del hígado, y normaliza las pruebas de función hepática. Sin embargo la artritis, el hipogonadismo y la cirrosis no experimentan una mejoría.

La mortalidad a los cinco años es del 11% para los que reciben una terapia intensiva de eliminación del hierro y del 69% para los no tratados. Las principales causas de muerte en los pacientes no tratados son la insuficiencia cardíaca (30%), la insuficiencia hepatocelular (25%) y el carcinoma hepatocelular (30%).

5. ANEMIA DE ENFERMEDADES CRÓNICAS Y DE LA INFLAMACIÓN AGUDA

La anemia de enfermedades crónicas (AEC) es la más frecuente en los pacientes hospitalizados y la segunda en ocurrencia en la población general. Se define como aquella anemia asociada a enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas, neoplásicas o a grandes traumatismos. En general su severidad es proporcional a la enfermedad de base.

La AEC es primariamente una anemia debida a una falla en la producción eritrocitaria, que se acompaña de una alteración del metabolismo del hierro en que destaca la coexistencia de una hipoferrremia con depósitos de hierro normal o

aumentado. La anemia es normocítica y normocrómica, sin embargo se ha observado que un 30-50% de los pacientes presentan hipocromía y microcitosis.

En la patogenia de la AEC participan algunas citoquinas y la eritropoyetina. Las primeras investigaciones de niveles de eritropoyetina en AEC fueron efectuadas en pacientes con artritis reumatoide. Aunque estos pacientes tienen un nivel de EPO aumentado como respuesta a su anemia, los niveles de EPO producidos son menores que aquellos detectados en otros pacientes con igual grado de anemia, pero no relacionada con enfermedad crónica. Hallazgos similares se han observado en pacientes con cáncer y con SIDA. Si bien la menor producción relativa de EPO pudiera contribuir a la reducción de la eritropoyesis en la AEC, ésta no debe ser considerada como la causa principal, ya que los niveles de EPO se encuentran aumentados comparados con individuos normales sin anemia.

Por lo anterior una falla de la médula ósea para responder al aumento de la EPO tiene un rol fundamental en la génesis de la AEC. En esta falla medular tienen una participación crucial diversas citoquinas que van a inhibir la proliferación de las células progenitoras eritroides y alterar el metabolismo del hierro. La interleuquina-1 (IL-1) es capaz de inhibir la formación de unidades formadoras de colonias BFU-E y CFU-E (progenitores eritroides tempranos). Se ha visto que el efecto sobre CFU-E es indirecto estando mediado por el interferón- γ (IFN- γ producido por linfocitos T como consecuencia de la acción de IL-1. El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) también es capaz de inhibir a las BFU-E y en forma indirecta a las CFU-E. En este último caso el efecto está mediado por el IFN- β , producido por las células del estroma medular bajo estímulo del TNF.

En la AEC existen profundas alteraciones del metabolismo del hierro. Existe un bloqueo en la entrega de hierro por el sistema retículoendotelial y una menor absorción intestinal de este mineral lo que produciría una deficiencia de hierro funcional que limita la eritropoyesis. Estas alteraciones están mediadas por algunas citoquinas. Las citoquinas y proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro como HFE, hepcidina, etc.

La vida media del glóbulo rojo en la AEC está leve a moderadamente disminuida. En estudios

relacionados en pacientes con enfermedades crónicas se estableció que la vida media de sus glóbulos rojos era de 80-90 días. Se cree que este fenómeno está relacionado con factores extracorpóreos, ya que al ser transfundidos a un paciente normal, la supervivencia de los glóbulos rojos es normal.

Los pacientes con infecciones/inflamaciones agudas, incluso leves, pueden presentar una anemia transitoria con alteraciones de laboratorio semejantes a las que se observan en la AEC.

La clínica de la anemia secundaria a enfermedades crónicas o enfermedades agudas está comandada por el cuadro base. La anemia es típicamente leve a moderada. Habitualmente es asintomática y de evolución estable en el tiempo en el caso de la AEC. En las infecciones/inflamaciones agudas es de curso autolimitado. Los exámenes de laboratorio, además de la anemia muestran un VCM normal o disminuido, hipoferrremia, transferrina disminuida, saturación de la transferrina disminuida o normal, protoporfirina libre eritrocitaria aumentada y receptor de transferrina sérico normal y ferritina sérica aumentada. Este cuadro de laboratorio es muy parecido a la anemia ferropriva con la diferencia de que en la anemia ferropriva los niveles séricos de receptor de transferrina están aumentados y la ferritina sérica está disminuida. Por otra parte, en la EAC o infección aguda existe un aumento de la proteína de fase aguda y VHS lo que no ocurre en la anemia ferropriva.

6. ANEMIAS SIDEROBLÁSTICAS

Las anemias sideroblásticas son un grupo heterogéneo de desórdenes que se caracterizan por presentar una alteración en la síntesis del grupo Hem y sideroblastos en anillo en la médula ósea. El grupo Hem es importante para muchas enzimas mitocondriales, y también es un componente integral de la hemoglobina, donde cumple funciones tanto estructurales como funcionales. También modula la transcripción de mRNA de la globina.

El hierro es un importante elemento que integra al grupo Hem tanto estructuralmente como funcional (ver punto 2.5) y además participa como cofactor de diversas enzimas.

En las anemias sideroblásticas se produce una acumulación de hierro amorfo en las mitocondrias de los eritroblastos de la médula ósea, en forma de fosfato férrico e hidróxido de hierro, llamándose a estas células sideroblastos en anillo.

Las anemias sideroblásticas se caracterizan por presentar en la médula ósea, una eritropoyesis inefectiva y una hiperplasia eritroide acompañada con un recuento normal o levemente aumentado de reticulocitos. En sangre periférica, los glóbulos rojos son mayoritariamente microcíticos hipocromos, pero pueden presentarse como normocíticos normocromos; el hecho de que puedan tener un grado de hipocromia proporciona una evidencia de una síntesis alterada de hemoglobina.

Otra característica importante es la sobrecarga

de hierro; sin embargo la causa de ésta es todavía confusa. Se ha establecido que la eritropoyesis inefectiva está asociada con un aumento de la absorción intestinal de hierro, y así contribuye a la sobrecarga.

Hay varios mecanismos que producen una síntesis defectuosa del Hem y se reflejan en diversas formas de anemias sideroblásticas (tabla 6-3). Estas se clasifican en dos grupos: Anemias sideroblásticas hereditarias y anemias sideroblásticas adquiridas, siendo estas últimas más comunes.

Tabla 6-3. Clasificación de Anemias Sideroblásticas

<p>Anemia sideroblástica hereditaria</p> <ul style="list-style-type: none"> Ligada al cromosoma X <ul style="list-style-type: none"> Forma autosómica dominante Forma autosómica recesiva Forma congénita Aislada, herencia indeterminada Asociada a citopatías mitocondriales (síndrome de Pearson) <p>Anemia sideroblástica adquirida</p> <ul style="list-style-type: none"> Idiopática Asociada con mielodisplasia, desórdenes mieloproliferativos Reversible, asociada con: <ul style="list-style-type: none"> Alcoholismo Ciertas drogas (isoniazida, cloramfenicol) Deficiencia de cobre (nutricional, toxicidad por Zinc) Hipotermia

Desde el punto de vista clínico los pacientes se caracterizan por presentar síndrome anémico y además visceromegalia y arritmia cardiaca y en cuanto a parámetros de laboratorio, generalmente presentan: Hemoglobina disminuida (menor a 10 g/dL), CHCM disminuida (hipocromia), Hierro sérico aumentado, TIBC normal o disminuida, Saturación de transferrina aumentada, Hemosiderina medular aumentada y Presencia de sideroblastos en anillo.

6.1. Anemia sideroblástica hereditaria

Este tipo de anemia es infrecuente. Se caracteriza por un defecto en el gen de la enzima ALAS. Hay dos genes que codifican a ALAS, por lo tanto tiene dos isoenzimas. Un gen codifica para ALAS1 en el cromosoma 3 (forma autosómica) y está ubicada principalmente en el hígado. El otro gen codifica para ALAS2

ubicado en el cromosoma X (región Xp11.21). Por lo tanto, hay cuatro tipos de Anemia sideroblástica hereditaria (ASH): las ligadas al cromosoma X, herencia autosómica, casos aislados congénitos y citopatías mitocondriales:

ASH por herencia ligada al cromosoma X. Las ASH ligada al cromosoma X ocurre principalmente en hombres (XY). Básicamente se produce una mutación de la isoenzima ALAS2 que está íntimamente relacionada con células eritroides inmaduras ya que su expresión está modulada por la eritropoyesis. A consecuencia de esto, la enzima tiene baja afinidad por el fosfato de piridoxal, hay una inestabilidad estructural, y el sitio catalítico es anormal. Cualquiera de estas anomalías disminuye la actividad de ALAS y obviamente la producción de Hem. Como consecuencia de esto, la síntesis de hemoglobina también está disminuida.

ASH por herencia autosómica. Se refiere a la transmisión de la ASH por formas autosómicas recesivas o dominantes.

ASH, forma congénita. Representan casos en que los padres aunque sean normales, sus hijos nacen con ASH.

ASH por mutaciones mitocondriales. Son desórdenes producidos por deleciones del genoma mitocondrial.

Cuadro clínico

Este tipo de anemia aparece generalmente en la niñez. Puede cursar con visceromegalia, sobrecarga de hierro. Como consecuencia de esta sobrecarga se presenta diabetes y arritmias cardíacas. La anemia puede ser altamente variable; casos graves pueden presentarse como anemia microcítica- hipocroma, con siderocitos en sangre periférica. En médula ósea hay hiperplasia eritroide, acompañada de eritropoyesis inefectiva, producto de un desequilibrio entre la síntesis de Hem y formación de hemoglobina, y sideroblastos en anillo.

Tratamiento de ASH

Casi la mayoría de los pacientes con ASH responden a la administración de piridoxina, expresándose en el aumento del recuento de reticulocitos, pero los signos de anemia no desaparecen. Los pacientes que no responden a la piridoxina son transfundidos periódicamente con concentrado de glóbulos rojos. En pacientes con anemia moderada, la sobrecarga de hierro es tratada con flebotomías. Para pacientes con anemia severa se utiliza el quelante de hierro desferroxamina.

6.2. Anemia Sideroblástica Adquirida

La anemia sideroblástica adquirida (ASA) es más común que la ASH. Se manifiesta en adultos. Este tipo de anemia se refiere a un defecto de la enzima ALAS, secundaria a cualquier daño. Existen las ASA idiopáticas y las ASA reversibles.

Anemia Sideroblástica Adquirida Idiopática (ASAI)

Está relacionada con los síndromes mieloproliferativos (SMP) y mielodisplásticos (SMD). Ocurre en personas de mediana edad. Hay tres formas de ASAI:

- Anomalia del cromosoma 5 q⁻ confinada a la serie eritroide, llamada anemia sideroblástica pura.
- Anormalidad de las tres líneas celulares. Las

mutaciones cromosómicas pueden ser múltiples: deleciones, trisonomía o inversión.

- Mutaciones puntuales del DNA mitocondrial de precursores eritroides tempranos (síndrome de Pearson).

Es una anemia crónica, estable, con una falla medular progresiva o una evolución leucémica. Esta falla medular se refleja en sangre periférica con citopenias en las tres líneas celulares.

Cuadro clínico. Esplenomegalia leve y sobrecarga de hierro. En el hemograma se aprecia una anemia normocítica (algunas veces puede cursar con macrocitosis), con hipocromía leve, presencia de punteado basófilo, leucopenia y trombocitopenia moderada. En el mielograma se observa hiperplasia eritroide, aumento considerable de sideroblastos en anillo. La saturación de transferrina y ferritina sérica están aumentadas.

Tratamiento. La mayoría de los pacientes son refractarios al tratamiento con piridoxina. En reemplazo se utilizan transfusiones periódicas y otros tratamientos de sostén.

Anemia Sideroblástica Adquirida Reversible (ASAR)

Es una anemia inducida por drogas y toxinas. Estas sustancias inhiben algún paso de la biosíntesis del Hem. Frecuentemente, la anemia sideroblástica es corregida con la eliminación del agente causal.

ASAR inducida por drogas

- **ASAR inducida por etanol.** El etanol es la causa más común de ASAR inducida por toxinas. Se produce por el abuso de alcohol. El mecanismo que produce anemia es la inhibición de la síntesis del grupo Hem, en varios de los pasos.

En sangre periférica, la hemoglobina es normal y el volumen corpuscular medio (VCM) es normal o levemente aumentado, hay presencia de siderocitos. En médula ósea, se presentan eritoblastos con vacuolas como resultado de una injuria o estrés de las células y también sideroblastos en anillo.

Al dejar de consumir alcohol, desaparecen los sideroblastos en anillo dentro de pocos días a dos semanas.

- **ASAR inducida por agentes antituberculosos.** Algunas drogas que se

usan para el tratamiento de la Tuberculosis como isoniazida, pirazinamida y cicloserina entre otras, son causales de anemia sideroblástica.

Estas drogas pueden interferir en el metabolismo de la vitamina B₆, disminuyendo el piridoxal fosfato (PLP) por lo que la actividad de ALAS estará disminuida así como también la producción del hem. La isoniazida puede inhibir la enzima piridoxal fosfoquinasa (formación de PLP).

La anemia se acompaña de niveles séricos disminuidos de PLP y actividad enzimática dependiente de PLP disminuida.

En sangre periférica la anemia es microcítica- hipocroma. Esta anemia puede revertirse administrando grandes dosis de piridoxal durante el tratamiento de la tuberculosis.

- **ASAR inducida por cloramfenicol.** Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis proteica bacteriana fijándose en la unidad 50 S del ribosoma procarionte y a su vez, puede inhibir la síntesis proteica en las mitocondrias de los humanos. Es por esta inhibición que el cloramfenicol induce anemia sideroblástica. La síntesis alterada de hem es identificada por una disminución de las actividades de ferroquelatasa y ALA sintetasa.

Se ha verificado que esta droga también reduce la expresión del receptor de transferrina y ferritina. En sangre periférica, se observa reticulocitopenia, anemia microcítica – hipocroma. El hierro sérico está aumentado. Con la discontinuación del uso del cloramfenicol desaparecen los sideroblastos en anillos.

ASAR inducida por factores nutricionales

- **ASAR por deficiencia de cobre.** La deficiencia de cobre es consecuencia de una ingesta inadecuada en sujetos con requerimientos aumentados. También puede ser la consecuencia de una disminución de la absorción por patologías digestivas o por la acción de una ingesta excesiva de zinc. El zinc induce la expresión de metalotioneína en el intestino la que atrapa al cobre perdiéndose este mineral al descamarse el enterocito, proceso que

ocurre normalmente entre 3 a 5 día. En la deficiencia de cobre existen niveles disminuidos de ceruloplasmina, enzima que por su actividad ferroxidasa La ceruloplasmina, enzima dependiente de cobre, facilita la transformación del hierro ferroso a férrico hecho indispensable para que el hierro se una a la transferrina y sea entregado a los eritroblastos para la producción de hem. Al no existir una cantidad suficiente de ceruloplasmina se producirá una síntesis alterada de Hem.

La deficiencia de cobre produce anemia, granulocitopenia, sideroblastos en anillo y eritroblastos con vacuolas.

La administración de cobre (sulfato de cobre) revierte completamente estas anomalías.

- **ASAR inducida por deficiencia de vitamina B₆.** Es secundaria a mala nutrición, sólo ocasionalmente causa anemia sideroblástica.

ASAR inducida por tóxicos

La ASAR inducida por zinc cae dentro de esta clasificación. El mecanismo de acción se explicó en el punto 2.2.2.

ASAR inducida por intoxicación por plomo. Las personas se pueden intoxicar con plomo por aspiración de gasolina, inhalación de humos, o absorción por la piel.

Los heterocigotos de deficiencia hereditaria de ALA deshidratasa son más susceptibles a la exposición con plomo. En la intoxicación plúmbica se produce una anemia ya que el plomo tiene efectos inhibitorios sobre la síntesis del hem. Todos los pasos de la síntesis del hem son afectados, pero especialmente ALA deshidratasa y ferroquelatasa, entre otras. El plomo también limita la entrega intracelular de hierro al sitio de acción de la ferroquelatasa y sustituye el metal hierro por zinc en el sitio de la protoporfirina. El plomo también incrementa la destrucción de los glóbulos rojos, y disminuye la síntesis de hemoglobina. Cuando la exposición es muy prolongada puede causar hipoplasia eritroide.

Las manifestaciones clínicas típicas de una toxicidad avanzada son: neuropatía autonómica, disfunción renal. Los cambios hematológicos son más bien variables: la anemia tiende a ser levemente microcítica hipocroma, la resistencia

osmótica está disminuida por la injuria a la membrana. El tratamiento consiste en remover las concentraciones de plomo mediante la administración de un quelante (EDTA) por infusión intravenosa. Un nuevo agente quelante más efectivo es el ácido 2,3 dimercaptosuccinico (DMSA).

7. PORFIRIAS

La palabra porfiria proviene del griego “porphyra”, que significa morado o púrpura. Las porfirias se consideran como un grupo heterogéneo de enfermedades adquiridas o hereditarias con carácter autosómico dominante o recesivo, caracterizadas todas ellas por una anomalía en la biosíntesis del hem. Cada tipo de porfiria tiene un patrón característico de sobreproducción y acumulación de precursores hem, dependiendo de la disfunción enzimática (enzima es una sustancia proteica capaz de activar una reacción química del organismo). El déficit específico de una enzima en cada tipo de porfiria resulta de un bloqueo parcial en la

biosíntesis del hem.

Las porfirias se pueden clasificar de acuerdo a tres características: a) el sitio principal de producción anormal de porfirinas, en hepáticas o eritropoyéticas (eritropoyesis es el mecanismo por el que se forma la sangre), b) la presentación: aguda (que tiene un curso breve y relativamente grave) o crónica (que tiene un curso prolongado por mucho tiempo) y c) el patrón de déficit enzimático en la producción del hem.

El grupo hem es sintetizado en grandes cantidades en la médula ósea e hígado. El grupo hem libre es el que se incorpora a la hemoglobina y a los citocromos, especialmente el p450.

El nivel en donde se encuentre la deficiencia enzimática determinará el tipo de porfiria que se produzca. Se han descrito alrededor de 7 tipos distintos de porfirias (tabla 6-4).

Tabla 6-4. Anormalidades genéticas y metabólicas de las Porfirias

Tipo de Porfiria	Herencia autosómica	Enzima defectuosa	Porfirina/ precursor excretado	Ruta de excreción	Principal tejido de origen
ALA deshidratasa	Recesiva	ALA deshidratasa	ALA, coproporfirina	Orina	Hígado
Intermitente aguda	Dominante	PBG deaminasa	PBG,ALA	Orina	Hígado
Eritropoyética congénita	Recesiva	UFG III sintetasa	Uroporfirina I	Orina	Médula ósea
Cutánea tarda	Dominante	UFG descarboxilasa	Uroporfirina I+III	Orina	Hígado
Coproporfiria	Dominante	CFG oxidasa	Coproporfirina PBG, ALA	Heces Orina	Hígado
Variegata	Dominante	PFG oxidasa	Protoporfirina PBG,ALA	Heces Orina	Hígado
Protoporfiria	Indeterminada	Ferroquelatasa	Protoporfirina	Heces	Médula ósea

ALA Ácido aminolevulínico; PBG, porfobilinógeno; UFG, Uroporfirinógeno.; PFG, Protoporfirinógeno; CFG, Coproporfirinógeno.

Las manifestaciones clínicas son producidas casi en su totalidad por los efectos causados en la piel y en el sistema nervioso, con lo cual se

pueden clasificar en 2 grupos: (a) las que presentan fotosensibilidad cutánea, debido a la propiedad de fluorescencia de las porfirinas,

cuando son expuestas a la luz ultravioleta de longitud de onda larga. Dentro de éstas se encuentran: Porfiria Cutánea Tarda, Coproporfiria Hereditaria, Porfiria Variegata, Protoporfiria Eritropoyética y Eritropoyética Congénita; y (b) las que se presentan con alteraciones neurológicas asociándose a un aumento de la producción y excreción de los precursores de las porfirinas, como el ácido aminolevulínico y el porfobilinógeno, definiendo una Porfiria Aguda o Inducible. Entre éstas se encuentran: Porfiria Intermitente Aguda, Porfiria por deficiencia de ALA deshidratasa, Coproporfiria Hereditaria y Porfiria Variegata.

La excreción de la porfirina está determinada por la capacidad de solubilización en el agua, que está dada por la cantidad de grupos carboxilos que posee.

Porfiria cutánea tarda

La porfiria cutánea tarda (PCT) es la más frecuente de todas las porfirias, es una enfermedad del adulto que no se presenta antes de los 45 años y afecta mayoritariamente a los varones. Tiene una prevalencia de 1 entre 15.000 personas. Sin embargo, la frecuencia en las mujeres ha aumentado por el consumo creciente de anticonceptivos orales y estrógenos. También se asocian a infecciones crónicas por virus de la Hepatitis C.

Se debe a una deficiencia de la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa, lo que produce porfirinas en exceso en el hígado, las que pasan al plasma y a la piel produciendo una fotosensibilidad que ocasionan lesiones cutáneas. Se manifiesta de 2 formas: (a) La enzima está considerablemente disminuida pero sólo en el hígado, a este grupo se le denomina PCT I y corresponde es su mayoría a casos de deficiencia adquirida (esporádica) y (b) Los pacientes que tienen PCT II poseen una deficiencia hereditaria de la enzima que afecta a todos los tejidos. Este tipo corresponde al 20% de los pacientes.

La mutación en el gen HFE es uno de los factores que contribuye a la patogénesis de la PCT. Se observó que individuos homocigotos para la mutación cys282tyr podrían desarrollar porfiria cutánea tarda esporádica, siendo el aumento del hierro hepático el factor desencadenante. Este aumento producido en la HH, inhibe a la uroporfirinógeno descarboxilasa.

Entre otros factores desencadenantes se

encuentran el hierro (que podría participar en reacciones que generan radicales libres), el alcohol (como factor hepatotóxico), el virus de la hepatitis C, y los estrógenos (se desconoce el mecanismo de estos dos últimos), y ocasionalmente los hidrocarburos clorinados (ej, hexaclorobenzeno). El hábito de fumar está posiblemente asociado. Estos factores, especialmente en combinación con el hierro, pueden producir especies reactivas de oxígeno en el hígado que inactivan la uroporfirinógeno descarboxilasa u oxidar sus sustratos.

También se puede presentar PCT en pacientes que presentan falla renal y que se hemodializan, ya que el proceso no elimina de manera efectiva las porfirinas debido a que se encuentran ligadas a proteínas. Dada la gran elevación de porfirinas, las lesiones cutáneas suelen ser mucho más graves.

Cuadro clínico: aparecen ampollas en las áreas expuestas a la luz solar, como cara, brazos y el dorso de las manos. La piel, especialmente la de las manos, es también frágil y vulnerable al menor traumatismo. Se aprecian costras y cicatrices. La cicatrización es lenta y va seguida a menudo de hiperpigmentación e hipopigmentación, hipertricosis (especialmente facial) y aspecto pseudoesclerodermia.

Puede presentarse lesión hepática por la presencia de porfirinas, a una infección crónica por el virus de la hepatitis C o al exceso de alcohol. La histopatología hepática muestra comúnmente siderosis, hígado graso, necrosis y cambios inflamatorios crónicos. Con el tiempo aparecen cirrosis y carcinoma hepatocelular.

El diagnóstico se realiza mediante los síntomas y signos que presentan los pacientes. La biopsia cutánea apoya el diagnóstico de la PCT, pero no es específica. Todas las Porfirias que causan lesiones cutáneas presentan porfirinas plasmáticas elevadas. En la PCT se encuentran también en la orina, siendo en su mayor parte Uroporfirinas I y III, porfirinas heptacarboxílicas, con aumentos menores de la coproporfiria y de las porfirinas con 5 y 6 carboxilos. En pacientes con daño renal, el diagnóstico se establece principalmente midiendo las porfirinas plasmáticas y fecales. La PCT tipo II se detecta además midiendo la uroporfirinógeno descarboxilasa eritrocitaria antes de realizar flebotomías ya que el aumento de la eritropoyesis posterior a este procedimiento puede elevar el nivel de la enzima en el eritrocito.

La PCT es la más fácil de tratar. Debe evitarse el alcohol, los estrógenos, el hierro, contacto con herbicidas y exposición al sol (utilizar cremas con filtros solares). Flebotomías de 400 – 500 mL cada 2 a 4 semanas. Si no es posible realizar la flebotomía, una opción es la administración de cloroquina o la hidroxiclороquina oral (125 mg 2 veces por semana) con control hepático o de 50 a 100 mg/ 24 horas. Estos fármacos eliminan el exceso de porfirinas del hígado. Las dosis más altas eliminan las porfirinas con demasiada rapidez, causando un empeoramiento transitorio de la porfiria y daño hepático.

Los 2 tipos de PCT responden a la sangría y a la cloroquina a bajas dosis, pero no otros tipos de Porfiria. Por lo tanto, es importante un diagnóstico exacto antes de iniciar el tratamiento.

La flebotomía suele estar contraindicada en pacientes con daño renal a causa de la anemia (debida generalmente a deficiencia de eritropoyetina), la cloroquina y la hidroxiclороquina no son eficaces. El tratamiento de reposición con eritropoyetina puede estimular la eritropoyesis, movilizar el exceso de hierro, apoyar la flebotomía y provocar la remisión de la PCT en estos pacientes.

LECTURAS SUGERIDAS

Allen, L.H. “Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome”. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1280S-1284S, 2000.

Andrews, N.C. “Iron homeostasis insights from genetics and animal models”. *Nature Rev/ Genetics* 1: 208-217, 2000.

Andrews, N.C. “Medial progress: disorders of iron metabolism”. *N. Engl. J. Med.* 341: 1986-1995, 1999.

Andrews, N.C., Levy, J.E. “Iron is Hot: Update the pathophysiology of hemochromatosis”. *Blood* 92:1845–1850, 1998.

Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C., Núñez, M.T. “DMT1, a physiologically relevant apical Cu⁺¹ transporter of intestinal cells”. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: C1525-C1530, 2003.

Aviado, M., Gattermann, N., Bottomley, S. “X chromosome inactivation ratios in female carriers of X-linked sideroblastic anemia”. *Blood* 97: 4000-4002, 2001.

Beard, J.L. “Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning”. *J. Nutr.* 131: 568S-580S, 2001.

Bennett, M., Lebrón, J., Bjorkman, P. “Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor”. *Nature* 403: 46-52, 2000.

Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Cook, J.D., Finch, C.A. **Iron metabolism in man**. Oxford, Blackweel Scientific, 1979.

Bulaj, Z., Phillips, J., Ajioka, R., et al. “Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda”. *Blood* 95: 1565-1570, 2000.

Cindy, N, Roy, C.A. “Iron homeostasis: new tales from the crypt”. *Blood*, 96: 4020-4025, 2000.

De Gobbi, M., Pasquero, P., Brunello, F. “Juvenile hemochromatosis associated with B-Thalassemia treated by phlebotomy and recombinant human erythropoietin”. *Haematologica* 85: 865-867, 2000.

Fiske, D., McCoy, H., Kitchens, C. “Zinc-induced sideroblastic anemia: report of case, review of the literature, and description of the hematologic syndrome”. *Am. J. Hematol.* 46: 147-50, 1994.

Fleming, R.E., Sly, W.S. “Hepcidine: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease”. *PNAS* 98: 8160-8162, 2001.

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin. Y., Romero. M.F., Boron. W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A. “Cloning and characterization of a proton-coupled mammalian metal ion transporter”. *Nature* 388: 482-488, 1997.

Hallberg, L., Hultén, L. “Iron requirements, iron balance and iron deficiency in menstruating and pregnant women” En: **Iron nutrition in health and disease**. Hallberg L, Asp N-G, eds. John Libbey & Company Ltd, London, 1996, pp. 165-181

International Anemia Consultative Group (INACG). **Guidelines for the eradication of iron deficiency anemia. A report of the International Anemia Consultative Group**. Nutrition Foundation, Washington, DC, 1977.

International Anemia Consultative Group (INACG). **Iron deficiency in women. A report of the International Anemia Consultative Group**. Nutrition Foundation, Washington, DC, 1981.

Kumar, A., Jazieh, A. "Case report of Sideroblastic Anemia by ingestion of coins". *Am. J. Hematol.* 66: 126-129, 2001.

Moyo, V.M., Mandishona, E., Hasstedt, S.J. et al. "Evidence of genetic transmission in African iron overload". *Blood* 91:1076-1082, 1998.

Núñez, M.T., Gárate, M., Arredondo, M., Tapia, V., Muñoz, P. "The cellular mechanisms of body iron homeostasis". *Biol. Res.* 33: 133-142, 2000.

Núñez, M.T., Núñez, C., Tapia, V., Muñoz, P., Mazariegos, D., Arredondo, M., Mura, C., Maccioni, R. "Iron-activated iron uptake: a positive feedback loop mediated by iron regulatory protein 1". *BioMetals* 16: 83-90, 2002.

Olivares, M., Walter, T., Cook, J.D., Hertrampf, E., Pizarro, F. "Usefulness of serum transferrin receptor and serum ferritin in diagnosis of iron deficiency in infancy". *Am. J. Clin. Nutr.* 72:1191-1195, 2000.

Olivares, M. "Anemia ferropriva" En: **Pediatría**. Meneghello, J., Fanta, E., Paris, E., Puga, T., eds. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1997, pp.1745-1749.

Olivares, M., Walter, T., Hertrampf, E., Pizarro, F. "Anaemia and iron deficiency disease in children". *Br. Med. Bul.* 55: 534-548, 1999.

Olivares, M., Walter, T., Osorio, M., Chadud, P., Schlesinger, L. "The anemia of a mild viral infection: the measles vaccine as a model". *Pediatrics*; 84:851-855, 1989.

Pietrangelo, A., Camaschella, C. "Molecular genetics and Control of iron metabolism in hemochromatosis". *Haematologica* 83: 456-461, 1988.

Pizarro, F., Yip, R., Dallman, P.R., Olivares, M., Hertrampf, E., Walter, T. "Iron status with

different infant feeding regimens: relevance to screening and prevention of iron deficiency". *J. Pediatr.* 118: 687692, 1991.

Richard, L. "The anemia of chronic disorders" In: **Wintrobe's Clinical Hematology**, T. Means, R. Baltimore, Maryland USA. Editorial Lippincott Williams & Wilkins, 1999, pp. 1011-1021.

Roetto, A., Totaro, A., Piperno, A., et al. "New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3". *Blood* 97: 2555-2560, 2001.

Scholl, T.O., Reilly, T. "Anemia, iron and pregnancy outcome". *J. Nutr.* 130:443S-447S, 2000.

Tabushi, M., Yoshimori, T., Yamagishi, K., Yoshida, T., Kishi, F. "Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in Hep-2 cells". *J. Biol. Chem.* 275: 22220-28, 2002.

Townsend, A., Drakesmith, H. "Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload". *Lancet* 359: 786-790, 2002.

Trinder, C., Fox, C., Vautier, G., Olynyk, J.K. "Molecular pathogenesis of iron overload". *Gut* 51: 290-295, 2002.

Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G. "Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse". *Nature Genetics* 21: 195-199, 1999.

Walter, T., Olivares, M., Pizarro, F., Hertrampf, E. "Fortification" In: **Nutritional anemia**. Ramakrishnan, U., CRC Press, Boca Ratón, USA, 2001, pp.153-183.

Walter, T., Olivares, M., Pizarro, F., Muñoz, C. "Iron, anemia, and infection". *Nutr Rev* 55:111-124, 1997.

Zoller, H., Pietrangelo, A., Vogel, W., Weiss, G. "Duodenal metal-transporter (DMT-1, NRAMP-2) expresión in patients with hereditary haemochromatosis". *Lancet* 353: 2120-2123, 1999.

ANEMIAS MEGALOBLÁSTICAS

Gonzalo Pombo V. e Iván Palomo G.

1. Introducción

2. Eritropoyesis megaloblástica

3. Laboratorio

4. Metabolismo de la cobalamina

- 4.1. Estructura
- 4.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales
- 4.3. Absorción, transporte y almacenamiento
- 4.4. Funciones

5. Déficit de vitamina B₁₂

- 5.1. Etiologías
- 5.2. Anemia perniciosa

6. Metabolismo del ácido fólico

- 6.1. Estructura
- 6.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales
- 6.3. Absorción, transporte y almacenamiento
- 6.4. Funciones

7. Déficit de ácido fólico

- 7.1. Etiología
- 7.2. Manifestaciones clínicas
- 7.3. Diagnóstico

8. Diagnósticos diferenciales

RESUMEN

Las anemias macrocíticas, con morfología megaloblástica -presencia de macrovalocitos y pleocariosis-, obedecen a deficiencias de vitamina B₁₂ y/o folatos.

Los trastornos en la absorción suelen ser la principal causa relacionada al déficit de B₁₂, mientras que el aspecto carencial se halla más vinculado al ácido fólico.

Desde el punto de vista morfológico y clínico, ambas entidades son indistinguibles, pero la presencia de neuropatía es más característica de la deficiencia de cobalamina.

El déficit de esta última obliga siempre a establecer su etiología: gastrógena o enterógena.

La anemia perniciosa es un ejemplo de patología autoinmune, y debe considerarse la posibilidad de enfermedades asociadas.

Las determinaciones humorales -vitamina B₁₂ y folato sérico, así como del folato intraeritrocitario-, representan parámetros que, la mayoría de las veces, permiten establecer el diagnóstico. Tener presente que un valor normal de folato intraeritrocitario excluye prácticamente, una deficiencia de estos dos co-factores de maduración nuclear.

1. INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista general, las anemias macrocíticas se dividen en megaloblásticas y no megaloblásticas. Es de hacer notar que, con frecuencia, se observa en la práctica diaria, macrocitosis sin anemia.

Se considera macrocitosis cuando el volumen corpuscular medio (VCM) de los glóbulos rojos, supera los 100 fl promedio. La hemoglobina suele elevarse en forma proporcional con aumento de la hemoglobina corpuscular media (HCM), siendo la concentración de HCM (CHCM) normal. En el extendido de sangre periférica, los hematíes pierden su palidez central, impresionando hiperocrómicos, término infrecuentemente empleado, pues implica elevación de la hemoglobina, lo cual no es cierto. Es así que a las anemias macrocíticas se las designa como normocrómicas.

Situaciones tales como hiperglicemia severa, hiponatremia, cuadros hiperleucocitarios, y la presencia de crioaglutininas, pueden cursar con "falsos" aumentos del VCM (pseudomacrocitosis), debiendo ser un diagnóstico de exclusión al

encarar el estudio de una macrocitosis.

El mecanismo biomolecular de las anemias megaloblásticas reside en el enlentecimiento de la síntesis de ADN, lo cual las diferencia de las otras causas de macrocitosis, en las cuales el VCM suele ser inferior a los 110 fL.

Alteraciones en el metabolismo de la vitamina B₁₂ (vit B₁₂): cobalamina, y/o del ácido fólico (AF) representan las causas más frecuentes de megaloblastosis, las cuales casi siempre se acompañan de anemia, siendo objeto de descripción en el presente capítulo.

2. ERITROPOYESIS MEGALOBLÁSTICA

La vit B₁₂ y el AF representan factores de maduración nuclear, su déficit ocasiona desequilibrio en el crecimiento y división celular, expresión del retraso en la síntesis del ADN. Más apropiado es hablar de hemopoyesis megaloblástica, pues afecta a las tres series, cuyas características pueden evidenciarse tanto en sangre periférica como en médula ósea.

El análisis del frotis (extendido de sangre periférica), revela: macrocitos, grado variable de ovalocitos, en realidad se trata de macroovalocitos, tamaño equivalente a dos eritrocitos, originados de mitosis incompletas, observándoselos bien hiper cromáticos. Estos, junto a la presencia de neutrófilos polisegmentados, con más de 4 lobulaciones nucleares, denominados pleocariocitos, constituyen las características de mayor relevancia en el diagnóstico de megaloblastosis. La presencia de anisocitosis, y sobre todo de poiquilocitosis es bastante constante, pudiendo observarse también: punteado basófilo, anillos de Cabot, así como de cuerpos de Howell Jolly, expresión de diseritropoyesis. Es común la presencia de eritroblastos circulantes.

Respecto de la lobulación de los neutrófilos, en condiciones normales, elementos de 4 lóbulos se observan en hasta un 17%, y de 5 lóbulos hasta un 2%. Cuando estos porcentajes se elevan o bien se evidencia al menos un neutrófilo de 6 o más lóbulos, se habla de pleocariosis.

La médula ósea suele ser hiper celular, con las siguientes características:

La serie eritroide es hiperplásica, con signos de eritropoyesis inefectiva, reflejo de la destrucción intramedular de los hematíes. Los eritroblastos son de gran tamaño, con núcleo inmaduro, en ocasiones con forma de “hoja de trébol” y cariorrexis, siendo su cromatina laxa (particulada o perlada). El citoplasma suele ser abundante y con gran basofilia citoplasmática, expresión de la extensa hemoglobinización. Estas características reflejan la disociación o asincronismo madurativo núcleo-citoplasmático, descrita por Ehrlich, a los cuales denominó megaloblastos.

En la serie mieloide se evidencia la presencia de metamielocitos juveniles gigantes, muy característicos de la megaloblastosis.

Los megacariocitos suelen presentar un tamaño mayor, con aumento del número de sus núcleos (hiperplóides).

La presencia de macrófagos con gruesos gránulos en su interior son expresión del aumento de los depósitos de hierro.

3. LABORATORIO

La macrocitosis megaloblástica, en general suele acompañarse de anemia, y a mayor severidad de la misma, es frecuente observar grados variables de leucopenia y/o trombocitopenia (pancitopenia). El VCM (Volumen Corpuscular Medio) es > 110 fL, la CHCM (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media) es normal, el RDW (“red cell distribution width”, índice de anisocitosis), suele estar elevado. El recuento de reticulocitos es normal o bajo, excepto en respuesta terapéutica y/o hemólisis.

Hiperbilirrubinemia indirecta y aumento de LDH, como expresión de hemólisis intramedular son frecuentes. En ocasiones, puede hallarse disminución de la haptoglobina, con el mismo significado. Elevación de la LDH, a valores por encima de 3000 UI/L, es muy sugerente de megaloblastosis. Cuando esta ocurre a expensas de la isoenzima 1, permite el diagnóstico diferencial con hemólisis.

4. METABOLISMO DE LA COBALAMINA

Aspectos bioquímicos y fisiopatológicos relacionados a esta vitamina, fueron objeto de dos premios Nobel. En 1928, William Castle, sugirió la presencia de un “factor extrínseco” sintetizado por el hígado, y que éste requería de un “factor intrínseco” para su absorción. El autor y otros científicos, caracterizaron este factor extrínseco, como vitamina B_{12} , siendo receptores del primero de los Nobel en 1934.

El segundo correspondió a Dorothy Hodgkin en 1964, por la descripción de la estructura tridimensional de la vitamina B_{12} (cristalografía por rayos X).

4.1. Estructura

La cobalamina (Cb) o vitamina B_{12} está formada por dos componentes básicos (constantes): un núcleo corrina y un nucleótido benzimidazólico; su componente radical (variable), es el que determina sus formas activas.

Un átomo de cobalto ocupa el centro del núcleo corrínico, a través del cual se une al nucleótido y por el otro al radical (figura 7-1).

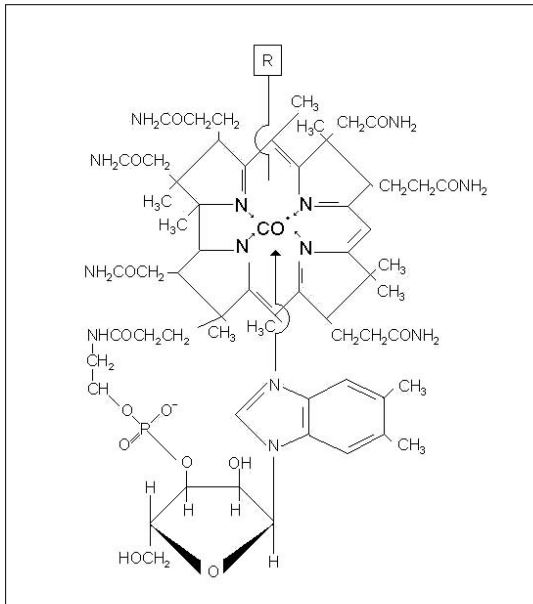


Figura 7-1. Estructura de la vitamina B₁₂

Las principales formas activas de la vit B₁₂ en el organismo humano son: metilcobalamina (plasma) y 5' desoxiadenosilcobalamina (hígado).

La cianocobalamina, muy estable, es utilizada como preparado comercial para las pruebas de absorción. La forma terapéutica, está representada por la hidroxicobalamina.

4.2. Fuentes, requerimientos diarios, depósitos corporales

Las principales fuentes de vit B₁₂ son las bacterias saprofitas intestinales (fuente menor), y los alimentos de origen animal (fuente mayor): carne, hígado, riñones, corazón. Además, los huevos, el queso, la leche y los pescados, poseen dicha vitamina (tabla 7-1).

Tabla 7-1. Aspectos metabólicos del ácido fólico y la vitamina B₁₂

	Vitamina B ₁₂	Acido fólico
Fuentes	Carnes rojas (hígado, corazón, riñón, cerdo) pescado, huevo, leche bacterias intestinales	Espinaca, lechuga, coles. bananas, melón, limón hígado, riñones
Requerimientos diarios	2 – 5 µg	50 –100 µg
Depósitos corporales	2 – 5 mg	10 – 12 mg
Agotamiento depósitos	3 – 5 años	3 – 4 meses
Absorción	Ileon distal	Intestino delgado proximal
Patología	Defecto absorción	Ingesta deficiente

Los requerimientos diarios oscilan entre 2 – 5 µg, siendo el contenido total de cobalamina del organismo entre 2 – 5 mg, cuyo principal reservorio es el hígado.

Si se interrumpe la absorción de la vit B₁₂, las reservas se agotan en el lapso de 3 – 4 años, pero requiere de 10 – 20 años si cesa la ingesta de la misma. Esta diferencia se debe a la recirculación hepática de dicha vitamina.

Una dieta clásica normocalórica contiene entre 10 – 30 µg de vit B₁₂, de los cuales se absorben 3 – 5 µg/diarios.

4.3. Absorción, transporte y almacenamiento

La absorción, transporte y almacenamiento de la vit B₁₂ es un proceso complejo en el que intervienen una serie de proteínas, siendo de suma importancia pues la mayoría de los déficit de vit B₁₂ se deben a problemas en la absorción. Las glándulas salivales y la mucosa gástrica secretan una cobalofilina (proteína R o haptocorrinas o proteína de acople), encargadas de fijar a la cobalamina o sus análogos (figura 7-2).

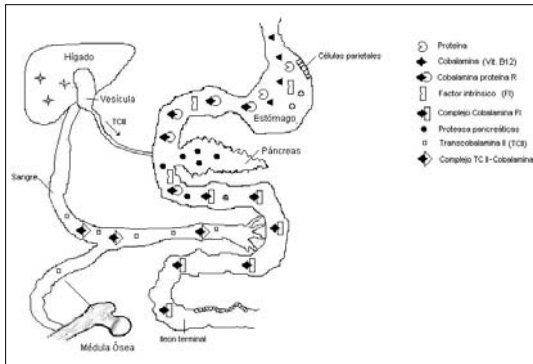


Figura 7-2. Metabolismo de la vitamina B₁₂

A nivel duodenal, la acción de proteasas pancreáticas, ocasionan la disociación del complejo cobalofilina-cobalamina, para que ésta pueda unirse al factor intrínseco (FI). Este es una glicoproteína sintetizada por las células parietales u oxínicas del fundus y cardias gástrico. El FI solo se une a la cobalamina y no a sus otras formas activas. Su secreción es estimulada por el ácido clorhídrico, histamina, gastrina, así como por el neumogástrico. De esta forma, el complejo cobalamina-FI, se une a receptores específicos en la membrana de la

célula intestinal (íleon distal), en presencia de calcio y a pH alcalino. Recientemente se han descrito dos proteínas epiteliales: cubilina y amnionless (AMN), de 460 y de 45-50 KDa, respectivamente. El complejo funcional cubilina-AMN une y endocita al complejo cobalamina-FI, a nivel intestinal. Una vez internalizado, y en el citoplasma, se libera la cobalamina la cual se acopla a su transportador: transcobalamina (TC). Estas, son de tres tipos: I, II y III, perteneciendo a la familia de las cobalofilinas, son α_1 , β y α_2 globulinas respectivamente, siendo sintetizadas por distintos tipos celulares (tabla 7-2). La mayoría de la Cb, entregada a los tejidos, es la transportada por la TC II, la principalmente asignada al tejido hematopoyético. Mientras que el 70 – 90 % de la Cb se fija a la TC I y III, su aclaramiento plasmático suele ser muy lento, y el déficit de éstas no acarrea patología alguna. Es de hacer notar, que el tejido nervioso recibe además, Cb transportada por estas dos últimas cobalofilinas.

La Cb es almacenada en el hígado (1 – 10 mg) y en los tejidos. Parte puede ser secretada por vía biliar al intestino (ciclo enterohepático), fundamentalmente la transportada por TC III.

Tabla 7-2. Cobalofilinas

	Cobalofilinas I	Cobalofilinas II	Cobalofilinas III
Síntesis	Precusores mieloides	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos.	Serie mieloide madura
Globulinas	α_1	β	α_2
Patología	Aumenta en Leucemia mieloide crónica	Disminuye en déficit de vitamina B ₁₂	Aumenta en Policitemia vera

4.4. Funciones

La Cb es clave en dos procesos metabólicos, a saber:

a) Conversión de homocisteína a metionina (metilcobalamina actúa como cofactor, de la enzima metionina sintetasa, en el proceso de desmetilación).

b) En el pasaje de metilmalonil –CoA a succinil-CoA. El cofactor es la 5' desoxiadenosil B₁₂ que actúa en la reacción de isomerización. El déficit

de cobalamina, ocasiona una acumulación intracelular de metilmalonil-CoA, con eliminación urinaria de ácido metilmalónico (aciduria metilmalónica).

5. DÉFICIT DE VITAMINA B₁₂

5.1. Etiología

La deficiencia de vit B₁₂ en los adultos, en su mayoría se debe a un defecto en la absorción, motivo por el cual siempre es importante investigar la causa de la misma (tabla 7-3).

Tabla 7-3. Etiología del déficit de vitamina B₁₂

<p>Ingesta inadecuada (rara)</p> <p>Alteraciones gástricas</p> <ul style="list-style-type: none"> Anemia perniciosa <ul style="list-style-type: none"> Ausencia hereditaria de FI normal Producción genética de un FI alterado molecularmente Gastritis atrófica asociada a autoinmunidad <ul style="list-style-type: none"> Anemia perniciosa juvenil, Gastritis atrófica degenerativa hereditaria, Atrofia gástrica adquirida (alcoholismo, gastritis crónica), Endocrinopatías (hipo o hipertiroidismo) Gastrectomía Lesiones que destruyan la mucosa gástrica <ul style="list-style-type: none"> Caústicos, Linitis plástica Alteraciones en el complejo vit B₁₂-FI <ul style="list-style-type: none"> Anticuerpos: Bloqueadores, Fijadores Enfermedades intestino delgado <ul style="list-style-type: none"> Enteropatía inducida por gluten, Esprué tropical Enteritis regional (Crohn), Linfoma de intestino delgado Tuberculosis intestinal, Esclerodermia, Resección ileal Drogas que alteran absorción de vit B₁₂ <ul style="list-style-type: none"> PAS, Colchicina, Etanol, Cimetidina, Ranitidina, Neomicina, Biguanidas Malabsorción específica de vit B₁₂ <ul style="list-style-type: none"> Ingesta de quelantes de calcio por largos períodos Inadecuada obtención de pH alcalino en íleon <ul style="list-style-type: none"> Zollinger-Ellison, Enfermedad pancreática Alteración de receptores en íleon <ul style="list-style-type: none"> Congénitos: Sme Immerslund Gräsbeck Adquiridos Competición con vit B₁₂ <ul style="list-style-type: none"> Parásitos: <i>Diphyllobotrium latum</i> Bacterias: “síndrome asa ciega” Insuficiencia pancreática <p>Utilización inadecuada</p> <ul style="list-style-type: none"> Enzimopatías congénitas o adquiridas <ul style="list-style-type: none"> Metilmalonil CoA mutasa, Metilentetrahidrofolato reductasa, Desoxiadensil transferasa Anomalías en la unión de proteínas a vit B₁₂, ocasionando inaccesibilidad a los tejidos <ul style="list-style-type: none"> Aumento de TC I y III: síndromes mieloproliferativos crónicos Aumento de TC II Déficit congénito o adquirido de proteína de transporte: Disminución de TC II <p>Aumento de requerimientos</p> <ul style="list-style-type: none"> Infancia (etapa crecimiento), Embarazo, Hipertiroidismo <p>Aumento en excreción</p> <ul style="list-style-type: none"> Unión lábil vit B₁₂ - TC II, Hepatopatía (inadecuada capacidad de depósito)

FI: Factor intrínseco; TC: transcobalamina

Comentaremos algunos aspectos particulares de situaciones específicas.

En la patología pancreática crónica, la malabsorción de Cb se debe a la imposibilidad de degradar a las proteínas R de la saliva, el jugo pancreático y la bilis, consecuencia de la falta de proteasas liberadas por dicho órgano. En el síndrome de Zollinger Ellison, el pH que llega al íleon suele ser ácido, impidiendo la absorción de la vitamina.

El síndrome de Imerslund, es de carácter hereditario recesivo, con aparición de una anemia megaloblástica antes de los 2 años de vida, asociado a proteinuria persistente, esta última suele no responder al tratamiento con vit B₁₂, presumiéndose un defecto tubular renal Su patogenia reside en una mutación del receptor ileal (cubilin) del complejo FI-Cb lo que impide la unión de este último al receptor y como consecuencia se presenta una mala absorción de la vit B₁₂.

Las anomalías en las proteínas de transporte (deficiencia de TC II), se expresan como una anemia megaloblástica, la cual suele manifestarse a edad temprana de la vida.

5.2. Anemia perniciosa

5. 2. 1. Fisiopatología

La anemia perniciosa (AP), fue descrita por Thomas Addison en 1849, siendo Austin Flint, quien en 1860, la relacionó con patología gástrica. Fue George Minot en 1926, quien reportó que la ingestión de grandes cantidades de hígado crudo podía curar la anemia perniciosa, enfermedad de elevada mortalidad hasta ese entonces.

Dicha entidad comprende la asociación de anemia por déficit de vit B₁₂ y gastritis atrófica crónica (tabla 7-4). Existen dos mecanismos

fisiopatológicos para explicarla:

a) La destrucción y/o pérdida progresiva de la masa de células parietales, localizadas fundamentalmente en el fundus y cuerpo gástrico, con el consecuente déficit en la producción de FI.

b) La presencia de autoanticuerpos “bloqueadores” en el jugo gástrico, los cuales se unen al sitio de interacción de la vit B₁₂, impidiendo así la formación del complejo vit B₁₂ – FI.

La gastritis atrófica crónica se reconoce macroscópicamente por la pérdida de los pliegues gástricos y el adelgazamiento de la mucosa. Las gastritis crónicas pueden ser de dos tipos: tipo A (autoinmune) y tipo B (no autoinmune) (tabla 7-4).

Tabla 7-4. Gastritis crónicas

Tipo A	Tipo B
Autoinmune	No autoinmune
Cuerpo y fundus gástrico	Antro
Anticuerpos anti-células parietales y anti-FI	No
Disminución de Pepsinógeno I sérico	
Aclorhidria	
Hipergastrinemia y carcinoides gástrico	Hipogastrinemia
Déficit de vit B ₁₂	

Desde el punto de vista anatomopatológico, la biopsia gástrica revela un infiltrado mononuclear (plasmocitos, células T y probablemente B) en la submucosa extendido a la lámina propia, de distribución interglandular. En su evolución, la reducción de las glándulas gástricas, con la pérdida de las células parietales, hace que éstas sean reemplazadas por células de contenido mucoso, llevando a la metaplasia intestinal.

La progresión de una gastritis crónica tipo A a una atrofia gástrica, y la aparición de las manifestaciones clínicas de anemia, es probable que transcurran entre 20 – 30 años, hasta su expresión.

Las células plasmáticas contiene autoanticuerpos contra antígenos de las células parietales y del FI.

El único “target” molecular demostrado de los anticuerpos anti-células parietales (AACP), es

la ATPasa H⁺/K⁺ en las células parietales gástricas. Esta es responsable de la secreción de ión H⁺ por dichas células, y su recambio por K⁺. Es improbable que estos auto-anticuerpos sean patogénicos *in vivo*, debido a que dicha ATPasa no es accesible a los anticuerpos circulantes. La presencia de AACP en el suero es predictor de gastritis autoinmune.

La patogenia de la gastritis atrófica es mediada por linfocitos T CD₄. La activación de LTh1, resulta de la interacción de los mismos con su receptor antigénico de la célula T (TCR), y el complejo subunidad β de la ATAasa H⁺/K⁺ con moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad, sobre la célula presentadora de antígeno. Se desconoce el mecanismo íntimo a través del cual se produce la activación de la célula presentadora de antígeno, así como la vía patogénica mediante la cual la célula T produce la gastritis.

5.2.2. Manifestaciones clínicas

Conocida como la “gran simuladora”, pues puede manifestarse de múltiples maneras, con signo-sintomatología variable. Enfermedad de comienzo lento e insidioso, a la edad promedio de 60 años, con leve predilección por el sexo femenino. Siendo más común en personas de ojos azules, canicie precoz, y grupo sanguíneo A. Existe también una predisposición genética, y alrededor del 20% de los pacientes con anemia perniciosa pueden experimentar dicha enfermedad en sus familiares.

La forma de presentación más frecuente, es por manifestaciones clínicas de anemia, la cual puede ser también un hallazgo en un «screening» de laboratorio de rutina. Es común observar palidez e ictericia, con una piel de tinte pajizo, similar al observado en el hipotiroidismo y en la insuficiencia renal crónica.

La presencia de una glositis atrófica de Hunter (lengua lisa, dolorosa y brillante) suele ser un signo característico, aunque no específico de dicho trastorno carencial. En ocasiones, puede haber un síndrome diarreico y malabsorción. Esplenomegalia se puede constatar en un 10–15 %.

El déficit de vit B₁₂ puede causar neuropatía periférica y lesión de cordones posteriores y laterales de la médula espinal (degeneración combinada subaguda), así como afección cerebral.

La lesión progresa de la desmielinización a la degeneración axonal y aún la muerte neuronal, las cuales pueden ser irreversibles a pesar del aporte de la vit B₁₂.

Dicha neuropatía periférica puede presentarse en ausencia de anemia megaloblástica manifiesta. Las parestesias distales y simétricas, en manos y pies, así como la hipoestesia, son expresión de la misma.

La hipo o apalestesia (sensibilidad profunda vibratoria) y la pérdida de la sensibilidad propioceptiva (sensación de postura y posición), reflejan el daño del cordón medular posterior, al igual que la ataxia sensorial con presencia del signo de Romberg.

La paresia de los miembros, la espasticidad y el signo de Babinsky expresan el daño del cordón medular lateral.

Entre las manifestaciones cerebrales pueden citarse al cambio de carácter, pérdida de la memoria, confusión y hasta una franca psicosis, conocida como “locura megaloblástica”.

Tener presente que déficit cognitivos, fatiga, depresión, los cuales son mal interpretados como relacionados a la edad, pueden ser expresión de déficit de vit B₁₂, aún sin anemia.

Manifestaciones cardiovasculares: a pesar de presentarse con hemoglobina extremadamente baja puede manifestar una buena tolerancia a la misma, sin embargo, la fiebre, expresión de la hemólisis intramedular o bien de proceso infeccioso o tiroideopatía asociada, puede desencadenar un cuadro de insuficiencia cardíaca. Por otra parte, eventos trombóticos arteriales y aún venosos, han sido atribuidos al aumento de los niveles de homocisteína, consecuencia del déficit de fólico y/o vit B₁₂.

5.2.3. Complicaciones gástricas

La aclorhidria, el sobrecimiento bacteriano y el desarrollo de una metaplasia intestinal constituyen todos factores de riesgo para aparición de un adenocarcinoma (AC). Los pacientes con AP, tienen tres veces más riesgo de AC, así como trece veces más de tumor carcinoide.

La prevalencia de AC en esta patología es de 1-3%, mientras que 2% de los pacientes con AC, tienen una AP. Se recomienda el seguimiento periódico con sangre oculta en materia fecal y/o videoendoscopia gástrica en estos enfermos.

5.2.4. Asociaciones clínicas

Es conocida la asociación de AP con endocrinopatías inmunes y enfermedades autoinmunes antirreceptor. Así se la ha encontrado relacionada a: tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, vitiligo, hipoparatiroidismo, enfermedad de Addison, insuficiencia ovárica primaria, diabetes insulino-dependiente, cirrosis biliar primaria, colitis ulcerosa, miastenia gravis, síndrome de Eaton Lambert, lupus eritematoso sistémico, entre otros.

Una asociación a inmunodeficiencia común variable, con descenso de inmunoglobulinas o déficit selectivo de Ig A, ha sido reportado en pacientes jóvenes con gastritis tipo B.

5.2.5. Diagnóstico

a) Hemograma. Revela anemia macrocítica, en general con un VCM mayor a 110 fl, y con frecuencia mayor a 120, con reticulocitos normales o disminuidos. Puede observarse presencia de leucopenia y/o trombocitopenia, o bien una pancitopenia periférica. Es característica la hipersegmentación de los neutrófilos. La elevación de la LDH y la hiperbilirrubinemia indirecta son expresión de la hemólisis intramedular.

b) Dosajes séricos: en la práctica se realizan los dosajes de vit B₁₂ sérica, la cual suele estar disminuida, al igual que el folato intraeritrocitario, siendo la concentración sérica de éste normal. Deben tenerse presente ciertas consideraciones, a saber: (i) los valores de vit B₁₂ sérica reflejan, los niveles de ésta, unida a sus dos proteínas transportadoras: haptocorrina y transcobalamina. Esta última (TC) representa una fracción cercana al 30 % de la vit B₁₂ circulante, siendo a la vez la única que libera dicha vitamina a la célula; (ii) las modificaciones en el status de la B₁₂, revelan una mayor sensibilidad para la holotranscobalamina (hTC) respecto de la holohaptocorrina (hHC); (iii) Aproximadamente un 15 % de disminución de los niveles séricos de B₁₂ se deben a un descenso de la hHC, sin reflejar un estado de deficiencia de B₁₂; (iv) Estas diferencias en la sensibilidad y especificidad se deben tener en cuenta en la interpretación de los resultados. Es posible que los valores de hTC reflejen mejor y detecten en forma más precoz el déficit de vit B₁₂.

c) Niveles de ácido metilmalónico (AMM) en orina. La aciduria metilmalónica es una expresión del aumento sérico del ácido metilmalónico que se observa en los pacientes con déficit de vitamina B₁₂. Permite hacer diagnóstico diferencial con el déficit de folatos, ya que en este último los niveles de ácido metilmalónico son normales.

d) Prueba de supresión de desoxiuridina (dU). Consiste en la incorporación *in vitro* de la desoxitimidina tritiada a las células de la médula ósea y linfocitos, la cual suele ser anormal, corrigiendo con el agregado de vit B₁₂ y/o AF al medio de cultivo. Es una prueba muy sensible, detectando carencia aún en ausencia de anemia. No siendo de uso rutinario pues requiere equipamiento y material especializado, por lo cual ha quedado relegado a la investigación.

e) Test de Schilling. Prueba utilizada para valorar

la absorción de la vit B₁₂. Permite además, diferenciar una anemia megaloblástica de origen “gastrógeno” de “enterógeno”. Consiste en cuantificar la excreción urinaria de la Cb marcada con Co⁵⁸, suministrada por vía oral, habiendo previamente saturado completamente la TC II, mediante la administración intramuscular de 1000 mg de Cb no marcada. La orina recolectada durante 24 horas, elimina entre 0 – 2% de la dosis administrada (valor normal: > 5%). El siguiente paso consiste en administrar Co⁵⁸ + FI. Si se obtiene corrección, mayor eliminación de Co por orina, se debe a que existe un déficit de FI, por lo tanto presume una etiología gástrica (gastrógeno). En el caso contrario, es decir cuando no corrige, el problema residiría a nivel intestinal (enterógeno).

f) Medición de la acidez gástrica (pH). Realizada en ayunas, revela un pH alcalino debido a la aclorhidria, la cual es resistente a la histamina o pentagastrina. Un 25% de los pacientes con esprué o intolerancia al gluten, también pueden presentarla.

g) Autoanticuerpos anti células parietales. Se detectan en casi el 90% de los pacientes con AP, y en hasta el 30% de los familiares de primer grado sin anemia, al igual que en aquellos con endocrinopatías autoinmunes. En sujetos normales, se observa un incremento en relación a la edad (2.5 – 9.6%). Se emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando estómagos de ratón, para evitar falsos positivos.

h) Autoanticuerpos anti-FI (complejo cobalamina-FI). Su presencia es casi diagnóstica de AP y gastritis tipo A. Pueden ser de dos tipos: tipo I o “bloqueadores”: impiden unión vit B₁₂ al FI. Se hallan presentes en el 70% de los sueros de los enfermos con AP. Los tipo II o “fijadores” los cuales interaccionan con el complejo vit B₁₂-FI impidiendo su absorción. Se encuentran en el 30–40% de los pacientes con AP, y raramente se los halla en ausencia de anticuerpos tipo I.

Ambos anticuerpos se pueden detectar con mayor frecuencia en el jugo gástrico que en el suero.

La hipergastrinemia resulta en la extensión de la gastritis al antro, y por la estimulación, por la aclorhidria, de las células G, productoras de gastrina. La destrucción de las células principales, es la responsable de los niveles descendidos de pepsinógeno I.

Biopsia gástrica: realizar múltiples tomas, con los hallazgos anatomopatológicos característicos.

6. METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO

6.1. Estructura

De la unión del ácido pterico y una o más moléculas de L-glutámico surge el ácido fólico o pteroilglutámico (figura 7-3). En los alimentos se encuentra bajo la forma de poliglutamatos, los cuales deben ser reducidos a tetrahidrofólico (THF), forma activa, para ser absorbidos.

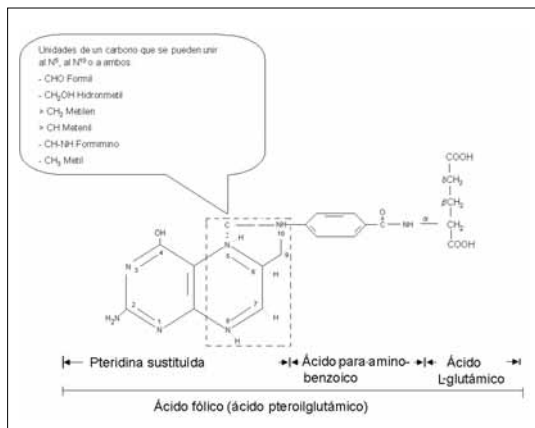


Figura 7-3. Estructura del ácido fólico

Las formas terapéuticas existentes son como ácido fólico o bien como ácido folínico.

6.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales

Las principales fuentes están representadas por los vegetales: espinacas, lechugas, coles. Las carnes, poco cocidas, también contienen dicho co-factor. Las bananas, el melón, el limón, garbanzos, lentejas, porotos, maníes, germen de trigo y levadura son otras sustancias en las cuales está presente (tabla 7-1). Se trata de un compuesto lábil, así las elevadas temperaturas, destruye el AF de los alimentos, motivo por el cual se aconseja evitar hervirlos, y reducir el tiempo de cocción.

El ácido fólico producto de síntesis intestinal, no suele ser aprovechado por el organismo, ya que se elimina por materia fecal.

Los requerimientos diarios son de 50–100 µg, siendo el embarazo y la lactancia etapas en las

cuales aumentan su demanda. Los depósitos corporales oscilan entre 10 – 12 mg, los cuales se agotan al cabo de 3 – 4 meses del cese de la ingesta.

6.3. Absorción, transporte y almacenamiento

El AF en los alimentos se encuentra bajo la forma de poliglutamatos, los cuales son degradados a monoglutamatos, por las conjugasas intestinales (carboxipeptidasas). Estos, a nivel del ribete en cepillo de las células del yeyuno proximal, se unen a un receptor específico, siendo incorporadas al espacio intracelular (figura 7-4). Allí son transformadas a dihidrofolato (DHF), luego a través de una DHF-reductasa, a tetrahidrofolato (THF), y este a 5 metil THF (5-MTHF), siendo esta última la forma en que circula por el plasma, unida a una proteína transportadora (β globulina) y a la albúmina.

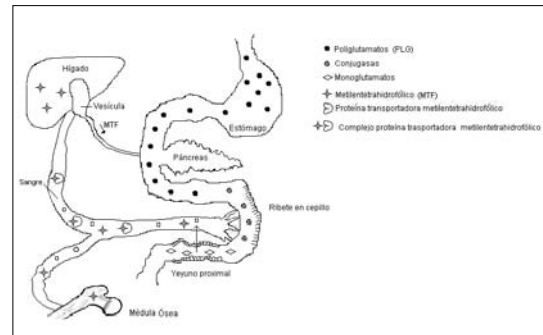


Figura 7-4. Metabolismo del ácido fólico

La determinación del 5-MTHF es expresión del folato sérico (folatemia), mientras que la valoración del folato intraeritrocitario, es un fiel reflejo de los depósitos corporales de AF.

El 5-MTHF se incorpora a los distintos tejidos, fundamentalmente hígado y médula ósea, donde es depositado como poliglutamatos, para luego ser transformado en otros compuestos entre ellos el 5-formil THF (ácido folínico) y el 5-10 metilTHF (metilTHF).

El eritrocito maduro es impermeable al AF, siendo este incorporado al citoplasma de los eritroblastos. Este proceso, al igual que su retención celular, es dependiente de la vit B₁₂, explicando por qué los pacientes con déficit de esta vitamina presentan disminución del FiGR.

El organismo utiliza el 5-MTHF de los depósitos corporales, siendo su reconversión a THF,

también dependiente de la vit B₁₂. Cuando existe deficiencia de Cb, este proceso no es posible, quedando “atrapado” el 5-MTHF (trampa de metilo).

Por último también existe una circulación enterohepática de AF, a través de la cual los folatos de los hepatocitos son eliminados por la bilis al intestino para ser posteriormente reabsorbidos.

6.4. Funciones

Interviene en la síntesis del ADN a través de sus formas metiladas, principalmente el metilTHF, co-enzima de la timidilato sintetasa (TMS), la cual transforma la desoxiuridina monofosfato (dUMP) en desoxitimidina monofosfato (dTMP). La vit B₁₂ también es necesaria para la síntesis del ADN, pues es requerida en la reconversión de 5-MTHF a THF, como ya se comentó antes.

7. DÉFICIT DE ÁCIDO FÓLICO

7.1. Etiología

A diferencia de la vit B₁₂, la deficiencia de folatos tiene como causas principales la inadecuada ingestión, el alcoholismo y la acción de múltiples agentes farmacológicos sobre el metabolismo del AF (tabla 7-5). El embarazo y posiblemente la tercera edad, son etapas en las cuales se incrementan sus requerimientos.

La hemólisis suele acompañarse de carencia del mismo debido al aumento de la demanda por la actividad eritropoyética exaltada, y ante el déficit de folatos puede observarse un “freno” en la respuesta reticulocitaria.

La anemia megaloblástica del alcoholismo suele deberse al déficit de AF, de carácter multifactorial: aporte inadecuado en la dieta, bloqueo absortivo del mismo, disminución del almacenamiento, pérdidas urinarias excesivas, aumento del secuestro hepático, por interferencia en ciclo enterohepático.

En la infancia, anemia macrocítica con

megaloblastosis, relacionada al metabolismo de los folatos, pueden deberse a causas congénitas. Una de ellas es el síndrome de Lesch-Nyhan, por deficiencia en la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa, y se caracteriza por hiperuricemia, automutilación, trastornos mentales y neurológicos. La otra es la aciduria orótica congénita, muy rara, y se presenta con retardo en el crecimiento físico y mental, anemia megaloblástica y trastorno inmune. No tiene respuesta al AF y la vit B₁₂, pero sí a la uridina, excepto el matiz inmunológico.

7.2. Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico puede ser indistinguible del déficit de vit B₁₂, respecto de las características y magnitud de la anemia.

Las manifestaciones neurológicas también pueden estar presentes, aunque su mecanismo fisiopatológico se desconoce. Suelen responder al aporte de AF o ácido fólico, pero no al de vit B₁₂.

7.3. Diagnóstico

Los aspectos morfológicos en sangre periférica así como en la médula ósea, no difieren de los comentados para el déficit de vit B₁₂.

Desde el cese de la ingesta de AF a la aparición de la anemia, se suceden una secuencia de eventos: en su inicio desciende el folato sérico, comenzando a incrementar el tamaño de los eritroblastos, a continuación emerge la hipersegmentación de los neutrófilos, con aparición de los metamielocitos gigantes, con su núcleo “en herradura”. *A posteriori*, se incrementa la excreción urinaria de formiminoglutamato (FIGLU). A partir del cuarto mes, desciende el folato intraeritrocitario. Le sigue en la secuencia la aparición de los macroovalocitos, así como los francos cambios megaloblásticos en la médula ósea. Por último, hacia el quinto y sexto mes, se pone de manifiesto la anemia.

Los parámetros humorales -folato sérico e intraeritrocitario- son de utilidad desde el punto de vista diagnóstico (tabla 7-6).

Tabla 7-5. Etiología del déficit de ácido fólico

Ingesta inadecuada (frecuente)	Dietas sin vegetales y/o carnes muy cocidas, Etilismo crónico.
Inadecuada absorción	Enfermedad celíaca, Esprué tropical, Esclerodermia Síndrome asa ciega, Otras patologías asociadas a malabsorción Fármacos Difenilhidantoina, primidona, barbitúricos. Cicloserina. Metformina. Colestiramina. Sulfazalazina. Etanol. Aporte excesivo de glicina o metionina. Otras (?): nitrofurantoina, glutetimida, anticonceptivos orales.
Inadecuada utilización (bloqueo metabólico)	Inhibición de la dihidrofolato reductasa Metotrexato, Pirimetamina, Trimetoprima, Triamtereno, Pentamidina. Difenilhidantoina (bloqueo de la captación y utilización celular) Deficiencias enzimáticas Congenitas Formiminotransferasa, Dihidrofolato reductasa, MTHF transmetilasa Adquiridas: Hepatopatías, Formiminotransferasa Deficiencia de vit B ₁₂ Alcohol Déficit de ácido ascórbico Excesiva incorporación dietética de glicina y/o metionina
Aumento de los requerimientos	“Parasitismo” Por el feto (sobre todo múltiparas y embarazos múltiples), lactancia Por tejido neoplásico (Sínd. linfoproliferativos) Infancia (etapa crecimiento), Incremento de la hematopoyesis (hemólisis, hemorragia), Cuadros hiperméticos (hipertiroidismo, síndrome febril), Síndrome de Lesch-Nyhan Fármacos (L-dopa ?)
Excreción aumentada	Diálisis, Dermatitis exfoliativa crónica, Déficit de vit B ₁₂ , Hepatopatía
Incremento de la destrucción	Drogas metabolismo de las purinas 6-Mercaptopurina. Tioguanina. Azatioprina. Allopurinol. Síndrome de Lesch-Nyhan (defecto enzimático con interferencia en síntesis de nucleótidos purínicos)
Interferencia en síntesis de pirimidinas	Antagonistas de pirimidinas: 5-Fluorouracilo. 6-Azauridina. Defectos enzimáticos: Aciduria orótica congénita
Inhibición de ribonucleótido reductasa	Citosina arabinósido, Hidroxiurea, Procarbazina, Déficit de hierro.
Inhibición de la síntesis proteica:	L-asparaginasa
Mecanismos desconocidos	Fármacos - tóxicos: Sulfasalazina, Benceno, Arsénico. Anemia megaloblástica sensible a la piridoxina (10 % de anemias sideroblásticas) Anemias megaloblásticas sensibles a la tiamina Anemias “megaloblastoides” Síndrome de Di Guglielmo (eritroleucemia), Mielodisplasias, Sínd. mieloproliferativos crónicos

MTHF: Metilen tetrahidrofolato

Tabla 7-6. Parámetros humorales del metabolismo del ácido fólico

	Deficiencia posible	Deficiencia
Folato sérico (ng/mL)	3 - 4	< 3
Folato intraeritrocitario (ng/mL)	100 - 200	< 100

8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Debe realizarse con aquellas causas de macrocitosis, las cuales pueden cursar sin anemia, con grados variables de megaloblastosis, y que suelen no responder al aporte de vit B₁₂ y o AF.

Son objeto de diagnóstico diferencial, las siguientes entidades: anemias diseritropoyéticas congénitas, los síndromes mielodisplásicos, la hipoplasia medular, las leucemias agudas, cuadros hemolíticos, hepatopatías, hipotiroidismo, drogas, entre otros. Los mismos serán analizados en los capítulos respectivos.

LECTURAS SUGERIDAS

Bolander-Gouaille, C. "The changing conception of vitamin B₁₂ deficiency and diagnosis". *Clinical Laboratory International* 2003, 38-39.

Carmel, R., Rasmussen, K., Jacobsen, D.W. et al. "Comparison of the deoxyuridine suppression test with serum levels of methylmalonic acid and homocysteine in mild cobalamin deficiency". *Br J Haematol* 93 (29):311-8, 1996.

Dickinson, C.J. "Does folic acid harm people with vitamin B12 deficiency?". *QJM*, 88 (5):357-64, 1995.

Finch, C.A., Winkelstein, A., Harker, L.A. **Manual de hematología**. Edit. El manual moderno. México. 2da edición, 1998, pp. 84-93.

Fyfe, J.C., Madsen, M., Hojrup, P., Christensen, E.I., Tanner, S.M., de la Chapelle, A., He, Q., Moestrup, S.K. "The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless". *Blood*; 103(5):1573-9, 2004.

Herbert, V., Vischer, T.J. "The megaloblastic anemias: physiopathology and diagnosis. En: Plenary Lectures and Educational Program". *XX Congress of the International Society of Hematology*. Buenos Aires, 1984.

Hoffbrand, V., Provan, D. "Macrocytic anaemias". *BMJ*, 314:431-34, 1997.

Kozyrati, R., Kristiansen, M. "The Human Intrinsic Factor-Vitamin B12 Receptor, Cubilin: Molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive Megaloblastic Anemia (MGA1) region". *Blood*, 91(10):3593-3600, 1998.

Martínez, P. "Anemias por alteración de la síntesis de ADN". *Journal of Medicine*, 18:2646-2654, 2001.

Oosterhuis, W.P., Niessen, R.W., Bossuyt, P.M. et al. "Diagnostic value of the mean corpuscular volume in the detection of vitamin B12 deficiency". *Scan J Clin Lab Invest*, 60 (1):9-18, 2000.

Saavedra, S., Regadera, A.I., Jarque, I., Sanz, M.A. "Anemia perniciosa". *JANO EMC*, 58(1338) pp.58-64, 2000.

Toh Ban-Hock, M.B., van Dhiel, I.A., Gleeson, P.A. "Pernicious Anemia". *NEJM*, 337 (20):1441-8, 1997.

Wahlstedt-Froberg, V., Pettersson, T. "Proteinuria in Cubilin-deficient whin selective vitamin B12 malabsorption". *Pediatr Nephrol*, 18(5):417-421, 2003.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Iván Palomo G., Marcela Vásquez R., Leonor Armanet B., Guillermo Ruiz R., Víctor Muñoz F., Patricia Dal Borgo A. y Ricardo Hojas B.

Introducción

Síndrome hemolítico

1. Clasificación de las anemias hemolíticas

2. Mecanismos de destrucción de los hematíes

- 2.1. Hemólisis extravascular
- 2.2. Hemólisis intravascular

3. Aspectos clínicos

- 3.1. Síndrome hemolítico agudo
- 3.2. Síndrome hemolítico crónico

4. Laboratorio

Anemias hemolíticas intracorporales

1. Membranopatías

- 1.1. Membranopatías hereditarias
 - 1.1.1. Esferocitosis hereditaria
 - 1.1.2. Eliptocitosis hereditaria
 - 1.1.3. Piroptocitosis hereditaria
 - 1.1.4. Estomacitosis hereditaria
 - 1.1.5. Xerocitosis hereditaria
- 1.2. Membranopatía adquirida
 - 1.2.1. Hemoglobinuria paroxística nocturna

2. Enzimopatías

- 2.1. Déficit de enzimas de la glucólisis anaerobia
 - 2.1.1. Déficit de Piruvatoquinasa
 - 2.1.2. Déficit de la Glucosa 6 fosfato isomerasa (GPI)
 - 2.1.3. Déficit de la Triosafofato isomerasa (TPI)
 - 2.1.4. Déficit de Hexoquinasa (HK)
 - 2.1.5. Déficit de Fosfofructoquinasa (PFK)
 - 2.1.6. Déficit de Fosfogliceratoquinasa (PGK)
- 2.2. Enzimopatías del metabolismo óxidorreductor
 - 2.2.1. Déficit de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
 - 2.2.2. Déficit de Glutación sintetasa (GS)
 - 2.2.3. Déficit de Gamma-glutamilcisteín sintetasa (GCS)
 - 2.2.4. Déficit Glutación reductasa (GR)
 - 2.2.5. Déficit de Glutación peroxidasa (GP)
- 2.3. Enzimopatías del metabolismo nucleotídico

3. Hemoglobinopatías

- 3.1. Talasemias
 - 3.3.1. Talasemia α
 - 3.3.2. Talasemia β
 - 3.3.3. Talasemia $\delta\beta$

3.3.4. Talasemia $\gamma\delta\beta$

3.3.5. Síndromes hemoglobina Lepore

3.2. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal

3.3. Hemoglobinopatías estructurales

- 3.3.1. Nomenclatura
- 3.3.2. Base genética de las hemoglobinopatías estructurales
- 3.3.3. Clasificación
- 3.3.4. Variantes de hemoglobina más comunes

Anemias hemolíticas extracorporales

1. Anemias hemolíticas inmunes

- 1.1. Antigénicos eritrocitarios
- 1.2. Anemias hemolíticas aloinmunes
 - 1.2.1. Enfermedad hemolítica del recién nacido
 - 1.2.2. Reacción hemolítica transfusional
- 1.3. Anemias hemolíticas autoinmunes
 - 1.3.1. AHAI por anticuerpos calientes
 - 1.3.2. AHAI por anticuerpos fríos
 - a) Enfermedad de las aglutininas frías
 - b) Hemoglobinuria paroxística *a frigore*
 - 1.3.3. AHAI por mezcla de autoanticuerpos fríos y calientes, o tipo mixto
 - 1.3.4. AHAI inducida por fármacos

2. Anemias hemolíticas no inmunes

- 2.1. Agentes infecciosos
 - 2.1.1. Parasitosis
 - 2.1.2. Infección bacteriana
- 2.2. Venenos
 - 2.2.1. Veneno de arañas
 - 2.2.2. Veneno de serpientes
 - 2.2.3. Veneno de abejas
- 2.3. Fármacos oxidantes
- 2.4. Agentes físicos
 - 2.4.1. Quemaduras
 - 2.4.2. Radiaciones ionizantes
- 2.5. Productos químicos
 - 2.5.1. Arsénico
 - 2.5.2. Cobre
 - 2.5.3. Anhídrido trimetílico

RESUMEN

Las anemias hemolíticas se caracterizan por ser anemias regenerativas. Fisiopatológicamente se clasifican en intra y extracorpúsculares. En las primeras, la alteración puede estar en la membrana, las enzimas o en las globinas. Las segundas, pueden estar mediadas por anticuerpos u otros mecanismos no inmunes.

En este capítulo se describen los hallazgos asociados de un síndrome hemolítico y las características fisiopatológicas y de laboratorio de las principales anemias hemolíticas.

INTRODUCCIÓN

En condiciones fisiológicas la masa de glóbulos rojos circulante permanece constante gracias a mecanismos de control, los cuales están finamente regulados para satisfacer los requerimientos corporales de oxígeno. La destrucción de los eritrocitos senescentes se produce a nivel del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) del bazo. Por su parte, la médula ósea está constantemente liberando eritrocitos para permitir el equilibrio.

Las anemias hemolíticas constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades hematológicas cuyo denominador común es la destrucción excesiva de los eritrocitos. La destrucción acelerada acorta la vida media de los glóbulos rojos y obliga a la médula ósea a aumentar su producción en un esfuerzo por mantener el nivel normal de hemoglobina circulante. Cuando esta producción aumentada equilibra la destrucción acelerada, desaparece la anemia pero continúa la hemólisis, estableciéndose una anemia hemolítica compensada. En otros casos, el aumento de la eritropoyesis no alcanza a compensar totalmente la destrucción excesiva y se desarrolla el cuadro clínico y de laboratorio común a todos los estados hemolíticos.

Existen dos grupos de anemias hemolíticas: (a) Las caracterizadas por la destrucción acelerada de los eritrocitos debido a un defecto, generalmente congénito de las mismas células (anemias hemolíticas intracorpúsculares) y (b) las anemias hemolíticas en que el eritrocito es normal pero lo destruyen prematuramente factores externos (anemias hemolíticas extracorpúsculares).

SÍNDROME HEMOLÍTICO

El proceso de eritropoyesis demora 6 a 8 días. En ese lapso la célula eritroide se multiplica 5 a 6 veces dando origen, finalmente, a glóbulos rojos capaces de servir a sus diferentes funciones por aproximadamente 120 días (ver capítulo 3). Sin embargo varias causas, pueden provocar una destrucción prematura de los glóbulos rojos (GR) y/o etapas más inmaduras (reticulocitos, entroblastos); ante esta situación la médula ósea (MO) responde aumentando el proceso eritropoyético. Todo esto conforma parte del síndrome hemolítico (SH).

Cuando la destrucción de elementos eritroides afecta primordialmente a eritroblastos o reticulocitos, conlleva a una anemia casi segura, en cambio cuando son afectados los GR no siempre es así. Aunque la anemia es generalmente notoria en los procesos hemolíticos agudos, no ocurre igual caso en los crónicos, ya que la anemia se manifiesta cuando se establece una descompensación entre destrucción y regeneración de eritrocitos.

1. CLASIFICACIÓN DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Las anemias hemolíticas se pueden clasificar en dos grupos: anemias hemolíticas intracorpúsculares, en las que la causa de la hemólisis radica en los eritrocitos, y generalmente son hereditarias y anemias hemolíticas extracorpúsculares en las que la causa del proceso hemolítico es ajena a los glóbulos rojos y por tanto son adquiridas. En la tabla 8-1 se nombran las principales anemias hemolíticas según una clasificación fisiopatológica.

Tabla 8-1. Clasificación de las anemias hemolíticas

<p>Causas intracorporales</p> <ul style="list-style-type: none">Defectos de membrana<ul style="list-style-type: none">Hereditarias<ul style="list-style-type: none">Esferocitosis hereditariaEliptocitosis hereditariaOvalocitosis hereditariaPiropoiquilocitosisAcantocitosisAdquiridas<ul style="list-style-type: none">Hemoglobinuria paroxística nocturnaDefectos enzimáticos<ul style="list-style-type: none">Deficiencia de G₆PDDéficit de piruvato kinasaDéficit de glutatión reductasaDefectos hemoglobínicos<ul style="list-style-type: none">TalasemiasPersistencia hereditaria de HbFHemoglobinopatías estructurales <p>Causas extracorporales</p> <ul style="list-style-type: none">Inmunes<ul style="list-style-type: none">Anemias hemolíticas aloinmunesAnemias hemolíticas autoinmunesNo inmunes<ul style="list-style-type: none">Agentes infecciososVenenosFármacos oxidantesAgentes químicosAgentes físicosMecánicas<ul style="list-style-type: none">Hemoglobinuria de la marchaCoagulación intravascular diseminadaFísicas<ul style="list-style-type: none">Quemaduras extensasRadiacionesCongelación de extremidadesInfecciones<ul style="list-style-type: none">Infecciones bacterianasInfecciones parasitarias

2. MECANISMOS DE DESTRUCCIÓN DE LOS HEMATÍES

Normalmente la destrucción de los eritrocitos está relacionada con la edad celular. El envejecimiento eritrocitario se caracteriza por un deterioro de sistemas enzimáticos, en especial los de la vía glicolítica, y consecuencia se presenta disminución de ATP y de los sistemas reductores por lo que el eritrocito pierde la capacidad para mantener su forma y la integridad de membrana. La destrucción normal de los GR ocurre en el sistema fagocítico mononuclear (SFM). La destrucción que acontece en los SH puede ocurrir en el SFM

(hemólisis extravascular) y a nivel intravascular. A continuación se describen ambos mecanismos.

2.1. Hemólisis extravascular

La mayor parte (cerca del 90%) de la destrucción de los eritrocitos es extravascular, es decir, ocurre en macrófagos del bazo. Los eritrocitos envejecidos tienen membranas más rígidas, se mueven lentamente y con dificultad a través de pequeñas aperturas de los cordones alineados de macrófagos del bazo; además estos eritrocitos tienen un aumento en la permeabilidad de cationes y las células

disminuyen rápidamente el valor de ATP al intentar mantener el equilibrio osmótico a través del bombeo de cationes en exceso.

En el macrófago la molécula de hemoglobina es fragmentada en hierro, hem, y globina. Los elementos esenciales, hierro y globina, se conservan y reutilizan para la síntesis de nueva hemoglobina u otras proteínas. El hierro hem puede ser almacenado como ferritina y hemosiderina en el macrófago, pero la mayor parte es liberado a la transferrina. Si se libera hacia la transferrina, el hierro es derivado a la médula ósea para reutilizarlo en la eritropoyesis. La fracción globina de la molécula de hemoglobina es fragmentada y reciclada dentro del fondo común de aminoácidos. Posteriormente, el hem es catabolizado y excretado en las heces. El puente alfa metano del anillo de porfirina se une, produciéndose un mol de CO y de biliverdina. El CO es liberado a la sangre, y es transportado por los eritrocitos como carboxihemoglobina, hasta los pulmones donde se exhala. La biliverdina es luego reducida en el macrófago a bilirrubina, la cual es liberada desde el macrófago y se une a la albúmina plasmática para ser transportada al hígado, donde se conjuga a bilirrubinglucuronido (glucuronido de bilirrubina) por la enzima UDP-glucuronil transferasa que se encuentra en el retículo endoplásmico de los hepatocitos. La bilirrubina conjugada es polar e insoluble en lípidos, se excreta en la bilis y al llegar al tracto intestinal es convertido en urobilinógeno por la flora bacteriana. La mayor parte del urobilinógeno se excreta en heces, donde es oxidado a urobilina o estercobilina. Una pequeña parte del urobilinógeno se reabsorbe desde el intestino, ingresa a la circulación portal y es excretado hacia el intestino por el hígado. Parte del urobilinógeno reabsorbido se filtra por el riñón y aparece en la orina (figura 8-1).

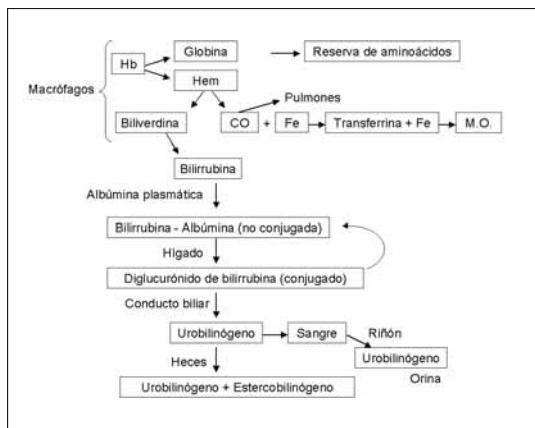


Figura 8-1. Esquema representativo de la hemólisis extravascular.

El bazo, respecto del hígado, es más eficiente en la eliminación de eritrocitos levemente lesionados debido a su patrón circulatorio en los cordones esplénicos. El flujo de sangre del hígado excede el del bazo; elimina eritrocitos marcadamente alterados.

2.2. Hemólisis intravascular

Normalmente solo una pequeña cantidad de hemoglobina (Hb) es liberada a la circulación producto de la destrucción intravascular de eritrocitos. Dicha Hb se descompone en dímeros α - β los que unen rápidamente a la haptoglobina (Hp) en una relación 1:1. El complejo haptoglobina-hemoglobina de mayor tamaño evita el filtrado de dímeros de la hemoglobina por el riñón y es depurado rápidamente.

En SH agudos la concentración de la haptoglobina libre disminuye, debido a que el hígado no la puede sintetizar a niveles compensatorios. Por otro parte, la haptoglobina, una proteína de fase aguda, suele encontrarse aumentada en procesos inflamatorios, infecciosos y neoplásicos.

Cuando la haptoglobina se agota, como ocurre en hemólisis intensas, los dímeros α - β libres logran filtrarse por el riñón y son reabsorbidos por células del túbulo proximal. Cuando los dímeros α - β que filtran en el riñón exceden la capacidad de absorción de las células tubulares, éstos aparecerán en la orina como hemoglobina libre, y según el grado de hemólisis, la hemoglobina puede ser rosada, roja o de color negro parduzco.

Los dímeros reabsorbidos en células del túbulo proximal son catabolizados a bilirrubina y hierro que luego ingresan al plasma. Sin embargo, algunos restos de hierro permanecen en las células tubulares y se unen en complejo a la ferritina y hemosiderina. Por último, las células tubulares cargadas con hierro se descaman y se excretan en la orina. Las inclusiones de hierro suelen observarse con la tinción Azul de Prusia. Por tanto, la presencia de hierro en la orina (hemosideruria) es signo de reciente hemólisis intravascular aumentada. En casos de hemólisis intravascular crónica, los gránulos de hemosiderina pueden aparecer en la orina en ausencia de hemoglobinuria.

En ausencia de haptoglobina, la hemoglobina no excretada por el riñón, es depurada directamente por el consumo hepático o puede ser oxidada a metahemoglobina. El hem se disocia de la metahemoglobina y se une a la hemopexina, la cual es sintetizada en el hígado y se combina con el hem en una relación 1:1. Este complejo se depura lentamente del plasma de (7-8 horas). Cuando la hemopexina se termina, el hem disociado oxidado se combina con la albúmina plasmática en una relación 1:1, y se forma entonces la metalbúmina. La metalbúmina se depura a nivel hepático muy lentamente y suele ser solo una forma combinante transitoria del hem, hasta que estén disponibles más hemopexina o haptoglobina.

El hem quizás se transfiera de metalbumina a hemopexina por depuración hepática y se encuentra por tanto, disponible. Cuando están presentes en grandes cantidades los complejos de metalbúmina y hemopexina-hem proporciona un tono café al plasma (figura 8-2).

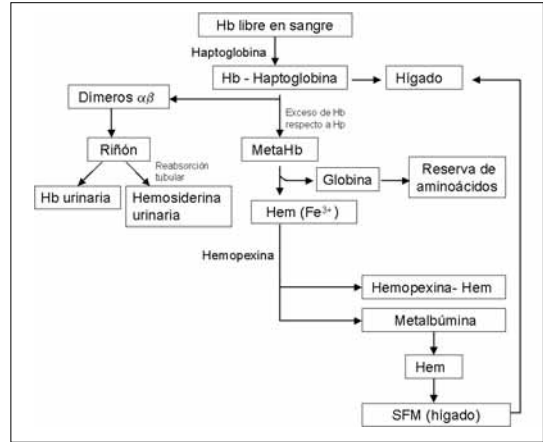


Figura 8-2. Esquema representativo de la hemólisis intravascular.

La hemólisis intravascular puede ser causada por: (a) activación del complemento sobre la membrana eritrocitaria, (b) traumatismo físico o mecánico el GR, y (c) presencia de sustancias tóxicas solubles en el medio ambiente eritrocitario.

En la tabla 8-2 se reúnen las alteraciones, pesquisables en el laboratorio, más características de las SH extravasculares e intravasculares.

Tabla 8-2. Características de laboratorio de los síndromes hemolíticos extravasculares e intravasculares

<p>Hemólisis extravascular Aumento de bilirrubina indirecta sérica Aumento urobilinógeno fecal y urinario Aumento CO_2 expirado</p> <p>Hemólisis intravascular Hemoglobinemia Hemoglobinuria Hemosiderinuria Metahemoglobinemia Disminución de haptoglobina Disminución de hemopexina</p>

3. ASPECTOS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas en la anemia hemolítica dependen de la intensidad de la anemia y de su forma de presentación (aguda o crónica). Dado que ambos factores dependen en gran medida de la causa que origina la hemólisis, la expresividad clínica de la anemia hemolítica puede variar desde la ausencia de sintomatología hasta una anemia con requerimiento transfusional.

3.1. Síndrome hemolítico agudo

El SH agudo se presenta bruscamente en un sujeto previamente sano. Presenta manifestaciones clínicas tales como fiebre, ictericia o palidez intensa, fatiga muscular, palpaciones y, eventualmente, emisión de orinas oscuras. El color oscuro de la orina obedece a la eliminación del exceso de hemoglobina plasmática libre (hemoglobinuria) producto de la hemólisis intravascular.

Si la anemia es muy intensa se puede presentar pérdida del conocimiento, signos de insuficiencia renal y shock hipovolémico.

Si se trata de un niño o paciente joven, el antecedente de ingesta medicamentosa es altamente indicativo de déficit de la G6PD o hemoglobinopatía inestable, mientras que en un sujeto adulto, lo más probable es que se trate de un trastorno adquirido.

3.2. Síndrome hemolítico crónico

Debido a que el SH crónico es de instauración lenta y progresiva y si la hemólisis no es intensa, suele dar tiempo a que se desarrollen los mecanismos de compensación. Por ello la expresividad clínica es generalmente menos evidente que en SH agudo y puede variar desde la ausencia de sintomatología a una anemia moderada o intensa. El examen físico demuestra la existencia de palidez y/o ictericia con esplenomegalia palpable. La intensidad de la ictericia y su distribución (piel y/o mucosas) varían ampliamente de un paciente a otro de forma que, en algún caso, queda limitada a la conjuntiva ocular. La ictericia hemolítica obedece al aumento de la bilirrubina no conjugada o libre (también llamada indirecta) por lo que nunca se acompaña de coluria (ictericia acolúrica) y prurito, excepto cuando coexiste con una enfermedad hepatobiliar.

Dado el carácter evolutivo de la anemia hemolítica crónica, su expresividad clínica es más una consecuencia de ciertas complicaciones que del propio síndrome anémico. Estas complicaciones son más importantes cuanto mayor es la intensidad de la anemia.

Las complicaciones debidas a la hipoxia crónica son especialmente evidentes en casos de anemias muy intensas y consisten en retraso del desarrollo óseo y crecimiento corporal, retraso del desarrollo gonadal (caracteres secundarios y menarquia) y eventualmente úlceras. Este tipo de complicaciones suelen ir asociadas a los efectos secundarios que produce la excesiva eritropoyesis como deformaciones del esqueleto debidas a la expansión del tejido mielóide a expensas de la eritropoyesis, estas deformaciones son especialmente evidentes en el cráneo y cara (fascies mongoloides, implantación anómala de los dientes) que pueden evidenciarse radiológicamente.

La excesiva eritropoyesis puede, por un lado, facilitar la aparición de hemocromatosis en

individuos genéticamente predispuestos debido al exceso de la absorción intestinal de hierro y, por otro, agotar las reservas de folato del organismo por hiperconsumo (crisis megaloblástica).

También se pueden presentar manifestaciones debidas al hipermetabolismo hemoglobínico, como es la colelitiasis, la cual es un fenómeno relativamente frecuente y que no exige una intensidad del cuadro anémico; a veces el dolor abdominal que produce constituye la primera y única manifestación de la enfermedad.

4. LABORATORIO

Los hallazgos de laboratorio en pacientes con anemia hemolítica reflejan el aumento de la destrucción de GR y de la eritropoyesis.

El hemograma es de gran utilidad en el diagnóstico inicial de las anemias hemolíticas. El volumen corpuscular medio (VCM) suele ser normal, aun cuando es posible observar leve aumento (98-105 fL) debido a la presencia de reticulocitos. La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) en general también es normal, de tal forma que, en general, las anemias hemolíticas son anemias normocíticas-normocromas.

A continuación se describen los principales hallazgos de laboratorio que reflejan aumento de la eritropoyesis:

- Reticulocitosis. El aumento del índice de producción reticulocitaria (>3) es una característica fundamental en la etapa inicial del diagnóstico de los SH. En el frotis sanguíneo teñido con May Grunwald-Giemsa este aumento de reticulosis se expresa en policromatofilia.
- Leucocitosis.
- Eritroblastos en sangre periférica.
- Hiperplasia eritroblástica en la médula ósea. Se caracteriza por aumento del número de precursores eritroides.

Los hallazgos de laboratorio que reflejan aumento de la destrucción de los GR, son los siguientes:

- Anemia.
- Presencia de esferocitos, esquistocitos u otro tipo de poiquilocitosis.
- Prueba de la globulina antihumana positiva.
- Disminución de la haptoglobina. Es un signo muy sensible de destrucción eritrocitaria periférica, especialmente intravascular (ver

punto 2.2.2.), pero no es específica, ya que puede observarse también en anemia megaloblástica. Rango normal: 0.5-1.5 g/L.

- Disminución de hemopexina. Sigue un curso similar al de la Hp, pero tiene menos valor clínico, ya que es más variable y su existencia es sólo apreciable cuando la hemólisis intravascular es muy intensa.
- Hb glicosilada disminuida. La determinación de la Hb glicosilada (HbA1c) puede ser de utilidad en el estudio de la hemólisis. Frecuentemente disminuye (2-5%) en relación con los valores normales.
- Estercobilinógeno y urobilinógeno aumentados. Normalmente un adulto elimina 50-300 mg/24 horas de estercobilinógeno por las heces; en anemias hemolíticas generalmente supera los 400 mg/día. El aumento de eliminación fecal de estercobilinógeno se acompaña de cierto grado de urobilinuria, lo que confiere una coloración oscura a la orina que puede sobreañadirse a la hemoglobinuria.
- Hiperbilirrubinemia no conjugada.
- Hemoglobinemia y metahemoglobinemia. Sólo en casos de hemólisis intravascular.
- Hemosiderinuria y hemoglobinuria. Sólo en pacientes con hemólisis intravascular.
- Aumento de LDH (Láctico Deshidrogenasa) sérica. La LDH es liberada de los eritrocitos destruidos; su especificidad es baja ya que aumenta en otras situaciones como anemia megaloblástica, infarto al miocardio y miopatías. En los procesos hemolíticos se observa un predominio de la isoenzima LDH-2 y en la anemia megaloblástica predomina la LDH-1.
- Aumento del CO₂ espirado.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS INTRACORPUSCULARES

La integridad del eritrocito depende de la interacción de tres unidades celulares, que lo capacitan para realizar su función primaria de transporte de oxígeno y CO₂. Estas tres unidades celulares son la Hb, la membrana eritrocitaria, y los elementos solubles intracelulares (enzimas, coenzimas, y substratos del metabolismo de la glucosa). La alteración de una de estas unidades celulares da lugar a alteraciones en las otras dos, dando como resultado un acortamiento de la vida media eritrocitaria (hemólisis)

Los defectos intracorpúsculares que pueden

conducir a destrucción prematura de los eritrocitos se pueden agrupar en tres categorías: (a) Anemias hemolíticas por defectos en la membrana del eritrocito (Membranopatías), (b) anemias hemolíticas por defectos genéticos de hemoglobina (Hemoglobinopatías), y (c) anemias hemolíticas por defectos enzimáticos del eritrocito (Enzimopatías).

1. MEMBRANOPATÍAS

1.1. Membranopatías hereditarias

La membrana de los GR es la responsable de las propiedades mecánicas y de la mayoría de las funciones fisiológicas de la célula.

Está formada por una bicapa lipídica plana, donde predominan los fosfolípidos y el colesterol y en menor medida los glicolípidos y aminofosfolípidos, distribuidos asimétricamente. De igual forma, se encuentran distribuidas parcial o totalmente en ella, las proteínas integrales de membrana, unidas por enlaces apolares. Su libre desplazamiento a través de la bicapa lipídica contribuye a mantener la fluidez de la membrana. Las proteínas periféricas interactúan entre sí para formar una malla o enrejado que recubre la cara interior de la doble capa de fosfolípidos y son las responsables de la estabilidad y las propiedades viscoelásticas de la membrana. Entre estas proteínas destacan la espectrina (Sp), la ankirina (banda 2.1, 2.2, 2.3 y 2.6), la banda 4.1, la banda 4.2, la banda 4.9, la aducina, la tropomiosina y la banda 7. Otras proteínas periféricas se disponen hacia la cara exterior de la bicapa lipídica y ellas son fundamentalmente antígenos de grupos sanguíneos (ver capítulo 3).

La banda 3 representa el 25% del total de las proteínas integrales. Está constituida por 2 dominios estructurales: el dominio citoplasmático, encargado de la unión con las proteínas del esqueleto, y la región de transmembrana que mantiene el contacto con el medio extra e intracelular, proporcionando los canales responsables del transporte de iones bicarbonato (HCO₃⁻) y cloruros (Cl⁻). Además, posee un sitio de glicosilación capaz de unir antígenos para el grupo sanguíneo I/i e interviene activamente en la eliminación de eritrocitos envejecidos.

Las glicoforinas son un grupo de proteínas integrales caracterizadas por su elevado contenido en ácido siálico. Las glicoforinas A, B, C y D son las más importantes y constituyen

los sustratos antigénicos de los diferentes grupos sanguíneos. La glicoforina C contribuye a la estabilidad de la membrana gracias a su interacción con proteínas periféricas, además de participar en el intercambio iónico transmembranoso.

La Sp es la proteína más abundante y además la principal responsable del mantenimiento del enrejado proteico. Está compuesta por 2 subunidades α y β enrolladas de forma antiparalela, las que se unen por sus extremos para formar tetrámeros. Estas 2 subunidades están constituidas por secuencias repetitivas de 106 aminoácidos, las que se enlazan para formar una triple hélice.

La ankirina (Ank) está compuesta por 3 subunidades estructurales correspondientes a 3 dominios funcionalmente diferentes: regulador, de unión a la membrana y de unión a la Sp. Su contribución a la integridad de la membrana es decisiva, ya que constituye un importante punto de anclaje a la bicapa lipídica a través de la banda 3.1.

La actina es una proteína organizada en forma de protofilamentos helicoidales estabilizados por la interacción con la Sp, la proteína 4.1 y la tropomiosina.

La proteína 4.1, forma parte del citoesqueleto y su función fundamental es estabilizar la unión espectrina-actina, y contribuir a fijar el esqueleto a la bicapa lipídica.

El mantenimiento de la forma y estabilidad de la membrana es también responsabilidad de otras proteínas. Entre ellas está la proteína 4.2, que actúa como modulador para estabilizar la interacción ankirina-banda 3. La banda 4.9, la aducina y la tropomiosina, protegen la estabilidad de la actina.

Los estudios moleculares han permitido conocer la localización cromosómica de estas proteínas, así como la secuencia nucleotídica de cada uno de los genes.

Las alteraciones en las interacciones entre las proteínas del citoesqueleto y lípidos de la membrana se dividen en 2 categorías, verticales y horizontales:

Interacciones verticales. Estas interacciones son perpendiculares al plano de la membrana de los eritrocitos y comprenden las que ocurren entre el citoesqueleto y las proteínas integrales,

y los lípidos de la membrana. Los defectos en estas interacciones conducen al desacoplamiento entre la doble capa lipídica y el citoesqueleto, lo que da lugar a la pérdida de porciones de la membrana. Todo esto trae como consecuencia la formación de esferocitos y la hemólisis. Los defectos verticales pueden producirse por una deficiencia primaria de espectrina o también por alteraciones de la proteína 4.2, Ank (banda 2,1), banda 3 o por la existencia de una espectrina anormal la cual se enlaza pobremente con la proteína 4,1.

Interacciones horizontales. Son paralelas al plano e importantes en la formación del citoesqueleto que soporta la tensión de la membrana dándole su estabilidad mecánica. Los defectos en la interacciones horizontales pueden ser causados por defectos o deficiencia de actina, proteína 4,1, y aducina; esto lleva a una rotura del citoesqueleto con la consecuente desestabilización de la membrana que da lugar a la fragmentación celular con formación de poiquilocitos.

Defectos en algunas de estas proteínas pueden dar lugar a trastornos clínicos en los cuales está involucrada la estabilidad de los GR.

Se incluyen distintos tipos de membranopatías: esferocitosis, eliptocitosis y piropoiquilocitosis, estomacitosis, xerocitosis hereditarias. En la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), la membrana del eritrocito es demasiado sensible al complemento, pero este defecto es una anomalía adquirida, no hereditaria.

1.1.1. Esferocitosis hereditaria

La Esferocitosis hereditaria (EH) es una anemia hemolítica intracorpúscular en la que los GR son destruidos extravascularmente, de preferencia en el bazo. Se caracteriza por la presencia de esferocitos debido a un defecto molecular que afecta a una de las proteínas del citoesqueleto de la membrana eritrocitaria. Suele presentar una herencia autosómica dominante, aunque en algunas ocasiones puede ser autosómico recesivo; se han descrito casos con mutaciones *de novo*. Presenta una incidencia de 1:1000 a 1:4500 individuos, siendo más frecuente en la raza blanca. A veces, el síndrome hemolítico se manifiesta en la primera infancia, pero hay casos en que el diagnóstico se realiza en edad adulta.

Fisiopatología

La supervivencia de los GR en la circulación depende de su capacidad de mantener una superficie lisa,

forma bicóncava y relación volumen/superficie tal que permita la deformación extrema a la que se ve expuesto en la circulación. En el bazo es donde esta propiedad cobra su mayor expresión, allí la más leve disminución de la plasticidad de la membrana les impide sortear los estrechos sinusoides, situación en la que los macrófagos esplénicos los fagocitan.

La EH se caracteriza por presentar diversidad clínica, la que se explica por: (a) el tipo de mutación, puesto que existen alelos sin sentido (generan un codón de término), alelos con sentido equivocado (codones equivocados), alelos con alteración del marco de lectura (generados por inserción o delección de bases), que conducen a diferentes fenotipos aunque se trate del mismo locus; (b) el efecto de dosis de mutación, ya que el cuadro clínico de un heterocigoto simple es menos severo que el de un homocigoto, de un heterocigoto compuesto que presenta dos mutaciones diferentes ubicadas en locus diferentes y de un doble heterocigoto con dos mutaciones diferentes en el mismo locus; (c) la localización de la mutación en la proteína, podrían comprometer o no su estructura, conformacional y eventualmente su función, y (d) el fondo genético de cada individuo (participación de otros genes).

La alteración molecular de la EH afecta a las proteínas del citoesqueleto; alrededor del 30% presenta alteraciones de la Sp, 30-45% de los pacientes presenta defectos tanto en la Sp como en la Ank, proteína esta última, que forma un puente entre la proteína banda 3 y la Sp. Aproximadamente un 20% de los pacientes presenta una mutación en el gen que codifica para la banda 3. Porcentajes menores afectan a la banda 3 y la proteína 4.2 (2-4%) y solo a proteína 4.2 (0,8%). El déficit de beta Sp suele ser leve y de herencia dominante, mientras que el déficit de alfa Sp es grave y de herencia recesiva. Cuando estas proteínas están alteradas, la bicapa lipídica no está suficientemente estable y parte de ella desaparece por vesiculación, dando lugar a una célula más redonda (esferocito) y menos deformable. Debido a su forma y su rigidez, los esferocitos no pueden atravesar los intersticios esplénicos, especialmente los que limitan con los senos venosos del bazo, y quedan expuestos a un ambiente donde no pueden mantener su elevado metabolismo basal, lo que provoca nuevas pérdidas de la membrana celular.

Un defecto aparentemente secundario de la

membrana de los GR, pero de importancia patológica, es su excesiva permeabilidad al Na^+ . La membrana del eritrocito normal es libremente permeable al agua y los aniones (Cl^- , HCO_3^- , etc.). Los cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) la atraviesan muy lentamente. Para regular su volumen y mantener el equilibrio iónico, la membrana utiliza un sistema de transporte activo, es decir, dependiente de energía. El Na^+ entra pasivamente a los GR por un gradiente electroquímica y sale de ellos por acción de la enzima Na-K-ATPasa, la cual está asociada a la membrana. Debido a que los GR de pacientes con EH presentan permeabilidad aumentada al Na^+ , la Na-K-ATPasa debe eliminar el exceso de Na^+ lo que implica un mayor gasto de energía.

Clínica y laboratorio

Los pacientes portadores de EH presentan anemia, esplenomegalia e ictericia (por hiperbilirrubinemia indirecta). Es frecuente la litiasis por cálculos biliares. En los huesos largos se observa hiperplasia eritroide compensadora de la médula ósea acompañada de expansión de la médula hacia el centro de la diáfisis y, en ocasiones, de eritropoyesis extramedular. Como la capacidad de la médula ósea para aumentar la eritropoyesis es de seis a ocho veces lo normal y esto supera habitualmente la intensidad de la hemólisis, la anemia suele ser leve o moderada y puede incluso no observarse. La compensación puede quedar interrumpida por episodios de hipoplasia eritroide desencadenados por las infecciones principalmente virales (parvovirus). La intensidad de la hemólisis puede aumentar transitoriamente en infecciones que inducen mayor esplenomegalia.

La alteración eritrocitaria característica es la presencia de esferocitos. El volumen corpuscular medio (VCM) suele ser normal o algo bajo, y la concentración de Hb corpuscular media (CHCM) puede aumentar hasta 30%.

En la práctica clínica el examen de laboratorio más utilizado es la fragilidad osmótica, aun cuando existen otros procedimientos, algunos de ellos solo son usados en investigación.

Prueba de fragilidad osmótica. Mide la resistencia de los eritrocitos a la hemólisis frente a condiciones de tensión osmótica. Esta resistencia depende de la relación superficie/volumen de los GR y de la función de la membrana. Los eritrocitos se incuban en

soluciones de concentraciones decrecientes de cloruro de sodio desde isotonicidad hasta marcada hipotonicidad. Los eritrocitos captan agua en un esfuerzo por lograr el equilibrio osmótico, de esta forma la célula se hincha hasta adquirir forma esférica. La captación adicional de agua crea una membrana porosa que finalmente estalla, liberando la Hb (hemólisis). Un pequeño porcentaje de GR normales se

hemolisan a 0,5% de NaCl y el 100% de los mismos lo hace a 0,3%. Debido a la menor relación superficie/volumen, los esferocitos no pueden incorporar tanta agua como los eritrocitos normales por lo que se hemolisan a concentraciones más cercanas a la isotonicidad (figura 8-3). La prueba es más sensible si la sangre se incubó toda la noche a 37°C antes de realizar el ensayo.

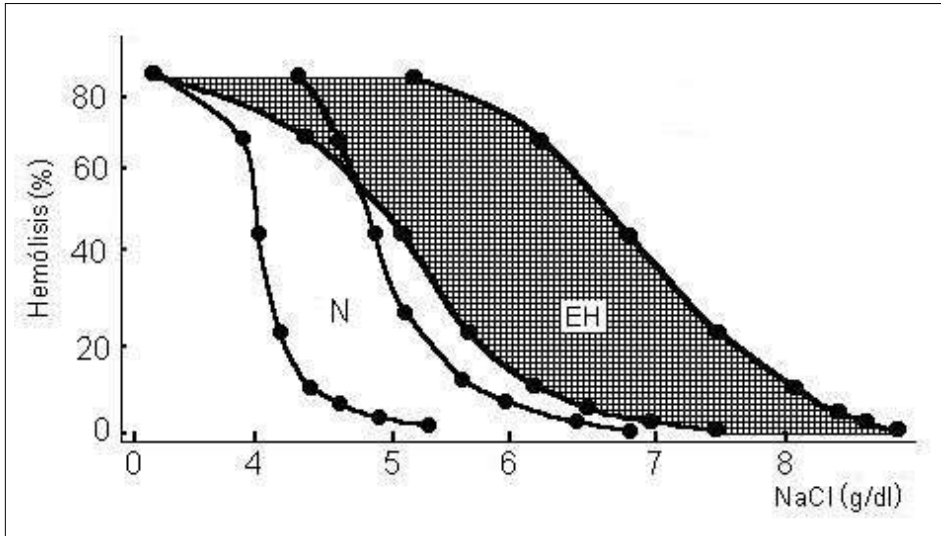


Figura 8-3. Representación gráfica de la fragilidad osmótica de eritrocitos normales y pacientes con esferocitosis hereditaria. La región achurada corresponde al rango de hemólisis de individuos normales (N) y la zona blanca representa la hemólisis en los pacientes con Esferocitosis Hereditaria (EH).

Prueba de la autohemólisis. La prueba de autohemólisis mide el porcentaje de hemólisis espontánea que ocurre después de incubar los eritrocitos durante 48 horas a 37°C, en condiciones estériles. El porcentaje de hemólisis es del 10-50% y <4% en pacientes portadores de EH y normales, respectivamente. La adición de glucosa a la muestra disminuye la autohemólisis.

Prueba de criohemólisis. Está basada en observaciones que demuestran que los eritrocitos de las personas con EH suspendidos en soluciones hipertónicas, son más susceptibles a los cambios de temperatura que los eritrocitos de los sujetos normales. Con este procedimiento es posible identificar todos los casos de EH, incluyendo a los portadores asintomáticos de la enfermedad. La capacidad de la prueba para identificar los casos menos graves, posiblemente representa la dependencia de la criohemólisis a factores que están más relacionados con los defectos

moleculares primarios de la membrana y menos a la relación del área de superficie y el volumen de los eritrocitos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). En el estudio de la EH la PAGE permite determinar la presencia o ausencia de proteínas de membrana de GR, situación que podría certificarse con “immunoblotting” o inmunoprecipitación.

Biología molecular. Técnicas como PCR alelo específico, “Southern blot”, secuenciación de DNA y otras, permiten estudiar mutaciones puntuales o deleciones, según corresponda.

En el diagnóstico diferencial, dado que la anemia hemolítica inmune generalmente presenta algún grado de esferocitosis, se debe incluir la prueba de antiglobulina humana (prueba de Coombs) directa e indirecta.

Tratamiento

Las variedades leves de EH no requieren tratamiento. La esplenectomía es el tratamiento estándar en los pacientes con hemólisis sintomática; con esto se corrige la anemia y la hemólisis, pero el defecto básico en la membrana permanece por lo que se encontrarán esferocitos en la sangre periférica. Existen pacientes que no responden a la esplenectomía, esto puede deberse a la presencia de bazo accesorio, desarrollo de esplenosis u otra causa de anemia hemolítica concomitante.

Los pacientes deben recibir profilácticamente 1 mg/día de ácido fólico para evitar carencia de esta vitamina, situación que se debe evitar en las anemias hemolíticas crónicas.

1.1.2. Eliptocitosis hereditaria

La Eliptocitosis hereditaria es un trastorno que se hereda como un rasgo autosómico dominante y que afecta a 1 de 4000 ó 5000 habitantes.

Fisiopatología

Se han descrito muchas mutaciones en los genes de α - y β -Sp, proteína 4.1, banda 3, glicoforina C y otras proteínas. Estas incluyen mutaciones puntuales, deleciones e inserciones. Las más comunes son en Sp, principalmente en el sector de asociación de las cadenas α y β .

Cada uno de estos defectos puede conducir a cambios esqueléticos que pueden hacer que la célula cambie a la forma elíptica y/o se fragmente bajo las exigencias de la circulación, dependiendo de la magnitud del defecto.

Clínica y laboratorio

La mayoría de las personas que sufren de esta patología no muestran signos de hemólisis. Los homocigotos para la alteración presentan hemólisis más intensa. La mayoría de los pacientes sólo presenta una hemólisis leve (Hb > de 12 mg/dL), menos del 4% de reticulocitos, niveles bajos de haptoglobina y supervivencia de los hematíes justo por debajo de los límites normales.

En el 10 a 15% de pacientes la hemólisis es considerablemente mayor, la supervivencia media de los GR es tan breve como 5 días y los

reticulocitos se elevan hasta el 20%. Los niveles de Hb rara vez descienden por debajo de 9 a 10 mg/dL. Los GR se destruyen preferentemente en el bazo, lo que se expresa clínicamente en esplenomegalia.

La presencia de eliptocitos es el hallazgo más característico y consistente del laboratorio con o sin anemia.

Tratamiento

La esplenectomía corrige la hemólisis, pero al igual que en la EH solo evita la hemólisis y protege al paciente de las complicaciones de la hemólisis crónica.

1.1.3. Piropoiquilocitosis hereditaria

La Piropoiquilocitosis hereditaria (PPH) corresponde a un trastorno recesivo autosómico poco frecuente; ocurre de preferencia en individuos de raza negra. La enfermedad se presenta en la lactancia o en la primera infancia como una anemia hemolítica grave con microcitosis y poiquilocitosis marcada. Los GR se destruyen a 44 ó 45°C, mientras que los hematíes normales resisten hasta 49°C.

La alteración se debe a un déficit de Sp y a un defecto en el autoensamblaje de la misma. Existe una cierta asociación entre PPH y Eliptocitosis hereditaria. La esplenectomía, no suprime la hemólisis, aunque sí la disminuye en forma importante.

1.1.4. Estomatocitosis hereditaria

La Estomatocitosis hereditaria es una anemia hemolítica autosómica dominante muy poco frecuente. Se caracteriza porque la membrana eritrocitaria tiene una permeabilidad anormal para sodio y potasio; hay aumento en la concentración intracelular de cationes, el agua entra a los GR lo que le da la forma de estomatocitos; éstos se caracterizan por presentar un área central pálida, estomática como rendija. La CHCM puede estar disminuida y la VCM puede presentarse aumentada.

Los GR presentan menos deformabilidad que los eritrocitos normales y, por ello los secuestra el bazo, donde el suministro de glucosa se agota con facilidad.

La anemia es, por lo general, leve a moderada.

La bilirrubina aumenta y la reticulocitosis es moderada. El frotis sanguíneo de estos pacientes presenta el 10 a 50% de estomatocitos.

La esplenectomía es de respuesta variable; en algunos casos la hemólisis desaparece, en cambio en otros sólo se observa una mejoría parcial en la supervivencia de los GR.

1.1.5. Xerocitosis hereditaria

En la Xerocitosis hereditaria se observa un trastorno de permeabilidad, con una pérdida neta de potasio intracelular que excede a la entrada pasiva de sodio y su ganancia neta. En consecuencia, la célula se deshidrata, y la CHCM aumenta. Los GR tienen aspecto de glóbulos blancos. Se desconoce su fisiopatología.

1.2. Membranopatía adquirida

1.2.1. Hemoglobinuria paroxística nocturna

La Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno adquirido y poco común de la membrana de los eritrocitos, que se caracteriza por su sensibilidad anormal al complemento. El estado se exagera durante el sueño, aunque muchos pacientes presentan hemólisis crónica que no se relacionan con el sueño ni con hemoglobinuria evidente.

Fisiopatología

Los GR de pacientes portadores de las HPN al ser transfundida a individuos normales presentan supervivencia acortada. Por otra parte, los GR normales tienen supervivencia normal en los pacientes con HPN.

Un clon anormal de células precursoras produce eritrocitos, plaquetas y neutrófilos que son muy sensibles a la lisis por el sistema del complemento. Se sabe que el defecto radica en una mutación en el gen PIG-A del cromosoma X; éste codifica una proteína que participa al inicio de la síntesis del glicosil fosfatidil inositol (GPI), molécula gracias a la cual diversas proteínas se unen a la membrana celular. El GPI, un glicolípido de anclaje, consiste en una molécula de fosfatidil inositol a la cual se une un glicano (N-glucosamina), tres manosas y etanolamina. Al carboxilo final de la etanolamina se unen las proteínas (figura 8-4).

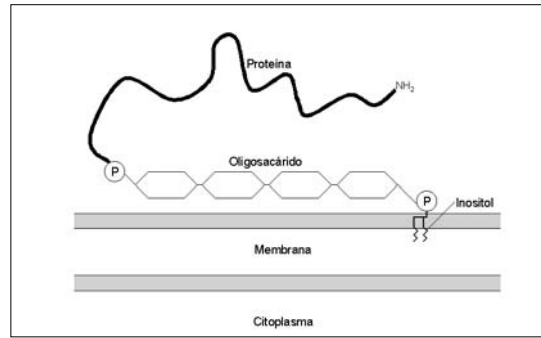


Figura 8-4. Estructura del Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI).

a) Síntesis del GPI. El GPI es sintetizado en el retículo endotelial. Brevemente, la molécula UDP-N-acetilglucosamina aporta N-acetilglucosamina (NAG), que es transferida al fosfatidil inositol en la superficie externa del retículo endoplásmico. Luego la NAG es deacetilada y se agrega un ácido graso al inositol. Posteriormente esta molécula es translocada a la cisterna del retículo endoplásmico. La GDP-manosa, actúa como un dador de manosa; la primera manosa es agregada al dolicol fosfato formando dolicol fosforil manosa (DPM), por la acción de la enzima DPM sintetasa. El DPM también es translocado y puede entregar manosas a la molécula anterior. El paso final es el anclaje de la fosfoetanolamina (PEA) a la tercera manosa. Las moléculas PEA se pueden unir a las otras dos manosas, pero ellas no participan en la unión a la proteína.

La proteína es sintetizada al interior de la cisterna del retículo endoplásmico y una transaminasa la une a una etanolamina terminal. Una vez que la proteína está anclada al GPI es transferida al aparato de Golgi y luego es transportada a la membrana.

b) Defecto molecular en la HPN

En la HPN la molécula GPI no es sintetizada, o lo es en muy pequeñas cantidades. El defecto ocurre en la adición de la NAG a la molécula de fosfatidil inositol.

El gen defectuoso en la HPN se denomina Pig A, se localiza en el brazo corto (p) del cromosoma X (Xp 22,1) y posee 6 exones. El primer exón es muy corto y no es traducido, el segundo codifica la mitad de la proteína madura y los exones 3-6 codifican el resto de la proteína

madura. El gen codifica para una proteína de 24 kDa y 84 aminoácidos. El tipo de mutaciones incluyen: deleciones (75%) y mutaciones puntuales (25%). Se han descrito varios tipos de mutaciones en el gen que codifica para la proteína Pig A.

Los eventos mutagénicos aparentemente tienen lugar en la "stem cell". Los primeros precursores identificables son CD34+, CD38- y en ellos se ha observado carencia de precursores de GPI. Debido a lo anterior es que ciertas proteínas no se expresen en la membrana celular de los pacientes con HPN: acetilcolinesterasa, CD55 (DAF), CD59 (MIRL), FcγRIIIb (CD16b), C8, CD58, CD14, CD73, CD87, CDw52, CD66c, P50-80, CD24, CD48, CD67 y receptor de folato.

El déficit de algunas de estas proteínas desencadenan los episodios de hemólisis intravascular que caracterizan esta enfermedad. El CD55 (DAF: Factor acelerador del decaimiento de convertasas), interviene en el control de la activación del sistema del complemento. Las deficiencias más graves se relacionan con la incapacidad de inactivar al Complejo de ataque a membrana (CAM) sobre los eritrocitos. La unión de C8 a la membrana y el paso siguiente,

la polimerización de C9, son eventos que normalmente se encuentran restringidos por el factor de restricción homólogo (HRF) y por CD59 (MIRL: Inhibidor de la lisis reactiva de membrana) que se une a C8 e impide la formación del CAM. El HRF interfiere con la unión de C9 a C8. CD59 es una proteína de transmembrana que sólo presenta un punto de unión extramembranal entre C9 y el complejo C5b-C8, pero bloquea el segundo punto de unión entre C9 y la porción transmembranal de C5b-C8; de este modo inhibe la reacción catalítica de C5bC8 sobre C9, impidiendo la formación del polímero de C9 y su inserción en la membrana.

En la HPN, la deficiencia de las proteínas CD55, CD59 y/o HRF, inhibidores naturales de la activación del sistema del complemento sobre la membrana celular, determina una susceptibilidad anormalmente aumentada de los eritrocitos a la lisis por el complemento.

Pruebas *in vitro* que cuantifican la sensibilidad de los eritrocitos a la lisis mediada por el complemento permiten identificar tres fenotipos (tabla 8-3).

Tabla 8-3. Fenotipos de Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)

Designación fenotípica	Sensibilidad al complemento	Expresión de GPI	Tipo de mutación
HPN I	Normal	Normal	Ninguna
HPN II	Moderada sensibilidad (3 a 4 veces más sensible de lo normal)	Positivo	Parcial
HPN III	Marcada (15 a 20 veces más sensible de lo normal)	Negativo	Completa

En el 78% de los pacientes existe una mezcla de células HPN I y HPN III, alrededor del 9% de los casos presentan células HPN I y HPN II, 9% presentan los tres fenotipos y 3% de los pacientes presentan células HPN II y III, y en casos raros sólo hay presencia de una población celular HPN II.

Clínica y laboratorio

Hemoglobinuria. Un 25% de los pacientes presentan hemoglobinuria debido a la hemólisis

durante el sueño. La orina en los pacientes con HPN durante la mañana es oscura y durante el día es clara. La causa de la exacerbación nocturna es poco conocida, pero se postula que sería una pequeña disminución del pH plasmático, secundaria a la retención de CO₂ producto de la hipoventilación nocturna (acidocis respiratoria).

Hipoplasia medular. La falla genética en las células troncales, puede explicar que algunos pacientes portadores de HPN desarrollen

anemia aplásica.

Trombosis. Pacientes con HPN poseen predisposición a trombosis, especialmente venosa. La trombosis explica alrededor del 50% de las muertes en estos pacientes. Trombosis fatal ocurre usualmente en el sistema portal y el cerebro; son comunes en extremidades y otros sitios. Adicionalmente, la Coagulación Intravascular Diseminada (CID) puede ser gatillada por la activación del complemento en plaquetas que presenta la alteración propia de la HPN; las plaquetas se activan y se producen agregados plaquetarios.

Alteraciones renales. En pacientes con HPN puede ocurrir insuficiencia renal, tanto aguda como crónica. El daño renal se expresa en disminución del “clearance” de creatinina. Además en estos pacientes se puede observar hematuria, proteinuria, hipertensión y/o una incapacidad de concentrar la orina. Las alteraciones renales podrían explicarse por repetidos episodios de trombosis que afectan a pequeñas vénulas y a la hemoglobinuria que caracteriza a la enfermedad.

Infecciones. El mayor índice de infecciones se explica por la leucopenia o defecto en la función de los leucocitos. Leves infecciones podrían exacerbar el proceso hemolítico conducir a crisis de aplasia.

Laboratorio. El diagnóstico de la HPN tradicionalmente se basaba en pruebas de laboratorio que investigaban la sensibilidad exagerada de los eritrocitos a la acción del complemento hemolítico; entre estas pruebas se encuentran las de hemólisis ácida o prueba de Ham, las de hemólisis por inulina y sacarosa, así como la investigación de hemosiderinuria (ver capítulo 29). Gracias al advenimiento de la citometría de flujo, ahora es posible investigar la expresión de algunas proteínas ancladas a las células a través de GPI. Las dos proteínas más frecuentemente investigadas en HPN por el trastorno en GPI son las moléculas CD55 y CD59 y su sub-expresión puede demostrarse en fracciones muy pequeñas de células deficientes, como suele ocurrir después de una crisis hemolítica (figura 8-5). En estas condiciones, en que las células deficientes son escasas, las pruebas tradicionales proporcionan resultados falsos negativos. La experiencia obtenida investigando estas moléculas ancladas por GPI ha demostrado ser más sensible que las pruebas tradicionales para investigar a la HPN.

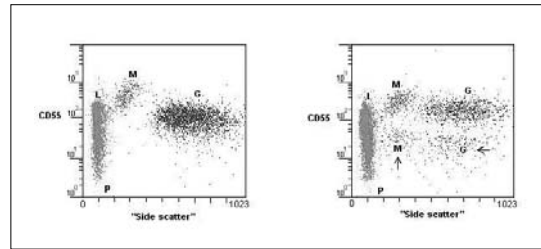


Figura 8-5. Expresión del antígeno CD55 en los leucocitos de un paciente con hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). El panel de la izquierda corresponde a un individuo normal: el eje horizontal corresponde a la complejidad interna de las células (“side scatter”) y el vertical a la intensidad de expresión del antígeno CD55. Se discriminan claramente las poblaciones de linfocitos (L), monocitos (M), granulocitos (G) y plaquetas (P). En el panel de la derecha, que corresponde a un paciente con HPN, se observan proporciones pequeñas de monocitos y granulocitos en los que la expresión del antígeno CD55 está francamente disminuida (flechas). Histogramas proporcionados gentilmente por el Dr. Alejandro Ruiz-Argüelles, Director Médico de Laboratorios Clínicos de Puebla y del Depto. de Inmunología del mismo.

Tratamiento

Como tratamiento sintomático de la anemia al paciente se le indica tratamiento con sales de hierro debido a la pérdida de este elemento (hemoglobinuria) y si se requiere se le indican transfusiones. En los pacientes que presentan trombosis venosa se utilizan anticoagulantes orales. En caso de infecciones se indican antibióticos. El trasplante de médula ósea es el único tratamiento curativo.

2. ENZIMOPATÍAS

Las anemias hereditarias resultantes de alteraciones del metabolismo de los glóbulos rojos se diferencian de las anemias hemolíticas por alteraciones de la membrana por la ausencia de esferocitos, una fragilidad osmótica normal y ser de herencia recesiva.

La estructura y síntesis de hemoglobina es normal y por no tener ninguna anomalía morfológica se las conoce como anemias hemolíticas congénitas no esferocíticas (AHCNE). El diagnóstico se hace descartando las otras causas de anemias hemolíticas, como hemoglobinopatías o esferocitosis, para luego continuar con las pruebas para desórdenes enzimáticos. El diagnóstico definitivo se hace con la cuantificación de la enzima o la identificación de la mutación específica al hacer el análisis del DNA.

Considerando las vías metabólicas de los GR las eritroenzimopatías se clasifican en tres grupos:

(a) de la glucólisis anaerobia o vía de Embden-Meyerhof, (b) del metabolismo oxidorreductor y (c) del metabolismo nucleotídico, siendo las alteraciones enzimáticas más frecuentes: Piruvato quinasa (PK), glucosa 6-Fosfato deshidrogenasa (G6PD) y Pirinridina-5' nucleotidasa (P 5'N), respectivamente.

2.1. Déficit de enzimas de la glucólisis anaerobia

2.1.1. Déficit de piruvatoquinasa

Las enzimopatías del metabolismo glucolítico alteran la capacidad energética del eritrocito, dificultando la formación o utilización del ATP. Cuando disminuye la capacidad energética del eritrocito éste envejece prematuramente y es eliminado de la circulación sanguínea por el sistema fagocítico mononuclear (SFM).

En general, la hemólisis acompaña a aquellas enzimopatías que ocupan una posición relevante o clave en la vía metabólica, por ejemplo, la Hexoquinasa (HK), Fosfofructoquinasa (PFK) y Piruvatoquinasa (PK) o las que intervienen en determinadas etapas esenciales como Glucosafosfato isomerasa (GPI), Triosafofosfato isomerasa (TPI), y Fosfogliceratoquinasa (PGK), principalmente. A excepción del déficit hereditario de PFK y TPI que se acompañan de importantes trastornos musculares y neurológicos, respectivamente, las restantes enzimopatías de la glucólisis anaerobia sólo presentan una anemia hemolítica crónica

de intensidad variable. La enzimopatía más frecuente de esta vía es el déficit de PK.

La PK es la enzima que cataliza una de las etapas más importantes de la glucólisis transformando el fosofenolpiruvato (PEP) a piruvato, proceso en que se produce una molécula de ATP.

La PK es un tetrámero (230 kDa) y es codificada por dos genes distintos, PK-LR y PK-M. El gen PK-LR codifica dos enzimas: PK-R (eritrocitos) y PK-L (hígado).

La síntesis de las enzimas eritrocitarias (PK-R) y hepática (PK-L) está regulada por un mecanismo de escisión y empalme ("splicing") alternativo a partir del gen PK-LR localizado en el cromosoma 1 y por el cual, el mRNA de la enzima PK-R difiere del de la enzima PK-L en la lectura de los exones 1 y 2, respectivamente.

El déficit congénito de PK se transmite con carácter autosómico recesivo y se han descrito alrededor de 400 casos a nivel mundial, la mayoría del norte de Europa. La clonación del gen PK ha permitido a través del ADNc, la secuenciación de este gen y el hallazgo de unas 130 mutaciones distintas debido a sustituciones, deleciones o adiciones. Aproximadamente el 70% de estas mutaciones afectan estructural y funcionalmente a importantes dominios de la PK.

Las 6 mutaciones que se indican en la tabla 8-4 se encuentran cerca del sitio de unión con el sustrato (1 y 3) o afectan su configuración.

Tabla 8-4. Mutaciones de la Piruvatoquinasa

	Nucleótido genómico	Exón	Sustitución base	Sustitución aminoácido
1	2757	4	G → T	Gly 159 Val
2	3660	6	C → T	Ala 295 Val
3	3719	6	G → A	Glu 315 Lys
4	3894	7	G → A	Gly 341 Asp
5	6360	10	G → T	Arg 504 Leu
6	6377	10	C → T	Arg 510 Ter

A medida a que un glóbulo rojo deficiente de P-K envejece hay una progresiva reducción de la glicólisis que va en paralelo a la gradual degradación de la enzima lo que lleva a una depleción de ATP y a hemólisis. Se observa un acúmulo de productos glicolíticos intermedios proximales al déficit enzimático en la mayoría de los casos como es el 2,3 difosfoglicerato o

el 3 fosfoglicerato lo que ayuda a confirmar el diagnóstico.

La herencia es de transmisión autosómica recesiva y la enfermedad la presentan los homocigotos y los heterocigotos compuestos. Los heterocigotos simples no tienen el cuadro clínico a pesar de tener el 50% de reducción de

actividad enzimática.

Laboratorio

Hematología. Hemoglobina entre 6 a 12 g/dl, reticulocitosis, moderada macrocitosis (VCM: 98-105 fl), disminución de la vida media eritrocitaria, equinocitosis ausencia de esferocitos circulantes y fragilidad osmótica normal.

Bioquímica. Moderada bilirrubinemia conjugada aumento de 2,3 DPG y PEP, y disminución de haptoglobulinemia, ATP, lactato y piruvato.

Para el diagnóstico definitivo existen técnicas como: ensayo enzimático cuantitativo que es la medida de la actividad enzimática en el hemolizado en UI por gramo de hemoglobina (rango normal: 11.1-18.9 UI/gHb), prueba de fluorescencia y autohemólisis. Finalmente la determinación de las distintas mutaciones de PK-R se realiza a través de técnicas moleculares.

Clínica

Los pacientes con déficit de PK tienen anemia, ictericia y esplenomegalia frecuentemente. La anemia puede ser severa y desde el nacimiento, necesitando transfusiones mensuales; un hecho llamativo es que los reticulocitos no siempre están elevados.

Los recién nacidos tienen casi siempre hiperbilirrubinemia de predominio indirecto y pueden requerir exsanguíneo transfusión al nacer. Esta hiperbilirrubinemia persiste durante los próximos años lo que produce los consiguientes cálculos biliares.

Tratamiento

Las crisis hemolíticas son poco frecuentes y no se asocian al uso de drogas, más bien aparecen con cuadros febriles importantes.

Los pacientes con anemia severa dependientes de transfusiones se deben esplenectomizar y después de ella ocurre un fenómeno denominado reticulocitosis paradójica con reticulocitos de 50-70 y hasta 90% a pesar de que la hemólisis disminuye y la necesidad de transfusiones también.

2.1.2. Déficit de la Glucosafosfato isomerasa (GPI)

La enzima GPI es la segunda enzimopatía más frecuente de esta vía. Se hereda con carácter

autosómico dominante. La clonación del gen GPI situado en el cromosoma 19 ha permitido identificar mutaciones que en prácticamente todos los casos obedecen a sustituciones de una única base nitrogenada y síntesis de una enzima inestable.

2.1.3. Déficit de la Triosafofosfato isomerasa (TPI)

El déficit TPI se hereda con carácter autosómico recesivo. Es codificada por un único gen situado en el cromosoma 12 cuya clonación ha permitido identificar cinco mutaciones diferentes, todas ellas por sustitución de una única base nitrogenada. La mutación prevalente en todas las poblaciones analizadas es la sustitución G-C del codón 104 (GAC-GAC) con cambio del glutamato por aspartato y empleada en el diagnóstico prenatal de la enfermedad. Esta mutación se acompaña de una marcada inestabilidad de la enzima deficiente.

2.1.4. Déficit de Hexoquinasa (HK)

Existen tres genes que codifican para la enzima HK: HK1, HK2 y HK3. La enzima eritrocitaria es codificada por el gen HK1, es la de menor actividad en comparación con otras enzimas de la glucólisis, es muy influenciada por la reticulocitosis. Se transmite por carácter autosómico recesivo.

2.1.5. Déficit de Fosfofructoquinasa (PFK)

La enzima PFK es codificada por tres genes diferentes (PFK M, PFK L y PFK P) con cinco isoenzimas (M4, M3L1, M2L2, ML3 y L4) los glóbulos rojos.

2.1.6. Déficit de Fosfogliceratoquinasa (PGK)

La enzima PGK es codificada por dos genes, uno situado en el cromosoma 19 (PGK testicular) y otro ligado al cromosoma X (Xq13) de distribución más generalizada y que codifica la enzima presente en las células sanguíneas. Afecta esencialmente a varones homocigotos siendo las mujeres heterocigotas, generalmente asintomáticas.

2.2. Enzimopatías del metabolismo oxidorreductor

Pertencen a diferentes vías metabólicas relacionadas todas ellas con el mantenimiento del glutatión reducido (GSH): (a) vía de las pentosas-fosfato: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), (b) vía de la síntesis del

glutación: Glutación sintetasa (GS) y Gamma-glutamylcisteína sintetasa (GCS) y (c) sistema oxidorreductor del glutación: Glutación peroxidasa (GP) y Glutación reductasa (GR).

El mecanismo fisiopatológico de la hemólisis en este tipo de enzimopatías es la pérdida del poder reductor eritrocitario frente a la acción de distintas sustancias oxidantes, que se generan en el interior del eritrocito o proceden del exterior (peróxido de hidrógeno, radical superóxido). En ausencia de un adecuado sistema oxidorreductor, tales sustancias condicionarán la desnaturalización de la hemoglobina y otras proteínas eritrocitarias produciendo una hemólisis inmediata. La enzimopatía más frecuente y destacada del metabolismo oxidorreductor es el déficit G₆PD.

2.2.1. Déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

La deficiencia de la glucosa 6 fosfatodeshidrogenasa (G₆PD) es el déficit enzimático del glóbulo rojo más frecuente en el ser humano. Se cree que hay 200 millones de personas afectadas, y la razón de esto, es que el déficit de ella confiere resistencia a la malaria. Justamente es al estudiar la anemia hemolítica provocada por la primaquina, droga antimalárica, que este déficit es descubierto.

La G₆PD es una enzima muy antigua en la evolución, ya que se encuentra en todos los organismos desde levaduras y protozoos a plantas y animales. En los mamíferos es citoplasmática y se encuentran en todas las células del cuerpo.

El rol de la G₆PD en el glóbulo rojo es un rol metabólico por su potencial reductor y así, la deficiencia de esta enzima provoca un daño oxidativo en él y su posterior destrucción.

La vida media de esta enzima es de 60 días y refleja paso a paso la edad del glóbulo rojo ya que éste es incapaz de formar nuevas moléculas proteicas y así, el reticulocito, que es el glóbulo rojo más joven, tiene 5 veces más actividad enzimática que los senescentes.

Formas clínicas

El déficit de esta enzima se manifiesta en el individuo en 3 formas clínicas: (a) anemia

hemolítica aguda (AHA), (b) anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE), y (c) anemia hemolítica neonatal. Actualmente se cree que esta última presentación se debe más a inmadurez hepática por déficit de la enzima en la célula hepática que a una hemólisis propiamente tal, ya que los recién nacidos no presentan anemia cuando hacen la ictericia.

En las AHA los individuos no tienen anemia ni hemólisis normalmente, ésta se hace evidente sólo bajo estrés, como es la administración de fármacos, las infecciones o la ingestión de habas (favismo) y la presentan personas con las mutaciones más frecuentes, como la Africana (A-) y la Mediterránea. Los siguientes fármacos que no deben ser indicados a los pacientes deficientes G₆PD: Antimaláricos (Primaquina, Pamaquina), Sulfonamidas (Sulfanilamida, Sulfapiridina, Sulfadimidina, Sulfa+Trimetropin, Sulfametoxazole), Nitrofurantoina (Nitrofurantoina, Furazolidona, Nitrofurazona), Otros (Ácido Nalidixico, Cloranfenicol, Probenecid, Azul de Metileno, Azul de Toloudina, Naftaleno, Trinitrotolueno, Fenilhidrazina, Fenazopiridina) y Antihelmínticos (B-Naftol, Niridazole)

Las AHCNE las producen variantes raras donde la mutación se ubica en la región de unión con NADPH y no depende tanto de la actividad de la enzima que a veces es bastante alta (35%). En general la hemólisis es de poca cuantía, aunque se han descrito anemias tan intensas como la talasemia mayor. El glóbulo rojo, en estos casos, no es capaz de resistir ni siquiera el estrés de la circulación y está en permanente destrucción.

Genética

El gen de G₆PD se clonó en 1984. Está ubicado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X. Este gen tiene 20kb de longitud y 13 exones. La secuencia codificadora comienza en el exón 2 ya que el exón 1 no codifica.

La enzima normal se denomina G₆PD B y es un oligómero con una sola cadena polipeptídica de 515 aminoácidos.

La deficiencia de G₆PD puede deberse a deleciones o a mutaciones puntuales afectando la transcripción, procesamiento o la estructura

primaria misma. Aunque la actividad enzimática sea muy baja (1%) nunca está totalmente ausente.

Las sustituciones de aminoácidos alteran la función de la enzima ya sea por disminución de la estabilidad de ella afectando la función catalítica de la G₆PD. El estudio electroforético y las propiedades cinéticas de la enzima residual ha mostrado que no todos los grupos étnicos tienen la misma mutación y así se han descrito más de 400 mutaciones.

Con la posibilidad actual del uso de la reacción de polimerasa en cadena para el estudio de exones individuales o grupos de exones, el análisis de las mutaciones de la G₆PD se ha simplificado y actualmente hay descritas alrededor de 100 variantes.

Clasificación

La organización mundial de la salud (OMS) ha categorizado las deficiencias de G₆PD según la actividad enzimática en 5 clases (tabla 8-5).

Tabla 8-5. Clasificación clínicomolecular de las variantes de G₆PD según la OMS

Clase	Actividad en eritrocitos (%)	Expresividad clínica	Ejemplos
I	0	Anemia hemolítica crónica Infección de repetición	Variantes raras G ₆ PD Barcelona
II	0-5	Asintomáticas o Anemia aguda medicamentosa Favismo	Variantes mediterráneas G ₆ PD mediterránea Variantes asiáticas G ₆ PD Cantón
III	5-15	Asintomáticas o Anemia aguda medicamentosa Favismo	Variantes africanas G ₆ PD Bética (A-)
IV	100	Asintomáticas	Enzimas normales G ₆ PD B+ y G6PD A+
V	130	Asintomáticas	Variantes hiperactivas G ₆ PD Hecktoen

De las 100 mutaciones diferentes de G₆PD descritas hasta la fecha, se las ha identificado en todos los exones salvo en el exón 1 que no tiene secuencia codificadora y en la gran mayoría de los casos sólo hay una sustitución aminoacídica. El 25% de las mutaciones están en el exón 10 que se extiende desde el nucleótido 1052 al 1287, y de ellas, todas menos 2 que se encuentran en el extremo 5' del exón, son de clase I. Se ha pensado en la

secuencia aminoacídica que codifica este exón se encuentra el sitio de unión del NADP porque algunas de estas variantes se activan con altas concentraciones de NADPH. Otra posibilidad sería que esta zona fuera una de contacto de subunidades y las mutaciones en esta zona alterarían la estabilidad de la enzima. En la tabla 8-6 se indican las mutaciones de las variantes más frecuentes de G₆PD.

Tabla 8-6. Mutaciones de las variantes más frecuentes de G₆PD

Variantes	Base nitrogenada mutada	Cambio de aminoácido	Clasificación según OMS
Mediterránea			
G ₆ PD Mediterránea	C563T	Ser188Phe	II
G ₆ PD Seattle	G844C	Asp282His	II
Africanas			
G ₆ PD A+	A376G	Asn126Asp	IV
G ₆ PD A-	A376G	Asn126Asp	
	y	y	
	G202A	Val68Met	III
	G680T	Arg227Leu	III
	T968C	Leu323Pro	III
A95G	His32Arg	III	
Asiáticas			
G ₆ PD Cantón	G1376T	Arg459Leu	II

Laboratorio

Para diagnosticar que existe un déficit de PK existen distintas pruebas de laboratorio, tanto rutinarias como específicas.

Hematológicas. Hemoglobina entre 3 a 4 g/dl, excentrocitos (presentan un desplazamiento de la hemoglobina hacia uno de los extremos), cuerpos de Heinz (hemoglobina desnaturalizada que precipita en el interior del eritrocito).

Bioquímicas. Se observa un aumento de hemoglobina, bilirrubina plasmática y urobilinógeno urinario y fecal, una disminución de haptoglobulinemia, hemoglobinuria y hemosidenuria.

El diagnóstico definitivo se realiza en técnicas como: ensayo enzimático cuantitativo que es la medida de la actividad enzimática en el hemolizado en UI por gramo de hemoglobina (rango normal: 4.6 - 13.5 UI/gHb) prueba de fluorescencia, prueba de reducción de metahemoglobina, prueba de ascorbato-cianide y electroforesis.

Tratamiento

El déficit de la G₆PD carece de tratamiento etiológico y siempre debe ser paliativo, a base de transfusiones sanguíneas cuando se requiera; además una vez establecido el diagnóstico debe procurarse evitar el contacto del paciente con todas aquellas sustancias capaces de

desencadenar el cuadro hemolítico.

2.2.2. Déficit de Glutación sintetasa (GS)

El déficit de GS es la segunda enzimopatía en frecuencia del metabolismo óxidoreductor. Junto a la GGS intervienen en la síntesis del glutatión con consumo de una molécula de ATP. Esta enzima tiene una vida media de 4 días y existe bajo dos formas moleculares, una exclusivamente eritrocitaria (produce sólo anemias) y otra sistémica (produce oxoprolinuria, retraso mental o neuropatía grave).

2.2.3. Déficit de Gamma-glutamilcisteín sintetasa (GGS)

El déficit de GGS es un desorden autosómico recesivo. La anemia hemolítica sólo se observa en estados homocigotos, donde los niveles de GSH eritrocitario son aproximadamente un 5% de lo normal, con una marcada disminución en la actividad de la GGS.

2.2.4. Déficit de Glutación reductasa (GR)

La enzima GR cataliza la reducción del glutatión oxidado en presencia de NADPH. Los estudios sobre su secuencia aminoacídica demuestran que contiene FAD, por lo que la actividad normal de la enzima depende de que la dieta contenga riboflavin, es por esto que la deficiencia parcial de glutatión reductasa se debe a una dieta

deficiente en este compuesto, es así que los niveles de glutatión reductasa aumentan luego de administrar concentraciones fisiológicamente adecuadas de riboflavin. Estudios actuales no han podido demostrar fehacientemente si la deficiencia de esta enzima es la real causante de las hemólisis que cursan estos pacientes.

2.2.5. Déficit de Glutatión peroxidasa (GP)

La enzima GP cataliza la oxidación de glutatión reducido por peróxidos, incluyendo peróxido de hidrógeno e hidroxiperóxidos orgánicos. Esta deficiencia es rara en casos de hemólisis, tanto en niños como en adultos, tanto así que en la actualidad no se sabe si la deficiencia de esta enzima es la real causante de la hemólisis.

2.3. Enzimopatías del metabolismo nucleotídico

Debido a que el eritrocito no cuenta con mecanismos para la síntesis *de novo* de nucleótidos adenilicos (AMP, ADP y ATP), todas aquellas enzimas que de alguna manera eviten su degradación o intervengan en su metabolismo adquieren gran importancia funcional. Estas enzimas son las siguientes: Pirimidina 5' nucleotidasa (P5'N), Adenilatoquinasa (AK) y Adenosina desaminasa (ADA).

La enzimopatía más frecuente y destacada del metabolismo nucleotídico es la P5'N, seguida de las restantes enzimopatías de interés clínico tabla 8-7.

Tabla 8-7. Eritroenzimopatías del metabolismo nucleotídico

	Subunidades activas	Localización preferente del gen	Localización cromosómica	Intensidad del síndrome hemolítico
P5'N	-	Exclusivo	?	++
AK	-	AK-1	9	+
ADA *	-	Común a otras células	20	+

P5'N, Pirimidina 5' nucleotidasa; AK, Adenilatoquinasa; ADA, Adenosina desaminasa.

3. HEMOGLOBINOPATÍAS

Las hemoglobinopatías son trastornos de la hemoglobina, originados sea por la síntesis de una cadena de globina estructuralmente anormal (hemoglobinopatías estructurales) o por la ausencia o bien disminución en la síntesis de una cadena normal (síndromes talasémicos). Este conjunto de patologías, están presentes en millones de personas y constituyen a nivel mundial el trastorno genético más frecuente.

Sus consecuencias varían desde ser indetectables hasta provocar la muerte del individuo afectado, causando un grave problema de salud pública en muchos países en desarrollo y en otras comunidades desarrolladas con gran número de inmigrantes procedentes de áreas de alta incidencia.

A pesar de los grandes avances en el conocimiento de la estructura, función y genética de la hemoglobina, aún no se cuenta con un tratamiento curativo para estas enfermedades, y las medidas terapéuticas a las que son sometidos especialmente los β

talasémicos son molestas para el enfermo, además de muy caras desde el punto de vista social y económico. Por ello el diagnóstico precoz y la prevención continúan siendo el pilar fundamental.

En la mayoría de los síndromes talasémicos, debido a la utilización de contadores automáticos que determinan el VCM, la detección de portadores suele ser fácil, puesto que su fenotipo se manifiesta como una microcitos. Por el contrario, en la mayoría de las hemoglobinopatías estructurales, al carecer de manifestaciones en su estado de portador heterocigoto, sólo técnicas un poco más laboriosas pueden detectarlas, siendo las más utilizadas en los programas de búsqueda a gran escala la electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino, el isoelectroenfoque de hemoglobinas y hoy en día la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La mayor parte de los programas de búsqueda de hemoglobinas estructurales se han dirigido hacia el diagnóstico de las formas que más problemas causan por su gravedad o por su

frecuencia, como son la Hb S, Hb C, Hb E, etc, o por sus combinaciones, y por tanto los países más desarrollados tecnológicamente, en los cuales además esta patología es frecuente debido a los fenómenos migratorios, son los situados a la cabeza de este tipo de estudios.

Por otra parte, está perfectamente establecida la relación de algunos tipos de hemoglobinas anormales con determinados grupos raciales, lo que le confiere a la investigación de los tipos de hemoglobinas una vertiente etnológica, aportando datos acerca de la influencia de determinadas migraciones en la composición étnica del área geográfica que se estudia.

En la práctica clínica el término hemoglobinopatía se emplea para denominar a las alteraciones de la estructura y la síntesis de la proteína, sin embargo, los trastornos heredados de la hemoglobina agrupan tanto a la patología del hemo como a la de la globina. Las hemoglobinopatías pueden clasificarse de forma general en varios grupos:

- **Talasemias.** Se caracterizan por la síntesis disminuida o bien ausente de una o más cadenas de globina, las cuales son de estructura normal.
- **Hemoglobinopatías estructurales.** Éstas se deben a cambios en la estructura de las cadenas de globina. Son silentes en la gran mayoría de los casos, pero en otros originan un funcionamiento y/o estabilidad anormal produciendo un transporte de O_2 defectuoso o bien anemia hemolítica.
- **Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF).** Se caracteriza por una alteración en el período neonatal del cambio en la producción de HbF a la del adulto, debido a causas genéticas. No tiene mayor importancia clínica y su interés es fundamentalmente derivado del estudio de la regulación génica.

A continuación se describirán los conceptos y clasificación de todos estos trastornos, puesto que en poblaciones donde las talasemias son comunes, a menudo existen dobles heterocigotos para ambos trastornos, además de que la fisiopatología de algunas variantes estructurales están muy relacionadas a los síndromes talasémicos.

3.1. Talasemias

En estas patologías encontramos ausencia o producción disminuida de una o más cadenas de globina, debido a alteraciones genéticas.

Se clasifican según la cadena afectada en α , β , γ , δ y ϵ , y según su forma de manifestarse en portador silente, rasgo talasémico, enfermedad de la hemoglobina H e hidropesía fetal, dependiendo de la gravedad de cada una de ellas.

Las α y β talasemias son además subdivididas en formas α^0 y β^0 , en los cuales no se produce la cadena afectada y en formas α^+ y β^+ cuando la cadena se sintetiza pero en cantidad reducida.

La repercusión fisiopatológica y las consecuencias clínicas derivadas de estos trastornos vienen dadas, en primer lugar porque al sintetizarse menos cantidad de una cadena de globina se forma menos hemoglobina normal, dando por resultado la aparición de una anemia microcítica e hipocrómica. Otro mecanismo que también juega un papel importante en la anemia que caracteriza a la talasemia, consiste en que la cadena producida en cantidad normal al no poderse aparear con la cadena deficitaria, se agrupa en hemotetrámeros más o menos estables, o bien precipitan en el interior del glóbulo rojo produciendo alteraciones en su maduración y supervivencia.

En la β talasemia, el exceso de cadena α es incapaz de formar un homotetrámero estable, por lo que precipita rápidamente en los precursores eritrocitarios, siendo destruidos en el interior de la médula ósea, proceso que se conoce como eritropoyesis inefectiva, o bien lo hace en el eritrocito, dando lugar a su destrucción en el sistema retículo endotelial (hemólisis extravascular). En la α talasemia, el exceso de cadenas γ y β sin aparear se agrupa en homotetrámeros hemoglobínicos conocidos respectivamente como Hemoglobina Bart (γ_4) y Hemoglobina H (β_4). Ambos son bastante inestables y sólo llegan a ser insolubles cuando el eritrocito envejece, precipitando en ese momento, por lo que se produce la destrucción de los eritrocitos viejos. Esto hace que en este tipo de talasemias la anemia hemolítica sea leve o moderada y que el grado de eritropoyesis ineficaz sea mucho menor que en la β talasemia.

Por otro lado, tanto la Hb Bart como la Hb H poseen gran afinidad por el O₂ al no presentar el efecto hemo-hemo, lo que las inhabilita para transportar este gas, ya que no puede cederlo a los tejidos.

3.3.1. Talasemia α

Hay dos formas clínicas importantes de las talasemias α , el hidrops fetal por Hb Bart y la enfermedad de la Hb H, las cuales resultan de la interacción de dos determinantes genéticos talasémicos α (α^0 y α^+).

- a) **Talasemia α^0 .** Resulta de la pérdida o delección de ambos genes de globina del cromosoma 16 cuyo haplotipo es (-/-), o bien por delección del elemento regulatorio HS-40.
- b) **Talasemia α^+ .** Resulta por delección de uno de los genes de cada par, o en otros casos denominados no delección en los que el gen está intacto, pero tiene mutaciones que le hacen inactivo parcial o totalmente. Se clasifican en:
 - **Tipo delección.** Su haplotipo es (- α) y (- α / - α)
 - **Tipo no delección.** En una minoría de los casos los genes α no están deleccionados, sino que se producen por mutaciones puntuales, pequeñas delecciones o sustituciones de una o más bases en los genes estructurales que regulan su expresión, por lo que afectan a los procesos de transcripción, procesamiento del RNA y traducción. Se caracterizan por una reducción en la síntesis de la cadena α de globina más intensa que en aquellos casos con haplotipo - α / . Estas formas conservan ambos genes de globina α , por lo cual no son detectables por las técnicas habituales de Southern-Blott. Hoy en día se sabe que a nivel molecular son formas muy heterogéneas. Su haplotipo es ($\alpha\alpha^T$).
 - **Hemoglobina Constant Spring.** Se considera otro grupo de no delección. Se origina por la mutación de una única base en el codón de terminación de la cadena α_2 , continuando la lectura del DNA cuando debería finalizar, y por tanto sintetizándose una cadena α con 31 aminoácidos más en el extremo C-terminal, pero en cantidad reducida dado que el RNA alargado es inestable. El haplotipo es (α^{CS} /).

Considerando que la síntesis de cadena α está regida por cuatro loci, de la interacción de los

determinantes genéticos citados anteriormente se puede esperar los siguientes cuatro fenotipos:

- **Estado de portador silente o rasgo talasémico α_2 .** Son los heterocigotos para el determinante α^+ , es la forma más leve de enfermedad y su genotipo puede ser (- α / $\alpha\alpha$), ($\alpha\alpha^T$ / $\alpha\alpha$), ($\alpha\alpha^{CS}$ / $\alpha\alpha$). Hematológicamente son normales. Algunos de ellos tienen un 1%-2% de Hb Bart al nacer.
- **Rasgo talasémico α_1 .** Ocurre como consecuencia de la interacción de dos heterocigotos para la α^+ talasemia, (- α / - α), (- α / $\alpha^T\alpha$), y diversas formas ($\alpha^T\alpha$ / $\alpha^T\alpha$).

El espectro tanto clínico como hematológico que presentan estos enfermos es muy variable, desde un fenotipo de mínima microcitosis e hipocromía hasta presentar un síndrome parecido a la Hb H. El rasgo de α talasemia puede ser puesto de manifiesto desde el nacimiento con la medición de los niveles de Hb Bart que relacionan los diferentes genotipos con los niveles de Hb Bart. El rasgo talasémico también se puede poner de manifiesto por la determinación de los valores de hemoglobina, VCM y HCM, y por existir en ellos una disminución del ratio de síntesis de las cadenas de globina (α / β), que aunque no siempre indica claramente el genotipo, sí diferencia abiertamente entre los individuos con rasgo talasémico de los individuos normales y de los (- α / $\alpha\alpha$).

- **Enfermedad de la Hemoglobina H.** Se produce por una falta de función de 3 genes α como resultado de la herencia de un determinante de α_2 talasemia de uno de los progenitores y una α_1 talasemia del otro, y en algunos casos la enfermedad de la Hb H es el resultado de la asociación de una talasemia delección y una no delección. Siendo el genotipo más frecuente el de (- - / $\alpha^T\alpha$). En estos pacientes se produce una anemia microcítica de intensidad variable, comportándose como una talasemia intermedia. Su clínica puede ser muy variada desde una forma moderadamente severa hasta un cuadro de anemia hemolítica intensa con hepatoesplenomegalia, alteraciones óseas, coleditiasis y úlceras de extremidades.

La confirmación analítica se fundamenta en el hallazgo de una banda de hemoglobina rápida e inestable en la electroforesis a pH alcalino, así como la demostración de cuerpos de inclusión de Hb H (β_4)

intraeritrocitaria con azul cresil brillante.

- **Hidrops fetal por Hemoglobina Bart.** Se produce por una delección completa de los genes de α globina, cuyo fenotipo es (- - / - -). Es incompatible con la vida y constituye una causa de aborto hacia la semana 30 de gestación, o bien muerte poco después del nacimiento por un cuadro de hidrops fetal con marcado edema, ascitis, hepatoesplenomegalia y un cuadro de hematopoyesis extramedular que se confirma en la necropsia.

Sus niveles de hemoglobina al nacimiento oscilan entre los 6-8 g/dL, la serie roja presenta hipocromía y poiquilocitosis marcada observándose reticulocitos y numerosos eritroblastos. La cuantificación de la Hb Bart supera el 80%, siendo el resto Hb Portland (20%), no existiendo Hb F ni Hb A, por lo que su diagnóstico es fácil por electroforesis en sangre de cordón.

α - Microcitosis

Es una forma infrecuente de aparición de la enfermedad de la Hb H. Acompaña a ciertas alteraciones hematológicas como los síndromes mielodisplásicos que progresan hacia las formas leucémicas. Es más frecuente en el sexo masculino, y se presenta incluso antes de que aparezcan las alteraciones hematológicas de la enfermedad de base. En ellas aparece un déficit muy importante en la síntesis de cadena α de globina, con cifras de Hb H que se sitúan en torno al 18%, pudiendo llegar incluso hasta el 57%. Los estudios moleculares de α estos pacientes muestran que no existen reordenamientos en el "cluster" de α globina y no aparece un efecto compensatorio de los genes ζ . Los niveles de α_2 mRNA y α_1 mRNA están reducidos en concordancia con los niveles extraordinariamente bajos de α globina, por lo cual se piensa que el déficit se debe a un problema de la transcripción de genes α .

3.3.2. Talasemia β

Aunque la β talasemia tiene un fenotipo considerado dependiente de algunos factores tales como la naturaleza de la mutación que la desarrolla, desde un punto de vista clínico se pueden diferenciar tres estados. El rasgo talasémico o talasemia menor, la enfermedad grave o talasemia mayor y talasemia intermedia.

a) Rasgo talasémico o talasemia menor. Se corresponde con la forma heterocigota. La

mayoría de los individuos con rasgo talasémico son portadores de un gen β normal (β^A) y el otro gen β talasémico (β^T) donde se localiza la mutación.

Se caracteriza por no tener, en general, una clínica llamativa, y ser en gran parte de los casos un hallazgo casual. El diagnóstico se basa en la microcitosis con un VCM de entre 60 fL y 75 fL, morfología microcítica de los hematíes y una concentración de Hb A_2 entre 3,5-6%. Se han descrito también casos de β talasemia heterocigota con valores normales de Hb A_2 , de 2 tipos:

- **Tipo I o silente.** Fue descrito por vez primera por Schwartz, y se caracteriza por una morfología normal de los hematíes o solamente leves alteraciones, e índices eritrocitarios normales. La síntesis de cadenas se encuentra alterada con un razón α/β de 1,6. Su interacción con una β talasemia con nivel de Hb A_2 elevada resulta en un cuadro de talasemia intermedia.
- **Tipo II.** Presenta una morfología anormal de los glóbulos rojos y un mayor desequilibrio en la síntesis de cadenas ($\alpha/\beta = 2,5$).

b) Talasemia mayor. Corresponde a la forma más grave de la enfermedad. Los individuos que la padecen son portadores de dos genes talasémicos ($\beta^T\beta^T$); son homocigotos.

A largo plazo la evolución es mortal, fundamentalmente por la presencia de siderosis hepática y miocárdica asociada a esplenomegalia, deformaciones óseas y anemia hemolítica. La anemia se produce como consecuencia de hemólisis, eritropoyesis ineficaz y pobre hemoglobinización de los eritrocitos. Estos pacientes son dependientes de transfusiones.

En el laboratorio se encuentra aumento de la Hb F con valores de entre 10% y 95% o más. La Hb A_2 es normal o ligeramente elevada. El estudio de los padres corrobora el diagnóstico.

c) Talasemia intermedia. Se denomina así a los casos sintomáticos que espontáneamente mantienen niveles de hemoglobina entre 7 y 11 g/dL, y que sólo muy ocasionalmente reciben transfusiones. Generalmente es el resultado de defectos genéticos combinados:

- Homocigotos para genes β^+ talasémicos de mayor gravedad.
- Combinación del gen β^0 talasémico grave con una β^+ talasemia particularmente benigna.

- Presencia de factores genéticos que aumentan la producción de cadenas de γ globina (persistencia hereditaria de Hb F, $\delta\beta$ talasemia o mutaciones de β talasemia asociadas con un incremento de cadenas γ , las cuales se combinan con el exceso de cadenas α para formar hemoglobina F).
- Herencia de una β talasemia heterocigota asociada a una triplicación de genes α ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ o $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$) y la presencia de variantes de hemoglobina inestables en estado heterocigoto (β talasemia dominante).
- También se ha demostrado que en muchas ocasiones la expresión más leve es debida a la asociación de α talasemia, produciéndose un equilibrio en la síntesis de cadenas de globina.

Base molecular de las β talasemias:

La mayor parte de los defectos moleculares causantes de β talasemia son la mutación de un único nucleótido (mutación puntual) que afecta a uno de los diferentes procesos moleculares involucrados en la expresión del gen de β globina, esto es: transcripción, procesamiento del pre-mRNA y traducción. Al contrario que en las α talasemias, solamente una minoría de las β talasemias están producidas por deleciones en el gen.

Los diferentes mecanismos responsables de la β talasemia representan modelos de inactivación de los genes en mamíferos, y gracias al análisis de los defectos en las talasemias se ha logrado entender algunos aspectos generales de la expresión de los genes.

3.3.3. Talasemia $\delta\beta$

Se debe a un defecto en la síntesis de cadenas $\delta\beta$. Se caracteriza, en su forma heterocigota, por un cuadro talasémico menor con Hb A_2 normal y niveles relativamente altos de Hb F, así como ausencia de Hb A y A_2 en el estado homocigoto con clínica de talasemia intermedia. Se clasifican de acuerdo con la estructura de la hemoglobina fetal en $G\gamma$ ($\delta\beta$)⁰ y $G\gamma A\gamma$ ($\delta\beta$)⁰.

3.3.4. Talasemia $\gamma\delta\beta$

Se han observado solamente en portadores heterocigotos. Se caracterizan por hemólisis neonatal y cambios hematológicos de talasemia β , con un nivel normal de Hb A_2 en el adulto.

3.3.5. Síndromes hemoglobina Lepore

Se producen a partir de un gen nuevo, fusionado durante el entrecruzamiento en la meiosis de los genes δ y β y transmitido posteriormente de forma mendeliana simple (figura 8-6).

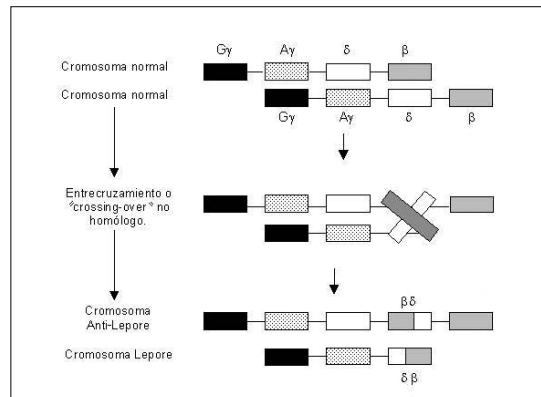


Figura 8-6. Formación del cromosoma Lepore

Existe una síntesis ineficaz de una cadena no α híbrida, estructuralmente anormal, formada por una porción N-terminal idéntica a la cadena δ y por una C-terminal idéntica a la β . El punto de fusión es variable, habiéndose detectado tres tipos: *Boston*, *Baltimore* y *Hollandia*, todas ellas con propiedades similares.

La síntesis de la cadena $\delta\beta$ de la Hb Lepore sigue un patrón prácticamente idéntico al de la cadena δ de la Hb A_2 , por ello no se detecta en la electroforesis alcalina de la sangre de cordón en el período neonatal. Sin embargo, en el individuo adulto la Hb Lepore es fácilmente detectada por dicho tipo de electroforesis, teniendo aproximadamente la misma movilidad que la Hb S, en cambio, en una electroforesis a pH ácido es imposible separarla de la Hb A. Los hallazgos en sangre periférica son muy similares a los que se encuentran en individuos heterocigotos para β talasemia con Hb A_2 alta, con presencia de microcitosis, hipocromía y codocitos.

Las manifestaciones clínicas en el estado homocigoto varían entre una forma de talasemia intermedia y mayor, no se sintetiza Hb A ni A_2 , apareciendo solamente Hb F y Lepore en una cuantía media del 15% del total, no muy distinto a lo que se encuentra en el estado heterocigoto. Este estado por su manifestación clínica puede considerarse una talasemia $\delta\beta^+$.

La forma heterocigota no se manifiesta desde el punto de vista clínico produciendo solamente microcitosis con Hb A₂ normal y una discreta elevación de Hb F.

3.2. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal

En la persistencia hereditaria de Hb F (PH HF) existe una producción de Hb F en el adulto que excede el nivel normal en ausencia de cualquier cambio hematológico mayor.

Existen diferencias fenotípicas, tanto en la cantidad de hemoglobina F producida como en la relación de las cadenas G γ / A γ que contienen.

El análisis molecular de las condiciones con PHHF ha demostrado que en algunos casos el "cluster" de β globina está intacto (PHHF-no deleción), mientras que en otros existen deleciones que afectan el extremo 3' del "cluster" con remoción completa de los genes δ y β (PHHF deleción).

• **Tipo deleción.** Son la mayoría de los casos y se debe a la pérdida de cantidad variable de material genético que incluye generalmente los genes δ y β . G γ A γ PHHF es muy similar a la G γ A γ $\delta\beta$ talasemia, excepto que en heterocigotos tienen mayor nivel de Hb F y en homocigotos tienen un cuadro hematológico y síntesis de globina similar a la talasemia β heterocigota, con 10% de Hb F y también distribución heterogénea.

La condición con deleción puede ser ampliamente dividida en G γ A γ ($\delta\beta$)⁰-PHHF, Hb Kenya-PHHF, G γ A γ ($\delta\beta$)⁰-talasemia, G γ (A γ $\delta\beta$)⁰-talasemia y (ϵ G γ A γ $\delta\beta$)⁰-talasemia. Cada grupo, con la excepción de Hb Kenya-PHHF, puede ser subdividido posteriormente a nivel molecular, pero dentro de cada grupo el cuadro clínico y hematológico es relativamente uniforme.

• **Tipo no deleción.** Se han descrito muchas variantes en las que la mutación de una única base dentro o fuera del grupo de genes γ - δ - β origina el trastorno.

En estos casos la producción de cadena γ deriva casi completamente de uno de los dos genes γ . El gen β sobre el cromosoma afecto está expresado en forma correcta.

Según la distribución de la Hb F en los hematíes, determinado por la técnica de elución ácida de Kleihauer, se pueden distinguir dos formas de

PHHF: PHHF homogénea o pancelular con aumento uniforme de Hb F en todos los hematíes. PHHF heterocelular, en la cual sólo una subpoblación de glóbulos rojos contiene Hb F. A este grupo pertenecen los tipo deleción y están estrechamente relacionados con las $\delta\beta$ talasemias.

Interacción de talasemias con variantes estructurales

Cuando un paciente adquiere un gen talasémico de una determinada cadena de globina en un cromosoma y un gen para una variante estructural del mismo tipo de cadena de globina en el otro cromosoma, el porcentaje observado de la hemoglobina estructuralmente anormal aumenta por sobre el nivel encontrado en un heterocigoto simple para aquella variante estructural, y la severidad clínica de la condición llega a ser como si fuera una homocigocidad para la hemoglobina anormal. Por otro lado, cuando un paciente hereda la combinación de talasemia de un tipo de cadena de globina (ρ , ej β) y un gen para una variante estructural del otro tipo de cadena (α) no se observa aumento en la cantidad de hemoglobina anormal, y las manifestaciones clínicas son similares a las del estado heterocigoto para dicha variante estructural.

β Talasemia en asociación con variantes estructurales de cadena β

• **Hemoglobina S / β talasemia.** Esta combinación afecta especialmente a personas con ancestros mediterráneos y africanos. El cuadro clínico simula al de anemia de células falciformes, pero la enfermedad, en general, sigue un curso más moderado. Ocasionalmente la enfermedad puede ser extraordinariamente moderada y el diagnóstico puede ser descubierto como un hallazgo incidental.

Estas diferencias en las manifestaciones clínicas se deben a la interacción del gen S con las diferentes formas de β talasemia (β^0 o forma grave y β^+ o forma leve), que como se sabe reduce la producción de β^A .

La esplenomegalia es una característica común y es de ayuda en diferenciar la hemoglobina S / β talasemia de la anemia de células falciformes en adultos y niños mayores.

Los hallazgos de laboratorio incluyen un grado variable de anemia acompañado por células en diana (codocitos), hipocromía y microcitosis de

los glóbulos rojos y ocasionalmente formas falciformes en el frotis sanguíneo de los pacientes más severamente afectados. Los estudios de cuantificación de hemoglobinas, sea con electroforesis o HPLC revela 60-90% de Hb S, 0-30% de Hb A, aumento de los niveles de Hb A₂ y 1-15% de Hb F.

• **Hemoglobina S / Hemoglobina Lepore.** Los casos descritos muestran un amplio espectro de severidad clínica desde una forma discreta a una grave con hepatoesplenomegalia y anemia hemolítica. El patrón de hemoglobinas muestra una ausencia de Hb A y la presencia de Hb A₂ (0.9%-2.6%), S (60%-90%), Lepore (10%) y F (9%-25%).

• **Hemoglobina S / Talasemia $\delta\beta$.** Esta combinación genética no se asocia con un cuadro clínico especialmente severo, probablemente porque el nivel de Hb F es elevado, protegiendo de la falciformación, por lo que no suelen tener crisis vaso-oclusivas. El patrón de hemoglobinas demuestra ausencia de Hb A, Hb F (15-25%), Hb S (60-70%) y Hb A₂ en niveles normales.

• **Hemoglobina C / β talasemia:** Esta condición ocurre fundamentalmente en gente de raza negra y se asocia con anemia moderada. El frotis sanguíneo se caracteriza por hipocromía y abundantes codocitos. La electroforesis de hemoglobina y HPLC demuestra 65-80% de Hb C, siendo el resto Hb A (en el caso de asociación de Hb C y β^+ talasemia) con bajo nivel de Hb F (2-5%). La Hb C / β^0 talasemia es menos común y se asocia con anemia más severa y esplenomegalia. La Hb A está totalmente ausente en ambas condiciones, siendo difícil de diferenciar de los homocigotos C / C.

• **Hemoglobina C / Hemoglobina Lepore.** Produce un trastorno muy discreto similar a la Hb C / β^+ talasemia.

• **Hemoglobina C / $\delta\beta$ talasemia.** Ocasiona un cuadro más leve que la Hb C / C y que la C / β^0 talasemia, y parecido más bien la Hb C / β^+ talasemia. Los niveles relativamente altos de Hb F en los eritrocitos reducen la severidad del proceso hemolítico secundario a la presencia de Hb C.

• **Hemoglobina E / β talasemia.** Esta asociación es bastante común en Tailandia y todo el sudeste asiático, por razones no muy bien comprendidas es tan severa como la β talasemia homocigota.

La Hb E por sí misma se asocia con un fenotipo de β talasemia debido a una disminución en la síntesis de cadenas β^E a causa de una disminución en la formación de β^E mRNA funcional, secundario a procesamiento anormal del precursor β^E del mRNA de globina. Sin embargo, el déficit total en la síntesis de globina en la Hb E homocigota es equivalente a aquella de la β talasemia heterocigota, siendo la Hb E homocigota un desorden benigno. Por ello es difícil entender por qué los dobles heterocigotos para Hb E y β talasemia presentan una enfermedad tan severa. Se ha sugerido que ya que la Hb E es inestable desde el punto de vista oxidativo, el mayor exceso de cadenas α generado por el estado de doble heterocigoto (comparado con Hb E homocigota) podría producir un estrés oxidativo suficiente como para causar desnaturalización acelerada y precipitación de la Hb E y, por lo tanto, mayor hemólisis.

La electroforesis de hemoglobina demuestra Hb E, un alto porcentaje de Hb F (cercano al 50%), sin Hb A, ya que la gran mayoría de los casos se asocian con β^0 talasemia.

La asociación de talasemia con otras variantes menos frecuentes también han sido descritas, encontrándose la asociación con Hb D, Hb J-Baltimore, Hb Hofu, y Hb G.

Talasemia β con variantes estructurales de cadena α

Los casos descritos de esta asociación proporcionan información acerca de la regulación post-transcripcional de la síntesis de hemoglobina.

Cuando un portador de una variante estructural de cadena α tiene también un gen de β talasemia, el nivel de la variante de cadena α es por lo general más bajo que en el estado heterocigoto simple. Esto se explicaría porque al producirse un desequilibrio en la síntesis de cadenas de globina con exceso de cadenas α , y aunque la cadena α normal y anormal se sintetizan a la misma velocidad, la degradación proteolítica de la cadena mutante es mucho más rápida que la normal. Además es posible que con un número limitado de cadenas no α , las cadenas α normales sean ligadas con preferencia, llegando a no combinarse las mutantes α con el número limitado de cadenas β o γ si el desequilibrio es severo.

Talasemia β con variantes estructurales de cadena β

En términos generales, en presencia de talasemia α , al haber un número limitado de cadenas α disponibles, la cantidad de una variante β cargada positivamente está disminuida en proporción al número de genes α delecionados, al contrario de lo que sucede con las variantes cargadas negativamente, que está presente en los heterocigotos en cantidades mayores.

• **Hemoglobina S / α talasemia.** Esta combinación de hemoglobinopatías es de interés debido a los efectos que la α talasemia asociada tiene sobre la cantidad de Hb S que se acumula en los heterocigotos SA y en las características clínicas de la enfermedad por Hb SS.

Inicialmente fue reconocido por distintos investigadores que individuos que heredaban un fenotipo de α talasemia y un estado heterocigoto para Hb S tienen niveles de Hb S que son menores que el simple heterocigoto SA: 25-35% versus 40-45%. Posteriormente se demostró que el bajo nivel de Hb S es debido a un recambio post-traducción de las cadenas β^S , que no pueden competir tan eficientemente como las cadenas β^A por el "pool" limitado de cadenas α disponibles.

La utilización de estudios de mapeo genético para la identificación de la α talasemia ha confirmado la correlación entre el porcentaje de Hb S y el número de genes α en los heterocigotos para Hb S: individuos con 4 genes α generalmente tienen Hb S mayor de 36%; aquellos con 3 genes α tienen Hb S del 30-36% y aquellos con 2 genes α tienen Hb S < 30%. En pacientes homocigotos para Hb S (SS) o bien dobles heterocigotos (SC) y α talasemia concomitante, el grado de anemia, hemólisis y otras anormalidades del glóbulo rojo son menores que si no tuvieran α talasemia asociada. Sin embargo, no existe igual certeza con respecto al grado de atenuación de la enfermedad vasooclusiva vista en la Hb S, cuando existe asociación con α talasemia.

• **Hemoglobina C / Talasemia α .** Los enfermos tienen un fenotipo talasémico y unos niveles de Hb C más bajos (alrededor de 30%), que los que normalmente se encuentran en los que sólo llevan Hb C (\approx 42%).

Las restantes hemoglobinopatías estructurales

asociadas con α talasemia son de escasa frecuencia, exceptuando como ya se señaló la Hb E en el Sudeste Asiático

Talasemia α asociada a variantes de cadena α

Debido a que las variantes de cadena α son raras, su asociación con la talasemia α es también poco frecuente. Se han descrito interacciones con Hb I, Hb Q, Hb G Philadelphia, Hb J Mexico, Hb J Tangariki, Hb J Cape Town y Hb Hasharon.

El porcentaje de la mayor parte de las variantes α en heterocigotos es aproximadamente un 25% o menos del total de hemoglobina. Al asociarse con α talasemia este porcentaje aumenta en proporción directa al número de genes α que falten.

El cuadro clínico de estos dobles heterocigotos es el que corresponde a su talasemia.

3.3. Hemoglobinopatías estructurales

Con este nombre se denomina a aquellas hemoglobinas patológicas cuya alteración fundamental reside en anomalías de la estructura molecular, siendo el proceso biosintético normal en la gran mayoría de los casos.

3.3.1. Nomenclatura

Existen tres sistemas distintos de nomenclatura para las variantes de hemoglobina: (a) nombre común, asignado por el investigador que primero descubre la nueva hemoglobina, (b) designación según el sitio y naturaleza del aminoácido sustituido en la cadena de globina y (c) designación de acuerdo con la posición sustituida en la hélice.

Primero se utilizaron las letras del alfabeto de una forma ordenada, reservándose la letra A para nominar a la mayor fracción de hemoglobina del adulto; la F para la fracción mayor de la fetal y la S para la causante de sicklellia, acordándose que la letra B no sería adjudicada a ninguna.

Este sistema funcionó bien hasta 1956, pero debido a que el número de letras es limitado y que muchas variantes con idéntica movilidad electroforética poseían propiedades y estructura diferentes, se acordó dar un nombre específico

a cada hemoglobina, la mayoría de las veces de origen geográfico.

La nomenclatura más lógica es la que se busca en la posición del aminoácido sustituido. De este modo la Hb S se designa como $\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$, o bien $\alpha_2\beta_2^{6\text{Val}}$. Así se indica la naturaleza de la sustitución en el sexto residuo aminoacídico desde el extremo N al C-terminal. En el momento actual se recomienda que los sobreescritos sean evitados, que no se ponga la cadena de globina no afectada, y que se indique rutinariamente la posición helicoidal. Así la Hb S se designa: $\beta_6(\text{A3})\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$.

La designación de la posición helicoidal tiene la ventaja de aportar en forma automática información de la región funcional y de la homología posible con variantes que afecten a regiones similares en otras cadenas de globina. Así las Hb Chesapeake y Wood tienen ambas la sustitución FG 4 Leu, la primera en la cadena α y la segunda en la β , puesto que es una posición importante para el control de la afinidad por el O_2 , no sorprende que ambas variantes tengan una expresión clínica muy parecida.

3.3.2. Base genética de las hemoglobinopatías estructurales

Las variantes de hemoglobinas son heredadas como rasgos codominantes, de acuerdo a la genética mendeliana clásica. Un individuo hereda un gen de cadena β de cada padre. Si ambos padres son heterocigotos para la Hb S, variante de cadena β , existe un 50% de posibilidades que el niño sea heterocigoto también como sus padres (AS), 25% que sea normal (AA) y 25% de posibilidades que sea homocigoto para dicha condición (SS).

Si uno de los padres es heterocigoto para la Hb S (AS) y el otro heterocigoto para la Hb C (AC), existe un 25% de posibilidades que el niño sea doble heterocigoto (SC). La presencia del gen para la Hb S produce enfermedad clínica sólo si es heredado en el estado homocigoto (SS), o doble estado heterocigoto (SC, SD^{Los Angeles}, SO^{Arab} o S / β talasemia). En contraste, las variantes inestables y aquellas con marcadas anomalías de la afinidad por O_2 causan morbilidad en los heterocigotos. En muchos casos, la función de la hemoglobina está tan deteriorada que el estado homocigoto sería incompatible con la vida.

Como es de suponer, los estados homocigotos han sido encontrados entre variantes con alta

frecuencia génica, tales como S, C y E y entre algunas con moderadas frecuencias génicas como D^{Los Angeles}, O^{Arab} y Korle-Bu. La existencia de otras variantes menos frecuentes presentadas en forma homocigota, son el producto de matrimonios con alta consanguinidad.

Debido a que un individuo hereda sólo 2 genes de cadena β , una variante de cadena β funcionalmente anormal constituye la mitad de la hemoglobina total en el eritrocito y por lo tanto es posible que contribuya en forma significativa a la función del glóbulo rojo. En contraste, las variantes de cadena α generalmente constituyen sólo el 25% de la hemoglobina total y es mucho menos probable que causen deterioro significativo de la función del glóbulo rojo. Esta consideración explica el porqué 50% de las variantes de cadena β se asocian con manifestaciones clínicas, comparados con sólo 20% de las variantes de cadena α . Sólo en forma ocasional, las variantes de hemoglobinas se originan como mutaciones espontáneas. Las mutaciones espontáneas se presumen que se originan a nivel de la célula germinal en una etapa tardía de su desarrollo.

Variantes estructurales de hemoglobina también se han encontrado en los otros dos genes de globina, esto es δ y γ . La menor cantidad de variantes de cadena γ detectadas se debe fundamentalmente a que la Hb F rara vez es detectable después de los 6 meses de vida. Así también las variantes de cadena δ pueden escapar a la detección debido a que están presentes en pequeñas cantidades (1-2%).

En términos generales ningún significado funcional ha sido adscrito a las variantes de cadena γ , con la excepción de la Hb F-Cincinnati (41G γ Phe \rightarrow Ser) que cursa con cianosis, Hb F-Onoda (146G γ His \rightarrow Tyr) que posee aumento de la afinidad por O_2 , Hb F-Poole (130G γ Trp \rightarrow Gly) que es una variante inestable y que cursa con anemia hemolítica al igual que la Hb F-Xinjiang (25A γ TGly \rightarrow Arg) 1, 1 y Hb F-M-Fort Ripley (92G γ His \rightarrow Tyr) y Hb F-M Osaka (63G γ His \rightarrow Tyr) que cursan con metahemoglobina y cianosis neonatal.

3.3.3. Clasificación

Las hemoglobinas patológicas pueden clasificarse desde distintos puntos de vista, sea por su trastorno genético, sus manifestaciones clínicas, su patología molecular, su comportamiento electroforético, sus propiedades funcionales y químicas o su origen geográfico.

a) clasificación según el trastorno genético

- **Sustitución de una única base.** De la larga lista publicada de hemoglobinopatías, la gran mayoría, más del 95% corresponden a reemplazos de un único aminoácido en la cadena polipeptídica de globina.

La alteración estructural puede ser explicada por la sustitución de una sola base en el codón correspondiente para el DNA de globina.

Unas pocas variantes poseen reemplazos aminoacídicos en dos sitios diferentes de la misma subunidad. Estas variantes se pueden originar por una mutación nueva sobre un gen con una variante preexistente, o bien por entrecruzamiento entre dos genes variantes. Así por ejemplo, la Hb C Harlem podría haberse originado por un entrecruzamiento entre genes que codifican para β^S y $\beta^{Korie Bu}$.

Solamente 4/5 de las posibles mutaciones (1690 de 2583 posibles mutaciones) pueden producir un cambio de aminoácido, debido a la capacidad de los distintos tripletes de nucleótidos de codificar el mismo aminoácido. Además de aquellas que provocan un cambio de aminoácido, solamente 1/3 (575) ocasionarían variación en la carga eléctrica de la molécula y por tanto las variantes serían identificadas en la electroforesis, en el resto de ellas la sustitución sería neutra desde el punto de vista eléctrico, pudiendo en algunas ocasiones ser detectada mediante HPLC.

- **Mutación con desplazamiento del marco de lectura (“Frame shift mutation”).** El desplazamiento en la lectura del código genético puede ser producido por una delección o bien adición de una base nitrogenada, que crea a nivel de la misma un desplazamiento en la disposición de los tripletes y con ello la aparición de nuevos codones de lectura completamente diferentes. Un ejemplo de desplazamiento de lectura es la Hb Wayne, producida por delección de una base nitrogenada a nivel del triplete AAA (lisina) en la posición 139 de la cadena α . Otro ejemplo por adición es el de la Hb Cranston al añadirse dos nuevas bases nitrogenadas (AG) al codón AAG en la posición 144 de la cadena β .

- **Delecciones e inserciones sin desplazamientos en la lectura.** Estas mutaciones se producen por la pérdida o adición de codones completos, por lo cual no se producen desplazamientos en la lectura y el resto de los aminoácidos no difieren de los normales. Habitualmente se comportan como hemoglobinas inestables, y la subunidad puede ser más corta como en el caso de la Hb Gun Hill (por delección de los residuos 91 a 95 en la cadena β), o más larga (por adición de 3 aminoácidos en la cadena α) como en la Hb Grady.

- **Fusión de genes.** Los ejemplos más característicos son las Hb Lepore (con fusión $\delta\beta$) y la Hb Kenya (fusión $\gamma\beta$).

- **Sustitución de una base en el codón de terminación de la cadena.** Un ejemplo clásico es la Hb Costant-Spring, donde al haber una mutación en el codón terminal (UAA, AUG o UGA), continúa la lectura donde debería terminar. Se obtiene de este modo una proteína con 31 aminoácidos más que la cadena α normal.

- **Mutaciones que provocan la finalización precoz de la cadena:** Esta situación se ha descrito en una variante donde faltan los dos residuos finales de la cadena β , siendo el resto de la cadena absolutamente normal. Es el caso de la Hb M^c Kees Rocks, producida por una mutación de A o G por U en la tercera base del codón UAU que codifica para tirosina en la posición 145, produciéndose un codón de terminación (UAA o UAG). Estas mutaciones sólo son viables si se producen después de los residuos de unión con el hemo. La Hb M^c Kees Rocks posee un importante aumento de la afinidad por el O₂ cursando con una eritrocitosis aún en el estado heterocigoto, alcanzando niveles de hematocrito de 50-64%.

b) Clasificación clínica

La larga lista de variantes de hemoglobina humana, de las que a la fecha han sido descubiertas más de 800, resultan fáciles de comprender si éstas son clasificadas de acuerdo a sus manifestaciones clínicas (tabla 8-8).

Tabla 8-8. Clasificación clínica de las hemoglobinopatías estructurales

Asintomáticas (Son la mayoría)

Portadores de Hb S (en condiciones muy especiales pueden dar síntomas)

Hb C

Hb D

Hb E

Anemia hemolítica

Síndrome de falciformación

(Enfermedad de células falciformes)

SS

SC

SD Los Angeles

SO Arab

S β talasemia

Hemoglobinas inestables

Poliglobulia

Hemoglobinas con alta afinidad por el O₂
Eritrocitosis familiar.

Cianosis familiar

Hemoglobinas con baja afinidad por el O₂

Hb Kansas

Hb Beth Israel

Hb St. Mandé

Hemoglobinas M

Metahemoglobinas

M- Boston

M- Saskatoon

M- Milwaukee-1

M- Iwate

M- Hyde Park

M- FM Osaka

Variantes estructurales que se expresan con fenotipo talasémico

Fenotipo de Talasemia β

Hemoglobinas Lepore

Procesamiento anormal de mRNA: Hb E, Hb Knossos

Inestabilidad extrema: Hb Indianápolis.

Fenotipo de Talasemia α

Mutantes de terminación de cadena

Hb Constant Spring

Hb Icaria

Hb Seal Rock

Hb Koya Dora

Inestabilidad extrema

Hb Quong Sze

La mayor parte de las variantes conocidas no se asocian con manifestaciones clínicas aparentes. Muchas de ellas fueron descubiertas en forma accidental o en el curso del estudio de grandes poblaciones.

En poblaciones donde no están presentes las variantes estructurales más frecuentes, como S, C o E, un individuo de cada 800 posee una variante estructural que puede ser detectada mediante electroforesis. Sin embargo, del total de mutaciones posibles, solamente un tercio produce cambios en la carga eléctrica que permitan su separación con la electroforesis, el resto de ellas presentan propiedades electroforéticas normales con medios convencionales.

G. Martín describe una incidencia de hemoglobinopatías estructurales de 1,47 / 1000, en un estudio realizado en 4.750 recién nacidos en la región de la Alta Extremadura. La presencia de ciertas variantes da también luces en cuanto a la genética poblacional y al estudio de migraciones.

Cuando las hemoglobinopatías estructurales presentan síntomas, éstos pueden ser de cianosis, eritrocitosis y hemólisis, recalando no obstante que la mayoría de las variantes carecen de manifestación clínica.

c) Clasificación según la patología molecular

Las manifestaciones clínicas de las hemoglobinopatías estructurales pueden llegar a entenderse mejor, si se correlaciona con el lugar que ocupa el aminoácido sustituido.

Según sea el lugar que ocupe y el tipo de aminoácido cambiado en la molécula, será la alteración que cause en la estructura y función de la molécula. En la mayoría de los casos este cambio no se manifiesta al no afectar a la carga, la estabilidad o la función, sin embargo, si se produce en una parte crítica de la misma que altere sus propiedades físicas, podrían originar un trastorno clínico de severidad variable. Al respecto, se consideran 3 grandes grupos:

- **Sustitución de un aminoácido externo (Polar) en la superficie de la molécula.** Solamente en algunos casos da lugar a anemia hemolítica y cuando está en su forma homocigota. Los más frecuentes son las Hb S, C, D y E.
- **Sustitución de un aminoácido interno (No**

polar). En términos generales la sustitución de un aminoácido interno resulta siempre en una anomalía severa, tanto en la estructura como en su función. Dentro de este grupo se generan los grandes subgrupos: Hemoglobinas inestables, Metahemoglobinas y Hemoglobinas con afinidad alterada por el O₂.

La sustitución puede ser de un aminoácido hidrofóbico por otro de igual característica, siendo menos grave que si el reemplazo es de un hidrofóbico por un hidrofílico, cuyo cuadro hemolítico es más intenso.

- **Cambios en las zonas de contacto entre subunidades ($\alpha_1\beta_1$) y ($\alpha_2\beta_2$).** Estos cambios pueden debilitar la molécula de hemoglobina, haciéndola inestable y en otros casos puede alterar la colaboración hemo-hemo y aumentar o disminuir la afinidad de la molécula por el O₂.

3.3.4. Variantes de hemoglobina más comunes

a) Hemoglobina S (β^6 [A3] Glu→Val)

La prevalencia más alta de Hb S está en el Africa tropical y entre los habitantes de raza negra o mestizos de aquellos países que participaron en la trata de esclavos. Ocurre con baja frecuencia en la cuenca del mediterráneo, Arabia Saudita y regiones del subcontinente Indio. Los resultados de estudios de polimorfismos del DNA sugieren que se origina de tres mutaciones independientes en el Africa tropical. La mutación más frecuente se encuentra en Benín (cercano a Nigeria), Africa Central Occidental. Un segundo haplotipo es prominente en Senegal y la costa africana occidental y el tercer haplotipo en la República Centroafricana. Estos mismos haplotipos se asocian con el gen β^s en negros norteamericanos y jamaicanos. Sólo los haplotipos de Benín y Senegal son prevalentes entre norteafricanos, griegos e italianos, sugiriendo que la mutación β^s se diseminó a esos países desde el Africa Occidental. En algunas partes de Africa hasta el 45% de la población posee el rasgo falciforme. En los Estados Unidos de América, América Latina y el Caribe, aproximadamente 8% de los negros poseen el rasgo.

Toda la abundante información existente señala que la distorsión de las células que contienen Hb S, sea la forma de hoz y la alteración de membrana por deshidratación, es el resultado de la polimerización de la hemoglobina,

provocando una disminución en la solubilidad y un aumento de la viscosidad en el estado oxigenado.

El equilibrio de Hb S entre sus fases líquida y sólida está determinada por cuatro variables: tensión de oxígeno, concentración de Hb S, temperatura y presencia de otras hemoglobinas además de la Hb S.

El más importante determinante fisiológico de la gelificación de la Hb S es el O_2 . La polimerización ocurre solamente con la desoxigenación. Con la desoxigenación la afinidad de la Hb S por el O_2 cae, estabilizando así el estado desoxi. Tanto el aumento del 2-3 DPG como una disminución del pH disminuyen la afinidad de la hemoglobina por O_2 , facilitando también la polimerización de la Hb S.

Existe una correlación positiva entre la concentración de Hb S y la gelificación. Bajo condiciones de laboratorio controladas, la gelificación ocurre a medida que la concentración de desoxi-hemoglobina S se eleva sobre 20,8 g/dL. Debido a que la temperatura requerida para que ocurra este fenómeno es bastante menor que el rango fisiológico, el significado de esto sólo se limita al estudio de laboratorio.

La influencia de otras hemoglobinas en la polimerización de la Hb S es variable. Tanto la Hb A como la F tienen un efecto inhibitorio en la gelificación. Las moléculas de desoxi-hemoglobina S se copolimerizan más efectivamente con otras moléculas de Hb S, y en orden descendente con Hb C, D, O^{Arab}, A, J y F. Estas observaciones *in vitro* predicen la severidad clínica de desórdenes que comprometen a estas variantes.

El portador heterocigoto no padece manifestaciones clínicas excepto en situaciones especiales. En la electroforesis de hemoglobina y en isoelectroenfoque aparecen dos bandas, la Hb A y la Hb S (40% aproximadamente). En el estudio mediante HPLC de hemoglobinas en fase reversa se observa un doble pico en la cadena β , eluyendo β^S entre 1 y 2 minutos luego de β^A .

En el estado homocigoto (SS) no aparece Hb A y el cuadro clínico, aunque se reconoce que hay una gran diferencia en su severidad, suele ser grave, lo que se denomina enfermedad de "células falciformes" y se caracteriza por: (a) anemia hemolítica crónica, (b) manifestaciones

sistémicas que incluyen retraso del crecimiento y desarrollo con mayor susceptibilidad para las infecciones, (c) crisis dolorosas vaso-oclusivas y (d) daño orgánico consecuencia de las crisis oclusivas y de la anemia crónica.

b) Hemoglobina c (β^6 [A3] Glu→Lys)

El reemplazo de lisina por ácido glutámico en la sexta posición de la cadena β da lugar a una variante con carga positiva que le confiere una lenta movilidad electroforética, tanto a pH ácido como alcalino. Aunque la Hb C no se puede separar de la Hb A₂ por técnicas electroforéticas, su separación es posible con la utilización de cromatografía en columna. La variante fue reconocida por vez primera en Detroit, en un emigrante de la costa occidental africana. Aunque hay menos evidencia que en el caso de la Hb S, la distribución de la Hb C en Africa sugiere que también se ha desarrollado como un medio de protección contra la malaria. El estado heterocigoto se ha detectado en 2-3% de los negros americanos y el homocigoto afecta aproximadamente a 1/5000 de ellos. Así como la Hb S, la Hb C ha sido detectada también en individuos que no tienen ancestros africanos.

Rasgo de Hemoglobina C (Hb C). El estado heterocigoto para Hb C es clínicamente silente. Aunque la concentración de hemoglobina está dentro del amplio rango de lo normal, el valor promedio para este grupo de sujetos es claramente bajo. La masa de glóbulos rojos y la sobrevivencia de los mismos también puede estar disminuida.

- **Enfermedad por Hemoglobina C (Hb CC).** La enfermedad por Hb C es un trastorno de moderada severidad. El crecimiento y desarrollo son apropiados y el embarazo y la cirugía son bien tolerados. El bazo está crecido en el 90% de los individuos afectados, habiéndose reportado también la ruptura espontánea del órgano. La función del bazo es normal. Como en otros desórdenes hemolíticos existe colelitiasis con mayor frecuencia. La anemia es de moderada severidad, con hematocrito de alrededor de 33%. La morfología eritrocitaria es marcadamente anormal con prominencia de dianocitos (90% o más), esferocitos ocasionales y células distorsionadas.

El acortamiento en la sobrevivencia del glóbulo rojo probablemente está relacionada a la disminución en la solubilidad de la desoxi-hemoglobina C, una consecuencia de

interacciones electrostáticas entre grupos amino β -6 cargados positivamente y grupos cargados negativamente en moléculas adyacentes. Los agregados intracelulares de hemoglobina limitan la deformabilidad celular aumentando la viscosidad interna, predisponiendo a fragmentación, formación de esferocitos y secuestro esplénico.

El diagnóstico descansa en el análisis electroforético de la hemoglobina. La mayor fracción es Hb C, la Hb A está ausente y la Hb F levemente aumentada. El estudio mediante HPLC, tanto de fase reversa (donde β^c eluye por delante de β^A) como de intercambio catiónico, donde la Hb C eluye al final del cromatograma, son de bastante ayuda.

- **Enfermedad por Hemoglobina SC.** El desorden conocido por este nombre resulta de la herencia de un gen S de un padre y un gen C del otro. Los eritrocitos contienen aproximadamente igual cantidad de las 2 hemoglobinas. La Hb A está ausente y la Hb F es normal o levemente aumentada. Ocurre con una frecuencia aproximada de 1 en 833 entre el grupo de negros americanos y 1 en 1400 en Jamaica. En Ghana la enfermedad por Hb SC es tan prevalente como la anemia de células falciformes, y en algunas regiones afecta hasta el 25% de la población.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad por Hb SC son similares, pero menos severas que las de la anemia de células falciformes (SS). Los síntomas durante el primer año de vida son raros y $1/4$ de los individuos afectados permanecen asintomáticos durante la primera década de la vida. El síntoma más común es el dolor abdominal episódico y el dolor esquelético, cualitativamente similares a aquellos eventos vaso-oclusivos de la anemia de células falciformes. El bazo está crecido en alrededor de $2/3$ de los niños, y aunque la perfusión de órganos está intacta su función está comprometida, siendo de menor cuantía, más gradual y a edades más tardías que en la anemia de células falciformes.

Debido a la frecuencia con la cual ocurren, tres complicaciones de la enfermedad por Hb SC poseen especial importancia: (a) Retinopatía proliferativa: es más común y más severa que en la anemia de células falciformes, pudiendo afectar hasta $1/3$ de la población; (b) necrosis aséptica de la

cabeza femoral: también se presenta con más frecuencia que en la Hb SS, y (c) síndrome torácico agudo: por embolia grasa luego del infarto de médula ósea ocurre más comúnmente durante los meses finales del embarazo. La exagerada vulnerabilidad de individuos con Hb SC a estas complicaciones se piensa que es debido a la mayor viscosidad relativa de la sangre.

La anemia es moderada o inexistente, sólo 10% de los individuos con enfermedad por Hb SC tienen una concentración de hemoglobina menor de 10 g/dL. El VCM puede estar disminuido y la CHCM puede estar aumentada por deshidratación celular. El frotis de sangre periférica contiene a lo menos 50% de dianocitos.

c) Hemoglobina d (D-Los Angeles; D-Punjab): $\beta 121$ [GH 4]Glu \rightarrow Gln

La Hb D tiene una movilidad electroforética idéntica a la Hb S a pH alcalino. Se distingue de la Hb S por su solubilidad normal, una movilidad electroforética en gel de agar a pH ácido claramente diferente. No produce falciformación.

Las propiedades electroforéticas y de solubilidad de la Hb G son tan similares a la D, que las dos generalmente no se diferencian por estas técnicas. Existen al menos 11 variantes de cadena β y seis variantes de cadena α que tienen las características electroforéticas y de solubilidad de las hemoglobinas D y G.

La Hb D-Punjab, también denominada Hb D-Los Angeles, es lejos la más común de las variantes de Hb D, presentándose en una frecuencia de 1-3% de la población de la región occidental de la India y en pequeño número en comunidades europeas que tienen lazos coloniales con aquel país. En Norteamérica la variante más prevalente es la Hb G-Philadelphia, una anomalía de cadena encontrada especialmente en negros.

Rasgo de Hemoglobina D (AD). El estado heterocigoto no se asocia con manifestaciones clínicas ni hematológicas. Personas con Hb AD son identificadas a través de programas de "screening" para Hb S, y salvo que se realicen otras técnicas de laboratorio para el diagnóstico diferencial se confunde fácilmente con Hb S.

- **Enfermedad por Hemoglobina D (DD).** Se caracteriza por moderada anemia hemolítica y esplenomegalia. La electroforesis de

hemoglobina muestra 95% de Hb D y cantidades normales de Hbs F y A₂.

- **Enfermedad por Hemoglobina SD.** De las 16 variantes señaladas que cumplen con los criterios de Hbs D y G, a la fecha 9 de ellas se ha reconocido que se asocian con Hb S. Con sólo una excepción (Hb D-Punjab), los estados de doble heterocigoto para Hb S, D o G son clínicamente silentes. La Hb D-Punjab interactúa con la Hb S produciendo anemia hemolítica de mediana intensidad y síntomas moderados que simulan la anemia de células falciformes. Gran parte de estos individuos son de origen africano.

d) Hemoglobina E: (β26 [B8] Glu→Lys)

Es la segunda variante estructural más prevalente en el mundo. De los 30 millones de personas que se estima que poseen este trastorno, más del 80% viven en el sudeste asiático. La diseminación de la variante a Norteamérica se debió a la inmigración Indochina a los Estados Unidos hacia el final de la década de los 70. La incidencia de Hb E entre los niños refugiados alcanza hasta el 19%.

La movilidad electroforética de la Hb E es similar, aunque ligeramente más rápida que la Hb C a pH alcalino. Puede diferenciarse de la Hb C mediante electroforesis a pH ácido, desplazándose junto con la Hb A, y es inestable frente a oxidantes. Los síndromes por Hb E se asocian con marcada microcitosis e hipocromía, simulando un síndrome talasémico. El estado de doble heterocigoto para Hb E y β talasemia se caracteriza clínicamente por talasemia mayor.

Rasgo de Hemoglobina E (AE). Aun cuando es clínicamente silente se asocia con microcitosis (VCM 65 fL), leve eritrocitosis y presencia de células en diana. La cuantificación de hemoglobina mediante electroforesis o HPLC de intercambio iónico revela 20% de Hb E. La proporción relativa de Hb E está reducida posteriormente por la coexistencia con talasemia y deficiencia de hierro.

- **Enfermedad por Hemoglobina E (EE).** Se caracteriza por microcitosis prominente (VCM 55-65 fL) y alteraciones morfológicas significativas (dianocitos, leptocitosis) pero sin anemia o anemia escasa. No se encuentran alteraciones físicas, salvo leve esplenomegalia. La Hb E compromete el 92% a 98% del total de hemoglobina. La Hb F está normal o ligeramente aumentada. El

acortamiento de la sobrevida del glóbulo rojo puede resultar en parte por inestabilidad de la Hb E, una propiedad atribuida a la tendencia de los dímeros β^E a disociarse en monómeros, exponiendo así los grupos SH reactivos.

e) Hemoglobina O^{ARAB}: (β121 Glu→Lys)

Se denomina así, debido a que el primer caso se identificó en un niño árabe y en asociación con Hb S. También ha sido encontrada en negros americanos, Jamaica, Sudán, Arabia Saudita, Yugoslavia, Bulgaria, Egipto y Grecia. Esta variante probablemente es originaria de África y emigró hacia el Medio Oriente. Tiene una movilidad electroforética similar a la Hb C a pH alcalino, pero se desplaza con la Hb S en agar citrato a pH ácido.

El estado heterocigoto y el doble heterocigoto para Hb O^{Arab} y C son clínicamente y hematológicamente normales.

- **Hemoglobina O^{Arab} homocigota.** Se caracteriza por moderada anemia hemolítica asociada a esplenomegalia. El frotis de sangre periférica además de mostrar las características morfológicas de eritropoyesis acelerada contiene abundantes “target cells”.
- **Enfermedad por Hemoglobina S- O^{Arab}.** Este doble estado heterocigoto es clínicamente y hematológicamente indistinguible de la anemia de células falciformes. Asplenia funcional ocurre a una edad precoz y es seguido por infartos esplénicos progresivos.

f) Hemoglobinas inestables

Su característica principal es la precipitación de la variante inestable, lo que produce una anemia hemolítica crónica secundaria al daño de la membrana con la formación de cuerpos de Heinz. Algunas son tan inestables que precipitan completamente en los hematíes casi después de sintetizarse, ejemplos de éstas son: Hb Bristol, Hb Castilla y Hb Hammersmith.

Otras son menos inestables, incluso sólo *in vitro*, como la Hb Hofu, por lo cual el término de “Hemoglobina inestable” se reserva para aquellas variantes cuya inestabilidad es lo suficiente como para causar clínica de hemólisis.

A pesar del gran número de variantes inestables descritas, la enfermedad por hemoglobinopatía inestable es rara. Lejos de la más común de las

variantes inestables es la Hb Köln, que tiene una amplia distribución a través del mundo. La Hb Hammersmith ha sido reportada en pacientes de China y Japón como también del Reino Unido. Gran parte de las variantes inestables han sido demostradas sólo en individuos aislados.

La enfermedad por hemoglobina inestable se expresa totalmente en su estado heterocigoto, por lo tanto el patrón de herencia es autosómico dominante. En una variedad de casos diagnosticados los padres de los casos índices eran normales, indicando que había ocurrido una mutación espontánea, y en éstos se observa que evolucionan con un cuadro hemolítico severo.

Defecto molecular

Las hemoglobinas inestables son un grupo muy heterogéneo dependiendo del grado de afectación de la molécula, de la posición que ocupe la mutación y del tipo de aminoácido cambiado.

Se pueden agrupar de la siguiente forma:

- **Aquellas que debilitan las uniones del hemo con la globina.** Como se ha señalado previamente la unión del hemo a la globina contribuye a estabilizar la estructura terciaria de la molécula. El hemo se inserta en una hendidura hidrofóbica en la superficie de la subunidad contactando con algunos aminoácidos no polares en las regiones CD, E, F y FG, aminoácidos que son invariables a lo largo de la evolución de los mamíferos. El debilitamiento de estas uniones puede generarse por:
- **Sustitución de un aminoácido en la cavidad del hemo.** Supone la pérdida de un puente entre ambos como ocurre en la Hb Sydney ($\beta 67$ [E11] Val \rightarrow Ala), porque al ser la alanina menor que la valina, aumenta la distancia con el hemo debilitando su unión.
- **Sustitución de aminoácidos no polares por polares en el interior de la subunidad.** Las subunidades de globina están dobladas de tal forma que todos los aminoácidos cargados, tales como lisina, arginina, ácido glutámico y ácido aspártico se ubican en la superficie de la molécula, permitiendo a sus grupos ionizados ponerse en contacto con el agua. En contraste, los residuos orientados

hacia el interior tienen grupos no polares, estabilizando el interior de la molécula por interacciones hidrofóbicas. El cambio de uno de estos aminoácidos permite la entrada de agua y la formación de metahemoglobina. Un ejemplo es la Hb Estambul ($\beta 92$ [F8] His \rightarrow Gln). La ausencia de este aminoácido que está directamente unido al hemo provoca la ruptura del puente y la pérdida del grupo. Aproximadamente un tercio de las variantes inestables incluyen la sustitución de un aminoácido cargado.

- **Delecciones de aminoácidos:** lo que puede condicionar dependiendo de su situación, la unión con el hemo, así por ejemplo la Hb Gun Hill $\beta 91-95$ [F7-FG2] incluye la pérdida de la histidina en posición 92 y por tanto la pérdida del hemo.
- **Aquellas que distorsionan la estructura del tetrámero.** Cada una de las cadenas de globina establecen puentes de unión con las cadenas homólogas y no homólogas como ya se señaló previamente. El cambio de un aminoácido por otro en estas zonas puede sugerir la distorsión del tetrámero formando dímeros o monómeros con inestabilidad variable. Las mutaciones que afectan la interfase $\alpha_1\beta_1$ (Hb Khartoum, Philly y Tacoma) por lo general son más inestables que aquellas que afectan los sitios de contacto $\alpha_1\beta_2$. Las cadenas de globina aisladas y los dímeros $\alpha\beta$ son vulnerables a la oxidación con formación de hemicromos. La formación de hemicromos es seguido por la precipitación de hemoglobina y cadenas aisladas.
- **Aquellas que alteran la estructura helicoidal de las globinas.** La secuencia primaria de una proteína es la que determinará, fundamentalmente, cómo se ordenará su estructura secundaria. Algunos residuos tienen mayor facilidad que otros para formar una hélice α . Así, la prolina que al carecer de un grupo amino libre, ya que lo tiene unido a su cadena lateral formando un anillo, le impide formar un puente H_2 con otro aminoácido, por lo que su presencia interrumpe la estructura helicoidal (que sólo se conserva si la prolina ocupa una posición extrema en la hélice esto es entre los 3 primeros aminoácidos). En consecuencia el cambio de un aminoácido de la hélice por una prolina distorsionará la estructura helicoidal cuya gravedad dependerá del punto donde ha tenido lugar la sustitución

en el segmento helicoidal.

Mecanismo de hemólisis

El acortamiento de la vida media del eritrocito está mediado fundamentalmente por 2 procesos: formación de cuerpos de Heinz y daño oxidativo a la estructura lipoproteica de la membrana.

La secuencia de eventos involucrados es la conversión oxidativa de la hemoglobina a hemicromos y la precipitación de estos últimos para formar cuerpos de Heinz. Estos se unen a las membranas celulares por enlaces hidrofóbicos, limitando la deformabilidad celular y aumentando la permeabilidad de la membrana. Los cuerpos de Heinz son removidos selectivamente por el bazo, fenómeno que contribuye directamente al proceso hemolítico, dejando además glóbulos rojos con viabilidad reducida.

El papel del daño oxidativo a las membranas no relacionado con la formación de cuerpos de Heinz está peor caracterizado.

Biosíntesis

La proporción relativa de hemoglobina inestable en los heterocigotos es, en general, considerablemente menor que la de las variantes estables. Las variantes inestables de cadena β constituyen menos del 30% del total de hemoglobina y las variantes inestables de cadena α menos del 20%. Los bajos niveles de hemoglobinas inestables son debidos con mayor probabilidad a pérdida de la cadena mutante de globina en la etapa post-traducción. La explicación más probable es que el bajo nivel de hemoglobina inestable resulta de proteólisis de las cadenas anormales de globina antes de su incorporación en los tetrámeros de hemoglobina.

Herencia

Es similar al de las demás hemoglobinas estructurales. Hasta la fecha no se han reportado estados homocigotos, pero sí con relativa frecuencia casos debidos a una mutación espontánea. Como prácticamente todos dan síntomas, su diagnóstico es relativamente fácil.

Clínica

A la fecha se han descrito 139 variantes inestables, siendo 33 de ellas (24%)

asintomáticas y sin anomalías hematológicas. Once variantes causan enfermedad hemolítica severa y se expresan clínicamente en el primer año de vida. Gran parte de ellas son variantes de cadena β y se van expresando progresivamente a medida que la síntesis de Hb F disminuye. Gran parte de estas variantes que producen enfermedad severa parecen haberse originado como mutaciones de novo. En estas variantes la concentración de hemoglobina es menos de 7 g/dL, el recuento reticulocitario mayor del 30% y la esplenectomía no produce alivio de la sintomatología.

Quince variantes producen una enfermedad hemolítica de moderada severidad y que se beneficia sustancialmente con la esplenectomía. La detección del desorden habitualmente se retrasa hasta la infancia tardía o adolescencia. Al examen físico generalmente se encuentra ictericia intermitente, esplenomegalia y síntomas de colelitiasis.

La gran mayoría de las variantes inestables producen enfermedad hemolítica leve, con anemia ausente o de grado moderado, reticulocitos entre 4 y 10%, esplenomegalia generalmente ausente. En general, el diagnóstico se establece durante una crisis hemolítica.

Varias hemoglobinas inestables no se asocian con anomalías hematológicas. Gran parte de ellas se detectaron en programas de "screening". No tienen significado clínico.

Las crisis hemolíticas ocurren característicamente durante el curso de enfermedades febriles. Es muy probable que la fiebre de por sí sea el factor precipitante más común. La termolabilidad de muchas de las hemoglobinas inestables predisponen a la formación de cuerpos de Heinz, aun con discreta elevación de la temperatura. En algunas hemoglobinas inestables se ha demostrado la relación de ciertas drogas oxidantes con el desarrollo de crisis hemolíticas.

Para muchas de las variantes inestables los síntomas clínicos de anemia no se correlacionan con la concentración de hemoglobina, fundamentalmente debido a diferencias en la afinidad de las distintas variantes por el O_2 . Algunas de ellas tienen baja afinidad, permitiendo una oxigenación tisular más eficiente. Otras variantes inestables se caracterizan por aumento de la afinidad por O_2 .

y son muy susceptibles a la hipoxia tisular si se agregan enfermedades que deterioran aún más la entrega de O₂. Algunas variantes inestables predisponen a la formación de metahemoglobina, produciendo cianosis, entre éstas se pueden señalar: Hb Freiburg, Hb St Louis y Hb Chile.

Diagnóstico

Se realiza al estudiar una anemia hemolítica no esferocítica congénita. Su diagnóstico se basa en el test de desnaturalización por calor y el test de isopropanol. El test de desnaturalización o de estabilidad con el calor resulta positivo en prácticamente todas las variantes excepto la Hb Bryn Mawer, también conocida como Hb Buenos Aires y Hb Indianapolis, donde la cantidad de hemoglobina anormal es menor al 2% del total de hemoglobina.

Por su simplicidad y sensibilidad, el test del isopropanol es el procedimiento de "screening" preferido, sin embargo los resultados falsos positivos son comunes especialmente si el espécimen ha sido almacenado o posee Hb F mayor del 4%. La adición de cianuro de potasio reduce el número de resultados falsos positivos y los efectos del almacenamiento se minimizan si los especímenes se guardan como sangre total más que como hemolizados y a 4°C de temperatura.

La electroforesis puede ser de ayuda en caracterizar una hemoglobina inestable aún cuando muchas variantes tienen un patrón electroforético normal. La HPLC es de indudable valor diagnóstico.

Sin embargo, la identificación precisa de una hemoglobina anormal requiere análisis del DNA.

La mayoría de los pacientes no requieren tratamiento. Aquellos con hemólisis severa se benefician con el aporte de ácido fólico y el tratamiento oportuno de las infecciones. Debe evitarse el uso de drogas oxidantes y prevenir la hipertermia. Algunos casos se benefician con esplenectomía, lo cual requiere la identificación precisa de la variante.

g) Variantes de hemoglobina con propiedades de transporte de oxígeno alterado

Las propiedades de transporte de O₂ de la hemoglobina puede alterarse principalmente por dos vías: (a) sustitución de un aminoácido

próximo al anillo del hemo produciendo una metahemoglobina (Hemoglobinas M), y (b) cambio de aminoácidos en otros lugares que provoquen aumento o disminución de la afinidad por el O₂ con el resultado de policitemia o cianosis, respectivamente.

• Variantes con alta afinidad por el O₂

La mayoría de las variantes con alta afinidad tienen sustituciones en una de las tres regiones que son fundamentales para la función de la hemoglobina: la interfase α_1 - β_2 , el C-terminal de la cadena β , el lugar de unión para el 2-3 DPG.

Muestran un desplazamiento primario de la curva de saturación de la hemoglobina hacia la izquierda, provocando hipoxia tisular cuyo mecanismo de adaptación se manifiesta como una poliglobulia. Esta poliglobulia es familiar, heredada con carácter autosómico dominante, exceptuando algún caso de mutación espontánea. Gran parte de los casos son asintomáticos.

Su diagnóstico se realiza al estudiar un paciente que se presenta con eritrocitosis. El recuento de leucocitos y plaquetas habitualmente es normal, y el frotis de sangre periférica es normal. Durante la evaluación inicial debe descartarse otras posibilidades diagnósticas de poliglobulia, como la proliferación eritroide autónoma (Policitemia Rubra Vera) y aquellas que producen proliferación eritroide secundaria, sea por aumento inapropiado en la secreción de eritropoyetina (neoplasias, lesiones renales) o por aumento apropiado (hipoxemia).

En una primera etapa se realiza una electroforesis de hemoglobina. Si ésta revela una banda anormal el diagnóstico está virtualmente establecido. Sin embargo si no se demuestra anomalías sea en electroforesis o isoelectroenfoque, por ningún motivo se puede descartar el diagnóstico. Sólo alrededor de la mitad de las variantes de hemoglobina de alta afinidad pueden ser separados de la Hb A por electroforesis en gel de acetato de celulosa a pH de 8,6. Algunas variantes pueden detectarse si se utilizan otros tipos de electroforesis como agar citrato a pH de 6,0 o bien HPLC, que es al momento actual un método altamente sensible para la detección de variantes estructurales de hemoglobina.

Sin embargo la única forma de establecer definitivamente el diagnóstico de una variante con alta afinidad por el O₂ es realizando la medición de la capacidad de enlace de la hemoglobina con el O₂, logrando demostrar una desviación hacia la izquierda de la curva de disociación de la hemoglobina con el 2-3 DPG normal (ya que el descenso de este fosfato provoca igual fenómeno). Cuando hay sospecha se realiza como método de despistaje una curva espectrofotométrica de unión del O₂ con el hemolizado desprovisto de fosfatos orgánicos, revelando en el espectro visible la presencia de metahemoglobina o carboxihemoglobina y en su ausencia una alteración significativa en la unión con el O₂, ello es diagnóstico de la presencia de una variante de hemoglobina funcionalmente anormal.

- **Variantes con baja afinidad por el O₂**

Bajo este punto se incluyen a aquellas variantes estables de hemoglobina que muestran como síntoma fundamental la cianosis, saturación arterial de O₂ muy baja con PO₂ normal y afinidad por el O₂ disminuida. Estas características presentan entre otras las siguientes hemoglobinas: Hb Kansas (β102 [G4] Asn→Tre), Hb Beth Israel (β102 Asn→Ser) y Hb St. Mandé (β102 Asn→Tyr).

La mayoría de los miembros afectados tiene un nivel de hemoglobina levemente disminuido, probablemente debido a la liberación de O₂ aumentada en los tejidos (desviación hacia la derecha de la curva de disociación del O₂), con lo cual la oxigenación tisular es muy eficaz, tolerando mucho mejor la anemia, y reduciéndose el estímulo para producir eritropoyetina.

Las tres variantes de hemoglobina citadas previamente tienen el cambio en el mismo aminoácido el β 102 asparragina situado en la interfase α₁β₂, que normalmente cuando la hemoglobina es oxigenada forma un puente de hidrógeno con el ácido aspártico α 94, unión que en estas variantes no puede formarse, disociándose más fácilmente en dímeros αβ, que la oxihemoglobina A. Además de éstas, se han encontrado diversas variantes inestables con baja afinidad por el O₂, pero no como síntoma fundamental.

- **Hemoglobinas M**

Son un grupo de variantes que ocasionan una forma de Metahemoglobinemia congénita transmitida de forma autosómica dominante.

La anomalía molecular básica es la sustitución de una histidina distal o proximal por una tirosina, cuya cadena lateral al ser más larga alcanza al Fe⁺² formando una unión covalente, estabilizándose en su forma oxidada Fe⁺³.

Hasta el momento se han descrito siete tipos en diversas partes del mundo. Seis de ellas muestran el cambio de histidina E7 o F8 por tirosina sea en la cadena α, β o γ: Hemoglobina M-Boston: α58 (E7) His→Tyr, Hemoglobina M-Iwate: α87 (F8) His→Tyr, Hemoglobina M-Saskatoon: β63 (E7) His→Tyr, Hemoglobina M-Hyde Park: β92 (F8) His→Tyr, Hemoglobina M-Milwaukee: β67 (E11) Val→Glu, Hemoglobina FM-Osaka: γ63 (E7) His→Tyr, y Hemoglobina FM-Fort Ripley: γ92 (F8) His→Tyr.

En la Hb M-Milwaukee, debido a la configuración helicoidal α, el ácido glutámico está situado internamente y su cadena lateral al ser suficientemente larga alcanza el grupo hemo, oxidando el átomo de hierro.

El equilibrio de O₂ de las hemoglobinas M depende de la cadena afectada, más que de la histidina proximal o distal sustituida. Así las de cadena α M-Boston y M-Iwate, en las cuales sólo la cadena β reacciona con el O₂ tienen una baja afinidad por el O₂, mientras que las variantes de cadena β, en las que sólo transportan O₂ las cadenas α, tienen una P₅₀ prácticamente normal.

Los pacientes suelen ser completamente asintomáticos, excepto por su cianosis y algunos por poliglobulia. El trastorno puede manifestarse desde el nacimiento si la alteración está en la cadena α, o a partir de los seis meses si está en la cadena β.

La sangre tiene un color chocolate marrón y en algunos casos discreta hemólisis, si bien la mayoría de sus parámetros hematológicos de rutina son normales.

El diagnóstico de presunción de la hemoglobina M se hace por el espectro de absorción del hemolizado y por la demostración de su presencia en la electroforesis de hemoglobinas realizadas en condiciones apropiadas,

especialmente con el hemolizado oxidado con ferricianuro. El diagnóstico diferencial debe hacerse con el déficit congénito de Citocromo b5 Reductasa y con la ingesta crónica de oxidantes.

Una vez que se ha establecido el diagnóstico de presunción la anomalía debe ser identificada estructuralmente por los métodos habituales.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS EXTRACORPUSCULARES

Las anemias hemolíticas extracorpúsculares pueden ser causadas por mecanismos inmunes o no inmunes.

1. ANEMIAS HEMOLÍTICAS INMUNES

Las anemias hemolíticas inmunes (AHI), son un grupo de anemias hemolíticas adquiridas, que

se producen por una disminución en la vida media de los glóbulos rojos como consecuencia del aumento de la destrucción celular a nivel periférico. La destrucción inmune de los eritrocitos se inicia con la unión de anticuerpos de clase IgG o IgM a proteínas o carbohidratos ubicados en la membrana celular. La destrucción de los eritrocitos puede suceder a nivel intravascular o extravascular, dependiendo si ella ocurre en el torrente circulatorio o fuera de él, respectivamente.

El sistema inmune puede atacar a los eritrocitos como consecuencia de un proceso autoinmune o aloinmune, lo que permite clasificar a las AHI en tres grandes categorías: Anemias hemolíticas autoinmunes, Anemias hemolíticas aloinmunes y Anemias Inducidas por fármacos (ver tabla 8-9). Los desórdenes inmunohemolíticos han sido también clasificados de acuerdo a la naturaleza específica del anticuerpo involucrado.

Tabla 8-9. Clasificación de las Anemias hemolíticas inmunes

<p>Anemias hemolíticas aloinmunes</p> <p>Enfermedad hemolítica del recién nacido Reacción hemolítica transfusional</p> <p>Anemias hemolíticas autoinmunes</p> <p>Por anticuerpos calientes Primaria Secundaria Síndromes linfoproliferativos Mesenquimopatías Infecciones virales Enfermedades inmunológicas</p> <p>Por anticuerpos fríos Enfermedad de aglutininas frías Hemoglobinuria paroxística <i>a frigore</i></p> <p>Inducidas por fármacos</p>

La hemólisis puede ocurrir en el interior de los vasos sanguíneos (intravascular) o en el sistema fagocítico mononuclear (SFM).

Hemólisis extravascular. Los eritrocitos en circulación pueden ser recubiertos (sensibilizados) con anticuerpos de clase IgG, IgM y/o IgA. Los eritrocitos sensibilizados pueden ser retirados de circulación por el SFM del bazo y 100 veces menos eficientemente por las células de Kupffer del hígado. En este proceso parecen estar involucrados dos mecanismos: (a) la presencia de macrófagos en el bazo que tiene receptores para la región Fc de las IgG (FcγR), específicamente IgG₁ e IgG₃, y receptores para el fragmento C3b del complemento, que pueden mediar la fagocitosis directa; y (b) una fagocitosis parcial de la célula, en la cual una porción de la membrana es removida por el fagocito, provocando una disminución en la relación superficie-volumen en el eritrocito. Este proceso parece ser el responsable de la formación de esferocitos, un marcador morfológico de las AHI, caracterizados por la pérdida de la deformabilidad propia de los glóbulos rojos normales, induciendo su secuestro a nivel esplénico.

En la destrucción extravascular de las células rojas, prácticamente no se produce liberación de hemoglobina al plasma, pero producto de la eritrofagocitosis se induce hipertrofia del SFM de hígado y bazo, lo que se traduce en hepatoesplenomegalia.

La presencia de fragmentos del complemento en la membrana eritrocitaria (C4b, C2b y C3b), producto de la activación parcial del complemento actúa sinérgicamente con la IgG para generar señales fagocíticas potentes que aumentan la tasa de destrucción inmune, constituyendo eficientes amplificadores de esta respuesta inmune.

Hemólisis intravascular. La destrucción de los eritrocitos sensibilizados con IgM es mediada por el complemento, involucrando más componentes de este sistema que los asociados con la hemólisis extravascular que sólo llega a la formación de C3b. La destrucción intravascular mediada por el complemento

ocurre por hemólisis directa producto de la activación total del complemento que permite la formación de C5b6789, también conocidos como Complejo de ataque de a membranas, que una vez formado es capaz de inducir la formación de poros en la membrana celular y así su lisis.

Este tipo de hemólisis se manifiesta por liberación de hemoglobina, estromas eritrocitarios y enzimas intracelulares al plasma, provocando hemoglobinemia. Cuando la hemoglobina escapa al plasma se une a la haptoglobina para formar un complejo que previene la excreción a nivel renal, por lo que la haptoglobina disminuye, el complejo es rápidamente limpiado por el SFM. Cuando la haptoglobina es saturada la hemoglobina remanente es excretada a nivel renal provocando hemoglobinuria, dando una coloración rosada de la orina.

1.1. Antígenos eritrocitarios

Se han descrito más de 250 antígenos eritrocitarios que se agrupan en 29 sistemas sanguíneos, 5 colecciones y 2 series. Los antígenos eritrocitarios residen en moléculas de diversa naturaleza química y función. Algunos de ellos además de expresarse en glóbulos rojos lo hacen en tejidos no eritroides; en la mayoría de los casos su rol biológico es desconocido. La bioquímica y la genética molecular han permitido establecer la estructura genética de la mayoría de estos antígenos.

Desde 1995, la International Society of Blood Transfusion (ISBT) se ha preocupado de establecer y actualizar la nomenclatura y clasificación de los sistemas sanguíneos humanos, basándose en aspectos genéticos. Los antígenos forman parte de un sistema sanguíneo cuando su biosíntesis está gobernada por sólo un gen o un complejo génico estrechamente ligados en genes homólogos, sin recombinación genética (tabla 8-9). Las colecciones de grupos sanguíneos están formadas por antígenos que están relacionados genética, serológica o bioquímicamente, pero no cumplen todos los criterios para conformar un sistema sanguíneo.

Tabla 8-9. Nomenclatura y genética de los grupos sanguíneos

N° ISBT	Nombre	Símbolo ISBT	N° Ags del Sistema	Producto génico	Localización cromosómica
001	ABO	ABO	4	Glicosiltransferasa	9q34.1-q34.2
002	MNS	MNS	43	Glicoforina A,B	4q28-q31
003	P	PI	1	Glicosiltransferasa	22q11-qter
004	Rh	RH	55	Polipéptido D y CcEe	1p36.2-p34
005	Lutheran	LU	21	Glicoproteína Lutheran	19q13.2
006	Kell	KEL	27	Glicoproteína Kell	7q33
007	Lewis	LE	6	Glicosiltransferasa	19p13.3
008	Duffy	FY	6	Glicoproteína Fy	1q22-q23
009	Kidd	JK	3	Glicoproteína Jk (transporte de urea)	18q11.1-q12.2
010	Diego	DI	21	Proteína Transporte (banda 3)	17q21-q22
011	Yt o Cartwright	YT	2	Acetilcolinesterasa	7q22
012	Xg	XG	1	Glicoproteína Xg ^a	Xp22.32-Yp11.3
013	Scianna	SC	4	Glicoproteína Sc	1p36.2-p22.1
014	Dombrock	DO	5	Glicoproteína Do	112p13.2-p12.1
015	Colton	CO	3	Aquaporina-1 (CHIP)	7p14
016	Landsteiner-Wiener	LW	3	Glicoproteína LW	19p13.3
017	Chido/Roger	CH/RG	9	C4 (complemento)	6p21.3
018	Hh	H	1	Glicosiltransferasa	19q13
019	Kx	XK	1	Glicoproteína Kx	Xp21.1
020	Gerbich	GE	7	Glicoforina C/D	2q14-q21
021	Cromer	CROMER	10	CD55(DAF)	1q32
022	Knops	KN	5	CD35(CR1)	1q32
023	Indian	IN	2	CD 44	11p13
024	Ok	OK	1	CD 147	19p13.3
025	Raph	MER2	1		11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	1		15q23-q24
027	I	I	1	N-Acetil glucosaminil transferasa	6p24
028	Globosido	GLOB	1	Globósido sintetasa	3q13
029	Gil	GIL	1	Aquaporin- 3	9p13

Ag_i, antígenos

Sistema ABO. El sistema ABO sigue siendo el más importante en la práctica transfusional. Su especificidad antigénica reside en estructuras oligosacáridas, sintetizadas por la acción de varias enzimas del tipo glicosil-transferasas que actúan secuencialmente sobre el tetrasacárido precursor o paraglobósido. La síntesis de estos antígenos requiere de la acción de enzimas codificadas por genes ubicados en los cromosomas 9 (ABO) y 19 (H).

En 1990 se dilucidaron las bases genéticas de los tres principales alelos del locus ABO. Los antígenos del sistema han sido identificados sobre glóbulos rojos, en secreciones y sobre la membrana de células epiteliales y endoteliales. Además, estructuras antigénicas similares han

sido detectadas en diversos organismos tales como microorganismos y plantas.

Sistema RH. El sistema Rh es el más polimórfico e inmunogénico de los sistemas sanguíneos humanos y el segundo en importancia clínica. Está compuesto por más de 50 antígenos, los cuales son codificados por dos genes estrechamente unidos, ubicados en el cromosoma 1; uno de ellos codifica la proteína RhD que expresa el antígeno D y sus variantes y el otro gen codifica la proteína RhCE que expresa los antígenos C, c, E, e y sus variantes. Las proteínas RhD y RhCE tienen pesos moleculares que fluctúan de 30 a 34 kDa y constan de 417 aminoácidos (figura 8-7). Se ha descrito la glicoproteína Rh 50, llamada

glicoproteína asociada al Rh (RhAG, CD241), codificada por un gen ubicado en el cromosoma 6 y que sería esencial para el ensamblaje de las proteínas Rh en la membrana eritrocitaria, así como para la inmunogenicidad de ésta. Existe además un grupo de «proteínas accesorias del Rh» conformadas por un grupo de otras glicoproteínas (glicoproteína LW, glicoforina B, banda 3, proteínas asociada a integrinas y glicoproteína Duffy), por esta razón al sistema Rh se le considera como un «complejo de proteínas Rh».

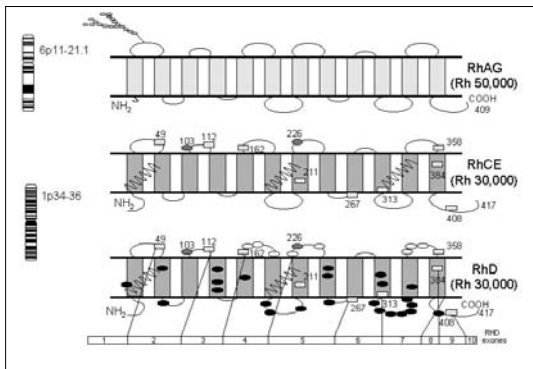


Figura 8-7. Topología de las proteínas RhD, RhCE y glicoproteína Rh50 (RhAG). Las proteínas del sistema Rh presentan doce regiones transmembrana. Los círculos indican los 35 aminoácidos diferentes entre la proteína D y la CE. En la proteína CE se indican los aminoácidos en posición 103 y 226 donde radica el polimorfismo C/c y E/e, respectivamente.

Las proteínas RhD y RhCE tienen 92% de homología entre sí y 38,5% y 39,2% con la RhAG respectivamente, además muestran una gran similitud en la topología, ya que todas presentan 12 regiones transmembrana, sugiriendo que ellas pertenecen a una misma familia de proteínas (familia de proteínas Rh).

El antígeno D es el más importante del sistema. En la población blanca aproximadamente el 15% de los individuos son Rh negativo, por carecer de la proteína D en sus glóbulos rojos. En Chile, la población mixta chilena presenta alrededor de un 6% de individuos Rh negativo, situación que es variable dependiendo del origen étnico de la población que se estudie, es así como en población mapuche se describe casi un 100% de Rh positivo.

En general el 80% de las personas Rh negativo se aloimmunizan en respuesta al contacto con eritrocitos Rh positivo. Estos aloanticuerpos son usualmente del tipo IgG y pueden causar reacciones hemolíticas postransfusionales de intensidad y severidad variable, y enfermedad

hemolítica del recién nacido que puede llegar a ser muy severa y mortal.

Los demás sistemas sanguíneos cobran importancia clínica en la medida en que los anticuerpos desarrollados causen reacciones hemolíticas transfusionales o enfermedad hemolítica del recién nacido. Los anticuerpos que más frecuentemente causan estos cuadros clínicos corresponden a los sistemas Kell, Duffy, Kidd y MNSs.

Sistema P (003), Sistema globósido (028) y colección 209. El sistema P, el sistema globósido y la colección o antígenos asociados 209 tienen en conjunto 4 antígenos altamente relacionados que dan origen a 5 fenotipos. Todos ellos existen como glicoesfingolípidos en la membrana de los glóbulos rojos y se sintetizan a partir de un precursor denominado lactosilceramido, el cual por la acción de diversas reacciones catalizadas por glicosiltransferasas originan al paraglobosido tipo 2, sobre el cual la enzima 4- α -galactosiltransferasa sintetiza P1, único antígeno perteneciente al sistema P. Por otro lado, el lactosilceramido es sustrato para otra enzima 4- α -galactosiltransferasa encargada de sintetizar el antígeno P^k, que actualmente forma parte de la colección 209.

La conversión del antígeno P^k a P se produce por la acción de la enzima N-acetil galactosaminil transferasa (globósido sintetaza) la cual adiciona, por enlace $\beta(1-3)$, un residuo de N-acetil galactosamina sobre P^k. El antígeno P es el único antígeno que forma parte del sistema globósido.

Sistema I (027) y Colección 207002. El antígeno I está compuesto por unidades repetidas de un disacárido compuesto por galactosa y N-acetilglucosamina, unidas a ceramidos o glicoproteínas de membrana. Además de glóbulos rojos, se detecta en granulocitos, linfocitos, macrófagos y plaquetas.

El antígeno I, que previamente pertenecía a la colección 207, constituye un sistema. Ha sido clonado el gen que codifica para una N-acetil glucosaminil transferasa, enzima responsable de la conversión de las cadenas lineales con actividad «i», en cadenas ramificadas con actividad «I», proceso que ocurre en los primeros 18 meses de vida. El antígeno i, precursor de I, permanece con la nomenclatura 207002.

1.2. Anemias hemolíticas aloinmunes

Las anemias hemolíticas aloinmunes, se producen cuando un individuo se expone a antígenos extraños presentes en otro individuo de la misma especie, generando anticuerpos contra ellos. Los aloanticuerpos no reaccionan con las células propias, sino que con eritrocitos que presentan antígenos desconocidos. Los cuadros clínicos asociados a este tipo de anemia son la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN) y las Reacción Hemolítica Transfusional (RHT).

1.2.1. Enfermedad hemolítica del recién nacido

La EHRN es una anemia causada por destrucción de los glóbulos rojos del feto o del neonato por anticuerpos maternos de clase IgG, capaces de atravesar la placenta, dirigidos específicamente contra antígenos presentes en los eritrocitos del hijo, que han sido heredados del padre. Solamente los anticuerpos clase IgG son transportados activamente a través de la placenta y por lo tanto capacitados para cruzarla y sensibilizar los glóbulos rojos fetales que posteriormente son retirados por el SFM del feto, especialmente en el bazo.

Los aloanticuerpos maternos pueden aparecer por embarazos ya que, aún en embarazos normales es relativamente común el paso transplacentario de pequeñas cantidades de sangre fetal a la madre. Los glóbulos rojos incompatibles pueden estimular el sistema inmune materno, produciendo su aloinmunización. Otra forma de sensibilización de la madre es a través de transfusiones con eritrocitos que presentan antígenos desconocidos, los que pueden estimular una respuesta inmune generando así aloanticuerpos.

La EHRN asociada a anticuerpos dirigidos contra antígenos de sistema Rh corresponde a los casos más severos. La incompatibilidad ABO es la causa más común de EHRN y constituye el 95% de los casos, pero el desarrollo de la enfermedad usualmente es de curso leve, sin importancia clínica. Anticuerpos dirigidos contra antígenos de los sistemas Kell, Duffy y Kidd, entre otros, también pueden causar esta enfermedad, con un grado variable de compromiso del hijo.

El feto afectado desarrolla anemia, producto del retiro de circulación por el SFM del bazo, de los glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos

maternos. La tasa de destrucción de eritrocitos depende del título de anticuerpos, la especificidad de éste y la cantidad de determinantes antigénicos por célula roja. El cuadro anémico provoca en el hijo una estimulación a nivel de médula ósea para acelerar la tasa de producción de eritrocitos, que induce la liberación de células inmaduras (eritroblastos) a circulación periférica. Cuando la médula no es capaz de suplir la demanda de glóbulos rojos, la eritropoyesis ocurre a nivel hepático y esplénico provocando hepatoesplenomegalia que induce hipertensión portal y daño hepatocelular. La anemia severa junto con la hipoproteinemia causada por una disminución de producción hepática de proteínas plasmáticas, induce una falla cardíaca con edema generalizado, efusión y ascitis, condición conocida como *hidrops fetalis*. En casos severos el *hidrops* puede presentarse entre las 18 a 20 semanas de gestación. El proceso de destrucción eritrocitaria persiste después del nacimiento ya que los anticuerpos maternos permanecen en la circulación del neonato por, aproximadamente, 25 días después del nacimiento (vida media de las IgG).

La hemólisis libera hemoglobina que se metaboliza a bilirrubina. La forma no conjugada de esta molécula es transportada a través de la placenta para ser conjugada en el hígado materno para luego ser excretada por la madre, así los niveles de bilirrubina en la circulación fetal y en el líquido amniótico, aunque estén aumentados no causan complicaciones al feto. Por el contrario, después del nacimiento la bilirrubina no conjugada se acumula en la circulación fetal ya que la inmadurez hepática hace que el proceso de conjugación sea poco eficiente, especialmente en recién nacidos prematuro, incluso con hemólisis moderada la bilirrubina no conjugada puede alcanzar niveles tóxicos (> 18 mg/dL) para el recién nacido, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica y se infiltra en el tejido cerebral produciendo una encefalopatía bilirrubínica irreversible, cuadro conocido como *kernicterus*.

Diagnóstico y evaluación prenatal

Detección y titulación de anticuerpos maternos. La detección de aloanticuerpos en el suero materno se realiza mediante la prueba de antiglobulina humana indirecta (PAI). Si se detecta en el suero de una embarazada la presencia de un aloanticuerpo de importancia clínica (activo a 37°C y detectado en fase antiglobulina humana), se debe identificar para

conocer su especificidad y luego titular de modo de tener un valor basal de la cantidad relativa de anticuerpo presente en el suero materno, la titulación debería hacerse mensualmente, usando como referencia el estudio paralelo del suero materno correspondiente al mes anterior.

Espectrofotometría de líquido amniótico.

Debe evaluarse cuidadosamente la necesidad de hacer espectrofotometría de líquido amniótico mediante amniocentesis, que es un método invasivo no exento de riesgos.

Este procedimiento se basa en que la concentración de bilirrubina en el líquido amniótico se correlaciona con el grado de anemia fetal. Este análisis consiste en medir la densidad óptica del líquido amniótico entre 350 y 700 nm, a los 450 nm se produce un "peak" de absorción dado por la bilirrubina presente, la diferencia que se produce con respecto a la linealidad de absorbancias se anota como ΔDO 450 nm, este valor se lleva al gráfico de Liley considerando la edad gestacional. La densidad óptica del líquido amniótico es más alta en el segundo trimestre y disminuye, gradualmente, hasta el nacimiento. En el gráfico se distinguen 3 zonas, que orientan el manejo obstétrico de las embarazadas; valores en zona III indican hemólisis severa con riesgo de vida por lo que se requiere de una intervención urgente; en la zona II es sugerente de una enfermedad moderada que podría requerir intervención; la zona I indica enfermedad ausente o leve que no requiere intervención, sino control seriado.

Ultrasonido. El desarrollo de la tecnología que utiliza ultrasonido, ha sido una herramienta de mucha utilidad en el seguimiento prenatal de la EHRN, ya que permite medir el tamaño de distintos órganos como la placenta y el hígado, así como determinar la presencia o ausencia de edema, ascitis y otras efusiones fetales.

Cordocentesis. El desarrollo del ultrasonido permitió además, efectuar procedimientos para la obtención de sangre de cordón, en la que se pueden medir los parámetros bioquímicos y hematológicos estándares, siendo ésta la forma más segura de determinar el estado de avance de la EHRN en ausencia de *hidrops*. Este procedimiento se puede realizar entre las 20 y 21 semanas de gestación, pero en situaciones extremas se puede hacer, incluso, con 18 semanas.

Determinación del fenotipo Rh del feto. El clonamiento del cDNA de los genes D y CE, han proporcionado un medio para determinar la presencia o ausencia del gen D en el feto a partir del DNA fetal obtenido desde las vellosidades coriónicas o por amiocentesis.

Diagnóstico y evaluación postnatal

Análisis de sangre de cordón. Al momento del parto es posible obtener sangre de cordón para los análisis bioquímicos, hematológicos e inmunohematológicos pertinentes. Desde el punto de vista hematológico se podrá detectar y evaluar la concentración de hemoglobina, reticulocitosis, presencia de eritroblastos; morfología de las células rojas (que se observarán con macrocitosis y policromatofilia como consecuencia del aumento de la eritropoyesis) Desde el punto de vista inmunohematológico se podría observar una prueba de antiglobulina humana directa (PAD) positiva si se trata de EHRN no ABO en la cual la PAD puede ser negativa o débilmente reactiva; también puede haber dificultad en la clasificación Rh o de otros sistemas sanguíneos que se revelan por medio de la prueba antiglobulina humana (ver capítulo 29). Desde el punto de vista bioquímico se encontrará hiperbilirrubinemia en un grado variable dependiendo de la severidad de la hemólisis, la que podría tender a un incremento significativo en las 48 a 72 horas siguientes al nacimiento.

Tratamiento prenatal

Reducción de la tasa de anticuerpos maternos. Si el feto está en un nivel de riesgo moderado o la edad gestacional no permite otro tipo de procedimiento, se puede recurrir a la plasmaféresis, procedimiento que debería reducir la tasa de anticuerpos hasta en un 75%. El plasma removido se reemplaza con albúmina e inmunoglobulinas intravenosa (IVIG), como una forma de reducir el nivel de rebote que habitualmente hace aumentar dramáticamente el nivel de anticuerpos maternos post plasmaféresis

Transfusión intrauterina. Si la severidad de la enfermedad indica alto riesgo y no es posible interrumpir el embarazo por la edad gestacional, se puede realizar una transfusión intrauterina. La transfusión intraperitoneal (TIP) que consiste en la inyección de glóbulos rojos compatibles,

en la cavidad peritoneal del feto, los eritrocitos son absorbidos por vía laguna linfática subdiafragmática, de ahí pasan al ducto linfático derecho y desde ahí a la circulación venosa; el proceso de absorción es dependiente de los movimientos diafragmáticos fetales. La otra modalidad que se puede aplicar es la transfusión intravenosa (TIV) a través del cordón umbilical, la ventaja de este método respecto al anterior es que el incremento del nivel de hemoglobina es inmediato e independiente de los movimientos diafragmáticos. La venopunción orientada con ultrasonido disminuye los riesgos. Este procedimiento tiene una tasa de supervivencia superior a la TIP.

Los glóbulos rojos a emplear en una transfusión intrauterina deben ser frescos, de grupo O que carezcan del antígeno que es reconocido por el anticuerpo materno, con una prueba cruzada negativa utilizando el suero materno, además se debe asegurar que sean irradiados, y en lo posible con serología negativa para citomegalovirus.

Tratamiento postnatal

En el período postnatal se utiliza la fototerapia si la hiperbilirrubinemia es leve. Este procedimiento consiste en exponer el neonato a una fuente de luz fluorescente (luz azul) que es capaz de reducir el nivel de bilirrubina, ya que es oxidada a biliverdina, metabolito no tóxico e hidrosoluble que es excretado por la bilis y la orina.

Si el RN sufre *hidrops* o los niveles de hemoglobina son inferiores a 12 g/dL, o la bilirrubina es superior a 5,5 mg/dL, se está en presencia de una ENRH severa, debiendo realizarse un recambio sanguíneo, con el objetivo de remover la bilirrubina libre y los glóbulos rojos sensibilizados, por otros no sensibilizados que tengan las mismas características que los empleados en una transfusión intrauterina. Con esto se corrige la anemia y se previene la hiperbilirrubinemia al remover los eritrocitos sensibilizados y la bilirrubina circulante. Los parámetros de hemoglobina y bilirrubina son más estrictos si se trata de un neonato prematuro.

Prevención

Para la prevención de la EHRN inducida por anti-D, existen protocolos de profilaxis bien establecidos que consisten en la inmunización pasiva de madres Rh negativas no sensibilizadas

al antígeno D, con anticuerpos anti-D comerciales (Rho IgG), cuyo objetivo es prevenir que células Rh positivas del feto o recién nacido estimulen una respuesta inmune materna, evitando así la formación de anticuerpos que pudieran ocasionar problemas en embarazos futuros.

Existe una protección natural a la inmunización cuando la madre es ABO incompatible con el feto, debido a que los hematíes fetales (ABO incompatibles), son rápidamente hemolizados en la circulación materna por acción de los anticuerpos naturales, antes que el antígeno D estimule al sistema inmune materno, de esta forma disminuye la incidencia de inmunización frente al antígeno D del sistema Rh.

1.2.2. Reacción hemolítica transfusional

La composición antigénica de los glóbulos rojos transfundidos siempre difiere con la del receptor, pero sólo una minoría de pacientes politransfundidos desarrollan anticuerpos, debido a que la aloinmunización depende tanto de la respuesta inmune del receptor como de la inmunogenicidad de los diferentes antígenos eritrocitarios. En general el riesgo de aloinmunización es de 1,0 a 1,4% por unidad transfundida.

Una reacción hemolítica transfusional ocurre cuando se transfunden glóbulos rojos portadores de antígenos frente a los cuales el receptor ha formado anticuerpos, con la consecuente destrucción de ellos. Son menos frecuentes las reacciones hemolíticas causadas por destrucción de los eritrocitos del receptor después de la transfusión de plasma incompatible. Dependiendo del antígeno y del anticuerpo involucrado, la hemólisis puede ocurrir inmediatamente a nivel intravascular, o más lentamente a nivel del SFM (extravascular). Esto también permite clasificar las reacciones de acuerdo al tiempo de aparición de los síntomas como, reacciones hemolíticas inmediatas o reacciones hemolíticas tardías.

a) Reacción hemolítica transfusional inmediata

Este tipo de reacciones ocurre cuando los anticuerpos están presentes en el plasma del paciente a títulos altos. La causa más típica de este tipo de reacción es la incompatibilidad ABO, dado que los anticuerpos anti-A y anti-B son de clase IgM, capaces de fijar y activar completamente el sistema del complemento. La incompatibilidad ABO ocurre,

principalmente, por errores administrativos; ocasiona el 86% de las muertes por reacciones hemolíticas transfusionales. Anticuerpos dirigidos contra otros antígenos, tales como, Kell, Jk^a y Fy^a, también pueden causar este tipo de reacciones.

Los mecanismos fisiopatológicos asociados con estas reacciones corresponden a los descritos para la hemólisis intravascular. Se inicia con la formación de un complejo inmune donde el anticuerpo involucrado es de clase IgM, capaz de activar el sistema del complemento, la cascada de la coagulación y el sistema de las cininas. La activación del complemento induce la formación del MAC que provoca hemólisis intravascular en forma inmediata, con liberación de hemoglobina, estroma y enzimas eritrocitarias al plasma, la hemoglobina satura a la haptoglobina por lo que comienza a ser eliminada por la orina generando hemoglobinuria. Producto de la activación del complemento también se liberan los fragmentos C3a y C5a que actúan como potentes anafilotoxinas, responsables de los síntomas de fiebre, escalofríos, hipotensión y shock. El estroma eritrocitario contiene sustancias tromboplásticas que activan la cascada de la coagulación induciendo Coagulación intravascular diseminada (CID) (ver capítulo 22). El complejo antígeno-anticuerpo formado, también activa el sistema de las cininas, liberando bradisinina, la que provoca hipotensión y liberación de catecolaminas que causan vasoconstricción en órganos tales como el riñón. El cuadro puede generar una falla renal producto de la isquemia renal causada por la combinación de la hipotensión, la vasoconstricción y la CID. La hemoglobina libre circulante parece no participar en la insuficiencia renal. Otro de los síntomas característicos de esta reacción son, dolor lumbar, enrojecimiento y dolor en el recorrido de la vena puncionada, disnea y taquicardia. En pacientes anestesiados los signos principales son la hipotensión, la hemoglobinuria y el sangramiento en napa de las heridas quirúrgicas producto de la CID. La severidad de la reacción se correlaciona con el volumen de glóbulos rojos incompatibles transfundidos.

Frente a este tipo de reacción, la transfusión debe ser inmediatamente suspendida, manteniendo permeable la vía para proceder a tomar una muestra de sangre posreacción, y usarla en caso necesario. La muestra debe ser enviada al laboratorio del Banco de Sangre junto con la unidad que gatilló la reacción para su

análisis. La muestra de sangre postransfusional debe ser centrifugada inmediatamente y observada en busca de hemoglobinemia, que se detecta por el tinte rosado del plasma, es muy conveniente compararla con la muestra pretransfusional. Hay que cuidar la hidratación del paciente para prevenir la falla renal, la administración de drogas vasoactivas mejoran la hipotensión y la perfusión a este nivel. Se requiere monitorear los mecanismos hemostáticos para evaluar la necesidad de transfundir plaquetas, crioprecipitado y/o plasma fresco congelado.

La mayoría de estas reacciones son evitables ya que la causa principal se debe a error humano, entre ellos se destaca: mal etiquetaje de la muestra del paciente, extracción de sangre a un paciente equivocado, errores de transcripción, errores en la identificación de la unidad de glóbulos rojos. El seguimiento riguroso de los procedimientos descritos en los manuales es la forma más segura para evitar estos errores, así como la aplicación de un completo programa de gestión de calidad.

b) Reacción transfusional hemolítica tardía

Las reacciones transfusionales hemolíticas tardías, por lo general son más leves que las inmediatas ya que la hemólisis es de predominio extravascular. Se producen cuando el título de los aloanticuerpos de isotipo IgG presentes en el suero es bajo, no siendo detectados en las pruebas pretransfusionales. Los síntomas se inician entre 2 a 14 días de realizada la transfusión de sangre incompatible. La respuesta anamnésica hace aumentar rápidamente los títulos del anticuerpo, así los glóbulos rojos transfundidos sufren hemólisis extravascular porque se sensibilizan con anticuerpos IgG o fracciones del complemento, siendo secuestrados por células del SFM hepático o esplénico. La especificidad de los anticuerpos involucrados en este tipo de reacción están dirigidos contra antígenos de los sistemas Kell, Rh (D, E y c), Duffy y Kidd. Se presentan con una incidencia de 1 en 3.200 transfusiones.

Fiebre y anemia son los principales síntomas aunque a veces se produce ictericia leve, eventualmente se presenta hemoglobinemia y hemoglobinuria mientras que el daño renal es muy excepcional. Por lo general el paciente que sufre este tipo de reacciones no requiere de una terapia especial.

Para el diagnóstico es necesario una muestra de sangre postransfusional para medir el nivel de hemoglobina, bilirrubina y realizar una PAD, que al ser positiva se debe proseguir el estudio con una elución para estudiar su especificidad; si la tasa de hemólisis es alta la PAD podría ser negativa y en este caso se debería detectar el anticuerpo en el suero del paciente (ver capítulo 29).

Debido a que este tipo de reacciones ocurre por una respuesta inmune secundaria, resulta de gran importancia en su prevención, considerar el historial transfusional, de trasplantes y de embarazos del paciente.

1.3. Anemias hemolíticas autoinmunes

Las Anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) se producen por alteraciones en los mecanismos reguladores normales de la respuesta inmune, con la consecuente formación de anticuerpos patológicos que reaccionan con antígenos eritrocitarios propios, induciendo su destrucción.

En situaciones normales, los linfocitos T supresores inducen tolerancia a los antígenos propios al inhibir la actividad de las células B, por lo que la pérdida o alteración de esta función puede resultar en la producción de autoanticuerpos. Las causas de la disfunción de este sistema regulador no están del todo dilucidadas, pero existen evidencias que agentes microbianos y drogas lo alteran, así como asociación con desórdenes relacionados con fallas en la inmunorregulación, como son Lupus eritromatoso sistémico (LES) y desórdenes linfoproliferativos.

La presencia de autoanticuerpos es importante por dos razones: (a) ellos pueden causar destrucción *in vivo* de glóbulos rojos, generando el cuadro anémico y (b) cuando los eritrocitos están cubiertos por autoanticuerpos y éstos también están libre en el suero y son reactivos con células de donantes al azar, puede ser más difícil la determinación de grupo sanguíneo ABO, la detección e identificación de aloanticuerpos y las pruebas de compatibilidad pretransfusionales. Los autoanticuerpos pueden ser inocuos o nocivos dependiendo de la temperatura máxima a la que son activos.

Uno de los criterios más usados en la clasificación de las AHAI, se basa en la temperatura de reacción del anticuerpo *in vitro*.

En las AHAI por anticuerpos calientes el anticuerpo involucrado reacciona con mayor fuerza a 37°C que a temperaturas más bajas, mientras que en AHAI por anticuerpos fríos, el autoanticuerpo reacciona con mayor fuerza entre 0 y 5°C. Adicionalmente se incluyen en este grupo las AHAI inducidas por fármacos.

Los eritrocitos recubiertos con autoanticuerpos son en primer lugar secuestrados en el bazo, ya que son detectados por receptores específicos presentes en los macrófagos, esta interacción puede inducir fagocitosis total o parcial de los eritrocitos. Cuando se produce la remoción de parte de la membrana celular y el eritrocito se libera nuevamente a circulación, situación que es muy frecuente, la célula queda con una menor proporción membrana – contenido, lo que trae como consecuencia la aparición de esferocitos, caracterizados por su rigidez, baja sobrevivencia y aumento de fragilidad frente a cambios osmóticos.

La incidencia anual de las AHAI es 1 en 80.000 personas, siendo el tipo caliente hasta un 70%, la Enfermedad de aglutininas frías entre un 16-32%, la Hemoglobinuria paroxística a frío el 2%, y la Anemia hemolítica inducida por fármacos entre el 12-18% de los casos. El tipo mixto, AHAI por anticuerpos fríos y calientes corresponde al 7% de los casos.

1.3.1. AHAI por anticuerpos calientes

La AHAI por anticuerpos calientes se produce cuando el sistema inmune del paciente produce anticuerpos anti-eritrocitarios que reaccionan más eficientemente en el laboratorio a temperaturas de 37°C. Generalmente los anticuerpos involucrados son de tipo IgG, predominantemente de las subclases IgG₁ e IgG₃, pueden además estar acompañados de IgA e IgM, rara vez estos últimos se presentan solos, pudiendo ser fijadores parciales o no fijadores de complemento, por lo que inducen hemólisis extravascular, como consecuencia de lo cual se observa hiperbilirrubinemia.

Los autoanticuerpos patógenos se unen a la superficie de los glóbulos rojos y activan complemento, proceso que generalmente no se completa generan la lisis intravascular de las células. Frecuentemente, el factor del complemento presente en los hematíes es C3b o C3d, este último generado por el inactivador de C3b. La lisis extravascular ocurre por la intervención de macrófagos con receptores de IgG o C3b presentes en los eritrocitos.

El 70-75% de todas las anemias hemolíticas autoinmunes son provocadas por anticuerpos calientes, de ellas aproximadamente entre un 30 a 50% son de origen idiopático (primario), es decir sin una enfermedad de base asociada. Este tipo de anemia puede presentarse a cualquier edad, aunque se observa frecuentemente en pacientes sobre los 40 años, y afectan con mayor frecuencia a mujeres. El porcentaje restante son secundarias a otras enfermedades, tales como síndromes linfoproliferativos, especialmente Linfoma de células B y Leucemia linfocítica crónica, LES, otras enfermedades autoinmunes, tumores malignos e infecciones.

El curso de la enfermedad puede ser moderado, con un desarrollo gradual de los síntomas, o agudo con síntomas fulminantes. Los hallazgos clínicos incluyen, debilitamiento progresivo, episodios febriles, hemoglobinuria, ictericia moderada, hepatoesplenomegalia y linfadenopatías.

Hallazgos de laboratorio

Hematológicos. El nivel de hemoglobina se encuentra disminuido en un grado variable de acuerdo a la intensidad de la anemia. El recuento de reticulocitos es usualmente elevado, pero dado que estas células ya presentan determinantes antigénicos desarrollados, es posible tener cuadros de reticulocitopenia, situación que se asocia con una alta mortalidad. El frotis sanguíneo muestra los hallazgos clásicos de anemia hemolítica: policromatofilia, macrocitosis, y esferocitosis.

Bioquímicos. La bilirrubina no conjugada está moderadamente elevada, al igual que los urobilinógenos urinarios. En casos severos se puede observar hemoglobinemia, disminución de la haptoglobina, aumento de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y hemoglobinuria.

Inmunoematológicos. Casi el 95% de los casos presenta la PAD positiva, confirmando la presencia de glóbulos rojos sensibilizados con IgG con o sin fracciones del complemento, y un eluado reactivo con anticuerpos de clase IgG (ver capítulo 29).

Generalmente el autoanticuerpo caliente no interfiere con la determinación del grupo ABO y Rh, pero puede interferir en los estudios de reactividad del suero. Aproximadamente en el 80% de los casos, el autoanticuerpo no solamente se encuentra unido a los eritrocitos,

sino que también aparece libre en el suero, reaccionando con células de donantes o en una PAI positiva, cuando hay una hemólisis activa.

La especificidad de los autoanticuerpos calientes es variable y la mayoría de ellos reconocen antígenos de alta incidencia. Unos pocos reaccionan específicamente con antígenos del sistema Rh como e, otros reaccionan más fuerte con células e positivas que e negativas (especificidad relativa), pero lo más frecuente es encontrar que reaccionan bien con todos los eritrocitos, salvo con células Rh nulo, por lo que presentan especificidad amplia para antígenos del sistema Rh. Ocasionalmente se han descrito autoanticuerpos asociados a otros sistemas sanguíneos como el sistema Kell.

Casos que cursan con PAD negativa pueden ser estudiados con técnicas de mayor sensibilidad como los geles y otras, o se explican por la presencia de anticuerpos de isotipo IgA.

La severidad de la enfermedad autoinmune se ha relacionado con ciertas propiedades de los autoanticuerpos, como título en el suero, avidez por los eritrocitos y capacidad de fijar el complemento, así como número y distribución de los antígenos en los glóbulos rojos.

Tratamiento

En pacientes con una enfermedad asociada a la AHAI, el tratamiento de ésta puede revertir el proceso hemolítico, aunque en adultos es infrecuente la remisión completa de la enfermedad. Además se requiere el uso de corticoesteroides, que actúan inhibiendo la síntesis de anticuerpos y la fagocitosis de hematíes sensibilizados. Los tratamientos adicionales utilizados en estos casos incluyen esplenectomía, terapia inmunosupresora, plasmaféresis, vinca alcaloides, danasol y IVIG.

La transfusión sanguínea como tratamiento, sólo debe ser considerada dependiendo del grado de hemólisis y de la habilidad del paciente para tolerar la anemia, ya que como se mencionó anteriormente, existen dificultades para encontrar unidades de glóbulos rojos compatibles. En el caso que la transfusión sea esencial para preservar la vida del paciente debido al compromiso cardíaco o de otro tipo derivado de la intensa anemia, es imprescindible transfundir para mejorar el transporte de oxígeno, hasta que la hemólisis aguda disminuya, o que las otras medidas terapéuticas logren beneficios más duraderos. La transfusión

no debe postergarse solo por incompatibilidad serológica, se recomienda transfundir sólo el volumen necesario, fresco, con la menor cantidad de plasma posible, y con un monitoreo constante del paciente durante y después de la transfusión.

La selección del donante de sangre apropiado es crítico en estos casos. Debe ser isogrupo, compatible a los aloanticuerpos que presente el paciente, compatible a los autoanticuerpos específicos. Si bien es cierto que la transfusión de unidades antigéno negativa cuando el autoanticuerpo presenta especificidad relativa es discutible, sería recomendable hacerlo para disminuir al máximo cualquier posible destrucción de las células transfundidas. En caso de autoanticuerpos inespecíficos, lo más importante es descartar la presencia de aloanticuerpos coexistentes por medio de métodos como dilución, autoabsorción, absorción diferencial, seguidas de la identificación de aloanticuerpos en los sueros libres de autoanticuerpos, con el fin de seleccionar los eritrocitos más inocuos para transfundir al paciente. En un 32-40% de los casos de AHAI se han detectado aloanticuerpos, y que aparecen después de transfusiones recientes. Es claro que estos aloanticuerpos no detectados pueden ser los causantes de un aumento de hemólisis posterior a la transfusión, y que puede erróneamente atribuirse a un aumento en la severidad de la AHAI.

En caso de urgencia transfusional, siempre existe posibilidad de realizar, al menos, algunas pruebas, pero es importante realizar con tiempo los estudios de laboratorio anteriormente señalados que son largos y engorrosos, para disponer de unidades lo más seguras posible en el momento de la transfusión.

1.3.2. AHAI por anticuerpos fríos

En el plasma de un alto porcentaje de individuos sanos es posible detectar autoanticuerpos fríos benignos, que reaccionan con mayor intensidad cerca de los 4° C y son activos sólo hasta temperaturas de 10 a 15°C, se encuentran en títulos inferiores a 64, por lo que no generan problemas serológicos ni clínicos. Sin embargo, estos autoanticuerpos se transforman en patológicos cuando aumenta su título, o aumentan el rango térmico de reactividad *in vitro* hasta 30°C o más.

Entre las AHAI por anticuerpos fríos se reconocen dos cuadros clínicos, Enfermedad de las aglutinas

frías y Hemoglobinuria paroxística a *frigore*.

a) Enfermedad de las aglutininas frías

La enfermedad por aglutininas frías (EAF) representa aproximadamente el 15% de todas las AHAI. Puede ser idiopática, afectando principalmente a adultos mayores con predominio en mujeres, o aparecer como una enfermedad crónica secundaria a neoplasias de células B como linfoma, macroglobulinemia de Waldenstrom, a leucemia linfocítica crónica, o como una condición transitoria secundaria a cuadros infecciosos por *Mycoplasma pneumoniae* o Mononucleosis infecciosa.

La especificidad de estos autoanticuerpos fríos es anti-I en un 90%, anti-i en un 8% de los casos, y excepcionalmente se han descrito otros antígenos involucrados. El isotipo encontrado es IgM.

Cuando el paciente se expone al frío ocurre la reacción antígeno anticuerpo principalmente en zonas del cuerpo expuestas (punta de los dedos de manos y pies, lóbulo de las orejas y punta de la nariz), donde la temperatura corporal puede fluctuar entre 28 y 31°C. La hemaglutinación obstruye la circulación capilar, causando entumecimiento, dolor y coloración azul de la piel; esta alteración circulatoria se conoce como acrocianosis o fenómeno de Raynaud, que en situaciones severas puede ocasionar gangrena de la zona afectada. El complejo antígeno anticuerpo formado fija y activa el sistema del complemento por la vía clásica, pudiendo producir una hemólisis directa de tipo intravascular. Sin embargo, cuando los glóbulos rojos vuelven a la circulación donde la temperatura corporal es mayor, los anticuerpos tienden a eluirse pero las fracciones del complemento permanecen opsonizando las células, induciendo su remoción por el SFM. Un tercer mecanismo de hemólisis menos importante, se genera por el trauma sufrido por las células cuando se aglutinan y ocluyen pequeños vasos sanguíneos periféricos.

La forma crónica se caracteriza por una anemia leve a moderada que depende básicamente de la habilidad del autoanticuerpo de activar el complemento. La forma secundaria a cuadros infecciosos, habitualmente se desencadena luego de 2 ó 3 semanas de iniciada la enfermedad y los signos más comunes son palidez e ictericia, mientras que la acrocianosis y la hemoglobinuria son infrecuentes.

Hallazgos de laboratorio

Hematológicos. Los valores de hemoglobina disminuyen moderadamente especialmente en periodos de invierno y climas fríos. El recuento de glóbulos rojos está artificialmente disminuido y la VCM está falsamente elevada produciendo un valor increíblemente alto de la CHCM, además como en todo cuadro hemolítico se observa reticulocitosis. Los glóbulos blancos y las plaquetas se mantienen normales en número y función. Dadas las características del anticuerpo involucrado es posible evidenciar aglutinación de los glóbulos rojos a temperatura ambiente, dificultando la preparación de los frotis y el trabajo de la muestra en contadores automáticos.

Bioquímicos. Los niveles de bilirrubina pueden estar levemente aumentados (no mayor a 3 mg/dL) al igual que la LDH.

Inmuno hematológicos. La PAD es positiva con suero antiglobulina humano poliespecífico o anti-complemento C3d, como consecuencia de las fracciones del complemento que permanecen sensibilizando las células. Una vez detectada la presencia de crioaglutininas, debe estudiarse su título que habitualmente supera la dilución 1/1000 cuando se incuba a 4°C, y la amplitud térmica del autoanticuerpo que puede fluctuar entre 0°-32°C. Generalmente, el rango térmico del autoanticuerpo predice en forma más certera que el título la patogenicidad del autoanticuerpo involucrado (ver capítulo 29).

En estos casos puede haber dificultad en la clasificación ABO y Rh, por la aglutinación espontánea de los GR del paciente a temperatura ambiente, mediada por anticuerpos IgM. Esta interferencia suele desaparecer si se trabaja estrictamente a 37°C.

La identificación de la especificidad del autoanticuerpo es solo una información adicional ya que no afecta el manejo clínico o transfusional del paciente. Por otra parte, es muy importante detectar la coexistencia de autoanticuerpos fríos y aloanticuerpos de importancia clínica, ya que estos últimos deben ser tomados en cuenta en la búsqueda de sangre compatible para una eventual transfusión, realizando una prueba cruzada a 37°C.

Tratamiento

Es importante investigar la presencia de linfoma antes de iniciar tratamiento de la EAF crónica,

ya que algunos agentes quimioterápicos pueden ser beneficiosos en pacientes con EAF secundarias. En la enfermedad idiopática no hay tratamiento específico, salvo que el paciente se mantenga en ambiente temperado. Dado que casi la totalidad de la IgM se encuentra en circulación, en caso de ser necesario puede realizarse plasmaféresis para retirar estas aglutininas frías. La transfusión sanguínea, la terapia con esteroides y la esplenectomía, sólo han mostrado efectividad en casos extremos y aislados.

Cuando el cuadro hemolítico es secundario a otra enfermedad, generalmente el cuadro es autolimitado y cede con el tratamiento de la patología de base.

b) Hemoglobinuria paroxística a frigore

La hemoglobineuria paroxística a frigore (EPF) es una enfermedad similar a la EAF, pero tiene una incidencia que no supera el 2%. En esta enfermedad los glóbulos rojos son hemolizados en el compartimiento intravascular por acción del autoanticuerpo llamado de Donath-Landsteiner. Este autoanticuerpo es una hemolisina bifásica de clase IgG, que se une a los eritrocitos del paciente después de la exposición al frío, activa la fijación del complemento, y cuando las células sensibilizadas llegan a zonas con mayor temperatura se gatilla la hemólisis intravascular, por medio de la generación del complejo de ataque a membrana, produciéndose como su nombre lo indica una hemoglobinuria paroxística o intermitente importante. La especificidad principal de esta hemolisina bifásica es para el antígeno P del sistema globósido (028), pero también se han descrito especificidades anti-i y anti-Pr.

La HPF es una anemia hemolítica aguda que aparece casi exclusivamente en niños y adultos jóvenes, generalmente es un problema transitorio. Puede tener una etiología idiopática y más frecuentemente ser secundaria a una variada gama de infecciones virales (citomegalovirus mononucleosis infecciosa, influenza, adenovirus, sarampión, entre otros), por *Mycoplasma pneumoniae* en niños y sífilis no tratada en adultos. El paciente, luego de la exposición al frío, presenta síntomas como fiebre, dolor en abdomen, espalda y extremidades, escalofríos, náuseas, vómitos, y hemoglobinuria significativa.

Hallazgos de laboratorio

Inmunoematológicos. Los más característicos son los hallazgos asociados con una hemólisis intravascular aguda. La morfología eritrocitaria es usualmente normal. La prueba de Donath-Landsteiner es positiva y permite pesquisar la hemolisina bifásica. La PAD es positiva si se realiza precozmente y usando suero antiglobulina específico para complemento. Si se realiza una incubación previa de la muestra a 4°C y lavados con solución salina fría podría obtenerse una reacción positiva con suero anti-IgG. La PAI también puede ser positiva si se realiza a 4°C, usando para los lavados solución salina fría al igual que en el caso anterior (ver capítulo 29).

Tratamiento

En los cuadros secundarios a infecciones es necesario tratar la enfermedad de base, mientras que en los cuadros idiopáticos, lo más adecuado es la prevención al evitar la exposición al frío. Dado que las crisis son autolimitadas habitualmente no requieren tratamiento, pero en situaciones extremas se ha recurrido al uso de plasmaféresis, esteroides y transfusión sanguínea. En este último caso, idealmente se requeriría contar con glóbulos rojos de fenotipo p (1 en 200.000 unidades), es muy difícil disponer de ese fenotipo, por lo que hay que transfundir al paciente en un ambiente temperado y con monitoreo constante.

La tabla 8-10 muestra una comparación de los hallazgos serológicos que se presentan en los diferentes tipos de AHAI descritas.

Tabla 8-10. Hallazgos serológicos en Anemias hemolíticas autoinmunes

	AHAI por Ac calientes	AHAI por Ac fríos	Hemoglobinuria paroxística a frigore
Anticuerpo	IgG	IgM	IgG bifásica
PAI	Reactiva (80%)	No reactiva Método precalentado	No reactiva
PAD	IgG IgG+C3d C3d Negativo	(67%) (24%) (7%) (1%)	C3d C3d
Eluado	Panaglutininas	No reactivo	No reactivo

AHAI, Anemia hemolítica autoinmune; Ac, anticuerpos

1.3.3. AHAI por mezcla de autoanticuerpos fríos y calientes, o tipo mixto

Un número significativo de pacientes (7 - 8%) que tienen AHAI por anticuerpos calientes, tienen además aglutininas frías en su suero, que están en bajos títulos y no son activas a temperaturas de 30°C o superior. Sin embargo, hay un grupo de pacientes que presentan anticuerpos fríos con altos títulos y con un rango térmico que llega a los 37°C. Los signos y

síntomas clínicos que ellos manifiestan, se deben a una hemólisis severa sin necesidad de exposición al frío. Se asocia a desórdenes linfoproliferativos, LES o también puede ser de etiología idiopática.

Los hallazgos de laboratorio muestran una PAD positiva tanto por IgG como por complemento. Los eluados muestran anticuerpos IgG inespecíficos y aglutininas frías con especificidad anti I.

1.3.4. AHAI inducida por fármacos

Los medicamentos pueden causar diversos efectos colaterales, dentro de los cuales está el inducir producción anormal de anticuerpos que provocan la destrucción inmune de glóbulos rojos y otras células. La anemia hemolítica inmune que sufren algunos pacientes tras la administración de ciertos fármacos tiene una incidencia baja, constituyendo entre el 12 a 18% de los casos de AHAI, cuando se usaban altas dosis de penicilina y alfa metildopa.

Es importante determinar acuciosamente los fármacos que ingiere un paciente que presenta hemólisis sin una explicación aparente, en busca de una causa etiológica de esta situación.

Se han descrito tres mecanismos principales por los cuales las drogas logran inducir la formación de los anticuerpos asociados a AHAI, cuyas características principales se resumen en la tabla 8-11, (a) Mecanismo de adsorción de la droga o hapteno (b) Mecanismo de complejo inmune; c) Mecanismo de autoanticuerpos. Recientemente se ha propuesto que todas las citopenias inmunes inducidas por drogas se inician con la interacción de la droga o alguno de sus metabolitos, con componentes de la membrana del glóbulo rojo lo que lleva a la formación de una estructura antigénica que produce anticuerpos dependientes o independientes de la droga.

Tabla 8-11. Hallazgos serológicos en AHAI por drogas

Clasificación	Adsorción de la droga (hapteno)	Complejo inmune	Autoanticuerpo
Tipo de droga	Penicilina Cefalosporinas Estreptomycinina	Quinidina	Metildopa
PAI	No reactiva excepto que GR se recubran con la droga	Reactiva en presencia de la droga	Reactiva en ausencia de la droga
PAD	IgG IgG+C3d a veces	C3d	IgG
Eluado	No reactivo, excepto que GR se recubran con la droga	No reactivo aún en presencia de la droga	Reactivo en ausencia de la droga

a) Adsorción de droga (hapteno)

El fármaco o alguno de sus metabolitos se fija fuerte e inespecíficamente a la membrana del eritrocito e induce la producción de anticuerpos anti-droga, los cuales se unen a la droga sin interactuar directamente con el glóbulo rojo. Los anticuerpos son usualmente de tipo IgG, reactivos en caliente y no activadores del complemento, por lo que las células sensibilizadas son secuestradas por el SFM, con lisis extravascular.

Este mecanismo se presenta en pacientes que han recibido altas dosis del fármaco. La droga

más característica es la penicilina; se ha descrito también en cefalosporinas, eritromicina y tetraciclinas.

Hallazgos de laboratorio. Esta anemia cursa con una PAD positiva, el suero del paciente y el eluado son no reactivos, ya que se requiere células cubiertas con la droga para que se produzca aglutinación. Dado que personas sanas pueden tener títulos bajos de anticuerpos anti-penicilina, es necesario demostrar presencia de títulos altos para implicar a la droga como causa de la anemia hemolítica. La PAD permanece positiva varias semanas después y puede observarse un patrón de campo mixto

en la PAD producto de que sólo algunas células están cubiertas con la droga (tabla 8-12) (ver capítulo 29).

b) Complejo inmune/neoantígenos

La primera droga que se relacionó con este mecanismo fue el estibofeno, posteriormente también se han descrito otros fármacos, entre ellos: quinidina, quinina, cefotaxima, clorambucil, clorpromacina, isoniacida, rifampicina, sulfonamidas, cefalosporina, tetraciclina y tiazidas, entre otros.

El mecanismo fisiopatológico inicialmente descrito planteaba que el fármaco se une a proteínas plasmáticas transportadoras originando un inmunógeno que estimula la formación de un anticuerpo anti-droga, éste reacciona con la droga y se forma un complejo inmune que se une inespecíficamente al glóbulo rojo (espectador inocente) por medio de la región Fab del anticuerpo, conformando un complejo trimolecular (anticuerpo-droga-eritrocito) capaz de activar el complemento, con la consiguiente hemólisis intravascular. Es necesario una pequeña cantidad de droga para gatillar este mecanismo en pacientes que tienen anticuerpos anti droga ya formados.

Recientemente han surgido evidencias para un modelo que plantea la formación de un neoantígeno, es decir la droga interactuaría de forma no covalente con componentes de membrana formando un determinante antigénico nuevo (constituido por la droga y componentes de la membrana), este neoantígeno estimularía al sistema inmune, se generarían los autoanticuerpos que serían capaces de fijar y activar el complemento con la consiguiente hemólisis intravascular.

Hallazgos de laboratorio. La hemólisis intravascular severa induce hemoglobinuria, hemoglobinemia que frecuentemente culmina con falla renal. Las pruebas de coagulación como el TTPA, están prolongadas producto del consumo del factor VIII y fibrinógeno. La PAD es positiva sólo por la presencia del complemento, el eluado es no reactivo principalmente porque las inmunoglobulinas se han perdido en los lavados. *In vitro*, el suero del paciente reacciona con los glóbulos rojos solo en presencia de la droga o su metabolito (ver capítulo 29).

El tratamiento consiste en la suspensión

inmediata de la droga, acompañado de la administración de esteroides sólo si la hemólisis es muy severa.

c) Formación de autoanticuerpos

En este mecanismo la droga induce la formación de autoanticuerpos IgG que reconocen determinantes antigénicos eritrocitarios (principalmente antígenos del sistema Rh), sin necesidad de que el fármaco esté unido a los hematíes. El autoanticuerpo se produce después de varios meses de terapia continua, por lo que la hemólisis puede presentarse luego de 18 semanas a 4 años de iniciada una terapia. La droga más representativa de este mecanismo es la alfa-metildopa, pero también se incluyen L-dopa, procainamida y drogas antiinflamatorias no esteroidales.

El mecanismo por el cual la droga induce la formación de autoanticuerpos no está dilucidado, se plantea que la droga alteraría directamente al sistema inmune inhibiendo la función de los linfocitos T supresores, o alterando antígenos propios del GR, sin embargo, no todas las investigaciones concuerdan con estos datos, por lo que se requieren más estudios al respecto.

Hallazgos de laboratorio. Los estudios hematológicos denotan disminución de la hemoglobina con reticulocitosis y esferocitosis. Las características serológicas de este tipo de anemia son diferentes a las descritas previamente ya que la PAD es positiva con suero antiglobulina poliespecífico y anti-IgG. El eluado y el suero del paciente son reactivos con glóbulos rojos normales en ausencia de la droga (ver capítulo 29).

El tratamiento habitual consiste, al igual que en las otras situaciones, en la suspensión de la droga. En caso que sea necesario transfundir, deben realizarse las pruebas pretransfusionales de rutina para determinar grupo ABO y Rh, detección de aloanticuerpos y prueba cruzada, los que no debieran presentar mayores interferencias y dificultades en su realización.

2. ANEMIAS HEMOLÍTICAS NO INMUNES

Las anemias hemolíticas extracorpúsculares no mediadas por mecanismos inmunes corresponden a las asociadas a infecciones, agentes físicos y químicos.

2.1. Agentes infecciosos

2.1.1. Parasitosis

El Paludismo y la Babesiosis son las únicas dos parasitosis que producen anemia hemolítica adquirida.

a) Paludismo o Malaria

Sus agentes causales son protozoos del género Plasmodium, cuya transmisión natural en el huésped humano son mosquitos hematófagos del género Anopheles.

Se ha logrado erradicar el Paludismo en algunos países de territorios templados, pero en muchos países tropicales y subtropicales, todavía sigue siendo endémica, provocando un elevado número de enfermos y casos fatales.

Existen 4 especies de Plasmodium que provocan el Paludismo en el ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. El *P. falciparum* provoca la forma más grave de malaria humana, la llamada terciana maligna; el *P. vivax* es la especie más frecuente.

La infección humana ocurre cuando un mosquito infectado pica para alimentarse de sangre. Es interesante anotar que en estos insectos sólo las hembras son hematófagas y, si están infectados inyectan **esporozoitos** al torrente sanguíneo de la persona atacada. Estos parásitos delgados y móviles permanecen poco tiempo, entre 30 y 60 minutos en circulación, luego de lo cual penetran a las células parenquimatosas hepáticas, iniciando el ciclo exoeritrocítico (fuera de la circulación sanguínea). Dentro de las células hepáticas, el parásito se multiplica por división asexual o de esquizogonia, tras lo cual, después de 8 a 15 días, según la especie que se trate, da origen a miles de **merozoitos**. Estas formas parasitarias son liberadas a la sangre, por estallido de las células hepáticas parasitadas y algunas de ellas invaden los glóbulos rojos, iniciando el ciclo eritrocitario. Dentro del glóbulo rojo el parásito se multiplica nuevamente por esquizogonia, lo cual se completa entre 44 a 49 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* o *P. ovale*, provocando una periodicidad clínica de fiebre terciana y cerca de 72 horas para *P. malariae*, con patrón cuaternario. Luego de progresivas invasiones a eritrocitos, se inicia la fase sexual de esta parasitosis. En ésta, los merozoitos entran a los eritrocitos, pero ya no se multiplican y se transforman en formas masculinas o femeninas,

llamadas micro y macrogametocitos. Sólo cuando han alcanzado la condición de gametocitos maduros son infecciosos para el mosquito Anopheles. En el estómago del insecto, los gametocitos masculinos y femeninos maduran hacia los gametos, proceso en el cual los gametos masculinos (ocho microgametos) salen del microgametocito buscando el gameto femenino por un proceso llamado exflagelación. Cuando la fusión de ambos gametos, masculino y femenino se produce da origen a un cigoto vermiforme y móvil que es el oocineto, el cual atraviesa la pared del intestino del mosquito, hasta llegar a la membrana basal, desarrollando allí un oocisto esférico. Aquí, el oocisto crece debido al desarrollo de cientos y miles de esporozoitos hasta que revientan y los esporozoitos son liberados al hemocele del mosquito. Pocas horas después, gran parte de los esporozoitos se concentran en las glándulas salivales, y así constituyen la masa del inóculo infectante del plasmodio para un nuevo huésped humano cuando el mosquito pica.

Los parásitos que invaden los eritrocitos son los grandes responsables de las alteraciones patológicas y fisiopatológicas del Paludismo. El desarrollo de los esquizontes en los eritrocitos, da origen a pigmentos intracelulares característicos que se observan en el interior de las células eritrocitarias en el frotis sanguíneo.

El *P. vivax* y *P. ovale* en la etapa eritrocitaria asexual se ubican de preferencia en los reticulocitos, mientras que *P. malariae* parasita los eritrocitos viejos circulantes.

Alteraciones hematológicas y diagnóstico. Es importante destacar que, tanto los eritrocitos parasitados como aquellos que no lo están, presentan fragilidad osmótica alterada, lo cual trae como consecuencia hemólisis intra y extravascular.

La eritropoyesis se altera por la infección parasitaria; ésta desorganiza la liberación de eritrocitos jóvenes por la médula ósea, lo que se refleja en los frotis sanguíneos, donde destacan las células de "cambio".

Cuando el Paludismo es producido por *P. vivax*, *ovale* o *malariae*, las secuelas patológicas más frecuentes son anemia de grado moderado y esplenomegalia. Las razones son variadas; por una parte son la consecuencia tanto de la hemólisis como de la baja de producción de eritrocitos. Por otra dependen de procesos

inmunológicos, e incluso se postula que puede desarrollarse autoinmunidad. Además, se presenta activación del sistema del complemento con consumo de los componentes de la vía clásica.

En el Paludismo por *P. falciparum*, si individuos que no han sido inmunizados, no reciben tratamiento, se produce hemólisis masiva.

El diagnóstico de certeza del Paludismo, se realiza observando los parásitos en frotis de sangre o en gota gruesa. Es preferible efectuar frotis de sangre delgados, teñidos con Giemsa o Wright, para mejor determinación de la especie. Algunos prefieren los preparados en gota gruesa para detectar los parásitos.

En la lectura del frotis se debe tener en cuenta que, en algunas ocasiones, las plaquetas se sobreponen en los eritrocitos lo cual puede ser confundido con plasmodio. Los parásitos presentan una cromatina púrpura que no está presente en las plaquetas.

Se recomienda tomar las muestras y examinar los frotis en cualquier momento, a intervalos de varios días, debido a que las infecciones no presentan una sincronía tan estricta, pues pueden existir etapas sexuales tardías.

Los profesionales con experiencia en el diagnóstico de laboratorio de Paludismo, aconsejan examinar los frotis de sangre como mínimo durante 15 minutos y la gota gruesa por 5 minutos.

En relación a las pruebas serológicas que se cuentan hoy en día, no muestran gran utilidad en la infección aguda, pero sí ayudan a detectar la infección en individuos que vuelven de áreas endémicas. Así como también de tamiz en donantes de sangre. Dentro de las numerosas técnicas, la más usada es la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). La técnica basada en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha dado resultados bastante satisfactorios, que a futuro podría tener bastante utilidad.

b) Babesiosis (Piroplasmosis)

Las garrapatas que parasitan animales domésticos y salvajes son los vectores biológicos que transmiten los protozoos intraeritrocitarios del género *Babesia*. Raramente se puede desarrollar la infección en el huésped humano, lo que se caracteriza por fiebre, anemia hemolítica, ictericia, hemoglobinuria e insuficiencia renal.

Los parásitos *Babesia* se presentan de varias formas al interior de los eritrocitos: desde formas redondeadas u ovals y pequeñas, hasta formas de anillos que se pueden confundir con las formas anulares del Paludismo.

Las garrapatas duras del género *Ixodidae*, son las únicas reconocidas como vectores naturales de la Babesiosis. Lo usual, es que la garrapata al alimentarse de sangre del animal, adquiere el parásito desde un huésped animal infectado y éste se multiplica y se distribuye por todo el cuerpo del vector, y pasa al humano cuando este huésped es atacado por la garrapata infectada.

Cabe también la posibilidad, que la Babesiosis sea transferida al humano por transfusión sanguínea.

Una vez que la *Babesia* entra al hospedero vertebrado, aparentemente invade al eritrocito directamente, sin tener una etapa previa hepática (exoeritrocitario) como sucede en el Paludismo.

El parásito se reproduce por simple gemación dentro del eritrocito infectado, hasta que éste se rompe y así las *Babesias* invaden otros eritrocitos y así se repite el ciclo.

La manifestación patológica más importante de la Piroplasmosis humana es consecuencia de la anemia hemolítica producida.

Alteraciones hematológicas y diagnóstico.

Habitualmente el diagnóstico de esta infección se realiza por identificación directa del parásito dentro del eritrocito, mediante frotis delgado de sangre y por gota gruesa, ambos coloreados con Giemsa. Preferentemente aparecen las forma anulares pequeños de *B. microti*, que difícilmente se pueden diferenciar de los trofozoitos juveniles de *P. falciparum*. Las pruebas serológicas no son satisfactorias para reemplazar los frotis de sangre.

2.1.2. Infección bacteriana

b) Sepsis clostridial

Es producida por el *Clostridium perfringens* y ocurre después de un aborto séptico o en asociación con enfermedad del árbol biliar, infección de heridas traumáticas, cáncer, leucemia, etc.

Frecuentemente la anemia hemolítica es fatal, ya que la hemólisis puede ser rápida y masiva.

Probablemente en la hemólisis participan toxinas clostridiales que atacan los lípidos de la membrana. El diagnóstico se sospecha cuando se presenta fiebre, ictericia y hemólisis intravascular. Se confirma con cultivos.

2.2. Venenos

2.2.1. Venenos de arañas

Todas las arañas producen veneno, pero solo algunas son peligrosas para el hombre, estas últimas son aquellas que tienen estructuras bucales que penetren la piel y que permiten inyectar un veneno patógeno. Los géneros más peligrosos para el ser humano son *Loxosceles* y *Latrodectus*.

Loxosceles laeta o más bien conocida como “araña de los rincones” es una de las dos arañas venenosas que existen en Chile, mide aproximadamente un centímetro y es de color café pardusca.

Esta araña es de carácter tímido y de hábitos nocturnos. Afortunadamente en Chile los accidentes por mordedura de esta araña son muy infrecuentes considerando que se convive con ella quizá sin saberlo; ha sido encontrada en un 41% de las viviendas urbanas y 24% de las viviendas rurales, según estudios hechos en el año 1980 en la zona central de Chile.

Loxosceles laeta posee uno de los venenos más poderosos del mundo, considerando el tamaño de esta araña. El cuadro clínico que provoca se llama Loxoscelismo y puede ser mortal en algunos casos. La mordedura de araña ocurre sólo en defensa propia. Puede acontecer durante todo el año, pero es más frecuente en primavera y verano. Generalmente sucede al comprimirla contra la piel durante la noche cuando la persona duerme (38%) o al vestirse (32%) con ropa colgada por largo tiempo en la muralla o en armarios. La mordedura es frecuente en cara y extremidades. La araña es vista en un 60% de los casos e identificada en un 13%.

Los cuadros producidos por la mordedura de las arañas del género *Loxosceles* se conoce como loxoscelismo y adopta dos formas clínicas, Loxoscelismo cutáneo y Loxoscelismo cutáneo- visceral.

El **Loxoscelismo cutáneo** ocurre en aproximadamente un 90% de los casos, es habitualmente de comienzo brusco y en 3/4 de los casos existe dolor, prurito local o dolor

indefinido; en el 1/4 restante se presenta como aumento de volumen. En el transcurso de las horas adquiere características de dolor franco y creciente. Existen dos tipos de loxoscelismo cutáneo: el necrótico (más frecuente) y el edematoso (raro).

El **Loxoscelismo cutáneo-visceral** es la complicación más seria del Loxoscelismo, con un 25% de mortalidad, y se da en el 15% de los casos; es grave y de alta letalidad si no es tratado. Se inicia de manera similar al Loxoscelismo cutáneo puro, pero alrededor de las 12-24 hrs. posteriores a la mordedura, se inician síntomas, signos y complicaciones derivadas principalmente de una hemólisis intravascular masiva: fiebre alta y sostenida, anemia violenta y progresiva, ictericia, hematuria, hemoglobinuria que pueden conducir a insuficiencia renal (nefrosis hemoglobinúrica), crisis hipertensivas, arritmias. El paciente se agrava rápidamente, aparece compromiso sensorial progresivo, que puede llegar a la inconsciencia, coma y muerte. Los exámenes de laboratorio muestran: anemia, trombocitopenia, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) aumentados, compromiso hepático, hematuria y hemoglobinuria.

Aspectos moleculares. El veneno de estas arañas es claro y viscoso, contiene esterases, fosfatasas alcalinas, y proteasas, pero lo más importante es la esfingomielinasa D, que es el factor de necrosis dérmica más importante, ya que altera las membranas celulares, activa mecanismos de inflamación, induciendo la quimiotaxis de neutrófilos, activa la vía de complemento, causa trombosis vascular local y reacciones inmunológicas.

El uso de la antitoxina es en muchos casos poco efectivo o causa reacciones alérgicas a la inmunoglobulina antitoxina del animal en donde fue preparado el suero. Por esto, se han hecho numerosos estudios buscando el mecanismo molecular en donde se gatilla el proceso de hemólisis, para poder idear algún método que permita detener la consecuencia más grave de Loxoscelismo que es esta anemia fulminante que puede llevar a la muerte.

El veneno de *loxosceles* presenta 2 proteínas muy homólogas con actividad esfingomielinasa llamadas P1 y P2 que producen dermonecrosis en animales de experimentación y en eritrocitos humanos induce *in vitro*, hemólisis mediada por complemento. Otras dos proteínas homólogas

denominadas P3 y P4 carecen de actividad.

La hemólisis es dependiente del complemento, P1 y P2 no inducen hemólisis directamente, pero hacen a los eritrocitos susceptibles a lisis por complemento. *In vivo* existe una alta expresión de reguladores del complemento (CR1, DAF, CD59, entre otros) por lo que se creería que las toxinas de loxosceles estarían afectando a estos reguladores y así la célula sería más sensible a la acción del complemento.

El veneno de loxosceles produce una hendidura en el dominio extracelular de las glicoporinas del glóbulo rojo dando origen a nuevos epítomos en donde actuaría el complemento, no afectando en ninguna forma a CR1, DAF y CD59. Las glicoforinas contienen ácido siálico en su estructura; si se emplean neuraminidasas para sacar el ácido siálico de estas proteínas, se obtienen glóbulos rojos sensibles al complemento por lo que se concluyó que las glicoforinas ejercen un papel fundamental en la protección contra la acción del complemento.

Las toxinas no se unen a la glicoforina purificada, por lo tanto la hendidura causada no es una acción proteolítica directa de ellas, sino que existe otro componente que está desencadenando este cambio conformacional. Existe una correlación de estos hechos. P2 se incorpora a la membrana dependiente de la dosis, hace que disminuyan las glicoforinas y aumenta la acción del complemento.

Las toxinas participan en forma indirecta en la hemólisis; existen metaloproteínas que causan la hendidura de las glicoforinas, las toxinas serían activadores de estas metaloproteinasas.

La glicoforina C también se ve afectada, esta proteína se expresa en una amplia gama de células y aparece más tempranamente en la maduración, lo que explicaría los efectos locales de la dermonecrosis causada.

La identificación del mecanismo de inducción de la susceptibilidad a lisis por complemento después del envenenamiento abre la posibilidad del desarrollo de una estrategia terapéutica más eficaz. Al descubrir a las metaloproteinasas como las desencadenantes del proceso hemolítico, se podría elaborar un tratamiento mejor y más efectivo que la antitoxina que se usa actualmente, dada la disponibilidad de drogas inhibitorias de estas enzimas. El mecanismo por el cual el veneno de araña induce la activación de metaloproteinasas se desconoce.

Tratamiento. Actualmente el tratamiento incluye: Limpieza del área afectada, frío local, elevación y posterior inmovilización laxa de los miembros afectados; para el prurito se ocupa antihistamínicos H1; analgésicos; dapsona, colchicina (sólo en cutáneos muy graves), corticoides (discutible), suero antiloxosceles 1-2 ampollas (esto sólo neutraliza la toxina libre en las 6 primeras horas después de la picadura, pero el riesgo es un “shock” anafiláctico, por la preparación que tiene el suero en animales).

Se deja que evolucione la placa, la escisión quirúrgica inmediata de la herida puede ser perjudicial; el deshibridamiento y el injerto cutáneo sólo se reservan para cuando remiten los signos de inflamación aguda.

Dependiendo del contexto del accidente y del paciente, se debe considerar la administración de antibióticos y profilaxis antitetánica.

Se debe evaluar función renal, electrolitos plasmáticos (especialmente el K⁺), complicaciones cardiovasculares, alteraciones inmunológicas y endocrinas.

2.2.2. Veneno de serpientes

Una de las serpientes que puede llegar a causar anemia hemolítica es la Cobra. Es poco frecuente, ya que solo se presenta cuando la mordedura se produce directamente sobre un vaso sanguíneo, inyectando el veneno directamente a la circulación. Los pacientes pueden presentar anemia grave (Hb de 3-5 g/dl), reticulocitosis, leucocitosis, hiperbilirrubinemia, esferocitosis, hemoglobinemia y hemoglobinuria.

Otras serpientes que pueden causar anemia hemolítica son la Marrón Rey de Australia y la Víbora de la Alfombra de Túnez.

2.2.3. Veneno de abejas

Las anemias hemolíticas por veneno de abejas son muy raras. Se conoce el caso de un niño que fue picado unas 200-300 veces, desarrollando una hemólisis intravascular que le provocó la muerte.

2.3. Fármacos oxidantes

Ciertos fármacos pueden denaturar por oxidación a la Hb; además pueden actuar con el oxígeno molecular formando radicales libres y peróxidos que denaturan la Hb y dañan la membrana del glóbulo rojo.

Se pueden producir anemias en sujetos normales, observándose su aparición en 1-2 semanas después de administrar el medicamento.

2.4. Agentes físicos

2.4.1. Quemaduras

Se produce una hemólisis intravascular con presencia de esquistocitos, esferocitos y crenocitos. Un paciente que presenta un 15% de superficie corporal quemada puede presentar hemoglobinuria moderada a marcada, en paciente con 20% de superficie corporal quemada y con quemaduras de tercer grado, la hemólisis puede ocurrir entre las 24-48 horas causando destrucción de un 30% de la masa globular.

La hemolisis ocurre porque el glóbulo rojo no soporta temperaturas mayores a los 47°C. Se produce fragmentación de las células, desarrollo de esferocitos por reducción de la elasticidad de la membrana. El tratamiento que se indica es transfusión de concentrado de glóbulos rojos.

2.4.2. Radiaciones ionizantes

Estudios *in vitro* muestran que el glóbulo rojo resiste dosis en el rango de 20.000 Rad. Para producir efectos letales. *In vivo*, ratones irradiados presentan tendencia a aglutinación espontánea de los eritrocitos.

Sin embargo, no existen claras evidencias que las radiaciones ionizantes induzcan a anemia hemolítica en humanos.

En laboratorio podemos observar: anemia hemolítica, reticulocitos, hipohaptoglobinemia, hiperbilirrubinemia, hiperplasia eritroide y en casos severos puede encontrarse hemoglobinemia y hemoglobinuria. Entre las características morfológicas se puede observar: Cuerpos de Heinz, esquistocitos, esferocitos, eliptocitos y crenocitos.

El proceso hemolítico desaparece 1-3 semanas de discontinuar el tratamiento.

2.5. Productos químicos

2.5.1. Arsénico

Hidruro arsénico, es un gas tóxico, que se genera por la reducción metálica del arsénico

en productos metálicos, se asocia su envenenamiento con el uso de ácidos (más frecuente), extracción y refinación de metales que contienen arsénico como impureza (galvanizado y soldado).

Las manifestaciones clínicas aparecen a las 2-24 hrs. y son: dolor abdominal, náuseas, vómitos, orina de color oscura, ictericia, anemia, reticulocitos, leucocitosis, hemoglobinuria, incidente renal agudo y a veces se presenta oliguria.

La anemia hemolítica aparece porque la hemoglobina es capaz de fijar la arsina dentro del glóbulo rojo, lo que lleva a una lisis de la célula, quizás como consecuencia de la acción de los compuestos formados en la oxidación de la arsina.

2.5.2. Cobre

La anemia asociada al Cu^{+2} puede deberse a: (a) Oxidación de la Hb, (b) Inactivación en la vía glicolítica, (c) Daño de la membrana celular y (d) Aumento de la fragilidad osmótica

Se asocia la anemia hemolítica como una primera manifestación de la enfermedad de Wilson, enfermedad hereditaria en la que se acumula cobre en los tejidos.

2.5.3. Anhídrido trimetílico

Es causante de anemia hemolítica y síntomas respiratorios. Anhídrido trimetílico se utiliza en la industria de marcos y manufactura de plásticos. La causa de hemolisis es poco conocida, pero se cree que mecanismos inmunológicos pueden jugar algún papel.

LECTURAS SUGERIDAS

Anemias hemolíticas intracorpúsculares

a) Membranopatías

Alloisio, N. "Analysis of the red cell membrane in a family with hereditary elliptocytosis—total or partial of protein 4.1". *Hum Genet*, 59(1):68-71, 1981.

Amador, M., Pérez, S., Estrada, F., Ramos, M., García S., Carrillo-Farga, J. "Las eliptocitosis hereditarias. Correlación morfológica-molecular". *Revista Mexicana de patología clínica* 49 (4): 185-202, 2002.

- Aramburu, N. "Esferocitosis hereditaria", *An Esp*; 52 (6): 569-72, 2000.
- Carrera, A. "Enfoque diagnóstico de las anemias hemolíticas", *Haematología*; 83: 3-17, 1998.
- Del Giudice E.M., Nobili, B., Francese, M., Durso, L., Iolascon, A., Eber, S. "Clinical and molecular evaluation of non-dominant hereditary spherocytosis". *Brit jour haemat* 112:42-47, 2001.
- Galanello, R. "A thalassemic child becomes adult", *Rev Clin Exp Hematol*. 7(1):4-21, 2003.
- Harteveld, C.L. "The Dutch IVS-I-116 (A → G) (alpha2) thalassemia mutation induces Hb H inclusion bodies when found in combination with the -alpha3.7 deletion defect". *Hemoglobin*, 27(1):49-51, 2003.
- Huisman, T.H. "Hb E and alpha-thalassemia; variability in the assembly of beta E chain containing tetramers». *Hemoglobin*, 21(3):227-36, 1997.
- Iolascon, A. "Red blood cell membrane defects Esferocitosis", *Rev Clin Exp Hematol*. 7(1):22-56, 2003.
- King, M., Behrens, J., Rogers, C., Flynn, C., Greenwood, D., "Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia". *Brit Jour Haemat* 111:924-933, 2000.
- Kinoshita, T., Inoue, N., Takeda, J. "Role of phosphatidylinositol-linked proteins in paroxysmal nocturne hemoglobinuria pathogenesis". *Annu Rev Med* 1996. 47:1.0
- Mootien, S., Gallagher, P. "Hereditary pyropoikilocytosis and the spectrin St. Claude allele (Letter)". *British Journal of Haematology* 124: (251-254), 2004.
- Muro, A., Marro, M., Gajovic, S., Porro, P., Luzzatto, L., Baralle, F. "Mild spherocytic hereditary elliptocytosis and altered levels of a- and g-adducins in b-adducin-deficient mice". *Blood* 95 (12): 3978-3985, 2000.
- Pavón, M., Estrada, M., Fernández, N., Sánchez, M., Vergara, R., González, A., Vilorio, P., Svarch, E. "Efectividad de la esplenectomía parcial en el tratamiento de la esferocitosis hereditaria". *Revista de Investigación Clínica* 52(3): 229-233, 2000.
- Peters, LL., Swearigen, R.A., Andersen, S.G., Gwynn, B, Lambert, A.J., Lux S.E., Churchill, G.A. "Identification of quantitative trait loci that modify the severity of hereditary spherocytosis in wan, a new mouse model of band-3 deficiency". *Blood* 103(8): 3233-40.
- Piedras, J., López-Karpovitch, X. "Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidylinositol - anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size". *Cytometry*, 2000. 42:234-238.
- Ruiz-Argüelles, G.J., Ramírez-Cisneros, F.J., Ruiz-Argüelles, A., Pérez-Romano, B., Morales-Aceves, R. "Deficiencia de proteínas de superficie ancladas por glucosilfosfatidilinositol en células de pacientes mestizos mexicanos con hipoplasia medular". *Rev Invest Clín (Méx)* 1999. 51:5-9
- Sánchez-López Y.J., Camacho-Torres, A.L., Magaña, M.T., Ibarra, B., Perea-Díaz, F. "Fundamentos biológicos, bioquímicos y genéticos de la esferocitosis hereditaria". *Bol Med Hosp Infant*. 60:431-445, 2003.
- Shafgat, S, Vega R. "Hereditary Spherocytosis". *Pediatrics in Review* 25:168-172, 2000.
- Streichman, S., Gescheidt, Y. "Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis". *Am J Hematol* 1998. 58: 206
- Streichman, S., Kahana, E., Tatarsky, I. "Hypertonic cryohemolysis of pathologic red blood cells". *Am J Hematol* 1985. 20: 373

b) Enzimopatías

Arese, P., De Fiora, A. "Pathophysiology of Hemolysis in Glucosa-6-phosphate dehydrogenase". *Seminars of Hematology* 27:1-40, 1990.

Beutler, E. "G6PD Populations genetics and clinical manifestations". *Blood Reviews* 10:45-52, 1996.

Beutler, E. Glucose 6 phosphate deficiency, ¿What is Favism?. 2004. <http://www.favism.org/favism>

Billson, V.; Clague, A.; Glucose 6 phosphate deficiency. 30 septiembre 2003. http://www.rcpa.edu.au/pathman/g6pdc_def.htm.

Billson, V.; Claugue, A. Pyruvate kinase – red cell. 30 septiembre 2003. <http://www.rcpa.edu.au/pathman/pyruvat2.htm>.

Carreiro, I. Deficiencia P⁵ nucleotidasa. 2003. http://www.biopsicología.net/fichas/page_7496.html. 22 marzo 2004.

Dal Borgo, P., Silva, R., Cavieres, M. 2000. “Dos nuevas mutaciones de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, G6PD Santiago y G6PD Calvo Mackenna”. *Revista chilena de pediatría*. 71(5): 370-377.

Demina, A., Varnsghehek, K., Barbot, J., Forman, L., Beutler, E. 1998. “Six previously undescribed pyruvate kinase mutations causing enzyme deficiency”. *Blood* 92(2): 647-652.

Glader, B., Lukens, N. 1999. **Wintrobe´s Clinical Hematology. Hereditary hemolytic anemias associated with abnormalities of erythrocyte glycolysis and nucleotide metabolism**. 10^o edición. pp: 1161 – 1175.

Glader, B., Lukens, N. 1999. **Wintrobe´s Clinical Hematology. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of hexose monophosphate shunt and glutathione metabolism**. 10^o edición. pp: 117 – 1189.

Jhonson, R., Goyette, G. Ravindranath, Y., Ho, Y. 2002. “Oxidation of glutathione peroxidase-deficient red cells by organic peroxides”. *Blood* 100(4): 1515-1516.

Marinaki, A., Escuredo, E., Duley, J., Simmonds, H., Amici, A., Naponelli, V., Magni, G., Seip, M., Ben-Bassat, I., Harley, E., Thein, S., Rees, D., “Genetic basis of hemolytic anemia caused by pyrimidine 5' nucleotidase deficiency”. *Blood*. 2001. 97(11): 3327-3332.

Mayayo, C., Pintado, T., Echeverría, V. 2001. “Protocolo diagnóstico de la anemia hemolítica. Programa de educación médica continuada (EMC) en medicina asistencial”. *Medicine*. 8(51): 2719 – 2721.

Saens-Sabrafen, J. 2001. **Hematología Clínica. Introducción al estudio de la patología eritrocitaria. Bases bioquímicas y fisiológicas**. 4^o edición. pp 75-77.

Stiene-Martin, E.A., Lotspeich-Steininger, Ch., Koepke, J. 1998. **Clinical hematology, principles, procedures, correlations**.

Hereditary anemias of increased destruction. 2^o edición. pp 252 – 267.

Van Wijk, R., van Salinge, W., Nerlov, C., Beutler, E., Gelbart, T., Rijksen, G., Nielsen, F. 2003. “Disruption of a novel regulatory element in the erythroid-specific promoter of the human PKLR gene causes severe pyruvate kinase deficiency”. *Blood* 101(4): 1596-1602.

Vives Corrons, J.L. 2001. **Hematología Clínica. Anemias hemolíticas. Aspectos generales. Anemia hemolíticas congénitas**. 4^o edición. pp 151-159. pp 173-181

Vives Corrons, J.L. 2001. “Anemias por alteraciones bioquímicas del eritrocito. Membranopatías y defectos del metabolismo: Programa de educación médica continuada (EMC) en medicina asistencial”. *Medicine*. 8(51): 2694 –2702.

c) Hemoglobinopatías

Bunn, H.F. and Forget, B.G. **Hemoglobin structure in Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects**. W. B. Saunders; Phyladelphia; 1986: 13

Bunn, H.F. “Subunit assembly of hemoglobin. An important determinant of hematologic phenotype”. *Blood* 1987; 69: 1.

Carrell, R.W., Winterbourn, C.C. “The unstable hemoglobins. *Tex Rep Biol Med* 1981; 40: 431. Casals, T., Baiget, M., Hernández, J. L. Doble heterocigocia β talasemia / Hb D Punjab: Estudio del primer caso descrito en España”, *Sangre* 1986; 31: 250.

Dacie, J. **The unstable haemoglobin haemolytic anaemias in The haemolytic anaemias and The hereditary haemolytic anaemias**, 3th Ed. W. B Saunders., New York 1988; 2: 56.

De Pablos, G. “Hemoglobinopatías estructurales en España”. *Biol. Clin. Hematol* 1988; 10: 5.

De Pablos, G., Almagro, M., Cabrera A., et al.: “Homocigosis para hemoglobina C y doble heterocigoto Hb C / β + talasemia en una familia española”, *Sangre* 1987; 32: 372.

Fairbanks, V.F. **The structural hemoglobinopathies in Hemoglobinopathies and Thalassemias**. Brian C Decker., New York 1980: 25.

Higgs, D.R., Weatherall, D. J., Wood, W. G., *et al.* "Clinical features and molecular analysis of acquired Hb H disease". *Am. J. Med* 1983; 75: 181.

Higgs, D.R., Vickers, M.A., Wilkie, A.O.M. "A review of the molecular genetics of the human globin gene cluster". *Blood* 1989; 73: 1081.

Hojas, Bernal. R., M^c Nab, P., Fairbanks, V., *et al.* "Hb Chile (β 28 B10 LeuMet) an unstable hemoglobin associated with chronic methemoglobinemia and sulfonamide or methylene blue-induced hemolytic anemia". *Hemoglobin* 1999; 23(2): 125.

Hsia, Y.E., Yuen, J., Hunt, J.A., *et al.* "The different types of α thalassaemia: Practical and genetic aspects". *Hemoglobin* 1988; 12: 465.

Hunt, D.M., Higgs, D.R., Old, J.M., *et al.* "Determination of α thalassaemia phenotypes by messenger ARN analysis". *Br. J. Haematol* 1980; 45: 53.

Liebhaber, S.A. " α thalassaemia". *Hemoglobin* 1994; 18:163.

Pagnier, J. "Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 1771.

Villegas, A., Calero, F., Porres, A., *et al.* "Valor del estudio funcional de la hemoglobina en las hemoglobinopatías estructurales". *Sangre* 1988; 33: 410.

Vivens Corrons, J.L., Vallespi, M.T., Jou, J.M., *et al.* "Doble heterocigoto Hb C / β talasemia. Nuevo caso de esta asociación en un sujeto de raza blanca". *Sangre* 1983; 28: 656.

Weatherall, D.J., Clegg, J.B. **The Thalassemias Syndromes**, Weatherall, D. J., Blackwell Scientific Publications. Oxford 1981: 221.

Wood, W. "Increased HbF in adult life" In **The Haemoglobinopathies**, Higgs, DR., Weatherall, DJ., Baillière Clin Haematology, W. B. Saunders, London 1993; 6: 177.

Anemias hemolíticas extracorpúsculares

a) Anemias hemolíticas inmunes

AABB: **Manual Técnico Asociación Americana de Bancos de Sangre**, 13^a edición, 2001.

Avent, N., Reid, M., "The Rh blood group system: a review", *Blood* 2000; 95:375-387.

Bergeron, D., Adams, S. "Autoimmun hemolytic anemias and drug-induced hemolytic anemias" En **Immunoematology principles and practic**. Eds. Quinley E. Chapter 16. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1998.

Bergeron, D., Adams, S., "Autoimmun hemolytic anemias and drug-induced hemolytic anemias" In **Immunoematology principles and practice**, Eds. Quinley E., Chapter 16, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998.

Cartron, J., Bailly, P., Le Van Kim, C., Cherif-Zahar, B., Matassi, G., Bertrand O., Colin, Y., "Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens", *Vox Sang* 1998;74(Suppl.2):26-64.

Dacie, J., Lewis S.M.. and Waters, H. "Serological investigation of auto-immune and drug-induced immune haemolytic anaemias" In **Practice Haematology**. Eds. Dacie J, Lewis SM. Chapter 29. Seventh edition. Churchill Livingstone, London 1991.

Dacie, J., Lewis, S.M. and Waters, H., "Serological investigation of auto-immune and drug-induced immune haemolytic anaemias" In **Practice Haematology**, Eds. Dacie J., Lewis SM., Chapter 29, Seventh edition, Churchill Livingstone, London, 1991.

Daniels, G., Cartron, J., Fletches, A., Garraty, G., Henry, J., Jorgensen, J, et al. "International society of blood transfusion committee on terminology for red cell surface antigens: Vancouver report". *Vox Sanguinis* 2003;84: 244.247.

Foerster, J. "Alloimmune hemolytic anemias" In **Wintrobe's Clinical Hematology** . Eds. Lee G, Bithell T, Foerster J et al. Chapter 40. Nigth edition, Lee & Febiger, London 1993.

Foerster, J., "Alloimmune hemolytic anemias" In **Wintrobe's Clinical Hematology**, Eds. Lee, G., Bithell, T, Foerster, J. et al., Chapter 40, Nigth edition, Lee & Febiger, London, 1993.

Garraty, G. "Review: immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin test caused by drugs". *Immunoematology*, 10:41-50. 1994.

Harmening, D., Ann, L., Green, R. "Autoimmun hemolytic anemias". In **Modern blood banking and transfusion practices**. Ed Harmening D. Chapters 20-21. Davis Company, Philadelphia. 1999.

Leger, R.M., Garratty, G. "Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies". *Transfusion*; 39: 11-6. 1999.

Mintz, Paul, **Transfusion Therapy: Clinical Practice**. American Association of Blood Bank. 1999.

Mollison, P.L., Contreras, M., Engelfriet, C.P. **Medical Transfusion in Clinical Medicine**, Blackwell Scientific Publication, London 552-549. 1987.

Palomo, I., Pereira, J., Vásquez, M. "Citopenias inmunes" En **Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica**, Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Roseblatt, M., Vergara, U.. Capítulo 26, Editorial Universidad de Talca, 2002.

Palomo, I., Pereira, J. **Fisiopatología de las citopenias inmunes**, Editorial Universidad de Talca, 1995.

Petz, L.D., Garratty, G. **Acquired immune hemolytic anemias**. New York: Churchill Livingstone, 28-37, 1980.

Petz, L.D. " 'Least incompatible' units for transfusion in autoimmune hemolytic anemia: should we eliminate this meaningless term? A commentary for clinicians and transfusion medicine professionals". *Transfusion* 43:1503-1507, 2003.

Pirofsky, B. **Autoimmunizacion and the autoimmune hemolytic anemias**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1969: 22.

Rossi, E., Simon T., Moss G. **Principles of Transfusion Medicine**. Williams & Wilkins, Ed. Cap 13, 99 a 112, 1991

Sherry, C. "Acquired immune anemias of increased destruction" In **Clinical hematology principles, procedures, correlations**. Eds. Stiene-Martin A, Lotspeich-Steininger C, Koepke J. Chapter 19. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998.

Sokol, R.J., Hewitt, S., Stamps, B.K. "Autoimmune haemolysis: An 18 years study of 865 cases referred to a regional transfusion centre". *Br. Med. J*; 282:2027-7. 1981

b) Anemias hemolíticas no inmunes

Chaorattanakawes, S., Natalang, O., Hananathachai, H., Nacher, M., Brockman, A., Kruso, S., Looaressuwan, S., Patarapotikul J. "Storage duration and polymerase chain reaction detection of Plasmodium falciparum from spots on filter paper". *Am J Trop Med Hyg*. 69(1):42-4, 2003.

Juwah, A.I., Nlemadim, A., Kaine, W. "Clinical presentation of severe anemia in pediatric patients with sickle cell anemia seen in Enugu, Nigeria". *Am J Hematol*. 72(3):185-91, 2003.

Owusu-Agyei, S., Fryauff, D.J., Chandramohan, D., Koram, K.A., Binka, F.N., Nkrumah, F.K., Utz, G.C., Hoffman, S.L. "Characteristics of severe anemia and its association with malaria in young children of the Kassena-Nankana District of northern Ghana". *Am J Trop Med Hyg*. 67(4):371-7, 2002.

Padley, D., Moody, A.H., Chiodini, P.I., Saldanha, J. "Use of rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present". *Trop Med Parasitol*. (2):131-7, 97, 2003.

Schenone, H., Saavedra, T., Rojas, A, Villarroel, F. "Loxocelismo en Chile: estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales" *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 31:403, 1989.

Verhoef, H., West, C.E., Kraaijenhagen, R., Nzyuko, S.M., King, R., Mbandi, M.M., van Laatum, S., Hogervorst, R., Schep, C, Kok, F.J. "Malarial anemia leads to adequately increased erythropoiesis in asymptomatic Kenyan children". *Blood*. 2002 100(10):3489-94. Epub 2002 Jul 25.

Vidal, P., Perez-Cotapos, L., Uribe, P. Enfermedades cutáneas causadas por artrópodos. Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Disponible en <http://vidal.med.puc.cl/Autor/EntomologiaMedica.html>

ANEMIA POR HEMORRAGIA AGUDA

Milton Larrondo L.

1. Introducción

2. Epidemiología

3. Fisiopatología

- 3.1. Transporte de oxígeno
- 3.2. Concentración de hemoglobina y saturación
- 3.3. Gasto cardiaco (GC)
- 3.4. Respuesta fisiológica a la hemorragia

4. Tratamiento

- 4.1. Conducta clínica inicial
- 4.2. Hemorragia aguda y transfusión
- 4.3. Alternativas a transfusión alogénica

RESUMEN

La anemia por hemorragia aguda es la más frecuente de las anemias agudas. Entre las causas más comunes destacan: politraumatizados con múltiples fracturas y/o compromiso visceral, hemorragia por várices esofágicas, ruptura aórtica, embarazo ectópico y hemofilia.

Este capítulo se refiere a la fisiopatología y manejo de las hemorragias agudas.

1. INTRODUCCIÓN

La anemia es definida por la reducción en el nivel de hemoglobina (Hb) o disminución del volumen de glóbulos rojos (GR) o hematocrito (Hto) respecto a un rango de referencia de acuerdo a sexo y edad. Clínicamente se le puede clasificar como aguda o crónica.

La anemia aguda está dada por una pérdida de eritrocitos producto de hemólisis o hemorragia aguda. Esta última causal de anemia aguda es la etiología más frecuente en la clínica y será referida en este capítulo.

2. EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia de anemia aguda por hemorragia se desconoce. La gravedad clínica depende de la etiología y si existe co-morbilidad. Entre las causas más frecuentes están las siguientes:

- Politraumatizados con múltiples fracturas y/o compromiso visceral.
- Hemorragia por várices esofágicas. Aproximadamente un 30% de pacientes cirróticos mueren por sangrado de várices. La tasa de resangrado post terapia médica es sobre el 60%.
- Ruptura aórtica. La mortalidad de una ruptura traumática es de 80% previo a hospitalizar. Un aneurisma aórtico roto también conlleva una alta mortalidad, aunque reciba tratamiento quirúrgico de inmediato (mortalidad sobre 70%).
- Embarazo ectópico. Con una detección precoz y manejo adecuado el pronóstico es muy bueno. Mortalidad 1-2%.

- Hemofilia. Un 10 a 15% de hemofílicos graves pueden desarrollar inhibidor para factor VIII y fallecer de una hemorragia aguda masiva.

Sexo. Los hombres tienen más incidencia de anemia aguda por causas traumáticas y por hemorragias digestivas altas. En mujeres predomina la anemia aguda de causa ginecológica.

Edad. Afecta preferentemente a adultos jóvenes (traumatismos, menstruación, embarazo ectópico). En pacientes sobre 50 años es más frecuente que la hemorragia aguda se adicione a un cuadro de anemia crónica. Es el caso de la hemorragia digestiva por patología gastrointestinal o personas en terapia con anticoagulantes orales o AINEs.

3. FISIOPATOLOGÍA

La función de los GR es el transporte de oxígeno (O₂) desde el pulmón a los tejidos y de CO₂ desde los tejidos al pulmón. Esto se realiza mediante la molécula de Hb, una proteína tetramérica compuesta de grupo heme y globina.

3.1. Transporte de oxígeno

Los principales determinantes son la concentración de Hb, la saturación de oxígeno, el gasto cardiaco, la tasa de extracción de oxígeno y el flujo sanguíneo.

Para comprender los parámetros del transporte de oxígeno éstos se detallan en la tabla 9-1.

Tabla 9-1. Transporte de oxígeno

Parámetro	Fórmula	Rango normal
Gasto cardiaco (GC)	VE x FC	4-6 L/min
Contenido arterial oxígeno (CaO ₂)	1.34xHbxSaO ₂ + (0.003x PaO ₂)	16-22 mL/dL
Contenido O ₂ venoso mixto (CvO ₂)	1.34xHbxSvO ₂ + (0.003x PvO ₂)	12-17 mL/dL
Oferta oxígeno (DO ₂)	GC x CaO ₂ x 10	500-750 mL/min/m ²
Consumo oxígeno (VO ₂)	GC x (CaO ₂ -CvO ₂) x 10	100-180 mL/min/m ²
Tasa extracción oxígeno	VO ₂ / DO ₂	0.23- 0.30

Hb, Concentración hemoglobina en g/dL; VE: volumen expulsivo; FC, frecuencia cardiaca; SaO₂, saturación oxígeno arterial; SvO₂., saturación oxígeno venosa mixta; PaO₂ , Presión parcial oxígeno arterial; PvO₂, presión oxígeno venosa mixta.

3.2. Concentración de hemoglobina y saturación

La relación de la Hb con el oxígeno sigue una curva de tipo sigmoidal. Esta curva de disociación de la Hb permite una afinidad apropiada a situaciones de aumento del consumo tisular. La P₅₀ es la presión de O₂ a la cual el 50% de la Hb se encuentra saturada con oxígeno y normalmente es de 26.3 mm Hg.

La P₅₀ aumenta durante la anemia, hipoxia o alcalosis lo que disminuye la afinidad de la Hb por el oxígeno y mejora su entrega a nivel de los tejidos.

3.3. Gasto cardiaco (GC)

El GC está determinado por el VE y la FC (tabla 9-1). En la anemia el GC aumenta porque se incrementa la frecuencia cardiaca por estimulación simpática a través de receptores beta adrenérgicos, los que también estimulan la contractilidad del miocardio.

Considerando que el corazón, a diferencia del resto de los tejidos, extrae normalmente el 80% de la oferta de oxígeno, su capacidad para aumentar el trabajo miocárdico descansa necesariamente en un incremento del flujo coronario que le permite aumentar la extracción de oxígeno.

Sin embargo, si el cuadro hemorrágico es severo (nivel de Hb < 7 g/dL) el flujo coronario se redistribuye hacia el epicardio, dejando

expuesto al tejido subendocárdico a riesgo de isquemia y eventual infarto.

En relación al resto de los órganos, éstos compensan la anemia, aumentando la oferta de oxígeno tisular a través de aumento de flujo capilar o redistribuyendo el flujo sanguíneo dentro del propio órgano.

Si la oferta de oxígeno se reduce (disminuye Hb por hemorragia aguda) su extracción puede aumentar entre un 15 a 25% para mantener un consumo constante en los tejidos. Si además aumenta el volumen circulante (manejo de hipovolemia por hemorragia) se incrementará el gasto cardiaco mejorando la disponibilidad de oxígeno tisular.

En condiciones normales la oferta de oxígeno (DO₂) es de 1.000 mL/min y el consumo (VO₂) es de 200 mL/min. La razón normal DO₂/ VO₂ es de 5:1 y solo el 20% del oxígeno es extraído dejando una saturación venosa mixta de 80%. Por lo tanto en situaciones de hipoxia (anemia severa) el paciente puede permanecer estable en la medida que aumente la extracción de oxígeno y mantenga esta relación sobre 2:1 (DO₂/ VO₂).

En sujetos sometidos a hemodilución isovolémica, en los cuales se redujo el nivel de Hb de 13 g/dL a 5.0 g/dL no se observó un incremento de lactato y el consumo aumentó levemente (3.07 mL O₂ / Kg/ min a 3.42 mL O₂ /Kg/min). Sin embargo, estos resultados si bien sugieren un bajo riesgo de isquemia

miocárdica aún con 5 g/dL de Hb, ésta se produjo en condiciones de isovolemia, lo que no sucede en situación de hemorragia aguda.

3.4. Respuesta fisiológica a la hemorragia

La anemia por un cuadro de hemorragia aguda produce una reducción de la capacidad transportadora de oxígeno junto a una disminución del volumen intravascular, generando hipoxia e hipovolemia. La hipovolemia lleva a hipotensión arterial lo que es detectado por receptores en el bulbo carotideo, arco aórtico y corazón. Estos transmiten impulsos a través de fibras aferentes del vago y nervio glossofaríngeo hacia la corteza cerebral, médula oblongada y pituitaria.

En la médula, la actividad del sistema autónomo simpático se incrementa produciendo norepinefrina en terminales nerviosos y además epinefrina en médula adrenal. También se produce aumento de la secreción de hormona antidiurética a nivel de la pituitaria lo que incrementa la reabsorción de agua en túbulos renales.

La disminución de la perfusión renal permite la secreción de renina por las células yuxtaglomerulares en las arteriolas aferentes, lo que estimula la producción de angiotensina I la cual es convertida a angiotensina II por enzimas convertidoras.

La angiotensina II produce contracción de la

musculatura lisa arteriolar y además estimula la producción de aldosterona. Esta aumenta la reabsorción de sodio desde el túbulo proximal, lo que lleva a aumento del volumen intravascular.

El tono venoso aumentado permite mejorar la precarga y el volumen diastólico final y con ello incrementar el volumen expulsivo.

Entonces, en este estado de hipoxia hipovolémica (hemorragia aguda) el incremento en el tono venoso por la descarga simpática permite dominar en la etapa inicial el efecto vasodilatador de la hipoxia, sin embargo si no se corrige la hipovolemia esta vasoconstricción mantenida llevará a hipoxia tisular por hipoperfusión, luego "shock", falla multiorgánica y eventualmente la muerte del paciente.

4. TRATAMIENTO

Debido al riesgo vital del paciente es importante determinar la masa globular perdida y la volemia efectiva, para así definir una terapia apropiada.

Por ejemplo, una hemorragia severa con pérdida de 150 mL/min implica una pérdida de la mitad de la volemia en 20 minutos, lo que será fácil de reconocer por los signos de "shock" hipovolémico resultante. Sin embargo, hemorragias más leves son más difíciles de reconocer por lo que se han clasificado de la siguiente manera (tabla 9-2)

Tabla 9-2. Clases de Hemorragia

Clase	% volumen sanguíneo	FC	Presión arterial	Perfusión tisular	Terapia
I	< 15	Normal	Normal	Normal	Ninguna
II	15-30	Aumento	N o baja	Baja	Cristaloides Coloides, eventual uso de GR?
III	30-40	Aumento	Baja	Disminuida	Cristaloides Coloides, GR
IV	> 40	Aumento	Baja	Disminuida	Cristaloides Coloides, GR

GR, glóbulos rojos.

4.1. Conducta clínica inicial

A continuación se nombra las principales conductas clínicas iniciales que se debe considerar ante un paciente con hemorragia aguda:

- Monitorizar la presión arterial, uso de oxímetro y monitor cardiaco
- Suplementar oxígeno vía cánula nasal o mascarilla
- Instalar vía venosa periférica e infundir 2 L de solución cristaloide
- Considerar transfusión si el paciente permanece hipotenso después de administrar volumen.
- Vasopresores no están indicados en “shock” hipovolémico

Cuando el paciente es estabilizado se deberán iniciar medidas específicas para el manejo de la causa de la anemia.

4.2. Hemorragia aguda y transfusión

El mejor ejemplo de hemorragia aguda lo constituye el paciente politraumatizado que generará una gran demanda de componentes sanguíneos al Banco de Sangre de manera inmediata poniendo a prueba el “stock” de seguridad de componentes sanguíneos y los procedimientos establecidos de manejo de esta emergencia transfusional masiva.

La indicación clínica habitual de transfusión inmediata está dada por las siguientes condiciones:

- Evidencia de “shock” hipovolémico en paciente con presión sistólica menor a 70 mm Hg.
- Persistencia de presión sistólica bajo 90 mm Hg después de administración rápida de 2 litros de cristaloides.
- Paciente hipotenso, con evidencia de sangrado activo y con Hb menor a 8 g/dL.

Esta indicación se sustenta en el aumento de mortalidad de pacientes en “shock” hipovolémico con Hb < 8 g/dL.

En el área de reanimación deben estar disponibles unidades tipo O que se transfundirán sin pruebas cruzadas. Unidades grupo O Rh (-) serán usadas en mujeres en edad fértil y se debe limitar el uso de estas unidades a no más de cuatro. Luego de 10 a 15 minutos el Banco de Sangre estará en condiciones de enviar unidades tipificadas y con pruebas cruzadas en fase inmediata (compatibilidad

ABO). La necesidad clínica inmediata de la transfusión no permite esperar hasta completar las pruebas cruzadas (fase de antiglobulina).

El riesgo inmunológico que posee esta conducta transfusional ha sido analizado en numerosos estudios y la conclusión es que la administración en situación de emergencia absoluta de unidades de GR tipo O sin pruebas cruzadas o ABO específico no se ha asociado a reacciones hemolíticas mayores. Sí se han producido reacciones por aloanticuerpos a otros grupos como Kell, Kidd o Rh pero con mínima repercusión clínica.

4.3. Alternativas a transfusión alogénica

En el paciente crítico, considerando las dificultades en disponer de componentes sanguíneos y los riesgos de la transfusión, se han buscado alternativas. Entre ellas el uso de eritropoyetina que si bien no sirve en el manejo de la anemia aguda, se está utilizando en algunas unidades de pacientes críticos para el manejo de la anemia crónica o episodios leves de hemorragia que no requieren uso de componentes sanguíneos.

En relación a sustitutos de glóbulos rojos como por ejemplo soluciones de perfluorocarbonos, hemoglobina encapsulada en liposomas y otros, todavía no demuestran eficacia clínica y un buen perfil de seguridad, por lo cual su uso clínico está aún a nivel de investigación bajo estrictos protocolos clínicos.

LECTURAS SUGERIDAS

Greenburg AG. “Pathophysiology of anemia.” *Am J Med* 101: 7-11, 1996.

Hebert, P.C., Wells, G., Blajchman, M.A., et al. “A multicenter, randomized, control clinical trial of transfusion requirements in critical care”. *N Engl J Med* 340: 409-417, 1999.

Hebert, P.C., Hu, L.Q., Biro, G.P. “Review of physiologic mechanisms in response to anemia”. *Can Med Assoc J.* 156: S27-40, 1997.

Hebert, P.C., Wells, G.A., Marshall, J.C. et al. “Transfusion requirements in critical care. A pilot study”. *JAMA* 273: 1439-1444, 1995

Hsia, C. “Respiratory function of hemoglobin”. *N Engl J Med* 338: 239-247, 1998.

Moore, F.A., McKinley, B.A., Moore, E.E. “The

next generation in shock resuscitation". *Lancet* 363: 1988-1996, 2004

Morales, D., Madigan, J., Cullinane, S., *et al.* "Reversal by vasopressin of intractable hypotension in the late phase of hemorrhagic shock". *Circulation* 100: 226-229, 1999

Mullon, J., Giacoppe, G., Clagett C, McCune D, Dillard T. "Transfusion of polymerized bovine hemoglobin in a patient with severe autoimmune hemolytic anemia". *N Engl J Med* 342: 1638-1643, 2000

Sloan, E.P., Koenigsberg, M., Gens, D., *et al.* "Diaspirin cross-linked hemoglobin in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized control efficacy trial". *JAMA* 282: 1857-1864, 1999

Stehling, L., Zauder, H.L. "Acute normovolemic hemodilution". *Transfusion* 31: 857-868, 1991.

Van Iperen, C.E., Gaillard, C.A, Kraaijenhagen, R.J., Braam, B.G., Marx, J.J., van de Wiel, A. "Response of erythropoiesis and iron metabolism to recombinant human erythropoietin in intensive care unit patients". *Crit Care Med* 28: 2773-2778, 2000.

Vincent, J.L., Baron, J.F., Reinhart, K., *et al.* "Anemia and blood transfusion in critically ill patients". *JAMA* 288: 1499-1507, 2002.

Weiskopf, R.B., Viele, M.K., Feiner, J., *et al.* "Human cardiovascular and metabolic response to acute, severe isovolemic anemia". *JAMA* 279: 217-221, 1998.

HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico
Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.
Editorial Universidad de Talca, 2005



SECCIÓN III

GLÓBULOS BLANCOS

LEUCOCITOS Y SISTEMA INMUNE

Iván Palomo G., Jaime Pereira G. y Ulises Vergara C.

1. Introducción

2. Leucocitos

2.1. Generalidades sobre hematopoyesis

2.2. Linfocitos

2.2.1. Características generales

2.2.2. Diferenciación de linfocitos

2.2.3. Reconocimiento antigénico

2.2.4. Activación de los linfocitos

2.3. Sistema fagocítico mononuclear

2.3.1. Monocitos

2.3.2. Macrófagos

2.3.3. Células dendríticas

2.4. Granulocitos

2.4.1. Neutrófilos

2.4.2. Eosinófilos

2.4.3. Basófilos

3. Órganos linfoides

3.1. Órganos linfoides primarios

3.1.1. Médula ósea

3.1.2. Timo

3.2. Órganos linfoides secundarios

3.2.1. Ganglios linfáticos

3.2.2. Bazo

3.2.3. Tejido linfoide asociado a mucosa

3.2.4. Amígdalas

4. Tránsito linfocitario

RESUMEN

Los glóbulos blancos o leucocitos incluyen linfocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos, que se forman en la médula ósea a partir de células pluripotentes, en un proceso finamente regulado y con la participación de diversas citoquinas y receptores para las mismas.

Los linfocitos son las células que participan en la inmunidad adquirida o específica. Las células T participan en la inmunidad celular y las células B en la inmunidad humoral. Una tercera subpoblación de linfocitos, las células NK, participan en la inmunidad celular de tipo innata.

Las células del Sistema Fagocítico Mononuclear (monocitos, macrófagos y células dendríticas) tienen como función fagocitar y presentar antígenos a las células T.

Los granulocitos presentan particularidades morfológicas y funcionales. La principal función de los neutrófilos es su capacidad fagocítica. En el capítulo se explican los procesos de activación, quimiotaxis, fagocitosis y bacteriolisis.

En el punto 2 del capítulo se describe la estructura y función de los diferentes tipos de leucocitos, y su número en sangre de individuos normales, lo cual se debe tener en cuenta al momento de interpretar los resultados de hemograma en diferentes patologías hematológicas, tanto malignas como no malignas.

Los órganos linfoides se pueden clasificar en primarios (timo y médula ósea) y secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas). En el timo maduran los LT y en la médula ósea los LB. En los órganos linfoides secundarios, los linfocitos toman contacto con los antígenos y es en ellos donde se genera la respuesta inmune específica (células efectoras y de memoria). En estos órganos existen zonas ricas en células B, y otras en que, principalmente, existen células T.

La capacidad de los linfocitos de recircular entre los órganos linfoides secundarios, vasos linfáticos, conducto torácico y vasos sanguíneos le permiten tomar contacto con antígenos en diferentes lugares del organismo.

1. INTRODUCCIÓN

Los leucocitos forman parte del sistema inmune, el que se incluye entre los mecanismos biológicos destinados a mantener la organización estructural y funcional de los individuos y está genéticamente programado para la neutralización y eliminación, tanto de agentes infecciosos, células y moléculas extrañas como de detritus celulares y células propias envejecidas, alteradas o transformadas.

El sistema inmune es, por lo tanto, esencialmente destructivo y requiere de un sofisticado mecanismo de regulación que permita responder agresivamente contra lo extraño o contra lo propio envejecido, alterado o transformado (**concepto de inmunidad**) al tiempo que se reconoce, se acepta, se tolera o no se destruye lo propio normal (**concepto de tolerancia**).

En este capítulo se revisan las características fundamentales de los glóbulos blancos y la

forma como ellos se organizan en los distintos tejidos y órganos asociados al sistema inmune.

2. LEUCOCITOS

El sistema inmune está constituido por células y mediadores solubles producidos por estas células (tabla 10-1). El primer paso en el desarrollo de una respuesta inmune es siempre el reconocimiento de aquello que debe ser eliminado (y que genéricamente se denomina antígeno), por receptores específicos que existen en la membrana de las células inmunocompetentes.

Las células del sistema inmune incluyen tanto linfocitos T, linfocitos B y células NK, como células inflamatorias y diferentes células fagocíticas o endocíticas especializadas en la captura, procesamiento y presentación de antígenos.

Desde un punto de vista funcional, las células y mediadores solubles del sistema inmune se han

separado tradicionalmente, en componentes naturales o innatos (Inmunidad Innata) y componentes específicos, adquiridos o adaptativos (Inmunidad Adquirida), que han desarrollado receptores y mecanismos distintos para el reconocimiento inmunológico. Así, mientras el componente adquirido se ha desarrollado en torno al tamaño y diversidad de nuestro repertorio linfocitario (estimado en 10^{18} linfocitos T y 10^{14} linfocitos B) que confiere una capacidad virtualmente ilimitada para reconocer y eliminar miles de millones de antígenos distintos, el componente natural o innato se ha desarrollado en torno a unos pocos receptores (PRR: "PAMP Recognition Receptor") que reconocen patrones moleculares propios de los agentes infecciosos (PAMP: "Pathogen Associated Molecular Pattern") o patrones moleculares propios de células propias envejecidas, transformadas o tumorales (ACAMP: "Apoptosis Cell Associated Molecular Pattern").

Desde un punto de vista estructural en cambio, los componentes celulares del sistema inmune pueden separarse en dos compartimientos distintos y finamente regulados, que difieren en su organización celular y en las estrategias utilizadas en la resistencia a agentes infecciosos, en la captura y presentación de antígenos y en la distinción entre agentes dañinos y sustancias inocuas: (a) **el Compartimiento sistémico**, que incluye médula ósea, bazo y ganglios linfáticos y, (b) **el Compartimiento epitelial**, que incluye tejido linfoide asociado a la piel (SALT: "Skin Associated Lymphoid Tissue"), a mucosas (MALT: "Mucosal Associated Lymphoid Tissue") y a glándulas secretoras (glándulas lagrimales, glándulas salivales y glándulas mamarias).

La especificidad de la respuesta inmune, reside siempre en los linfocitos T y linfocitos B y la eliminación del antígeno puede hacerse en forma directa mediante una respuesta celular citotóxica (respuesta celular) o de manera indirecta a través de la síntesis y secreción de anticuerpos específicos, que reclutan y activan mecanismos accesorios de eliminación (respuesta humoral). Las células accesorias (células NK, fagocitos, células inflamatorias y otras células) cumplen, en cambio, importantes funciones efectoras en la inmunidad innata y en el procesamiento y presentación de antígenos durante la inmunidad adquirida.

La expansión clonal de linfocitos T y B, es entonces un requisito necesario para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, pero se requieren 3 a 5 días para la generación de linfocitos efectores diferenciados, capaces de la eliminación específica del antígeno. La acción de los mecanismos naturales o innatos de inmunidad ocurre de manera inmediata y puede, por lo tanto, controlar de manera rápida y efectiva la replicación de los agentes patógenos, evitando probables daños en el lapso requerido para el desarrollo de una respuesta adquirida.

Las células del sistema inmune innato (células accesorias) y del sistema inmune adquirido (linfocitos T y B), derivan de células troncales pluripotentes (células madre o "stem cells") de la médula ósea, órgano en el que ocurre este proceso hematopoyético de diferenciación y maduración las células sanguíneas (ver punto 2.1).

Tabla 10-1. Componentes del sistema inmune

Células	Mediadores solubles
Linfocitos T y Linfocitos B* Células NK (células "natural killer") Células dendríticas Monocitos y Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Basófilos Mastocitos Células epiteliales Células endoteliales Otras células	Anticuerpos* Sistema del Complemento Citoquinas y Quimioquinas Proteínas catiónicas Radicales libres

*, son las únicas células o mediadores solubles antígeno-específicos

2.1. Generalidades sobre hematopoyesis

Durante la vida fetal la hematopoyesis (ver capítulo 1) ocurre en el hígado y en el bazo. A partir del nacimiento se suspende el proceso en estos órganos y se incrementa la actividad de la médula ósea, iniciada en los últimos meses de gestación. En la médula ósea, las células se desarrollan en un espacio tridimensional y en constante comunicación y dinámica interacción de las células hematopoyéticas troncales (HSCs: "Hematopoietic Stem Cells") con las células estromales del entorno local, mediante factores solubles (factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas) o contactos célula-célula.

Las células hematopoyéticas troncales (ver capítulos 1 y 2) son elementos centrales en la formación de células sanguíneas a lo largo de nuestra vida. Sus capacidades de autorrenovación y multipotencialidad, permiten su diferenciación en distintas líneas celulares (linfocitos, células mieloides o eritrocitos) en los órganos hematopoyéticos que proporcionan el entorno celular y molecular requerido en el proceso:

(a) la estructura anatómica y disposición tridimensional de vasos sanguíneos y diferentes compartimientos celulares; y (b) estroma tisular, que incluye diversos tipos celulares (fibroblastos, adipocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales de los sinusoides) y macromoléculas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina, hemonectina, tenascina, trombospondina y proteoglicanos).

La proliferación y diferenciación celular en la médula ósea, depende de la interacción entre células hematopoyéticas progenitoras y células estromales de soporte, que proporcionan los factores de crecimiento CSF, citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión requeridas en el proceso y en la organogénesis de los órganos linfoides secundarios, tales como linfonódulos, Placas de Peyer, el compartimiento linfoide del bazo (pulpa blanca) y el tejido linfoide asociado a mucosas.

Para el desarrollo de linfocitos en la médula ósea, la diferenciación a partir de HSC debe pasar por un tipo celular intermedio denominado progenitor linfoide común (CLP: "common lymphoid progenitor"), en el cual el programa de diferenciación en células mieloides o eritroides se ha apagado.

Al parecer la subdivisión del potencial de la

célula hematopoyética precursora en los compartimientos linfoide, mieloide o eritroide depende de la expresión de los factores de transcripción PU.1 y GATA-1.

GATA-1 es un regulador positivo del desarrollo eritroide, que bloquea los programas linfoide y mieloide antagonizando con PU.1. Cuando la expresión de GATA-1 está reprimida la expresión del programa linfoide o mieloide dependerá de los niveles de expresión de PU.1. Altos niveles promueven la diferenciación mieloide activando la expresión de receptores para citoquinas mieloides y bloqueando la expresión de citoquinas y sus receptores linfocídeos (como por ejemplo, IL-7 y su receptor IL-7R).

Una vez que han abandonado el órgano linfoide primario, los linfocitos T (Timo) y linfocitos B (Médula ósea) recircularán a través de los órganos linfoides secundarios (incluyendo ganglios linfáticos y placas de Peyer), en búsqueda de antígenos.

En la médula ósea las células hematopoyéticas se distribuyen en tres compartimientos morfofuncionales: (a) compartimiento de células madres, (b) compartimiento mitótico o de división y (c) compartimiento de maduración – almacenamiento.

Las células del compartimiento "stem cell" (de células madres) corresponden a menos del 1% de las células de la médula. No son identificables morfológicamente, por lo que deben ser estudiadas en cultivos *in vitro*. La "stem cell" o célula madre pluripotente, también denominada CFU-ML ("Unidad formadora de colonias mieloides y linfoides") tiene la capacidad de dividirse y autoperpetuarse. Da origen a dos líneas celulares principales, mieloide y linfoide. En la línea mieloide, a partir de la CFU-GEMM (granulocítica, eritroide, monocítica y megacariocítica) se producen dos diferentes CFU "encomendadas", CFU-GM (granulocito, monocito) y CFU-MegE (megacariocito, eritroide); posteriormente se generan las CFU-G, CFU-M, CFU-E, CFU-Meg.

En el compartimiento mitótico, a partir de las CFU de las líneas celulares específicas antes mencionadas, se generan las primeras células reconocibles morfológicamente de cada línea celular: mieloblasto en el caso de los granulocitos, que posteriormente madurará a promielocito y luego a mielocito etapa en la cual se diferencian las tres líneas específicas de

los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos); las etapas posteriores de maduración de los granulocitos corresponden a juveniles, baciliformes y segmentados. Por su parte, la serie monocítica madura en las etapas de monoblasto y monocito. De la CFU-Meg, en la línea megacariocítica se reconoce las etapas de megacarioblasto, megacariocito y plaquetas; por su parte en la serie eritroblástica se reconocen las etapas, proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto poliromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y glóbulo rojo. En la línea linfoide, a partir de la CFU-L, después de un proceso de diferenciación y maduración se originan los linfocitos T y linfocitos B.

En el proceso de diferenciación y maduración de las diferentes líneas celulares, participan varios factores de maduración y citoquinas secretadas por células del estroma. Existen factores que actúan sobre progenitores de multilínea: “Kit ligand”, GM-CSF (CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos), G-CSF (CSF de granulocitos), IL-3 (IL= Interleuquina), IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, “Flt-3 ligand”, Factor inhibidor de leucemia (LIF), Oncostatin (OSM). Algunos de estos factores participan también en la maduración de algunas líneas celulares en particular. Entre los factores de maduración de los granulocitos y monocitos, se reconocen a GM-CSF; G-CSF favorece la maduración a neutrófilos, M-CSF a monocitos, IL-5 a eosinófilos y “Kit ligand” a basófilos. Por su parte, el regulador fisiológico de la

maduración eritroide es la eritropoyetina (EPO) y de los megacariocitos la trombopoyetina (TPO) también denominada “mpl-ligand”. “Kit ligand” también parece tener participación en la maduración eritroide. En la línea linfoide B, que a diferencia de los linfocitos T, maduran en la médula ósea, el factor de maduración es la IL-7. Las células de las diferentes líneas hematopoyéticas presentan receptores para los factores de maduración antes nombrados.

2.2. Linfocitos

Los linfocitos, junto con las células presentadoras de antígeno (CPA) son la base celular de la respuesta inmune específica.

2.2.1. Características generales

Los linfocitos constituyen aproximadamente el 20-25% de los leucocitos circulantes en el adulto (tabla 10-2). Desde el punto de vista morfológico, en los frotis sanguíneos teñidos con May Grünwald-Giemsa se distinguen dos tipos: los **linfocitos pequeños** (7-9 μ m) que presentan una relación núcleo/citoplasma alta y representan la mayoría, y los **linfocitos grandes** (11-20 μ m), que presentan citoplasma más abundante (figura 10-1). El núcleo generalmente es redondo u oval y compuesto predominantemente de heterocromatina. Los nucléolos pueden no observarse con tinción de May Grünwald-Giemsa. En los linfocitos grandes puede observarse gránulos citoplasmáticos (linfocitos granulares grandes).

Tabla 10-2. Leucocitos normales en sangre periférica de los humanos adultos normales

Tipo de célula	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Leucocitos (totales)		4 - 10
Neutrófilos	60-65	2 - 7
Eosinófilos	0-4	0 - 0,4
Basófilos	<1	0,1 - 1
Monocitos	4-10	0,2 - 0,8
Linfocitos	20-25	1,5 - 3,5

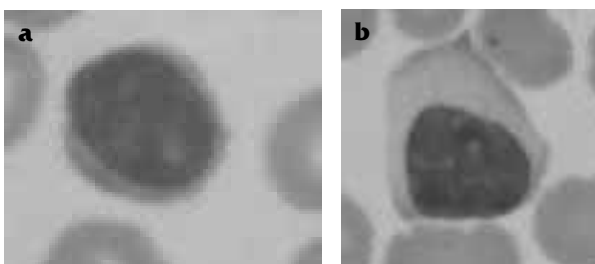


Figura 10-1. Microfotografía de un linfocito pequeño y grande en frotis de sangre teñidos con May Grünwald - Giemsa. (a) linfocito pequeño (7-9 μ m de diámetro), su relación núcleo/citoplasma es alta; (b) linfocito grande (11-20 μ m), presenta citoplasma más abundante.

Los denominados «linfocitos activados o reactivos» corresponden a linfocitos asociados a una respuesta inmune. Estos linfocitos estimulados antigénicamente se caracterizan por presentar citoplasma abundante, hiperbasófilo (azul intenso) y de bordes irregulares.

Los linfocitos, al igual que otros leucocitos, se pueden movilizar (recirculación y “homing”). Inicialmente se forma un pseudópodo que rodea la célula y al contraerse empuja el núcleo hacia delante quedando una cola citoplasmática llamada urópodo (ura: cola, podi: pie), presentando la célula un aspecto de espejo de mano o pera. La velocidad es de aproximadamente 20 μ /minuto, la que aumenta cuando la célula es estimulada. El urópodo, además de permitir el movimiento facilita las interacciones con otras células (linfocitos, macrófagos, etc.).

Los linfocitos además de presentar diferencias morfológicas, constituyen un grupo celular funcionalmente heterogéneo. Se dividen en tres grupos funcionales diferentes: los **linfocitos T (LT)** que participan en la inmunidad adquirida de tipo celular, los **linfocitos B (LB)** que participan en la inmunidad adquirida de tipo humoral y las **células NK («Natural Killer»)** que no expresan marcadores de células T o de células B y que participan en la inmunidad natural o innata.

En humanos, las células precursoras de linfocitos T y de linfocitos B, originadas a partir de la CFU-L en la médula ósea, experimentan un proceso de maduración y diferenciación en el timo y médula ósea, respectivamente. La mayor parte de los linfocitos que se encuentran en la sangre, linfa, ganglios linfáticos y timo corresponden a subpoblaciones de linfocitos T. En la médula ósea, en cambio, el mayor porcentaje de las poblaciones linfocitarias corresponde a linfocitos B; en el bazo y amígdalas el porcentaje de ambas subpoblaciones es similar.

Las células plasmáticas generalmente presentan forma ovalada. Corresponden a las células efectoras de la línea linfocítica B (productoras de inmunoglobulinas). El núcleo, con una distribución radial de la heterocromatina, está ubicado excéntricamente y el citoplasma presenta una gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso que le otorga la intensa basofilia que le caracteriza al ser teñidas estas células con May Grünwald - Giemsa. A nivel perinuclear presenta un desarrollado aparato de Golgi (figura 10-2).

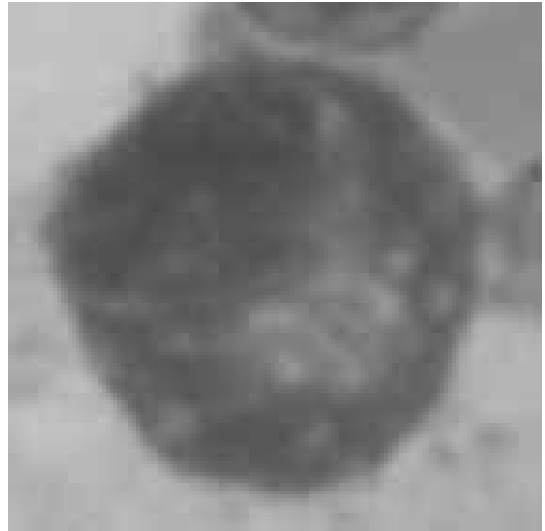


Figura 10-2. Microfotografía de una célula plasmática.

Las células plasmáticas presentan un diámetro de 10-25 μ m. Se caracterizan por presentar núcleo excéntrico y basofilia citoplasmática. Se ubican principalmente en los órganos linfoides secundarios y muy raramente en sangre periférica.

En el estudio hematológico de rutina de los linfocitos sanguíneos sólo se utiliza la tinción de May-Grünwald-Giemsa, metodología que no permite conocer la línea celular de los linfocitos. En caso de requerirse dicha información, como es el caso de diagnóstico diferencial de leucemias, se utiliza citometría de flujo para identificar las subpoblaciones de linfocitos. Al respecto, el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos permite identificar marcadores de superficie designados con el **sistema CD** («cluster designation») a modo de ejemplo se muestran algunos en la (tabla 10-3). De esta forma se reconoce como marcadores de las células T al complejo CD3 y a las dos subpoblaciones más importantes de esta línea celular se les identifica por ser **CD4+** (LT «helper») o **CD8+** (LT citotóxicos). Basándose en el patrón de secreción de citoquinas, se reconocen dos subpoblaciones de células T «helper»: LTh1 y LTh2. Los LTh1 secretan IL-2, IFN- γ , IL-3 y estimulan la inmunidad mediada por células; los LTh2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y favorecen la respuesta inmune humoral. Por su parte, los linfocitos B se reconocen por la expresión en su membrana de inmunoglobulinas IgM y en algunos casos IgD. Además son CD19+, CD20+, CD22+ y también expresan moléculas MHC clase II. Las células NK presentan los siguientes marcadores: Fc γ RIII (CD16), CD56 y CD57.

Tabla 10-3. Moléculas CD asociadas a linfocitos

CD	Sinónimo	Expresión célula	Función(es)
CD2 CD3	LFA-2	LT, células NK LT	MAC Transducción de señales
CD4 CD7 CD8		LT «helper» LT y timocitos LT citotóxicos	Adhesión, transducción de señales Adhesión, transducción de señales
CD10 CD11b	CALLA CR3 (α)	LT inmaduros Granulocitos, monocitos, NK	MAC. Con CD18 forma Mac-1 Receptor de iC3b
CD16	FcRIII	Granulocitos, macrófagos, células NK	Receptor de baja afinidad para IgG
CD19 CD20 CD21		Células B Pre-B y LB LB	Regulación de activación ¿Regulación de activación? Receptor de C3d y virus de Epstein Barr Ligando de CD23
CD22 CD23 CD25	FcRIIa Receptor de IL-2 baja afinidad	LB maduros LB activados LT, LB, macrófagos Activados	MAC Receptor de IgE de afinidad intermedia Con cadena 70 KDa forma receptor alta afinidad IL-2
CD28 CD29 CD35	VLA (β) CR1	LT citotóxicos Amplia Granulocitos, mono- citos, eritrocitos LB	MAC con CDw49a,b,c,d,e,f Receptor de C3b
CD40 CD54 CD55 CD56 CD57	ICAM-1 DAF	LB Amplia Amplia NK, algunos LT NK, algunos LT	Une CD40-L. Activación de LB. MAC Regulador del complemento

CD, «cluster designation»; MAC, molécula de adhesión celular; LB, linfocitos B; LT, linfocitos T; LFA, antígeno asociado a función de linfocito; ICAM, molécula de adhesión intercelular; VLA, antígeno muy tardío; DAF, «Decay Accelerating factor»; NK, células «Natural Killer».

2.2.2. Diferenciación de linfocitos

Los linfocitos se generan a partir de la CFU-L de la médula ósea que presenta desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en el núcleo y expresa CD34, C-Kit y HLA-DR en la membrana celular. La maduración de ambas líneas celulares, T y B implican una **etapa independiente de antígeno**, que ocurre en la médula ósea (línea B) y en el timo (línea T), y una **etapa dependiente de antígeno** que en ambas líneas celulares ocurre en los órganos linfoides secundarios (ver punto 3.2). La maduración de las células B se puede separar en dos estadios previos al LB maduro: **Pro-B** en que las células son TdT+, CD10+, CD19+, CD24+, CD34+, CD38+ y HLA-Dr+ y **Pre-B** se caracterizan por ser TdT+, CD10+, CD19+, CD20+, CD24+,

CD38+ y cadenas μ citoplasmáticas + (de IgM). Las **células B maduras** presentan el siguiente inmunofenotipo: CD19+, CD20+, CD21+, CD22+, CD24+, IgM+, IgD+ (no siempre) y FcR+.

Las etapas finales de diferenciación de los LB tienen lugar en periferia, en algún órgano linfoide secundario (ver punto 3.2) y son antígeno dependientes. En el punto siguiente se explica muy brevemente el proceso de activación linfocitaria que ocurre como consecuencia de la interacción, en este caso, entre IgM o IgD de membrana de un LB y el antígeno respectivo. Los LB vírgenes expresan en su membrana IgM y IgD y son negativos para CD10, CD23, CD38 y CD77. La célula B que toma contacto con el antígeno expresa CD23;

luego como célula precursora del centro germinal en los folículos linfoides (ver punto 3.2) el fenotipo que le caracteriza es IgM+, IgD+, CD10+, CD23-, CD38+ y CD77. Posteriormente en la zona oscura del centro germinal, las células (centroblastos) son IgM+, IgD-, CD10+, CD23-, CD38+ y CD77-. En la zona clara del mismo centro las células (centrocitos) presentan el siguiente fenotipo: IgG+ o IgM+ o IgE+, CD10+, CD23-, CD38+ y CD77-. Durante la etapa de precursor del centro germinal y centroblasto ocurre el fenómeno de **mutación somática** y entre la etapa de centroblasto y de centrocito se produce el fenómeno de **cambio de clase**. La última etapa es en la que se generan **células plasmáticas** (IgG+ o IgA+ o IgE+, CD10-, CD23-, CD38+ y CD77-) y **células de memoria** (IgG+ o IgA+ o IgE+, CD10-, CD23-, CD38- y CD77-).

Se distinguen dos subpoblaciones de células B, LB1 y LB2: la subpoblación B1 presenta receptores BcR polirreactivos de baja afinidad y se encuentra mayoritariamente en el peritoneo y en el bazo; la subpoblación B2, constituye la mayor parte del repertorio linfocitario B y se encuentra, fundamentalmente, en los órganos linfoides secundarios y en la sangre. La mayoría de los linfocitos B1 se caracteriza por la expresión del marcador CD5 (glicoproteína monomérica de 67 kDa, propia de linfocitos T) y aunque su función es todavía un misterio, se ha sugerido que la activación de estas células conduce a la producción de anticuerpos que proporcionan protección contra infecciones bacterianas durante la vida fetal, mucho antes que el repertorio linfocitario de la respuesta inmune adquirida sea completamente funcional. Además, en el repertorio adulto, los linfocitos B1 dan origen a células plasmáticas que secretan IgM y a una fracción importante de células plasmáticas productoras de IgA en el intestino. De hecho, la transferencia pasiva de linfocitos peritoneales B1 en ratones Scid (que sufren de una severa inmunodeficiencia combinada), reconstituye la producción de IgA contra muchas bacterias intestinales. Por otro lado, la transferencia pasiva de células de hígado fetal o del omentum intestinal, a ratones irradiados, rápidamente reconstituye la subpoblación B1, mientras la transferencia de precursores de médula ósea adulta reconstituye la subpoblación B2 pero no la B1. En el repertorio linfocitario adulto, los linfocitos B1 son bastante frecuentes en la población B que sufre neoplasias y en aquellos que reconocen una gran variedad de autoantígenos y reaccionan cruzadamente con antígenos bacterianos como polisacáridos y

lipopolisacáridos. El repertorio de receptores BcR es bastante más limitado en los linfocitos B1 que en los linfocitos B2, sus reordenamientos génicos V_H son más restringidos, y, como no expresan la enzima TdT (Deoxinucleotidil transferasa terminal), carecen de regiones N en las uniones VDJ.

Por su parte, la maduración de las células T se puede separar también en dos estadios previos al LT maduro: **Pro-T** que son TdT+, HLA-DR+, CD1+, CD2+, CD5+, CD7+, C-kit+ y CD3 citoplasmático +, y **Pre-T** que son TdT+, CD1+, CD4+, CD5+, CD7+, CD8+, CD3 citoplasmático +. Las **células T maduras** presentan el siguiente inmunofenotipo: CD2+, CD3+, CD4+ ó CD8+, CD7+, y TCR $\alpha\beta$ +. Por otra parte, como se indicó en el punto 2.2.1, en base al diferente patrón de secreción de citoquinas, se distinguen dos subpoblaciones de células T "helper" (CD4+), LTh1 y LTh2.

2.2.3. Reconocimiento antigénico

Los LB y LT presentan receptores para antígenos específicos, que incluye una Ig de membrana en el Receptor de células B (BCR) o el heterodímero $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ en el receptor de células T (TCR).

a) Receptor de linfocitos B e Inmunoglobulinas

Estructura

El receptor de linfocitos B (BcR), es una estructura compleja, que incluye dos subunidades estructural y funcionalmente distintas. La primera subunidad corresponde a una inmunoglobulina (Ig) de membrana, que actúa como receptor clonotípico, responsable del reconocimiento específico del antígeno (Ag). La segunda subunidad corresponde al complejo accesorio Ig α /Ig β , responsable del transporte y expresión de BcR en la membrana y de la transducción de señales de activación, cuando el receptor clonotípico se une al epítipo antigénico.

Todas las Igs, tanto de membrana como de secreción, tienen una estructura básica constituida por 2 cadenas pesadas (H) idénticas entre sí y 2 cadenas livianas (L), también idénticas entre sí.

Cadenas H y L se asocian formando una estructura simétrica, compuesta por 2 heterodímeros H/L idénticos y covalentemente

unidos entre sí por puentes disulfuro ubicados por detrás de una región “hinge” o bisagra, de gran movilidad.

En la región aminoterminal de cada heterodímero existe un paratopo o sitio de combinación para el Ag, formado por el dominio aminoterminal de cadenas pesadas y livianas.

La Ig de membrana es una molécula bivalente con 2 sitios de combinación para el Ag y monofuncional: sólo tiene función de reconocimiento antigénico. La región carboxiterminal de las cadenas H contiene una región hidrofóbica de anclaje a la membrana y un dominio citoplasmático. La versión soluble de una Ig (Igs) se denomina anticuerpo y se distingue de una Ig de membrana porque carece de la región hidrofóbica de anclaje a la membrana y porque es una molécula bifuncional: que conserva la capacidad para reconocer el antígeno, pero que mediante su extremo libre carboxiterminal de las cadenas pesadas (denominada región Fc), tiene la capacidad de reclutar y activar mecanismos efectores de respuesta inmune (estimular la fagocitosis, activar el sistema del complemento, activar citotoxicidad dependiente de anticuerpos).

En las cadenas livianas (de 25 kDa) se distingue una región o dominio variable (VL) aminoterminal de 110 aminoácidos y un dominio carboxiterminal (CL) de 110 aminoácidos.

Así, cadenas L obtenidas de Ig de membrana y de anticuerpos que reconocen distintos epítopos, tendrán distinta región VL pero idéntica región CL. Sin embargo, diferencias en el dominio CL de cadenas livianas permiten distinguir dos clases, tipos o isotipos de cadenas L, denominados cadenas kappa (κ) y lambda (λ).

Las cadenas pesadas (de 50kDa) contienen un dominio variable (VH) aminoterminal de 110 aminoácidos y 3 ó 4 dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4) carboxiterminales de 110 aminoácidos cada uno.

Variaciones en la región constante de las cadenas pesadas, permiten distinguir 5 clases, tipos o isotipos de cadenas pesadas, denominadas μ y ϵ (que contienen 4 dominios CH) y α , δ , γ (que contienen 3 dominios CH).

La clase de cadena pesada de una Ig de membrana o de un anticuerpo, determina la clase, tipo o isotipo de la Ig de membrana o del anticuerpo. Así, se distinguen Igs de membrana o anticuerpos de clase IgM que contienen cadena pesada μ , de clase IgD que contienen cadena pesada δ , de clase IgG que contienen cadena pesada γ , de clase IgA que contienen cadena pesada α y de clase IgE que contienen cadena pesada ϵ .

La región constante libre de las cadenas pesadas (región Fc) de un anticuerpo es responsable de la función efectora de ese anticuerpo. Por lo tanto, las diferencias en la región constante determinan diferencias en la función efectora de los anticuerpos IgM, IgG, IgA, IgE e IgD (opsonización, activación del sistema del complemento, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), presencia en las secreciones, movilización transplacentaria).

En los linfocitos B, la Ig de membrana es siempre un monómero formado por 2 cadenas livianas y 2 cadenas pesadas. Entre los anticuerpos en cambio, es posible encontrar Ig poliméricas (poli-Ig) que forman dímeros, trímeros, pentámeros o hexámeros. Así, un anticuerpo de clase IgM es un pentámero o hexámero mientras IgA puede encontrarse como monómero, dímero o trímero. La polimerización de esta poli-Ig ocurre por asociación con una proteína J (“joining”) de 15 kDa, que permanece covalentemente unida al extremo carboxilo de las cadenas pesadas del anticuerpo.

Variabilidad en la especificidad antigénica

En humanos, la diversidad en la especificidad antigénica de las Ig de membrana o de los anticuerpos se genera por recombinación o reordenamiento génico que ocurre al azar, durante la generación y diferenciación de linfocitos en la médula ósea (que actúa como órgano linfóide primario central). A esta diversidad o variabilidad generada de manera antígeno-independiente (en ausencia de antígeno) por recombinación génica, se sumará luego la diversidad generada por mutación en el órgano linfóide primario o, por hipermutación en las regiones variables de cadenas pesadas y livianas, luego del reconocimiento antigénico en los órganos linfoides secundarios de la periferia.

En el DNA germinal de las células troncales

precursoras de los linfocitos B, no existe el gen que codifica la cadena pesada, así como tampoco existe el gen que codifica la cadena liviana de una inmunoglobulina. Durante el proceso de diferenciación que conduce a la generación de linfocitos B en la médula ósea, ocurre un proceso de reordenamiento génico (catalizado por un complejo enzimático denominado **recombinasa**), que permitirá ensamblar o crear el gen que codifica la cadena pesada y el gen que codifica la cadena liviana de una inmunoglobulina.

La cadena pesada de una Ig está codificada por una única familia de segmentos génicos, minigenes o minixones, situados en el cromosoma 14 humano. Esta familia de segmentos génicos incluye múltiples copias de segmentos génicos variables (segmentos V_H), de diversidad (segmentos D_H), segmentos de unión (segmentos J_H) y segmentos génicos constantes (segmentos C_H). El gen para la cadena pesada será ensamblado a partir de un único segmento génico J (elegido al azar) que será colocado junto a un único segmento D y luego a un único segmento V, generando así la región del DNA que codificará la región o dominio variable de la cadena pesada. La región VDJ ya ensamblada se unirá luego al segmento génico C que codifica la región o dominio constante de la cadena pesada. Se genera de esta manera el gen para la cadena pesada, conteniendo segmentos génicos VDJC.

Reordenado el gen que codifica la cadena pesada, debe efectuarse el reordenamiento génico que conduce a la generación del gen que codifica la cadena liviana de la Ig.

La cadena liviana de una Ig está codificada por dos familias génicas distintas: la familia génica para la cadena kappa (κ) situada en el cromosoma 2 humano y, la familia génica lambda (λ) situada en el cromosoma 22 humano. Ambas familias génicas contienen segmentos génicos variables (V_L), segmentos génicos de unión (J_L) y segmentos génicos constantes (C_L) a partir de los cuales debe ensamblarse un gen kappa o un gen lambda, respectivamente.

b) Receptor de células T

Estructura

El receptor de linfocitos T (TcR), es un complejo glicoproteico transmembrana, que

incluye dos subunidades estructural y funcionalmente distintas (y no covalentemente unidas entre sí). La primera subunidad es el receptor clonotípico, TcR $\beta\alpha$ o TcR $\delta\gamma$, responsable del reconocimiento específico del antígeno (Ag). La segunda subunidad corresponde al complejo accesorio CD3, responsable del transporte y expresión de TcR en la membrana y de la transducción de señales de activación, cuando el receptor clonotípico se ha unido específicamente al antígeno.

El receptor clonotípico reconoce fundamentalmente fragmentos peptídicos asociados a una molécula de presentación antigénica (moléculas MHC de clase I o MHC de clase II) o antígenos glicolípidicos asociados a moléculas CD1. Mientras el repertorio linfocitario B puede reconocer tanto antígenos solubles como de membrana, de naturaleza proteica, hidrocarbonada, lipídica, nucleotídica, etc., el repertorio linfocitario T reconoce, fundamentalmente, fragmentos peptídicos asociados a molécula MHC de clase I o MHC de clase II.

El 90-95% de los linfocitos T $\beta\alpha$ corresponden a linfocitos T, que reconocen fundamentalmente fragmentos peptídicos unidos a una molécula de presentación MHC, en la membrana de una célula presentadora de antígeno. El 5-10% restante, corresponden a linfocitos T $\delta\gamma$ entre los cuales se pueden distinguir linfocitos que reconocen fragmentos peptídicos unidos a moléculas MHC, linfocitos T $\delta\gamma$ que reconocen glicolípidos unidos a moléculas CD1 y finalmente, linfocito T $\delta\gamma$ que, como los linfocitos B, pueden reconocer directamente diversas moléculas (particularmente compuestos fosforilados).

El receptor clonotípico T, es un heterodímero T $\beta\alpha$ o T $\delta\gamma$ formado por dos cadenas glicoproteicas de 40 a 60 kDa, covalentemente unidas entre sí por puentes disulfuro. En cada cadena del receptor clonotípico T $\beta\alpha$ o T $\delta\gamma$, se distingue: un dominio variable (V) aminoterminal de 112 a 119 aminoácidos, un dominio constante C, de 139 a 178 amino-ácidos, un dominio hidrofóbico transmembrana de 25 aminoácidos y una pequeña cola citoplasmática de 12 aminoácidos.

Variabilidad en la especificidad antigénica

De manera similar a lo que ocurre con las células

precursoras de linfocitos B en la médula ósea, el DNA germinal de las células precursoras de linfocitos T que colonizarán el timo (órgano linfoide primario en la generación de linfocitos T), no contiene los genes que codifican las cadenas alfa y beta o gamma y delta de los linfocitos $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$, respectivamente.

Linfocitos y reconocimiento antigénico

Además de presentar un receptor diferente, las células B y células T reconocen el antígeno de forma diferente; en el caso de los LB las Ig de membrana (IgM en linfocitos B vírgenes, IgG, IgA o IgE en linfocitos B de memoria), reconocen directamente el antígeno, sin intervención de otra célula. El TCR en cambio, reconoce péptidos extraños presentados por una célula presentadora de antígeno y unido a moléculas MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad) de clase I, si se trata de LTc y de clase II si se trata de LTh. Estos péptidos se originan durante el procesamiento del antígeno en células blanco (cuando son presentados en moléculas MHC clase I), y en las denominadas células presentadoras de antígeno profesionales (cuando son presentados en moléculas MHC clase II). Existe además una subpoblación de linfocitos T, que reconoce moléculas lipídicas (lipoproteínas, glicolípidos) presentadas en el contexto de moléculas CD1, en la membrana de células presentadoras profesionales.

Las células NK, no expresan inmunoglobulinas de membrana ni TCR, pero presentan receptores: de activación KAR («Killer Activating Receptor») y receptores de inhibición KIR («Killer Inhibition Receptor»). Los receptores KAR reconocen patrones moleculares hidrocarbonados característicos de microorganismos y los receptores KIR reconocen moléculas MHC de clase I en células propias; estos últimos transducen señales de inhibición de los mecanismos de citotoxicidad.

Los linfocitos T y las células NK son altamente efectivas en la eliminación de células tumorales y células infectadas por virus y, aunque los receptores involucrados en el reconocimiento de la célula blanco son distintos, tanto linfocitos T como células NK utilizan el mismo mecanismo de citotoxicidad que involucra la liberación de perforina, granzimas y granulinas, y almacenados en gránulos citoplasmáticos, y expresa FasL.

2.2.4. Activación de los linfocitos

La unión del antígeno con el receptor específico

de una célula T o B activa al linfocito mediante un delicado proceso bioquímico que implica transducción de señales al interior de la célula, generación de segundos mensajeros (IP_3 , DAG, Ca^{2+}) y fosforilación de proteínas. Proteínas fosforiladas, se unen a secuencias reguladoras de genes que participan en la activación de los linfocitos. Como consecuencia de la activación, el linfocito sufre un proceso denominado **transformación blástica** que implica una serie de cambios estructurales y bioquímicos que terminan en la formación de una célula grande, de citoplasma basófilo (por aumento de retículo endoplásmico), núcleo laxo, semejante a un linfoblasto. La activación linfocitaria produce una **amplificación clonal** (etapa de proliferación de células con la misma especificidad antigénica), posteriormente ocurre una **producción de células efectoras**, responsables de la síntesis de anticuerpos (células plasmáticas) y de la inmunidad mediada por células (LT CD4+ y LT CD8+) y **células de memoria** (estas dos últimas como parte de la etapa de maduración).

2.3. Sistema fagocítico mononuclear

Dada su relación ontogénica, y sus características estructurales y funcionales, a los monocitos y macrófagos se les agrupa en el denominado Sistema fagocítico mononuclear (SFM), antes llamado sistema retículo endotelial. Se describirá en este punto a las células dendríticas (DC, «Dendritic Cells») por su origen común, aunque no son principalmente fagocíticas.

Las células del SFM presentan un amplio espectro de funciones: (a) remoción de células muertas, senescentes, extrañas, y alteradas; (b) regulación de la función de otras células; (c) procesamiento y presentación de antígenos; (d) participación en reacciones inflamatorias; (e) destrucción de microorganismos y (f) destrucción de células neoplásicas.

2.3.1. Monocitos

Los monocitos presentan un diámetro de 12-15 μm (figura 10-3) y representan un 4-10% de los leucocitos sanguíneos (tabla 10-2). En su citoplasma tienen gránulos azurófilos o primarios que contienen hidrolasas ácidas, que junto con los mecanismos oxidativos, participan en la destrucción de las partículas fagocitadas; al respecto es válido lo que será descrito antes para los neutrófilos (punto 2.4.1).

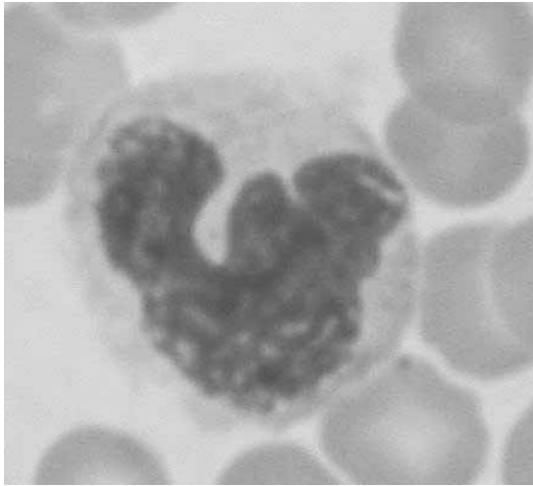


Figura 10-3. Microfotografía de un monocito. Los monocitos son precursores sanguíneos de los macrófagos tisulares. Presentan un núcleo excéntrico arriñonado.

Después de salir de la médula ósea los monocitos circulan aproximadamente 8 horas;

al igual que los neutrófilos, en la sangre se reconocen dos compartimentos, circulante y marginal; luego pasan a los tejidos donde se transforman en macrófagos. En relación a los monocitos los macrófagos son de mayor tamaño y presentan mayor capacidad fagocítica y microbicida. Pueden permanecer vivos entre algunos meses y años. Se encuentran en varios órganos, destacando su presencia en el hígado (células de Kupffer), riñones, pulmones (macrófagos alveolares e intersticiales), serosas (peritoneal y pleural) bazo, ganglios linfáticos, cerebro, aparato reproductivo (testículo, ovario, útero, oviductos), hueso (osteoclastos) e intestino. también se encuentran en la leche materna.

a) Receptores de fagocitos mononucleares

Los macrófagos y monocitos presentan una gama importante de receptores: para región Fc inmunoglobulinas, complemento, lipoproteínas, citoquinas y factores quimiotácticos, entre otras moléculas (tabla 10-4).

Tabla 10-4. Receptores de macrófagos y monocitos

Receptores de Inmunoglobulinas Fc γ RI (CD64) Fc γ RII (CD32): A, B y C Fc γ RIII (CD16): A y B Fc ϵ RI Fc ϵ RII Fc ϵ RIII (CD23): A y B Fc α R Receptores del Complemento CR1 (CD35) CR3 (CD11b/CD18) Receptores de Citoquinas TNF-R IL-1R M-CSFR IFN γ R Receptores de factores quimiotácticos De péptidos formilados De quimioquinas De C5a Receptor de lipopolisacárido (CD14) Receptores de lipoproteínas LDL-R Receptor "scavenger" (de LDL modificada) Receptores de hormonas De Glucocorticoides De Insulina De Estrógenos Otras hormonas Receptor de transferrina Receptor de lactoferrina Receptor de fibronectina

Las **Moléculas de Adhesión Celular (CAM)** participan en las uniones célula-célula y célula-matriz. En los monocitos y macrófagos, entre otras moléculas de adhesión se han descrito las moléculas LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) y p150,95 o CR1 (CD11c/CD18) de la familia integrinas y las moléculas CD2 e ICAM-1 (CD54) de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SfIg).

2.3.2. Macrófagos

Los macrófagos pueden ser residentes (fijos en tejidos) o libres. Entre los primeros destacan:

Macrófagos intestinales. Los macrófagos se encuentran principalmente en la lámina propia del tracto gastrointestinal. Las áreas corticales ricas en linfocitos asociados a intestino (GAL) y las placas de Peyer contienen muy pocos macrófagos. Respecto a su función, podrían participar en la presentación antigénica, y en la fagocitosis de bacterias y células muertas.

Macrófagos del hígado. Las células de Kupffer se ubican en las paredes vasculares de los sinusoides hepáticos. Pueden fagocitar un espectro amplio de células y partículas, entre ellos, liposomas, bacterias, parásitos, virus, glóbulos rojos y plaquetas opsonizadas con IgG y/o complemento.

Macrófagos cerebrales. Estos macrófagos son llamados células microgliales. La función de estos macrófagos no es bien conocida, posiblemente participan en la inducción de la respuesta inmune y probablemente modulen la función neuronal.

Macrófagos peritoneales. Éstos se encuentran entre los macrófagos de serosas; tienen capacidad para destruir células neoplásicas y bacterias. En casos de peritonitis o ascitis maligna aumenta el número de macrófagos.

Macrófagos de órganos reproductivos. Los testículos contienen un gran número de macrófagos. Pueden participar en la fagocitosis de espermios moribundos no eyaculados y en la destrucción de microorganismos. En los ovarios los macrófagos pueden participar en la fagocitosis de células degenerativas del cuerpo lúteo.

Macrófagos del hueso. Los osteoclastos se encargan de la resorción ósea.

Macrófagos del tejido conjuntivo: Corresponden a los histiocitos.

Macrófagos renales. Son las células mesangiales de los glomérulos renales.

Los macrófagos libres están situados en órganos linfoides secundarios (macrófagos de los sinusoides esplénicos y de los senos medulares en los ganglios linfáticos), allí atrapan material extraño.

Los macrófagos tienen una vida media mucho más larga que los neutrófilos en los tejidos, pudiendo ser meses e incluso años.

Una subpoblación de los monocitos y macrófagos, expresa en su superficie moléculas MHC de clase II, que participan en la presentación del antígeno a los linfocitos T «helper». Por otra parte, sintetizan y secretan citoquinas como interferón (IFN) α y β , IL-1 y factor de necrosis tumoral (TNF).

2.3.3. Células dendríticas

Las células dendríticas (DC) residen en la periferia y actúan como centinelas del sistema inmune monitoreando el microambiente tisular periférico y capturando antígenos en el contexto de receptores PAMP. Debido a su capacidad migratoria única, las células dendríticas pueden transportar antígenos desde la periferia a los órganos linfoides secundarios donde, luego de su maduración, procesarán y presentarán fragmentos antigénicos estimulando la activación y diferenciación de linfocitos T-antígeno específicos. Injuria tisular, infecciones y otros factores que alteren la homeostasis tisular periférica, proporcionarán señales de peligro que conducen a la producción local de citoquinas proinflamatorias y movilización de células DC a los órganos linfoides secundarios. En estos órganos la síntesis y secreción concomitante de IL-12 estimulará la diferenciación de linfocitos Th1. Dosis bajas de LPS (lipopolisacáridos) de bacterias gram negativas favorecen el desarrollo de una respuesta Th2, mientras la exposición a altos niveles de LPS la suprime. La inhalación de bajas dosis de LPS a nivel respiratorio induce migración y maduración de DC y el desarrollo de una respuesta Th2. La inhalación de altos niveles de LPS induce respuesta Th1 y la inhalación de antígenos purificados no induce migración de DC a ganglios linfáticos y por lo tanto ocurre respuesta celular T. Junto a monocitos, macrófagos y linfocitos B, las DC forman la subpoblación de células presentadoras de antígeno profesionales. Sin embargo, las DC

presentan la mayor capacidad y eficiencia en el inicio y en la modulación de la respuesta inmune. Morfológicamente se caracteriza por la presencia de prolongaciones alargadas que salen del cuerpo celular.

Durante su maduración, las DC sufren una serie de cambios inmuno-funcionales que les permite una mejor adaptación a las circunstancias o eventos inmunológicos, así consiguen una mayor especialización en sus funciones de presentación antigénica y de proporcionar señales accesoria de coestimulación a los linfocitos T.

Se ha demostrado la existencia de distintas líneas de DC, con diferentes estadios madurativos y vías de migración, lo que implica una distribución anatómica diferente. A partir de la célula pluripotencial CD34+ y en presencia de GM-CSF y TNF α se diferencia en: (a) CD1 α +, CD14-, de las que se originan las células de Langerhans (DC de la piel) y (b) CD1 α -, CD14+ que dan origen a las DC mieloides. Las células de Langerhans se trasladan hacia tejidos no vascularizados como la epidermis en la piel, y las DC mieloides lo hacen hacia zonas vascularizadas, localizándose en los intersticios (DC intersticiales). Una vez que las células de Langerhans han incorporado el antígeno en la piel, migran por la linfa hacia los ganglios linfáticos donde lo presentan a las LT; las DC intersticiales, por su parte, migran hacia el bazo a través de la sangre.

La maduración de las DC es fundamental en la iniciación de la respuesta inmune. Los estudios de maduración *in vitro* de las DC se realizan a partir de monocitos obtenidos de sangre periférica e incubados en presencia de GM-CSF e IL-4; se obtiene así una población de **DC inmaduras**, células que expresan en su superficie moléculas MHC clase II en baja densidad, receptor de manosa, quimioquina CCR5 y FcR, y no expresan la molécula de adhesión ICAM-1 y molécula coestimuladora B7. En el paso a DC maduras participan LPS, y citoquinas como IL-1 y TNF α . Las **DC maduras** expresan en su superficie altos niveles de moléculas MHC clase II, moléculas coestimuladoras (CD40, CD86/B7-2 y B7-1), moléculas de adhesión (ICAM-1 y LFA-3) y receptores para quimioquinas como CCR7.

In vivo, factores, tanto de tipo infecciosos como inflamatorios, influyen en estimular la maduración y el movimiento de las DC hacia los tejidos linfoides secundarios.

2.4. Granulocitos

En la serie granulocítica, a partir del estadio madurativo de mielocito se reconocen tres líneas celulares diferentes: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. En la tabla 10-2 se muestra el porcentaje que cada una de estas líneas celulares ocupa entre los leucocitos en los adultos y el número absoluto que representa.

2.4.1. Neutrófilos. En los adultos, los neutrófilos maduros representan aproximadamente el 65% de los $4-10 \times 10^3/\mu\text{L}$ glóbulos blancos de la sangre.

Los neutrófilos tienen un diámetro de 10-15 μm y un núcleo segmentado con 2-5 lóbulos (figura 10-4). En su citoplasma se han descrito cuatro tipos de gránulos, los primarios o azurófilos (lisosomas), secundarios (específicos), terciarios y vesículas secretoras (tabla 10-5). Los **gránulos primarios**, son escasos en los estadios maduros, y contienen enzimas y proteínas microbicidas (entre otras, peroxidasa, lisozima, proteínas catiónicas) proteínas (elastasa, catepsina G y otras proteínas) e hidrolasas ácidas (entre otras, N-acetilglucuronidasa y catepsinas B y D). Los **gránulos secundarios**, son los más numerosos en los neutrófilos maduros; contienen lisozima, colagenasa, fosfatasas alcalina, lactoferrina y otras enzimas y proteínas. Los **gránulos terciarios** contienen principalmente gelatinasa. Las **vesículas secretoras**, al parecer formadas por endocitosis, contienen algunas proteínas plasmáticas.

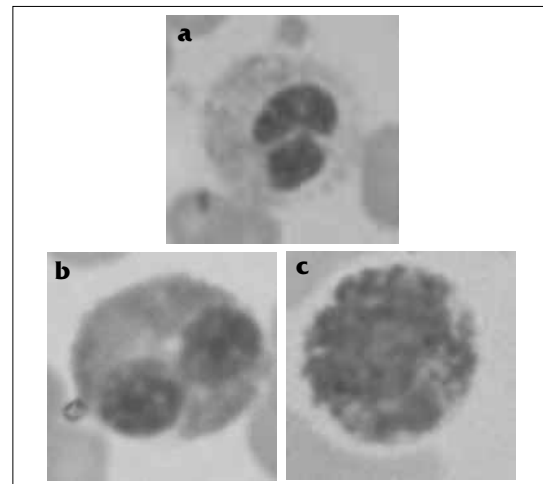


Figura 10-4. Microfotografía de granulocitos maduros. (a) Los neutrófilos son células de 10-15 μm . Debido al pH neutro de su citoplasma y contenido granular, éstos no se tiñen con la clásica tinción hematológica de May Grünwald-Giemsa. Una característica de los neutrófilos maduros es su núcleo segmentado. Los eosinófilos (b) y los basófilos (c) tienen un diámetro similar a los neutrófilos, presentan un núcleo bilobulado y gránulos que se tiñen en forma característica con May Grünwald- Giemsa.

Tabla 10-5. Contenido de los gránulos de los neutrófilos humanos

	Gránulos primarios	Gránulos secundarios	Gránulos terciarios	Vesículas secretoras
Membrana		CD11b (Mac-1) Citocromo b ₅₅₈ Receptor de FMLP Receptor de laminina Receptor de uPA	CD11b (Mac-1) Citocromo b ₅₅₈ Receptor de FMLP Receptor de laminina	CD11b (Mac-1) Citocromo b ₅₅₈ Receptor de FMLP Receptor de uPA Fosfatasa alcalina CD10, CD13, CD45 CD16 DAF (CD55) CR1 (CD35)
	CD63 CD66c CD68	CD15 CD66a CD666 Receptor de Fibronectina Subunidad α de Proteína G Antígeno NB1 RAP1, RAP2 Receptor de Trombospondina Receptor de TNF Receptor de Vitronectina		
Matriz				
Agentes microbicidas	Lisozima Mieloperoxidasa Defensinas Proteínas catiónicas Proteína bactericida permeabilizante (BPI)	Lisozima Colagenasa	Lisozima	
Proteasas	Elastasa Catepsina G Proteinasa 3			
Hidrolasas ácidas	N-Acetilglucuronidasa Catepsinas B y D β-Glucuronidasa β-Glicerofosfatasa β-Galactosidasa β-Glucosaminidasa α-Fucosidasa α-Manosidasa N-Acetil-β-glucosaminidasa			
Otros	Sialidasa Azurocidin Ácido mucopolisacárido Proteína ligante de heparina Factor inactivador de C5a	Sialisidasa Pro-uPA Apolactoferrina β ₂ -Microglobulina Histaminasa Heparinasa Proteína ligante de Vitamina B12 Inhibidor de proteína Kinasa C Otros	Gelatinasa Acetiltransferasa	Pro-uPA/uPA Proteínas plasmáticas: Tetranectina, Albúmina, Otras

FMLP, péptido formil-metil-leu-phe; uPA, Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

Algunas moléculas expresadas en la membrana de los neutrófilos son: (a) moléculas de adhesión, entre ellas LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), p150, 95 (CD11c), β_2 - integrina (CD18), ICAM-3 (CD50), L-selectina (CD62b), (b) receptores: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), Receptor para C5a (CD68), receptor para G-CSF (CD114), (c) ectoenzimas: aminopeptidasa N (CD13, inactiva IL-8), endopeptidasa (CD10, inactiva FMLP) y (d) otros: "Decay accelerating factor" (DAF, CD55), y Antígeno leucocitario común (CD45).

Una vez que los neutrófilos salen de la médula ósea, permanecen en circulación aproximadamente 7 horas, para luego pasar al azar a los tejidos, donde permanecen vivos 2-3 días. La producción y destrucción diaria de neutrófilos es de $0,9 \times 10^9$ /Kg de peso.

Para que los neutrófilos puedan cumplir su función de fagocitar y destruir las partículas ingeridas deben movilizarse al foco infeccioso, fagocitar y destruir el contenido:

a) Quimiotaxis

El movimiento de los neutrófilos al sitio de infección es dirigido por un gradiente químico (**quimiotaxis**). Entre otros factores quimiotácticos, para los que estos leucocitos poseen receptores, destacan algunas proteínas del complemento (C5a, C3a), péptidos formilados (Ej. N-formil-met-leu-phe, FMLP) y lípidos derivados de las bacterias, factor plaquetario 4 (PF4), metabolitos de la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, especialmente el leucotrieno B4 (LTB4), y las llamadas quimioquinas, entre ellas la IL-8. Varios de estos factores han sido clonados y secuenciados.

Los factores quimiotácticos actúan a bajas dosis (0,1-1mM). El efecto biológico de los factores quimiotácticos es lograr una migración dirigida de los neutrófilos. La respuesta leucocitaria a los factores quimiotácticos es regulada positiva o negativamente por varios estímulos fisiológicos y farmacológicos. Varias citoquinas, como por ejemplo, TNF α e IFN γ favorecen la quimiotaxis. En el caso del IFN γ participa aumentando la hidrólisis de fosfatidilcolina por la fosfolipasa D. La desensibilización celular al estímulo del factor quimiotáctico puede ocurrir por aumento de cAMP o degradación del factor quimiotáctico.

Adhesión de neutrófilos al endotelio

Para que los neutrófilos lleguen a los tejidos infectados, junto con recibir la señal quimiotáctica, éstos deben unirse al endotelio, luego rodar sobre éste ("rolling"), sufrir un proceso de activación adicional y luego participar de un proceso de migración transendotelial. En este proceso tienen importante participación algunas moléculas de adhesión celular (capítulo 12), expresadas en forma constitutiva e inducida en la membrana de los neutrófilos y células endoteliales.

Aproximadamente la mitad de los neutrófilos circulantes forman parte del "pool" marginal, que mantienen interacción intermitente con el endotelio. Las moléculas de adhesión de la familia selectinas (L-selectinas, CD62L en leucocitos y E-selectinas, CD62E en células endoteliales) y sus ligandos, carbohidratos sialilados, son responsables del "rolling" de los neutrófilos sobre el endotelio. La interacción de los factores quimiotácticos con sus respectivos receptores inicia el proceso de transducción de señales en los neutrófilos, lo que inicialmente se asocia con expresión de moléculas de adhesión de la familia integrinas, especialmente LFA-1 (CD11a-CD18) que se une a su ligando de la superfamilia de las inmunoglobulinas ICAM-1 (CD54) en las células endoteliales. Este último tipo de interacción resulta en un marcado incremento de la adhesión de los neutrófilos al endotelio y término del "rolling". Luego los neutrófilos migran entre las células endoteliales al tejido.

b) Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso que realizan diversos tipos celulares que van desde células epiteliales a fibroblastos y células del sistema inmune como monocitos-macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, que son conocidas como fagocitos profesionales. El primer paso en la fagocitosis es el reconocimiento de partículas, agentes infecciosos o células por receptores de la membrana celular. En metazoos la fagocitosis es importante en la remoción de células apoptóticas durante el desarrollo y remodelamiento tisular. En mamíferos es importante en la inmunidad innata y en la inmunidad adquirida y contribuye en nuestra habilidad para combatir agentes infecciosos. El proceso de formación del fagosoma a nivel superficial, y su transformación en fagolisosoma

es complejo e implica uniones ligando-receptor, transducción de señales de activación, rearrreglos locales del citoesqueleto en el sitio de internalización, y una serie dinámica de fusión/fisión de membrana y eventos de remodelación.

Receptores que participan en la fagocitosis

Una etapa inicial de la fagocitosis es el reconocimiento, por parte de la célula fagocítica, de la partícula a ser fagocitada. Para ello las células fagocíticas poseen 2 grupos de receptores, según lo que son capaces de reconocer: (a) ligandos propios de los organismos o células a fagocitar y (b) moléculas que se han unido a ellas y que favorecen la fagocitosis (opsoninas).

Entre los receptores que unen moléculas no opsonicas y que se presentan fundamentalmente los macrófagos, se encuentran: (i) los **receptores “scavenger”** que

unen varios ligandos, entre otros, proteínas modificadas, polianiones (incluye ácidos nucleicos), fosfolípidos ácidos (incluye lipopolisacárido de bacterias Gram negativas y ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas y (ii) el **receptor de manosa**, que une carbohidratos.

Entre los receptores de opsoninas, se distinguen: (i) los **receptores de fragmento Fc de IgG** (FcγR) e IgA (FcαR) unidos a un dímero de cadenas γ, los **receptores del complemento** y otros receptores (de colectinas y de proteínas plasmáticas). Los receptores de Fc son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, con 3 (FcγRIA) o 2 (otros receptores Fc) dominios tipo inmunoglobulina extracelulares, un dominio transmembrana y una corta cola citoplasmática; FcγRIIB, unido a glicofosfatidilinositol (GPI), es una excepción. En la tabla 10-6 se muestran los diferentes FcγR y el FcαR, indicado las células que los presentan.

Tabla 10-6. Receptores de la región Fc de IgG e IgA

Receptor	CD	Células
FcγRI*	CD64	Monocitos, macrófagos, Neutrófilos maduros tratados con IFNγ
FcγRIIA	CD32	Neutrófilos maduros, monocitos Macrófagos, plaquetas
FcγRIIB	CD32	Monocitos, macrófagos Linfocitos B, mastocitos
FcγRIIIA	CD16	Macrófagos, células NK Mastocitos
FcαR	CD89	Granulocitos, monocitos Macrófagos

* Tres locus génicos; I, alta afinidad; II, afinidad intermedia; III, baja afinidad

Los receptores del complemento incluyen CR1, una proteína de transmembrana que une C3b, y dos integrinas CD11b/CD18 y CD11c/CD18, también llamadas CR3 y CR4, respectivamente. Estos dos últimos receptores unen iC3b, molécula derivada de C3b y se une covalentemente a la superficie celular.

Otros receptores unen un grupo de moléculas llamadas colectinas, entre ellas la proteína que

une manosa (MBL), molécula que participa en la activación del sistema del complemento y la proteína C reactiva (PCR) que se puede unir por ejemplo al carbohidrato C del *Streptococcus pneumoniae*. Además también existen receptores para algunas proteínas plasmáticas que se pueden unir a los microorganismos, por ejemplo receptores para fibrinógeno y fibronectina.

Transducción de señales en la fagocitosis

Se describirá el mecanismo de transducción de señales asociados a la fagocitosis mediada por Fc γ R. Los receptores Fc γ RI, Fc γ IIA y Fc γ IIIA comparten la capacidad para activar la cascada de tirosina kinasa. Los dominios ITAM (“inmune-tirosine activation motifs”) de la cadena γ de los receptores Fc γ R pueden ser fosforilados por tirosina kinasa de la familia SyK. Esta etapa es fundamental para la ingestión y la polimerización de actina. Paralelamente, la unión ligando-receptor activa la **fosfolipasa C** la cual desdobla el fosfatidil inositol-4,5-difosfato (PIP₂) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ permite que se libere Ca²⁺ de los depósitos citoplasmáticos, el que permite dos acciones: (a) desencadena el ordenamiento de los filamentos de actina y de la proteína contráctil miosina, responsables del movimiento de los neutrófilos y (b) activa la **fosfolipasa A₂** que convierte los fosfolípidos de membrana en ácido araquidónico a partir del cual se obtienen otros metabolitos. El DAG activa la **proteína kinasa C** que fosforila proteínas que participan en los procesos de degranulación y secreción. La fosfolipasa D escinde fosfatidilcolina a ácido fosfatídico y colina; su activación se asocia a la unión de ligandos a receptores del complemento.

Endocitosis

La endocitosis, proceso por el cual el material

es introducido en la célula, puede tomar la forma de una **pinocitosis** (bebiendo por células) y **fagocitosis** (comiendo por células). La pinocitosis se refiere a ingestión de macromoléculas y la fagocitosis es visible al microscopio óptico. Ambos procesos involucran invaginación de la membrana celular y la formación de vesículas o vacuolas (fagosomas). La mayoría de las células pueden realizar pinocitosis, pero la fagocitosis es un proceso característico de los neutrófilos, monocitos y macrófagos, y, en mucho menor grado, de los eosinófilos y basófilos.

La **fagocitosis** de los microorganismos se ve favorecida si éstos están recubiertos (opsonizados) con IgG (subclases 1 ó 3) y/o fracciones del complemento (C3b y/o C4b). Los neutrófilos al igual que los monocitos y macrófagos, poseen receptores para la región Fc de IgG (Fc γ R) y para C3b y C4b (tabla 10-7). La unión de estas opsoninas con el receptor respectivo, activa la célula fagocítica, ésta emite prolongaciones que engloban al microorganismo. El fagosoma formado por la membrana plasmática, posteriormente se fusiona con la membrana de los gránulos citoplasmáticos que descargan su contenido enzimático en el interior del fagosoma. El DAG, a través de la proteína kinasa C que fosforila proteínas, “gatilla” la degranulación.

Tabla 10-7. Receptores para inmunoglobulinas y fracciones del complemento en los granulocitos y monocitos/macrófagos

	Fc ϵ RI	Fc ϵ RII	Fc γ RI	Fc γ RII	Fc γ RIII	C5aR	CR1	CR3
Neutrófilos	-	+	-	+ ?	+	+	+	+
Eosinófilos	-	+	-	-	+	+	+	+
Basófilos	+	-	-	-	+	+	+	+
Monocitos/ macrófagos	?	-	+	+	+	+	+	+

Fc ϵ R, Receptor para IgE (I, alta afinidad; II, afinidad intermedia); Fc γ , Receptor para IgG (I, alta afinidad; II, afinidad intermedia; III, baja afinidad); C5aR, receptor de C5a; CR1, receptor de C3b; CR3, receptor de iC3b.

Antes se indicó el contenido de cada uno de los tres tipos de gránulos de los neutrófilos (tabla 10-5). Así por ejemplo los gránulos azurófilos

contienen componentes antibacterianos; también contienen elementos como elastasa que puede favorecer el movimiento de los

neutrófilos al hidrolizar algunos componentes de la matriz extracelular. Los gránulos secundarios son liberados más fácilmente de los neutrófilos, conteniendo entre otras moléculas, algunas que activan el sistema del complemento. También contienen colagenasa, que al igual que la elastasa puede favorecer el movimiento de las células fagocíticas. Por otra parte, la apolactoferrina al unir hierro puede tener un efecto antimicrobiano, entre otras razones por privar de este elemento a las bacterias. Por su parte, la gelatinasa contenida en los gránulos terciarios puede participar, junto a otros componentes, en la modificación de la matriz extracelular durante el desplazamiento

de los neutrófilos. En otro orden, proteínas de membrana de los gránulos terciarios y de las vesículas secretoras, pueden aumentar su expresión en la superficie celular, después de la activación.

Mecanismos microbicidas

Una vez fagocitados los microorganismos, éstos son destruidos por mecanismos dependientes e independientes del oxígeno, también denominados mecanismos oxidativos y no oxidativos, respectivamente (tabla 10-6). Ambos mecanismos a menudo participan en forma sinérgica.

Tabla 10-6. Mecanismos antimicrobianos de los neutrófilos

Dependientes del oxígeno
Mediados por mieloperoxidasa Ácido hipocloroso (HOCl)
Independientes de mieloperoxidasa Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) Ión superóxido (O ₂ ⁻) ¿Otros?
Independientes del Oxígeno
pH ácido Lisozima Lactoferrina Defensinas Proteína bactericida permeabilizante (BPI) Proteínas catiónicas de los gránulos

a) Mecanismos antimicrobianos dependientes del oxígeno. Durante la fagocitosis, proceso dependiente de energía, se produce un aumento del consumo de oxígeno, de la oxidación de la glucosa y de la producción de metabolitos del oxígeno, fenómeno también denominado “estallido respiratorio” (figura 10-5). La generación de dichos metabolitos se debe a la activación de la NADPH oxidasa que al oxidar el NADPH reduce el oxígeno molecular a ión superóxido (O₂⁻), el que se convierte en peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Los metabolitos del oxígeno pueden actuar a través de un

mecanismo dependiente o independiente de mieloperoxidasa (MPO), enzima presente en alta concentración en los gránulos primarios, los que son degranulados al interior del fagosoma. La MPO, en presencia de un ión haluro como Cl⁻ (o Br⁻), transforma el H₂O₂, generada por mecanismos dependientes de oxígeno en ácido hipocloroso (HOCl), un potente oxidante y antimicrobiano, (antibacteriano, antifúngico, antiviral y antimicoplasma). Los radicales superóxido e hidroxilo, por sí solos tienen acción microbicida.

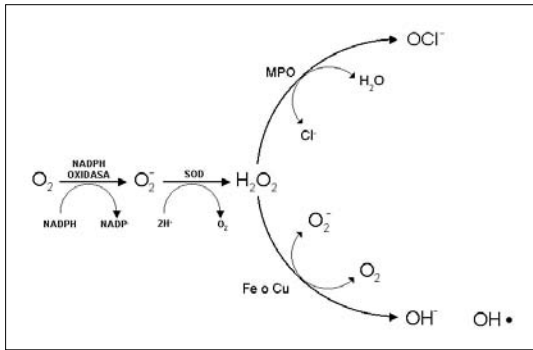


Figura 10-5. Mecanismos microbicidas oxidativos. Una oxidasa cataliza la reducción de oxígeno a ión superóxido (O_2^-) a expensas del NADPH. El NADPH es regenerado a través de la vía de las hexosas. El O_2^- es transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 por la superóxido dismutasa (SOD). Reacciones posteriores que comprometen al H_2O_2 y al O_2^- , llevan a la formación de dos tipos de compuestos microbicidas: radicales libres altamente oxidantes (OH^\bullet) o halógenos oxidados (por ejemplo: ácido hipocloroso, HOCl).

La oxidasa dependiente de NADPH, es un complejo multienzimático que incluye dos proteínas de membrana (de dos tipos de gránulos: vesículas secretoras y gránulos secundarios) y tres citosólicas, cuando la célula está en reposo. El componente de membrana es un heterodímero formado por una proteína de 91 kDa (gp91phox) y una proteína de 22 kDa (p22phox). Estas proteínas, junto con flavin adenin dinucleótido (FAD) forman un flavocitocromo denominado citocromo b_{558} . Adicionalmente en la membrana participa una proteína de unión de nucleótidos de guanina denominada rap1. La subunidad de 91 kDa presenta el sitio de unión para el NADPH. Ambas subunidades presentan grupos HEME. El componente citoplasmático está formado por tres proteínas independientes: p40phox, p74phox y p67 phox. Además participa otra proteína de unión de nucleótidos de guanina, rac2; en reposo une GDP y cuando la célula es activada una GTP.

Precozmente durante la activación, las vesículas secretoras y posteriormente los gránulos secundarios, se fusionan con la membrana plasmática, la cual durante la fagocitosis se invagina y por tanto la membrana de los fagosomas presentará las proteínas de membrana de la NADPH oxidasa. Como consecuencia de la activación de los neutrófilos, proceso en que p47phox es fosforilada, las proteínas citosólicas son translocadas a la membrana plasmática, formándose y activándose el complejo NADPH oxidasa.

La enfermedad granulomatosa crónica es una inmunodeficiencia primaria, causada por mutaciones que producen una pérdida o inactivación de una de las subunidades principales de la NADPH oxidasa (ver capítulo 11).

b) Mecanismos antimicrobianos independientes del oxígeno. Estos mecanismos funcionan en ausencia de metabolitos del oxígeno, situación que se presenta en un ambiente anaeróbico. En los mecanismos no oxidativos participan proteínas y enzimas presentes en los gránulos citoplasmáticos de los fagocitos (tabla 10-5). Entre otros componentes de estos mecanismos destacan: (a) la **lisozima**, enzima catiónica que destruye el péptidoglican de la pared celular, principalmente de las bacterias Gram positivas; (b) la **proteína bactericida permeabilizante (BPI)**, proteína catiónica que permeabiliza la membrana bacteriana; (c) la **catepsina G**, una serino proteasa con actividad sobre bacterias Gram negativas y (d) las **defensinas**, péptidos de 29-34 aminoácidos, ricos en arginina y cisteína, y que presentan actividad microbicida sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y algunos virus.

Una vez muertas las bacterias en el interior de los fagolisosomas, son degradadas por **hidrolasas ácidas**, que por la generación de ácido láctico durante la glicólisis, encuentran su pH óptimo para actuar.

2.4.2. Eosinófilos. Los eosinófilos son células de aproximadamente 10-15 μm de diámetro y cuyo núcleo es generalmente bilobulado (figura 10-4) y su citoplasma anaranjado con tinción de hematoxilina-eosina. Representan el 1-4% de los leucocitos sanguíneos (tabla 10-2); alrededor del 99% de los eosinófilos se encuentra en los tejidos donde llegan luego de un breve paso de aproximadamente 30 minutos por la sangre, después de salir de la médula ósea.

Los eosinófilos presentan dos tipos de **gránulos** en su citoplasma: gránulos específicos de eosinófilos y gránulos pequeños. Los gránulos específicos, aproximadamente 20 por célula, en su centro presentan la proteína básica mayor (MBP) y algunas citoquinas; en la matriz contienen proteína catiónica eosinófila (ECP), peroxidasa eosinófila (EPO), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y algunas citoquinas. Los gránulos pequeños que almacenan arilsulfatasa, se encuentran en los

eosinófilos maduros.

Cuando los eosinófilos son estimulados secretan algunos **mediadores** derivados de membrana: Leucotrieno C₄ (LTC₄), leucotrieno B₄, 15-HETE y PAF.

Los eosinófilos pueden sintetizar varias **citoquinas** proinflamatorias; se ha descrito mRNA para: IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, factores de crecimiento (TGF α , TGF β , TNF α , GM-CSF), IFN γ y algunas quimioquinas.

Uno de los **receptores** más importantes desde el punto de vista fisiopatológico son los receptores de Fc de IgE de baja afinidad (Fc ϵ R11) (tabla 10-4).

Los eosinófilos se acumulan en los tejidos. La quimiotaxis y la adhesión a las células endoteliales y a la matriz extracelular parece ser controlada por la respuesta inmune de células T y subsecuente liberación de citoquinas. Las citoquinas liberadas en procesos alérgicos son las que participan en respuestas inmunes tipo Th2 (IL-4, IL-5), en cambio en la reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) se encuentran citoquinas asociadas a respuesta tipo Th1 (Ej. IL-2, IFN γ). La liberación de IL-5 por LTh2 sensibilizados luego de su estimulación con antígeno específico, se puede asociar al desarrollo de eosinofilia durante enfermedad alérgica.

Las citoquinas además de participar en la diferenciación de los eosinófilos a partir de los precursores, contribuyen a su acumulación en el tejido inflamado. En esta última función participan principalmente IL-3, IL-5, GM-CSF, PF4, LTB₄, IL-8 y RANTES.

En la adhesión a endotelio y migración transendotelial participan, al igual que para los neutrófilos, las moléculas de adhesión celular: selectinas, integrinas y de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Algunas citoquinas (IL-3, IL-5 y GM-CSF) prolongan la supervivencia de los eosinófilos en los tejidos y aumentan su capacidad citotóxica.

En varias patologías aumenta la cifra absoluta de eosinófilos en la sangre (eosinofilia): infecciosas parasitarias, enfermedades alérgicas, neoplasias y algunos fármacos (ver capítulo 11), y enfermedades mieloproliferativa (ver capítulo 13).

2.4.3. Basófilos. Los basófilos representan menos del 1% de los leucocitos sanguíneos (tabla 10-2). Al igual que los otros granulocitos maduros presentan un diámetro aproximado de 10 μ m. En los frotis sanguíneos teñidos con May-Grünwald Giemsa, los gránulos citoplasmáticos ácidos que se caracterizan por presentar un intenso color azul violeta, casi cubren completamente el núcleo bilobulado (figura 10-4).

Los basófilos son muy similares a los mastocitos o células cebadas, en cuanto a la composición de sus gránulos y a su función.

La diferenciación a basófilos y mastocitos desde células inmaduras (CD34+, c-kit-, Fc ϵ RI-) ocurre a través de varias etapas en que éstos y otros marcadores de membrana se van modificando. Las células cebadas maduras presentan el siguiente fenotipo Fc ϵ RI+ y c-kit+ y los basófilos son Fc ϵ RI+, c-kit-, CD23+. Además al igual que los eosinófilos son CD25+ y CD125+.

En la diferenciación de basófilos la principal citoquina que participa es IL-3; también participan GM-CSF, IL-4 e IL-5. Esta última promueve además la diferenciación de eosinófilos. El TGF β -, en presencia de IL-3 suprime la diferenciación de eosinófilos y favorece la diferenciación de basófilos.

Varias moléculas mediadoras de inflamación son liberadas tanto de basófilos y mastocitos por mecanismos mediados por unión de IgE u otros mecanismos. Ambas células contienen histamina, PAF, condroitinsulfato, LTB₄, LTC₄, IL-4 e IL-13. Sólo en los mastocitos, óxido nítrico (NO), prostaglandinas D₂ (PGD₂), PGF₂, tromboxano A₂, triptasa, carboxipeptidasa A, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , TGF- β , IFN γ ; y sólo en los basófilos, MIP-1 α .

Varios factores pueden activar la secreción de mediadores de inflamación por parte de basófilos y células cebadas. Entre ellos, la unión de una molécula de IgE (o IgG) y su respectivo antígeno (alergeno) a los Fc ϵ RI (o Fc γ R11), anafilotoxinas (C3a y C5a), lectinas (ej. Conavalina A), algunas citoquinas (ej. IL-1, MIP-1 α). El péptido formil-met-leu-phe sólo estimula la secreción de los basófilos.

Ambos tipos celulares participan en las etapas iniciales del proceso inflamatorio, pero en las etapas más avanzadas de reparación sólo lo hacen los mastocitos. Así, inicialmente ambos

secretan mediadores inflamatorios (Histamina, IL-4, quimioquinas); solo los basófilos (IL-13); y solo los mastocitos (TNF, etc.), moléculas que durante el proceso van disminuyendo. Por su parte, las células cebadas durante el desarrollo del proceso siguen liberando otros mediadores, ahora antiinflamatorios (IL-10, TGF- β , etc.) y más adelante, moléculas que favorecen la reparación tisular (proteinasas, factores de crecimiento y otras citoquinas).

Varios fármacos antialérgicos y antiinflamatorios inhiben la secreción de mediadores desde los basófilos y mastocitos; sus acciones son

múltiples y variadas; entre otros se incluyen agonistas de B₂, antagonistas de H₁, corticoides y ciclosporina A.

3. ÓRGANOS LINFÓIDES

Desde un punto de vista inmunológico, los órganos y tejidos linfoides, se pueden clasificar en primarios y secundarios (figura 10-6). Más recientemente se han descrito los tejidos linfoides terciarios; parte de ellos son descritos aquí como tejido linfoide asociado a mucosas (punto 3.2.3) y se incluye además en este concepto el tejido linfoide asociado a piel.

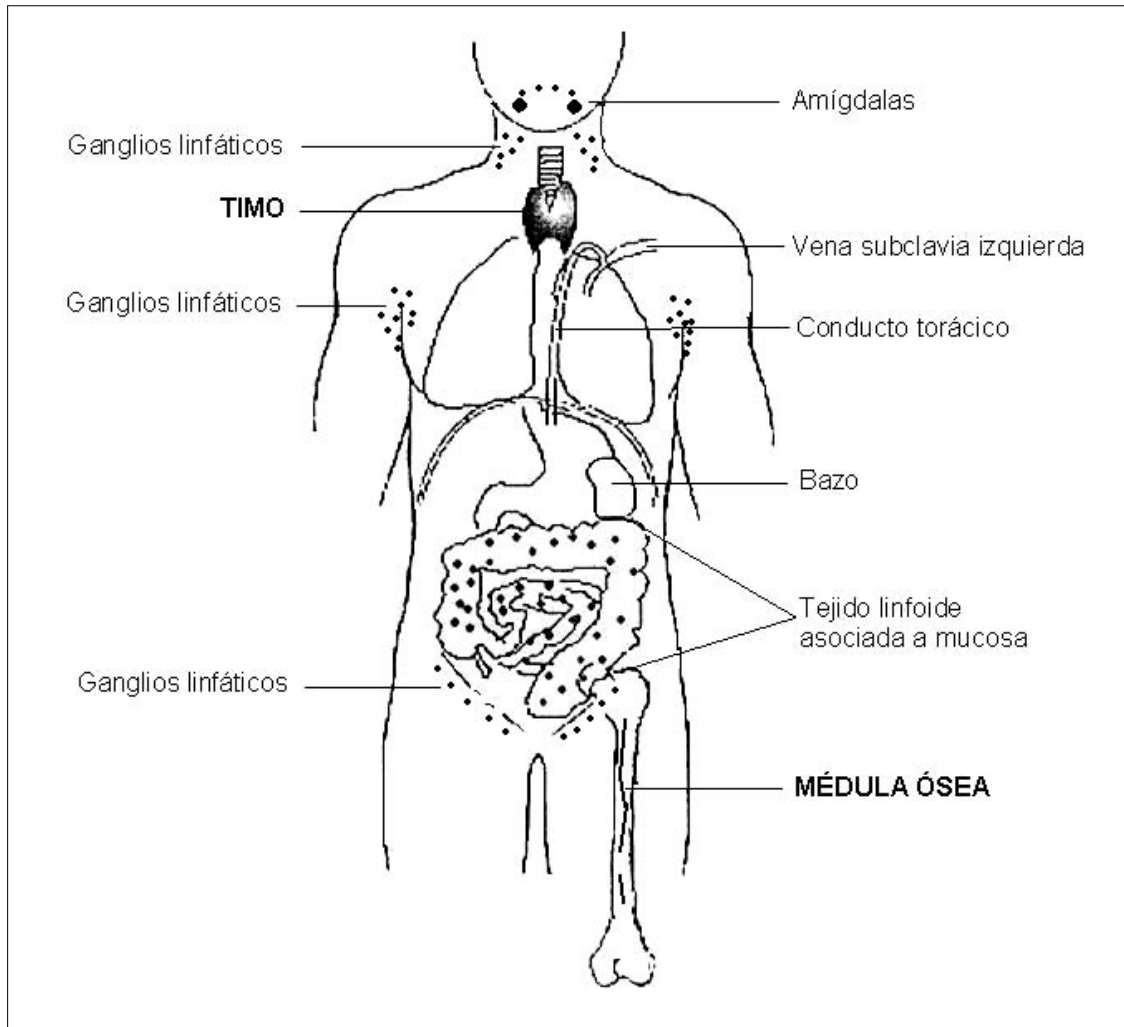


Figura 10-6. Órganos linfoides. Se muestran los órganos linfoides primarios (Médula ósea y Timo) secundarios (Bazo, Ganglios linfáticos: cervicales, axilares mesentéricos e inguinales), tejido linfoide asociado a mucosa (GALT: intestinal; BALT: bronquial) y amígdalas (palatinas, faríngea y linguales). Además se indica el lugar de drenaje de los linfocitos desde el conducto torácico a la sangre (vena subclavia izquierda).

3.1. Órganos linfoides primarios

En los órganos linfoides primarios, timo y médula ósea en el hombre, las células linfoides experimentan un proceso de proliferación y diferenciación a células T y células B, respectivamente. Este proceso no requiere presencia de antígenos extraños (antígeno independiente). Allí los linfocitos adquieren el repertorio de receptores antigénicos específicos (LT: TCR y LB: IgM e IgD) y aprenden a distinguir entre lo propio y lo extraño.

3.1.1. Médula ósea

En la médula ósea, a partir de la segunda mitad del embarazo y en el resto de la vida, ocurre la diferenciación y maduración de los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas (Hematopoyesis, ver punto 2.1 y capítulos 1 y 2). Entre los leucocitos, tiene especial interés en este caso la maduración de los linfocitos B.

En el hombre y otros mamíferos, la médula ósea es el tejido equivalente a la bolsa de Fabricio, órgano en el que se diferencian los linfocitos B en las aves; el origen de «B» se refiere a bolsa. La bolsa de Fabricio es un órgano linfoepitelial, que corresponde a un trozo de intestino modificado, localizado cerca de la cloaca; los folículos están en la corteza y médula de la bolsa.

La médula ósea se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos (principalmente en las epífisis) y en los espacios existentes entre las trabéculas de los huesos esponjosos.

La médula ósea está formada por dos importantes compartimientos: vascular y hematopoyético.

Los vasos sanguíneos del **compartimiento vascular** forman un esqueleto estructural en la médula ósea. La sangre que ingresa a la médula ósea lo hace por las arterias nutricias que perforan la diáfisis a través de los agujeros nutricios. Estas arterias entran en la cavidad medular y dan origen a la arteria longitudinal central, desde la cual se generan pequeños vasos que irrigan tanto la médula como el hueso cortical. Las ramas dirigidas a la médula descargan su sangre a capilares los cuales vacían en una extensa red de sinusoides. Los sinusoides (45 a 80 μ m de diámetro) están compuestos por células endoteliales, una lámina basal y una capa externa de células reticulares; estas últimas cubren aproximadamente el 50% de la superficie endotelial. Estos sinusoides drenan en una vena

longitudinal central, que a su vez descarga su contenido en venas que salen del hueso por el conducto nutricio. El pasaje transendotelial de células maduras, desde el comportamiento hematopoyético a la sangre ocurre directamente a través de poros de migración transitorios (4 μ m de diámetro) que se forman en las células endoteliales de los sinusoides.

El **compartimiento hematopoyético** está formado por los islotes de células hematopoyéticas de las diferentes líneas celulares (serie granulocítica, serie monocítica, serie eritroblástica, serie megacariocítica y serie linfocítica), en sus distintos estadios madurativos. En células se ubican entre los sinusoides, y entre éstos y la cortical del hueso. Además de las células hematopoyéticas en la médula ósea también existen otras células que forman parte del denominado estroma medular. Entre ellas destacan: macrófagos, células reticulares y algunas células adiposas. Estas células participan activamente en la regulación de la hematopoyesis secretando citoquinas y factores de maduración. Adicionalmente los macrófagos fagocitan núcleos expulsados por los eritroblastos ortocromáticos al madurar a reticulocitos, células alteradas y células muertas.

La hematopoyesis implica un complejo proceso de maduración y diferenciación celular. A partir de una célula pluripotencial se originan los diferentes tipos de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), glóbulos rojos y plaquetas. En dicho proceso participan varias citoquinas (ver punto 2.1 y capítulos 1 y 2). Por otra parte, las moléculas de adhesión celular (ver capítulo 12) presentes en las células hematopoyéticas y del estroma, y la matriz extracelular tienen fundamental participación en el proceso de maduración y focalización en la médula ósea. En el caso particular de los linfocitos, las células B maduran en la propia médula ósea.

Respecto a las células T, si bien éstas maduran en el timo, desde la médula ósea emigran células “encomendadas” a madurar como linfocitos T. Usando citometría de flujo, en médula ósea, se ha detectado una subpoblación que coexpresa CD34 (marcador de “Stem Cells”), CD2, CD7 y CD3 citoplasmático (marcadores de línea T). Sin embargo, también se propone la existencia de un progenitor común para ambos linajes celulares, B y T. Otros hallazgos indican que CD44 podría participar en el «homing» de las células linfoides que llegan al timo a madurar como células T.

3.1.2. Timo

La principal función del timo es participar en la maduración y diferenciación de los linfocitos T a partir de la proliferación y diferenciación de linfocitos troncales inmunológicamente no competentes que llegan, en estado inmaduro, desde la médula ósea.

En el humano, el timo comienza a originarse hacia el final de la sexta semana de gestación. Para el nacimiento el timo está totalmente desarrollado.

El timo es un órgano de naturaleza linfoepitelial que se ubica en el mediastino antero-superior, sobre los grandes vasos del corazón. Su tamaño y grado de desarrollo varían con la edad del individuo, alcanzando su máximo desarrollo (40 a 50 gramos), cerca de la pubertad, después de la cual empieza a involucionar, proceso que continúa hasta avanzada edad.

Está formado por dos lóbulos, derecho e izquierdo, unidos por tejido conectivo. Ambos lóbulos están rodeados por una cápsula de tejido conectivo; ésta emite numerosos tabiques al interior de los lóbulos subdividiéndolos en miles de lobulillos de 0,5-2 mm. Cada lóbulo posee una zona periférica y más rica en células, denominada corteza y la médula. Los tabiques llegan hasta el límite córticomedular.

El estroma laxo, compuesto por células reticulares epiteliales entreteje la corteza y la médula. En el retículo se encuentran linfocitos, macrófagos y células dendríticas interdigitantes.

Las **células retículo-epiteliales** tienen un aspecto variable. Presentan prolongaciones en forma de estrella, que interaccionan entre sí. En la periferia de la corteza y alrededor de los vasos sanguíneos, estas células conforman una capa continua de células planas. En la médula existen más células reticulares epiteliales que en la corteza, conformando en la primera los corpúsculos de Hassall. Las células reticulares epiteliales expresan en su superficie moléculas MHC de clase I y de clase II, las que al interaccionar con las células linfoides son fundamentales en el proceso de maduración de estos últimos.

Los **macrófagos** se encuentran en cantidad moderada en la corteza, pero son más abundantes en la médula. También expresan moléculas MHC de clase I y II.

Las **células dendríticas interdigitantes** se encuentran en abundante cantidad en el límite córticomedular y en la médula, se ubican entre el retículo que conforman las células retículo-epiteliales. Al igual que estas últimas, presentan largas prolongaciones citoplasmáticas a través de las cuales toman contacto con los linfocitos. También al igual que las células reticulares-epiteliales expresan en su membrana moléculas MHC clase I y II, y participan en la maduración de los linfocitos.

Las **células linfoides** se localizan entre las mallas que dejan las células retículo-epiteliales y son mucho más abundantes en la corteza que en la médula tímica. En la corteza subcapsular externa son células grandes ($\approx 15 \mu\text{m}$); corresponden a linfoblastos (células linfoides inmaduras). En el resto de la corteza y médula son más pequeños.

Después de la pubertad, cuando el timo comienza a involucionar, pierde peso y aumenta progresivamente la proporción de **adipocitos** (células grasas); sin embargo durante toda la vida persisten restos de parénquima. En el adulto una vez que se ha formado un "pool" de células T periféricas, aparentemente no es necesario la producción de grandes cantidades de linfocitos T.

Respecto a los **vasos sanguíneos**, el timo es irrigado por sangre que fluye a través de arterias que ingresan por la cápsula, formando arteriolas en los tabiques. Aquí se forman las vénulas interlobulares las cuales se vacían en la vena tímica eferente. Los capilares presentan un endotelio rodeado de una gruesa lámina basal. La corteza sólo es irrigada por capilares, éstos participan de la llamada **barrera hematotímica**, que protegería a las células linfoides en maduración en la corteza tímica, contra sustancias antigénicas circulantes.

En el timo ocurre la maduración de los linfocitos T, células que participan de la inmunidad celular e indirectamente en la inmunidad humoral. Células linfoides inmaduras llegan, desde la médula ósea (durante la gestación: del saco vitelino, bazo e hígado) a la región subcapsular de la corteza tímica donde se diferencian a células T inmaduras (timocitos). Durante el proceso de maduración, desde células doble negativas (CD4-, CD8-), y CD3- y TCR- a células T CD4+ (LTh) o CD8+ (LTc) y CD3+ y TCR+, las células linfoides se movilizan desde la corteza a la médula tímica. Durante este recorrido interaccionan con células reticulares epiteliales

y células dendríticas interdigitantes, las cuales expresan en su membrana moléculas de MHC clase I y II.

En el proceso de maduración ocurren los procesos de selección, positiva y negativa. En la primera, los linfocitos que a través de su TCR reconocen las moléculas MHC propias son seleccionados positivamente (pueden continuar el proceso de maduración); los otros sufren apoptosis. Las células que pasan la primera etapa son sometidas a la llamada selección negativa, durante la cual son eliminadas (apoptosis) las que, a través de su TCR, reconocen con alta afinidad antígenos propios en las moléculas MHC de clase I o II de las células reticulares-epiteliales o células dendríticas interdigitantes. Durante el proceso de maduración tímica sobrevive alrededor del 5% de las células linfoides que proliferaron en la corteza tímica; las células T maduras (LTc y LTh), abandonan la médula tímica a través de las venas que drenan al timo.

La falta de desarrollo congénita de timo se denomina Síndrome de DiGeorge. Estas personas no pueden producir linfocitos T, desarrollando una inmunodeficiencia grave.

3.2. Órganos linfoides secundarios

Los diferentes órganos linfoides secundarios, que incluyen los **ganglios linfáticos**, el **bazo** y el **tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)**, cumplen importantes funciones en el sistema inmune, proporcionando una interfase entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida, puesto que permiten: (a) reclutar un gran número de linfocitos vírgenes desde la circulación sanguínea, (b) recolectar antígenos solubles y células dendríticas desde los tejidos periféricos, (c) proporcionar el entorno celular y molecular necesario para el desarrollo de tolerancia antígeno específica o para la expansión clonal de linfocitos y el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, (d) modular la recirculación y “homing” de linfocitos efectores y de memoria.

3.2.1. Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos son pequeños órganos linfoides ovales y encapsulados, de 1-3 cm de diámetro. A diferencia de otros órganos linfoides, están interpuestos en el trayecto de los vasos linfáticos, actuando como filtros a través de los cuales pasa la linfa en su camino hacia la sangre; entre otros elementos filtran

bacterias, otros microorganismos y otras sustancias extrañas.

Los ganglios linfáticos se encuentran en número variable en ciertas zonas del cuerpo, pero son más abundantes en las regiones axilar, cervical, inguinal, en las cavidades corporales (Ej. mesenterio) y a lo largo de los vasos mayores.

Los elementos de sostén del ganglio linfático son: (a) la **cápsula** que rodea al ganglio y está compuesta de tejido conectivo, (b) **trabéculas**, son prolongaciones de la cápsula hacia el interior del parénquima ganglionar, y (c) **tejido reticular**, red tridimensional formada por células y fibras reticulares, suspendidas de la cápsula y trabéculas, que forma la estructura del órgano.

El parénquima del ganglio se divide en dos regiones: corteza y médula.

La **corteza**, es la zona más externa y separada en compartimientos por las trabéculas. Se distinguen las cortezas externa y profunda (o paracorteza). La corteza externa alberga los denominados **folículos** (o nódulos) **linfoides primarios** que son agregados esféricos de LB (vírgenes y de memoria). Estos nódulos pueden presentar un **centro germinativo**, denominándose así **folículos linfoides secundarios**. Estos últimos se forman cuando se desarrolla una respuesta inmune; en el centro germinal se encuentran LB llamados centroblastos. Aquí se generarían los LB de memoria y células plasmáticas (células efectoras de las células B). La región periférica de los folículos secundarios se denomina **zona del manto o calota**, formada por linfocitos que están emigrando del centro germinal. La corteza externa es una zona dependiente de médula ósea o zona B. En la corteza profunda (paracorteza) no existen folículos y está poblada principalmente de células T. (zona dependiente de timo, zona T) Las células presentadoras de antígeno emigran hacia esta zona para presentar los antígenos en moléculas MHC clase II a los LTh. Si éstas se activan, ocurrirá una expansión clonal y aumentará la anchura de la paracorteza. Las células T recién formadas emigran hacia los senos medulares, dejan el ganglio y van a la zona de actividad antigénica. Las **véculas de endotelio columnar (HEV)** están localizadas en esta región; a través de este tipo de epitelio los linfocitos de la circulación general ingresan al parénquima ganglionar. En la interacción de los linfocitos con el endotelio y migración transendotelial participan moléculas de adhesión, en forma similar a lo descrito para

los neutrófilos (ver punto 2.4.1.). Luego de ingresar los LB migran a la corteza y la mayoría de los LT, permanecen en la corteza profunda.

La **médula** corresponde a la parte más interna del ganglio. Consiste en los llamados cordones medulares constituidos por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Estos cordones están ubicados alrededor de los senos medulares, los que convergen a la región del hilio donde desembocan en los vasos linfáticos eferentes. Los linfocitos de los cordones están en proceso de emigrar desde la corteza para entrar en los senos medulares y así vía linfáticos eferentes alcanzar el conducto torácico, y luego la circulación general (ver punto 4).

Los vasos que llegan al ganglio se llaman **vasos linfáticos aferentes** y se introducen en él por varios puntos de la superficie convexa y vacían la linfa en el seno subcapsular. Este seno se continúa con los senos corticales o paratrabeculares (paralelos a las trabéculas) los que descargan la linfa en los senos medulares que a su vez drenan la linfa en los vasos linfáticos eferentes. Éstos abandonan el ganglio por el hilio; ambos vasos linfáticos, aferentes y eferentes poseen válvulas. También entran y salen a través del hilio (zona cóncava del ganglio), los vasos sanguíneos (arteria y vena) y nervios. Otros tejidos linfoides como las amígdalas, el bazo y el timo tienen sólo vasos linfáticos eferentes.

Entre las funciones de los ganglios linfáticos, está el filtrar la linfa que entra vía vasos linfáticos aferentes, así los macrófagos pueden fagocitar alrededor del 90% de los antígenos que ingresan a los ganglios. Esto causa un proceso inflamatorio con aumento de volumen del ganglio.

Además de la fagocitosis del antígeno en los ganglios linfáticos, los linfocitos B y/o T toman contacto con los antígenos. Una respuesta inmune primaria (primer contacto con el antígeno específico) se inicia con activación de LTh vírgenes, ubicados en la corteza profunda; aproximadamente 48 horas después de la activación se transforman en linfoblastos los que sufren mitosis generándose a los 5 días un clon de LTh efector y de memoria. Si el agente infeccioso es intracelular (ej. Virus) se activan los LTh que reconocen los antígenos expresados en moléculas MHC de clase I.

Al mismo tiempo que se activa la respuesta inmune celular los escasos LB existentes en la

corteza profunda y otros reclutados desde la corteza externa pueden endocitar el antígeno, procesarlo y presentarlo a los LTh. Por su parte, los LT CD4⁺ facilitan la respuesta inmune humoral, particularmente en el caso de los llamados antígenos timo dependientes. Así en la paracorteza se generan pequeños focos de diferenciación y maduración de LB a células plasmáticas las que secretarán anticuerpos (IgM, IgG) que llegan a la sangre vía linfa eferente. Posteriormente algunos LTh y LB migran a los folículos primarios de la corteza externa amplificando la respuesta inmune. Allí se generan linfoblastos, llamados en este caso centroblastos. Por un proceso de maduración y selección por afinidad van siendo seleccionados los que presentan mayor afinidad por el antígeno. También ocurre aquí el fenómeno denominado **cambio de clase o isotipo**.

3.2.2 Bazo

El bazo es el órgano linfoide de mayor tamaño del cuerpo (aproximadamente 150 g en adultos); está situado en el peritoneo, en la región superior izquierda del abdomen.

El bazo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo desde la cual parten trabéculas hacia el parénquima del órgano. Por el hilio entran la arteria esplénica y nervios, y salen la vena esplénica y vasos linfáticos. La estructura del órgano está dada por una red tridimensional de fibras y células reticulares, conectadas a la cápsula y trabéculas (similar a los ganglios linfáticos).

La arteria esplénica se ramifica en las arterias trabeculares, las que al presentar un diámetro de 0,2 mm dejan las trabéculas y son rodeadas por linfocitos denominándose a éstos **vaina linfática periarterial** y al vaso, arteria central. Luego ésta pierde la vaina linfática y se subdivide en varias arterias penicilares, que entran a la llamada pulpa roja (ver más adelante). El extremo de las arterias penicilares corresponden a capilares arteriales terminales que descargan la sangre en los senos esplénicos. Éstos drenan en las venas pequeñas de la pulpa, las que van aumentando de calibre, llegando a formar la vena esplénica, que drena en la vena cava.

El parénquima esplénico o pulpa esplénica, se divide en pulpa blanca y pulpa roja. La **pulpa blanca** está compuesta por tejido linfoide, principalmente linfocitos, estrechamente asociados a la arteria central, a cuyo alrededor

forman la vaina linfática periarterial. En ésta existen principalmente células T (aproximadamente 70% de CD4+ y 30% de CD8+). Las células B están organizadas en folículos, generalmente incorporados en la vaina linfática periarterial. Los folículos primarios contienen células B no estimuladas y los folículos secundarios son sitios de activación y proliferación de células B, y contienen centro germinal. La pulpa blanca está rodeada por una delgada zona marginal que la separa de la pulpa roja, que contiene células B, células “helper”, macrófagos y células dendríticas interdigitantes (células presentadoras de antígeno).

En la zona marginal también se encuentran los senos marginales; aquí es donde las células y antígenos transportados por la sangre tienen acceso al parénquima del bazo. Así puede ocurrir: (a) contacto entre los antígenos y las células presentadoras de antígeno; (b) los macrófagos pueden fagocitar microorganismos y células senescentes; (c) células T y B de la sangre pueden ingresar a la pulpa blanca; y (d) los LTh, reconocen antígenos presentados en moléculas MHC clase II por las células dendríticas interdigitantes; esto dará lugar a activación y proliferación clonal en la pulpa blanca (folículo secundario).

A modo de resumen, los linfocitos se forman en la pulpa blanca, las células B de memoria y células plasmáticas en los folículos linfáticos y las subpoblaciones de células T en las vainas linfáticas periarteriales. Los LB y LT recién formados entran en los senos marginales y emigran hacia el sitio inflamatorio, o forman parte de la reserva recirculante de linfocitos. La mayoría de las células plasmáticas emigran a la médula ósea para sintetizar y secretar anticuerpos en los senos medulares; sólo algunas se quedan en la zona marginal para hacer lo propio en los senos marginales.

La **pulpa roja** está compuesta de sinusoides venosos separados por cordones parenquimatosos, que consisten en mallas de células reticulares y fibras reticulares, en la que existen abundantes eritrocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y granulocitos. Estos macrófagos son responsables de retirar de la circulación los glóbulos rojos y plaquetas, senescentes y alterados.

Desde el punto de vista inmune, el bazo presenta una función similar a los ganglios linfáticos, la diferencia fundamental radica en

que el bazo es el más importante sitio de respuesta inmune a antígenos circulantes y los ganglios linfáticos participan en la respuesta inmune a antígenos presentes en la linfa. El concepto de respuesta inmune se refiere a la respuesta inmune innata y específica, tanto celular (fagocitosis, activación de células T) como humoral (activación de células B con la consiguiente síntesis de anticuerpos).

3.2.3 Tejido linfoide asociado a mucosa

En muchas regiones del cuerpo, el tejido linfoide no está encapsulado como en los ganglios linfáticos y el bazo. Se trata de tejido linfoide difuso sin organización especial, que no se separa con precisión del tejido conectivo vecino, pero que presenta folículos linfoides aislados. A estos tejidos se le denomina **tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)**, las localizaciones más características son las asociadas a la mucosa intestinal (**GALT**, “gut”) y respiratoria (**BALT**, “broncus”); también existe en la mucosa urogenital. Además de linfocitos que se encuentran en mayor porcentaje, también se hallan linfoblastos, células plasmáticas y macrófagos. Los folículos de los MALT son similares a los existentes en el bazo y los ganglios linfáticos; las regiones centrales son ricas en células B, igual que los centros germinales.

GALT. Todo el tracto gastrointestinal contiene MALT. Sin embargo, el intestino delgado, principalmente el íleon, además de folículos linfoides aislados, contiene conglomerados linfoides denominados **placas de Peyer**. Éstas presentan un folículo formado por células B, rodeado por una región más laxa de células T y macrófagos que actúan como CPA. Las placas de Peyer no cuentan con vasos linfáticos aferentes, pero sí presentan vasos linfáticos eferentes que drenan en los ganglios linfáticos mesentéricos. Los linfocitos llegan a las placas a través de pequeñas arteriolas que son drenadas por HEV. Si bien el íleon está revestido por epitelio cilíndrico simple, las zonas adyacentes a los folículos linfoides de las placas están cubiertas por células de tipo escamoso (pequeñas y anchas) llamadas células M, a través de las cuales los antígenos lumbinales penetran por pinocitosis y fagocitosis.

BALT. El tejido linfoide asociado a la mucosa de bronquios es, estructuralmente, similar a las placas de Peyer, presenta folículos ricos en células B, y sectores en que existen LT y CPA. El

BALT se encuentra en los bronquios de todos los lóbulos pulmonares; se ubica principalmente en las bifurcaciones de los bronquios y bronquiolos. Al igual que en el GALT en la zona adyacente a los folículos linfoides el epitelio cilíndrico es reemplazado por células M descritas en el GALT. Tampoco presentan vasos linfáticos aferentes, pero sí eferentes y está ricamente vascularizado.

La **IgA** es la clase de anticuerpo que más activa y eficientemente puede ser secretada a través del epitelio. Ello le significa una importante participación en la defensa contra patógenos a nivel de las vías respiratorias y del tracto intestinal. En el intestino la producción de IgA se inicia por el ingreso de los antígenos a las placas de Peyer, donde células T de regiones interfoliculares y células B foliculares, son estimuladas. Algunos de los linfocitos B se diferencian a células productoras de IgA y migran a la lámina propia, ubicada bajo el epitelio de mucosa. Las citoquinas más importantes en el cambio de clase a isotipo IgA son el factor de crecimiento transformante B (TGF-B) e IL-5. Algunas células B activadas migran a los centros germinales de las placas de Peyer, donde ocurren proliferación de los LT y mutaciones somáticas de los genes de Ig, lo que conduce a una mayor afinidad de los anticuerpos. Los linfocitos productores de IgA pueden permanecer en la lámina propia o pueden migrar a otras mucosas u órganos linfoides.

3.2.4 Amígdalas

Las amígdalas son agregados encapsulados, de manera incompleta, de folículos linfoides. Existen 3 tipos de amígdalas: (a) palatinas: bilaterales, localizadas en los límites de la cavidad oral y la faringe; (b) faríngea: única, ubicada en el techo de la faringe nasal y (c) linguales: varias, se encuentran en superficie dorsal del tercio posterior de la lengua. Por su estratégica localización, las amígdalas están directamente expuestas a tomar contacto con antígenos inhalados e ingeridos. El parénquima de los diferentes tipos de amígdalas es similar, está conformado por folículos linfoides ricos en células B, los que pueden presentar centros germinales. Reaccionan a los antígenos formando linfocitos y estableciendo una reacción inflamatoria. La superficie de las amígdalas está recubierta por epitelio, diferente en cada caso.

4. TRÁNSITO LINFOCITARIO

La recirculación y “homing” linfocitario es un evento central en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, puesto que linfocitos B y linfocitos T deben interactuar primero con células presentadoras profesionales (células dendríticas y células dendríticas foliculares, respectivamente), antes que se produzca la necesaria colaboración entre linfocitos T y linfocitos B. En la figura 10-7 se muestra un esquema de la recirculación de los linfocitos.

Antígenos solubles y células dendríticas cargadas con antígenos capturados en la periferia, son transportados vía vasos linfáticos aferentes hacia órganos linfoides secundarios, a los cuales deberán ingresar linfocitos T y linfocitos B vírgenes, vía HEV. Si los linfocitos fallan en el reconocimiento de antígenos específicos, retornarán a la circulación (a través de vasos linfáticos eferentes que desembocarán en el conducto torácico), para entrar a un nuevo órgano linfoide secundario (recirculación y “homing”).

Cuando un linfocito virgen, se encuentra con el antígeno, deberá decidir en el contexto de señales accesorias de coestimulación proporcionadas en el órgano linfoide secundario, si desarrolla una respuesta inmune efectora que conduce a la eliminación del antígeno o bien se hace tolerante al antígeno o muere para evitar la autoinmunidad

A diferencia de los linfocitos T vírgenes, los linfocitos T efectores son capaces de producir citoquinas y eliminar el antígeno (en el caso de linfocitos T citotóxicos) o bien modificar la conducta de otros leucocitos (como hacen los linfocitos T “helper”) y expresar moléculas de adhesión y “homing” que les permitirán ahora migrar desde el órgano linfoide secundario al tejido periférico por donde ingresó originalmente el antígeno.

La mayoría de las células efectoras morirá luego de eliminado el antígeno, pero una pequeña fracción permanecerá como células memoria: (a) como células de memoria efectoras que migrarán a los tejidos periféricos o (b) como células de memoria centrales, que como los linfocitos vírgenes harán recirculación y “homing” entre los órganos linfoides secundarios.

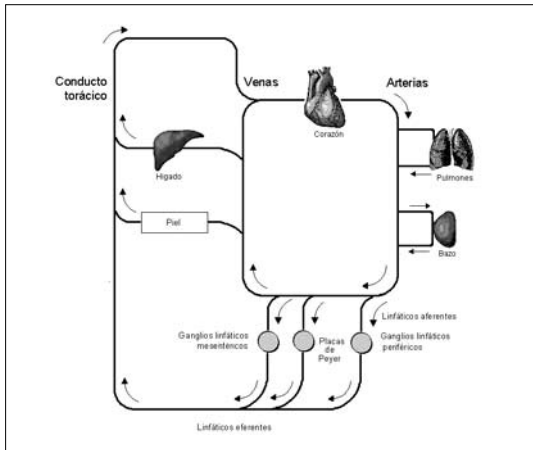


Figura 10-7. Recirculación de los linfocitos. Una vez que las células T y B salen de los órganos linfoides primarios como linfocitos maduros, pasan a través de la circulación general a los tejidos linfoides secundarios. Desde los ganglios linfáticos, salen a través de los vasos linfáticos eferentes y vuelven a la circulación general, fundamentalmente, por el conducto torácico.

LECTURAS SUGERIDAS

Babior, B., "NADPH oxidase: An update", *Blood*, 93(5):1464-1476, 1999.

Degos, L., Linch, C., Löwenberg, B., **Textbook of Malignant Haematology**, Chapters 3, 4, Martin Dunitz, 1999.

Gartner, L. y Hiatt, J., Traducido por Sapiña, S., **Histología, texto y atlas**, Capítulos 10 y 12, Interamericana, 1997.

Geneser, F., **Histología: sobre bases moleculares**, Capítulos 10, 11 y 16, Editorial Panamericana, 2001.

Hampton, M.; Kettle, A.; Winterbourn, C., "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, mieloperoxidase, and bacterial killing", *Blood*, 92(9): 3007 - 3017, 1998.

Herzog, E.L, Chai, L., Krause D.S. "Plasticity of marrow-derived stem cells". *Blood* 102(10): 3483-3493, 2003.

Lee, R., Foerter, J., Lukeng, J., Pareskevas, F., Greer, J., Rodgers, G. (eds), **Wintrobe's clinical hematology**, Chapters 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, Lippincott Williams E. Wilkins, Philadelphia, 1998.

Mebius, R.E. "Organogenesis of lymphoid tissues". *Nature Rev. Immunol.* 3: 292-303, 2003

Palomo, I., Pereira, J., Koenig, C. "Células y órganos del sistema inmune" En **Fundamentos de inmunología básica y clínica**, Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Roseblatt, M., Vergara, U., capítulo 3, Editorial, Universidad de Talca, 2002.

Paul, W., Editor, **Fundamental Immunology** (Four Edition), Chapters 14, 30, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999.

Pereira, J., "Producción, cinética y función de los granulocitos" En **Fisiología de la sangre** Mezzano, D. y Pereira, J., (Eds.), capítulo 7, Editorial Universitaria, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 1993.

Stiene-Martin, A., Lotspeich-Steininger, Ch., Koepke, J., **Clinical Hematology: Principles, procedures and correlations**, Second edition, Chapter 23, 1998.

Trambas, C.M. y Griffiths, G. "Delivering the kiss of death" *Nature Rev. Immunol.* 4:399-403, 2003.

ALTERACIONES NO MALIGNAS DE LOS LEUCOCITOS

Iván Palomo G., Flavio Carrión A. y Alejandra King D.

- 1. Introducción**
- 2. Alteraciones cuantitativas de los leucocitos**
 - 2.1. Neutrófilos
 - 2.1.1. Neutrofilias
 - 2.1.2. Neutropenias
 - 2.2. Eosinófilos
 - 2.2.1. Eosinofilias
 - 2.3. Basófilos
 - 2.3.1. Basofilia
 - 2.4. Monocitos
 - 2.4.1. Monocitosis
 - 2.5. Linfocitos
 - 2.5.1. Linfocitosis
 - 2.5.2. Linfopenia
- 3. Alteraciones funcionales de los leucocitos**
 - 3.1. Alteraciones funcionales de los granulocitos
 - 3.1.1. Defectos de la adhesión
 - 3.1.2. Defectos de la quimiotaxis
 - 3.1.3. Defectos del metabolismo oxidativo
 - 3.1.4. Defecto de los gránulos de los lisosomas
 - 3.2. Alteraciones funcionales de los linfocitos
 - 3.2.1. Defectos en la expresión de moléculas MHC
 - 3.2.2. Defectos de activación y función de células T
 - 3.2.3. Síndrome hiper IgM ligado al sexo
 - 3.2.4. Inmunodeficiencia común variable
 - 3.2.5. Deficiencia selectiva de IgA
 - 3.2.6. Deficiencia selectiva de subclases de IgG
 - 3.3. Alteraciones funcionales secundarias de los leucocitos y en situaciones especiales
 - 3.3.1. Sistema inmune fetal y neonatal
 - 3.3.2. Envejecimiento y sistema inmune
 - 3.3.3. Inmunidad y nutrición
 - 3.3.4. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades crónicas
 - 3.3.5. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades infiltrativas y tumorales
 - 3.3.6. Inmunodeficiencia secundaria a terapia inmunosupresora

RESUMEN

En este capítulo se revisan las alteraciones no malignas de los denominados leucocitos o glóbulos blancos, tanto cuantitativas como funcionales. Entre las alteraciones cuantitativas se analizan las causas de aumento y disminución de los diferentes tipos de glóbulos blancos y entre las alteraciones cualitativas se revisan las disfunciones de los granulocitos (especialmente neutrófilos) y los linfocitos.

1. INTRODUCCIÓN

Los leucocitos, al igual que las demás células sanguíneas, se forman en la médula ósea (ver capítulos 1 y 2). La función de cada tipo de glóbulo blanco (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos) es diferente (ver capítulo 10).

Las alteraciones que pueden presentar los leucocitos son del tipo oncohematológicas y no neoplásicas; estas últimas se pueden clasificar en cuantitativas y cualitativas. Este capítulo trata sobre las alteraciones no neoplásicas, así por ejemplo respecto a las alteraciones cuantitativas se describirán las situaciones patológicas que pueden asociarse con neutrofilia, neutropenia, eosinofilia, basofilia, linfocitosis, linfopenia y monocitosis. Por otra parte, en lo que se refiere a las alteraciones cualitativas se abordarán las alteraciones funcionales de los granulocitos (defectos de la adhesión, de la quimiotaxis, del metabolismo oxidativo, de los gránulos de los lisosomas) y de los linfocitos (defectos en la expresión de MHC, de activación y función de células T, síndrome hiper IgM ligado al sexo, inmunodeficiencia común variable, deficiencia selectiva de IgA y deficiencia selectiva de subclases de IgG).

2. ALTERACIONES CUANTITATIVAS DE LOS LEUCOCITOS

Las alteraciones cuantitativas de los leucocitos

serán desarrolladas en el siguiente orden: Granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), Monocitos y Linfocitos.

2.1. Neutrófilos

En los adultos, los neutrófilos constituyen alrededor del 50-60% de los leucocitos circulantes lo que representa aproximadamente 2.000-7.000 neutrófilos/ μL . Los neutrófilos, como fagocitos, son parte de la inmunidad natural; participan en la defensa frente a microorganismos, especialmente bacterias y en procesos inflamatorios.

2.1.1. Neutrofilias

Se define neutrofilia como un aumento en el recuento absoluto de neutrófilos en sangre periférica ($>7.500/\mu\text{L}$). Esto se puede producir por tres mecanismos que pueden actuar de forma aislada o conjunta: (a) incremento de la movilización de neutrófilos desde las reservas de la médula ósea o desde las células periféricas marginales, (b) trastorno en la migración de neutrófilos hacia los tejidos periféricos, y (c) expansión de la población celular debido a un aumento de la actividad mitótica. En la tabla 11-1 se resumen las causas de neutrofilia.

Tabla 11-1. Causas de neutrofilia

- Infecciones agudas (locales o generalizadas): bacterias, hongos, parásitos, y algunos virus.
- Inflamaciones: daño de tejido por quemaduras, cirugía, necrosis isquémica como en infarto agudo de miocardio, gota, enfermedad vascular del colágeno, reacciones de hipersensibilidad y procesos inflamatorios similares.
- Alteraciones metabólicas: uremia, cetoacidosis diabética y eclampsia.
- Envenenamiento por químicos (plomo, mercurio, derivados del benceno), drogas (digitales) y veneno de insectos (araña).
- Fármacos: corticoides, adrenalina, epinefrina.
- Síndromes mieloproliferativos: leucemia mieloide crónica, policitemia vera.
- Cáncer metastásico.
- Causas misceláneas: intoxicación, hemorragia aguda, hemólisis aguda.
- Causas fisiológicas: ejercicio intenso, recién nacidos, embarazo.

Infecciones

Las neutrofilias pueden resultar de una infección, especialmente las causadas por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Gonococcus* y *Meningococcus*, por algunos bacilos, así como por ciertos hongos, *Spirochetas*, algunos virus, *Rickettsia* y parásitos.

En las infecciones, la cinética de los neutrófilos puede separarse en tres fases: temprana, intermedia y tardía. Durante la etapa inicial la cifra de neutrófilos circulantes disminuye levemente; luego ingresan a la sangre, neutrófilos provenientes desde la médula ósea, período en el cual la vida media de éstos es más corta que lo normal. La fase intermedia se caracteriza por neutrofilia; sin embargo, si la demanda de células es mayor, la reserva medular se puede agotar y observarse neutropenia. En la fase tardía, el flujo de neutrófilos desde la médula ósea a la sangre disminuye y la vida media de los neutrófilos se prolonga.

La presencia de fiebre, hipotermia, taquicardia y taquipnea caracteriza al denominado "systemic inflammatory response syndrome" (SIRS). SIRS representa la respuesta inflamatoria del organismo, sea ésta debida a infección o no. Cuando se presenta compromiso pulmonar, vaso dilatación con hipotensión arterial, etc. en presencia de SIRS, se denomina "SIRS severo"; cuando éste es causado por una infección se denomina sepsis. La sepsis es inducida por microorganismos o mejor dicho por sus toxinas, como son el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas o por compuestos celulares de Gram positivas como son el peptidoglicán y ácido teicoico, así como también toxinas de hongos. Monocitos, macrófagos, y células

epiteliales reconocen la invasión de estos patógenos. Es así como estas células inducen la producción de mediadores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina-1 (IL-1), IL-6 e IL-8. Varias citoquinas, principalmente IL-6 e IL-8 provocan un aumento en el número de neutrófilos, aunque también es liberada la Mcl-1, una proteína anti-apoptótica lo cual aumenta la sobrevivencia de éstos. Luego se liberan mediadores antiinflamatorios (IL-4, IL-10 e IL-13) los que detendrían los procesos anteriores.

Inflamación

La neutrofilia relativa en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) se asocia con el desarrollo temprano post-infarto de deficiencia cardíaca congestiva.

La neutrofilia se produce comúnmente en ataques agudos de gota pudiendo alcanzar valores de 30.000 neutrófilos/ μ L. La reacción inflamatoria por gota parece ser el resultado de la acción de agregación de uratos y cristales de uratos en células mononucleares, induciendo la secreción de IL-1, citoquina que actúa como pirógeno endógeno, y también tiene capacidad quimiotáctica para neutrófilos.

También se observa neutrofilia en asociación con glomerulonefritis aguda, fiebre reumática y con varias enfermedades del colágeno.

Hemorragias agudas

Una a dos horas después de iniciada una hemorragia aguda se presenta leucocitosis. Es mayor cuando el sangramiento ocurre en la cavidad peritoneal, espacio pleural, cavidad articular. Esto probablemente ocurre como

resultado de la suma de efectos inflamatorios de varios componentes sanguíneos. En casos de ruptura en el embarazo tubárico, el recuento puede ser tan alto como 22.000 leucocitos/ μ L. En casos de hemorragia intracraneal o hemorragia subaracnoidea, se puede encontrar neutrofilia. Recuentos de alrededor de 30.000 leucocitos/ μ L se puede observar en casos que presentan ruptura esplénica.

En hemorragias agudas, durante las primeras 3 horas, la neutrofilia ocurre por demarginación de los leucocitos a la circulación y luego el aumento se debe a la salida de neutrófilos desde la médula ósea.

Neoplasias malignas

El rápido crecimiento de neoplasias puede causar neutrofilia, posiblemente como resultado de necrosis tisular en algunos sectores del tejido infiltrado. También algunos tumores pueden contener y/o inducir el aumento del factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF).

Neutrofilia fisiológica

El ejercicio intenso, o después de una inyección con epinefrina se asocia con neutrofilia. También se observa durante el embarazo y en los recién nacidos.

El ejercicio provoca un aumento bifásico en el número de neutrófilos. El ejercicio de intensidad moderada puede reforzar en los neutrófilos la actividad de estallido respiratorio, posiblemente

por el aumento de la concentración de hormona del crecimiento y de la citoquina inflamatoria IL-6. En contraste, el ejercicio intenso o ejercicio de larga duración pueden suprimir la degranulación de los neutrófilos y la producción de oxidantes reactivos.

El ejercicio estimula la liberación de citoquinas: IL-1, TNF- α , e interferón γ (IFN- γ). La IL-6 e IL-8 aumentan cuando el ejercicio es más intenso. Éstas provocan un incremento en el recuento de neutrófilos ya que la IL-6 ejerce efectos sobre el eje hipotálamo-adrenal, liberando glucocorticoides los cuales provocan la demarginación de neutrófilos al torrente sanguíneo. La IL-8 ejerce un efecto quimiotáctico y activa los neutrófilos.

Glucocorticoides

Los glucocorticoides provocan neutrofilia por liberación de neutrófilos desde la médula ósea y por demarginación de los mismos. Esto último se puede explicar porque los glucocorticoides reducen la síntesis de mRNA que codifica para la molécula de adhesión L-selectina que participa en el "rolling" de los leucocitos al endotelio.

2.1.2. Neutropenias

Se entiende por neutropenia la disminución del recuento absoluto de neutrófilos bajo 1.500/ μ L. Las neutropenias se pueden clasificar dependiendo de su magnitud, en leve, moderada y marcada (tabla 11-2). Esta clasificación es usada para predecir el riesgo de infecciones bacterianas graves.

Tabla 11-2. Clasificación de neutropenias según el recuento absoluto de neutrófilos

Tipo	Neutrófilos (μ L)
Leve	1.000-1.500
Moderada	500-1.000
Grave	<500

Las causas de las neutropenias son varias y pueden ser adquiridas o congénitas (tabla 11-3).

Tabla 11-3. Clasificación de neutropenias según origen

Tipo	Subtipos	Ejemplos
Adquiridas	Medicamentosa	Tóxicas Inmunológica
	Infecciosa	Virus Bacterias
	Inmune	Alloinmune Autoinmune
	Crónica benigna	
	Otras	Asociada a enfermedades hematológicas Asociada a enfermedades endocrinas y metabólicas Asociada a carencias nutricionales
Congénitas	Ligadas a una patología genética compleja	Disgenesia reticular Neutropenia y alteraciones linfoides Neutropenia asociada a hemopatías constitucionales Síndrome de Shwachman-Diamond Mielokatexis
	Neutropenias congénitas aisladas	Neutropenia cíclica Neutropenia congénita grave

a1) Neutropenias adquiridas

Las neutropenias adquiridas presentan una duración variable y, generalmente, su diagnóstico se basa en el examen clínico y exámenes básicos de laboratorio.

Neutropenia medicamentosa

La neutropenia asociada a fármacos se presenta más en niños que en adultos y los mecanismos pueden ser de tipo tóxico o inmune.

- **Mecanismo tóxico.** Se produce por una supresión de la médula ósea o por la destrucción periférica de neutrófilos. Esto es propio de la mayoría de los citostáticos y de otros medicamentos como zidovudina, pirimetamina, penicilinas semisintéticas, cloranfenicol y clorpromazina. Generalmente, la toxicidad de los medicamentos es dosis-dependiente y con grandes variaciones individuales. La recuperación ocurre en aproximadamente dos semanas después de suspender el tratamiento con el fármaco involucrado.

- **Mecanismo inmune.** En algunos individuos, determinados medicamentos inducen la síntesis de anticuerpos, los cuales pueden inhibir la granulopoyesis o causar destrucción de neutrófilos maduros. La neutropenia suele aparecer de forma aguda, observándose en la médula ósea una hipoplasia granulocítica o una detención de la maduración a nivel de promielocito, con incremento de los precursores más inmaduros. Los medicamentos involucrados más frecuentemente son: fenitoína, penicilina, procainamida, hidralazina y quinidina.

Neutropenia infecciosa

Varias infecciones pueden dar lugar a neutropenia, con frecuencia moderada y pasajera. En la mayoría de las ocasiones la etiología es viral (hepatitis, varicela, parvovirus, VIH, sarampión, rubéola, parotiditis, influenza, virus de Epstein-Barr y citomegalovirus). La neutropenia está presente durante la fase de viremia y en general se debe a un aumento de la marginación de los neutrófilos circulantes. En los últimos años se ha determinado la presencia de neutropenia en los pacientes portadores de

VIH, fenómeno que podría ser explicado por diferentes mecanismos: (a) infección bacteriana o por una infiltración viral de la médula ósea, (b) terapia mielosupresiva, zidovudina, ganciclovir y sulfametoxazol trimetropin, y (d) aumento de la apoptosis.

Las infecciones bacterianas también pueden originar neutropenia, suponiendo, generalmente un factor de gravedad, especialmente en el recién nacido. La neutropenia se debe a los cambios tóxicos producidos en la médula ósea como resultado de la infección o a una destrucción excesiva de neutrófilos. Entre estas bacterias se han observado, por ejemplo: salmonellas, brucellas, bacterias Gram negativas y micobacterias.

Neutropenia inmune

Las neutropenias inmunes pueden ser alo o autoinmunes:

Neutropenia aloinmune. Es propia del recién nacido y está ligada a la presencia de anticuerpos de origen materno dirigidos contra uno o varios antígenos de los neutrófilos fetales. La madre se sensibiliza contra antígenos de los neutrófilos fetales que atraviesan la barrera placentaria durante la gestación. Los anticuerpos IgG cruzan la circulación placentaria en sentido materno-fetal y sensibilizan los neutrófilos fetales.

- **Anticuerpos anti-HNA-1.** Se originan por la falta de expresión del receptor FcγIIIb a nivel de la membrana de los neutrófilos de la madre. Dicho receptor expresa el sistema antigénico HNA-1 o NA.
- **Anticuerpos anti-NB (HNA-2^a o CD177).** Se originan por la presencia de poliformismos de este antígeno en los neutrófilos de la madre.

El diagnóstico se confirma mediante la determinación de anticuerpos antineutrófilos que reaccionan contra neutrófilos neonatales y paternos, pero no contra los maternos, en el suero de la madre y del recién nacido. La evolución es benigna, normalizándose el número de neutrófilos alrededor de los dos meses de edad.

Neutropenia autoinmune. Se subdivide en varios tipos según su forma de presentación:

- **Neutropenia autoinmune del lactante, preescolar o primaria.** La mayoría de los casos se observan en niños menores de 1 año. Suele descubrirse con ocasión de un episodio infeccioso de gravedad moderada, a veces acompañado de monocitosis y eosinofilia. La neutropenia puede variar entre moderada y grave. Los anticuerpos pueden presentar especificidad contra antígenos específicos (NA-1, NA-2, NB-1). El autoanticuerpo más frecuente (anti-HNA1) se ha asociado a infección previa por Parvovirus. Los anticuerpos pueden ser IgG, IgA o IgM. En la mayoría de los casos la cifra de neutrófilos se normaliza en un plazo de 12 a 24 meses después del tratamiento de antibióticos, IgG a altas dosis y la administración de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF).
- **Neutropenia autoinmune del niño mayor.** Puede presentarse como fenómeno aislado, asociada a otras citopenias inmunes (anemia hemolítica autoinmune y/o trombocitopenia inmune) o en el contexto de una enfermedad autoinmune de carácter sistémico (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide o hepatitis crónica activa) o enfermedades linfoproliferativas malignas. El tratamiento está dirigido a la enfermedad de base.

Neutropenia crónica benigna

Esta denominación incluye a un grupo de neutropenias con bajo riesgo infeccioso y de cronicidad variable. La neutropenia se puede mantener por varios años; se han descrito remisiones espontáneas. El mielograma generalmente muestra marcada hiperplasia mielóide con reducción de las formas más maduras. La evolución es generalmente favorable.

Otras neutropenias adquiridas

Asociada a enfermedades hematológicas. Incluye leucemias agudas, aplasia medular adquirida, síndromes mielodisplásicos, histiocitosis y enfermedades malignas con metástasis medular.

Asociada a enfermedades endocrinas y metabólicas. Se ha observado disminución del número de neutrófilos en casos de hiper o hipotiroidismo, insuficiencia suprarrenal, panhipopituitarismo, acidemia, hiperglicemia y glucogénesis. La normalización del recuento de neutrófilos

generalmente se asocia al tratamiento de la enfermedad de base.

Asociada a carencias nutricionales.

Carencia en vitamina B₁₂, folato o más raramente, hierro, pueden acompañarse de neutropenia. Los estados de marasmo, anorexia psicógena, así como la carencia en cobre, también pueden producir neutropenia.

a2) Neutropenias congénitas

Asociadas a una patología genética compleja

Disgenesia reticular. Se origina por ausencia de células madres comprometidas en la diferenciación mielo-linfoide. En sangre periférica, desde el nacimiento, se presenta neutropenia grave asociada a linfopenia. Tanto la médula ósea, el timo y los ganglios linfáticos muestran ausencia de células mieloides y linfoideas. El único tratamiento eficaz es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), que se debe realizar precozmente, ya que el riesgo de infecciones bacterianas o virales de evolución fatal es muy alto.

Neutropenia y alteraciones linfocitarias.

Algunas inmunodeficiencias presentan neutropenia a lo largo de su evolución, entre otras, la hipogammaglobulinemia, la disgamaglobulinemia, la ataxia-telangiectasia y la enfermedad de Chediak-Higashi. En estas patologías, la neutropenia se debe a la muerte de muchos precursores mieloides en la médula ósea.

Neutropenia asociada a enfermedades hematológicas constitucionales.

Algunas de estas patologías afectan la serie granulocítica; entre otras: (a) aplasia medular: anemia de Fanconi y disqueratosis congénita evolucionan a falla medular global incluyendo la línea mieloide; (b) alteraciones de la serie roja: se puede encontrar neutropenia en la evolución a largo plazo de una anemia Blackfan-Diamond. Algunas anemias hemolíticas presentan neutropenia asociada a hiperesplenismo. La enzimopatía por déficit de hexokinasa, puede cursar con pancitopenia.

Síndrome de Shwachman-Diamond. Se hereda como un rasgo autosómico recesivo, asociado con mutaciones en el brazo largo

de los cromosomas 6 ó 12. Se caracteriza por una disminución en la producción y diferenciación de los granulocitos y defectos en el crecimiento, así como también por insuficiencia pancreática y alteraciones osteocondrales. La neutropenia es constante y marcada (<1000 células/ μ L); se pueden observar anemia y trombocitopenia.

Mielokatexis. Desorden congénito de carácter autosómico dominante, caracterizado por apoptosis de los granulocitos debido a la expresión disminuida de la proteína bcl-X en las células precursoras de la médula ósea. Esta inmunodeficiencia presenta neutropenia persistente desde la infancia. Los neutrófilos de estos individuos muestran cambios degenerativos, tales como: permeabilidad aumentada a los colorantes, vacuolas citoplasmáticas, núcleo picnótico e hipersegmentado.

Neutropenias congénitas aisladas

Neutropenia cíclica y Neutropenia congénita grave (Enfermedad de Kostmann).

Ambas enfermedades presentan neutropenia acompañada por infecciones graves y recurrentes. La neutropenia cíclica, se caracteriza por episodios recurrentes de 3-6 días aproximadamente cada 3-4 semanas, de neutropenia grave (< 200 neutrófilos/ μ L). En la neutropenia congénita grave estos episodios la presentan constantemente. En ambas enfermedades, los episodios de neutropenia incluyen anorexia, malestar, estomatitis con úlceras orales y faringitis, aunque pueden aparecer infecciones más graves en los pacientes con neutropenias más profundas. Los pacientes con neutropenias cíclicas puede ser asintomáticos. En los pacientes sintomáticos, la normalización del recuento de neutrófilos coincide con la desaparición de los síntomas. La aparición de la enfermedad generalmente ocurre en la infancia, aunque se han descrito casos diagnosticados en la edad adulta. La neutropenia suele asociarse a monocitosis. El diagnóstico de sospecha en pacientes con episodios cíclicos de estomatitis y faringitis; requiere la realización de recuentos, de neutrófilos dos veces por semana durante seis semanas para poder confirmar el diagnóstico. En ocasiones, la neutropenia crónica benigna muestra un patrón cíclico, pero nunca presenta la regularidad que

caracteriza a la neutropenia cíclica. En la etapa inicial de neutropenia cíclica, la médula ósea muestra un rápido incremento de promielocitos y mielocitos, seguido del aumento de formas más maduras. En la enfermedad de Kostmann la médula ósea presenta un número normal de precursores mieloides inmaduros con una detención madurativa en el estadio de promielocito, existiendo una marcada disminución de las otras formas madurativas. En ambas enfermedades se ha observado la presencia

de una mutación en el gen que codifica para la elastasa en el cromosoma 9.

2.2. Eosinófilos

2.2.1. Eosinofilia

La eosinofilia se define como recuento de eosinófilos superior a 700 células/ μL en la sangre y se presenta en muchas condiciones clínicas (tabla 11-4).

Tabla 11-4. Causas de eosinofilia

- Trastornos alérgicos: asma bronquial, urticaria, edema angioneurótico, fiebre del heno, sensibilidad a fármacos, tabaquismo.
- Enfermedades dermatológicas: pemfigus, dermatitis hipertiforme.
- Parasitosis: parásitos tisulares (ej., triquinosis, equinococos, schistosomiasis); menos frecuente en el parasitismo intestinal.
- Síndrome de Loeffler.
- Infiltración pulmonar de eosinófilos.
- Eosinofilia tropical (principalmente filariasis).
- Enfermedades hematológicas: leucemia mieloide crónica, policitemia vera, anemia perniciosa, enfermedad de Hodgkin, post-esplenectomía.
- Enfermedades malignas, especialmente con metástasis o necrosis.
- Post- irradiación.
- Misceláneas: periartitis nodosa, artritis reumatoide, sarcoidosis, ciertos venenos.
- Idiopática.

Los eosinófilos, a través de sus enzimas, pueden neutralizar mediadores de inflamación como la histamina, la sustancia de reacción lenta de anafilaxis (SRS-UN) y el factor activador plaquetario (PAF). Además, los eosinófilos ejercen funciones específicas durante la infección parasitaria ya que pueden causar daño en los parásitos.

Alergias. En estos casos, generalmente la eosinofilia es moderada (200-1.500 eosinófilos/ μL) pero en algunos casos puede ser marcada, como por ejemplo, en el asma bronquial (≈ 30.000 eosinófilos/ μL), siendo éstos frecuentemente abundantes en secreciones nasales, esputo y ronchas de individuos alérgicos.

Enfermedades dermatológicas. En estas patologías la eosinofilia se asocia más frecuentemente con dermatitis herpetiforme, dermatitis exfoliativa, psoriasis, prurito, eccema, micosis fungoide y granulomas faciales.

Parasitosis. Las infecciones por parásitos metazoarios causan una marcada y prolongada eosinofilia; los protozoos también, pero con menos frecuencia. Los parásitos que enquistan, causan leve eosinofilia e inflamación, sin embargo, los parásitos que invaden tejidos causan eosinofilia más significativa. Un ejemplo de esto es la infección por *Trichinella spiralis*; la eosinofilia aparece a las 1-2 semanas, después de la ingestión de alimentos infectados, alcanzando su nivel más alto al final de la 3^o semana, pudiendo persistir por 6 meses o más. Se han descrito recuentos tan elevados como 15.000 eosinófilos/ μL . En la equinococosis, la eosinofilia es leve, pero ocasionalmente puede ser marcada, probablemente asociada a la filtración de fluido cístico en los tejidos. En estadios tempranos de cisticercosis, ocurre eosinofilia moderada. Con cierta frecuencia se observa eosinofilia en Toxoplasmosis humana y en las infecciones humanas por *Toxocara canis* (Larva migrante visceral). En esquistosomiasis la eosinofilia puede ser observada durante el

período de incubación. En la malaria los valores de eosinofilia son variables. Las parasitosis intestinales se asocian menos frecuentemente con eosinofilia. Así *Enterobius vermicularis*, *Trichocephalo trichiuris trichiura*, diferentes amebas, y los parásitos flagelados, generalmente no se asocian con eosinofilia. El síndrome de Loeffler es un cuadro caracterizado por infiltraciones pulmonares transitorias, debido probablemente a una reacción de hipersensibilidad, donde la eosinofilia está presente.

Infiltración pulmonar de eosinófilos. A diferencia del síndrome de Loeffler que es agudo, autolimitado y benigno, la infiltración pulmonar de eosinófilos es crónica. Se acompaña de tos, disnea, fiebre, sudoración, malestar general y otras manifestaciones. Se caracteriza por infiltrados pulmonares bilaterales pleomórficos y eosinofilia. Puede ser producido por diferentes infecciones: tuberculosis, coccidioidomicosis, brucelosis, neumonía viral o bacteriana, o puede acompañar a numerosas infecciones parasitarias causando eosinofilia. También puede ser una manifestación de enfermedades neoplásicas (Enfermedad de Hodgkin), granuloma eosinofílico, reacciones alérgicas y otras enfermedades.

Eosinofilia tropical. Se encuentra en la India y al sureste de Asia. Es una respuesta inmune al parásito *Wuchereria bancrofti* o *Brugia malayi*. En el diagnóstico se considera el antecedente de estadía en el trópico, IgE aumentada, y anticuerpos antilarias.

Enfermedades hematológicas. En algunas neoplasias hematológicas se puede presentar cierto grado de eosinofilia: linfoma de Hodgkin y leucemia mieloide crónica.

Irradiación. La eosinofilia ha sido descrita en trabajadores expuestos a sustancias radioactivas y en pacientes oncológicos post-irradiación.

Miscelánea. La eosinofilia ha sido observada en asociación con un grupo misceláneo de patologías: Periarteritis nodosa; artritis reumatoide complicada con vasculitis y pleuritis;

casos graves de tuberculosis de los nódulos linfáticos; colitis ulcerativa y malformaciones congénitas cardiovasculares. También se asocia a sustancias tóxicas como: sulfato de cobre, alcanfor, pilocarpina y fósforo. Pacientes con alteraciones vasculares y del colágeno se han asociado a eosinofilia.

2.3. Basófilos

2.3.1. Basofilia

Se define basofilia al recuento de basófilos superior a $150/\mu\text{L}$. Se puede observar en pacientes con: mixedema, colitis ulcerativa, sinusitis crónica, varicela y en algunos casos de nefrosis. También se puede observar en pacientes con déficit de hierro, cáncer pulmonar, leucemia mieloide crónica, policitemia vera, metaplasia mieloide agnogénica, algunas anemias hemolíticas crónicas, enfermedad de Hodgkin, y post-esplenectomía.

La infiltración de basófilos ha sido observada en áreas de dermatitis por contacto, aparentemente en respuesta a una interacción inicial entre el antígeno y los linfocitos. La aparición de basófilos está relacionada a ciertos tipos de hipersensibilidad y la IgE parece ser un intermediario esencial en esta reacción. En las reacciones a los parásitos, la descarga de mediadores por los basófilos parece ayudar en la expulsión de estos organismos multicelulares. Además, la histamina liberada por los basófilos reclutados, o por los mastocitos locales pueden modular algunas reacciones retardadas a través del estímulo de receptores de histamina-2 en células como los linfocitos T. El uso de estrógenos y drogas anti-tiroideas también se asocian con basofilia.

2.4. Monocitos

2.4.1. Monocitosis

Se entiende por monocitosis al aumento del recuento de monocitos por sobre $1000/\mu\text{L}$. Se puede presentar en algunas infecciones, neoplasias y mesenquimopatías (tabla 11-5).

Tabla 11-5. Causas de monocitosis

- Infecciones bacterianas: tuberculosis, endocarditis bacteriana subaguda, sífilis y brucelosis.
- Durante la recuperación de infección aguda y de agranulocitosis.
- Infecciones por protozoos y rickettsias.
- Enfermedades oncohematológicas: leucemia monocítica, enfermedad de Hodgkin y otros linfomas, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, enfermedad de Gaucher y enfermedad de Niemann Pick.
- Tumores sólidos: cáncer de ovario, de estómago y de mamas.
- Mesenquimopatías: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide.
- Enfermedad granulomatosa: sarcoidosis, colitis ulcerativa.
- Terapia esteroideal

Infecciones bacterianas

La monocitosis puede estar presente en ciertas infecciones bacterianas, incluyendo tuberculosis activa, listeriosis, endocarditis bacteriana subaguda, septicemia, sífilis y brucelosis.

La infección por *Listeria monocytogenes* produce una respuesta mononuclear en conejos y otros animales, pero rara vez en humanos. Esta bacteria en su estructura presenta lípidos (agente productor de monocitosis) que causan la respuesta de monocitos. En los pacientes se observa un aumento de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8.

En la tuberculosis los monocitos son la principal célula en la formación del tubérculo, donde hay una alta tasa de recambio monocito-macrófago. Esta actividad puede reflejarse en la circulación sanguínea en monocitosis, relacionada a una activa extensión del proceso de tuberculosis. La lipoarabinomanoma presente en la superficie del *M. tuberculosis*, cuya acción es similar al LPS interactúa directamente con el complejo de membrana CD14-receptor Toll tipo 2 de los macrófagos alveolares, estimulando en ellos la liberación de TNF- α e IL-1. También se ha observado un aumento de IL-4, IL-6 e IL-10.

También se puede presentar monocitosis en la endocarditis causada por *Streptococcus viridans*, pudiendo representar hasta un tercio del recuento diferencial.

En la sífilis, el *Treponema pallidum* activa los monocitos a través de la unión de la lipoproteína a CD14, lo que induce la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α .

La *Brucella melitensis* es un patógeno intracelular facultativo que posee la capacidad de sobrevivir e incluso es capaz de multiplicarse

en el interior de las células fagocíticas del huésped. La fase bactericida de la brucelosis coincide con la participación de la inmunidad mediada por células, donde proliferan los macrófagos residentes y se reclutan monocitos circulantes. Después de la infección aumenta la secreción de IL-6, IL-1 y TNF- α .

La interacción de los microorganismos antes mencionados con los monocitos/macrófagos activa una serie de procesos fisiopatológicos que tienen por finalidad iniciar una respuesta inmune mediada por citoquinas que estimulan la monocitosis. Brevemente, algunas estructuras de membrana de los agentes etiológicos (Lipoarabinomanoma, LPS, lipoproteína, ácido lipoteicoico y peptidoglicano) interactúan con el complejo CD14-receptor Toll tipo 2 ó 4, presente en la superficie de los monocitos/macrófagos, complejo que está unido a la proteína MD2. Este complejo activa la familia de proteínas quinasas con actividad mitógena (MAP-quinasa) y la estimulación de la transcripción del factor nuclear κ B (NF- κ B), previa activación del complejo MYD88, quinasa asociada a receptor de IL-1 (IRAK) y factor asociado al receptor de TNF (TRAF6). Además, el receptor Toll 2 ó 4 estimula a la proteína adaptadora que contiene dominio de homología para receptor Toll/IL-1 (TIRAP), la que a su vez activa, la fosfatidilinositol 3 quinasa que estimula la transcripción de NF- κ B.

Tumores sólidos malignos

Las neoplasias malignas, como el cáncer ovárico, gástrico o de mamas, con frecuencia presentan monocitosis.

El quimioattractante de macrófagos, MCP-1, es producido por las células epiteliales en el cáncer ovárico. Cuando las células ováricas sufren la

transformación a células neoplásicas, comienzan a sintetizar un grupo de citoquinas, entre las que destacan IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α , las cuales estimulan la monoclonación.

Mesenchimopatías

Los macrófagos y las moléculas que éstos secretan son fundamentales en la inflamación y destrucción observada en la artritis reumatoidea. Un evento temprano en la patogénesis de esta enfermedad es la infiltración de macrófagos activados en la membrana sinovial; éstos

secretan citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 e IL-6; al igual que en las enfermedades infecciosas estas citoquinas estimulan la monoclonación.

2.5. Linfocitos

2.5.1. Linfocitosis

La linfocitosis se refiere al aumento del recuento de linfocitos superior a 4.500/ μ L. Las principales causas de linfocitosis se indican en la tabla 11-6.

Tabla 11-6. Causas de linfocitosis

- Infecciones agudas: coqueluche, mononucleosis infecciosa y hepatitis.
- Infecciones crónicas: brucelosis, tuberculosis, sífilis y toxoplasmosis.
- Síndromes linfoproliferativos: leucemia linfática crónica y aguda, algunos casos de linfomas, enfermedad de las cadenas pesadas y leucemia de células vellosas.
- Linfocitosis relativa: exantemas, después del estadio inicial, especialmente en paperas y rubéola; durante la convalecencia de infecciones agudas; tirotoxicosis; y muchas condiciones asociadas a neutropenia.

Varias infecciones por bacterias (*Bordetella pertussis*, *Brucella spp*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Triponema pallidum*), parásitos (*Toxoplasma gondii*) y virus (Virus de Epstein Barr, virus Dengue, virus parainfluenza e influenza, citomegalavirus) pueden asociarse a linfocitosis absoluta.

Bordetella pertussis

Es un cocobacilo Gram negativo que causa coqueluche o tos convulsiva. La linfocitosis es rara en infecciones bacterianas, excepto en la causada por *Bordetella pertussis*; en alrededor del 60-80% de los lactantes infectados con *B. pertussis* la linfocitosis es mayor que 11.000 células/ μ L.

La linfocitosis inducida por *B. pertussis* resulta de un bloqueo en la migración de los linfocitos desde la sangre a los tejidos. El proceso involucra la adherencia de los linfocitos a receptores específicos de las células endoteliales ubicadas en las vénulas post-capilares, seguida de la activación de la adenilato-ciclase dependiente de la motilidad celular.

La toxina pertussis, una toxina proteica purificada de la bacteria *B. pertussis*, no inhibe la unión de los linfocitos a las células endoteliales, pero sí inhibe la migración de los linfocitos hacia los órganos linfoides, por

inhibición de la transducción de la señal quimiotáctica.

Se sabe que la señal intracelular de los receptores de quimioquinas, por ejemplo IL-8R, depende de la unión de éstos a proteínas G en los linfocitos. Estas proteínas G son inactivas cuando GDP se une a la subunidad de la proteína, pero se activa cuando el GDP es intercambiado por GTP. Durante la unión del ligando, los receptores de quimioquinas asociados a las proteínas G, facilitan el intercambio de GDP por GTP. Con esto, la proteína G se disocia en 2 subunidades: $G\alpha$ y $G\beta$; luego se activa la enzima fosfolipasa C asociada a la membrana, que escinde el fosfatidilinositol 1,4,5 difosfato (PIP2) a la forma de segundos mensajeros intracelulares fosfatidilinositol 1,4,5, trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 moviliza el calcio desde reservorios intracelulares, para activar varias isoformas de proteínas kinasas Ca^{+2} dependientes las que catalizan la fosforilación de proteínas. Esto activa una serie de eventos que participan en respuestas celulares tales como quimiotaxis, desgranulación y expresión de moléculas de adhesión.

Brucella spp

Las Brucellas son bacterias intracelulares facultativas. Activan la proliferación de células

NK, ya sea directamente o estimulando la producción de IL-2 por los macrófagos y neutrófilos. Las células NK producen IFN- γ que a su vez activa a los macrófagos y promueve la lisis de las bacterias fagocitadas. Así, las células NK constituyen una línea de defensa en una fase inicial de la infección. Como las Brucellas residen en el interior de los macrófagos, sus antígenos, de los cuales se destaca el LPS, pueden ser procesados y presentados por moléculas MHC-II. Esto induce proliferación clonal de linfocitos T CD4+ que en la brucelosis se caracteriza por una preponderancia de linfocitos T “helper” 1 (LTh1), debido a que las bacterias intracelulares estimulan la producción de IL-12 y de IFN- γ . Algunos antígenos bacterianos que alcanzan el citoplasma son presentados a los LT CD8+ por moléculas MHC-I, con lo cual, además de favorecer el aumento de esta población linfocitaria, se lisan las células infectadas y aumenta la producción del IFN- γ .

Se han descrito otros factores de virulencia en distintas especies de Brucellas los que provocan activación de la respuesta inmune mediada por linfocitos. La enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD) de la *Brucella abortus* induce la secreción de IFN- γ por los LTh1 e induce una acción citotóxica de los LT CD8+.

Se ha sugerido que las cepas lisas de *B. melitensis* sobreviven mayor tiempo dentro de los macrófagos inhibiendo los mecanismos apoptóticos de estas células, favoreciendo así una continua producción de señales que, posteriormente, activarían la proliferación linfocitaria.

Mycobacterium tuberculosis

Es una bacteria intracelular facultativa, aerobia estricta; agente causal de la tuberculosis.

Como respuesta al encuentro con *M. tuberculosis*, los neutrófilos y monocitos liberan, entre otras citoquinas, IL-15 la cual estimula la activación y la proliferación de células NK.

Al igual que en la brucelosis, luego de la respuesta natural o innata, los antígenos de las micobacterias residen en fagosomas primarios. Allí sus proteínas son procesadas y expresadas en moléculas MHC II, lo que estimula los LT CD4+ con posterior proliferación de los mismos. Fosfoligandos producidos por esta micobacteria (isopentenil pirofosfatasa) pueden estimular LT citotóxicos $\gamma\delta$, y producir una proliferación linfocitaria clonal, en ausencia de moléculas

presentadoras.

Treponema pallidum

Es una bacteria móvil y de forma helicoidal; causal de la sífilis.

Los antígenos TpN17, TpN37 y TpN47 de las espiroquetas inducen respuesta de los LT. La proliferación linfoide alcanza su máximo nivel alrededor del día 30 de la infección.

La respuesta de los linfocitos T asociados a la infección por *T. pallidum* en humanos produce citoquinas que son características de LTh1 (IFN- γ y IL-2).

Toxoplasma gondii

Es un protozoo intracelular que causa la toxoplasmosis. Luego de la ingestión de ooquistes, los taquizoitos son liberados en el intestino delgado e invaden las células epiteliales mucosas, desde donde ingresan a la circulación. Así se activa la inmunidad natural del huésped; *T. gondii* tiene la capacidad de activar componentes de la inmunidad innata como macrófagos y células NK. Esto se traduce en proliferación de células NK y en el aumento de secreción de IFN- γ , lo cual potencia la actividad microbicida de los macrófagos. Esta activación inmune lleva a la inhibición de la replicación de los taquizoitos, previo al reclutamiento de los LT y a una apropiada activación de dichas células. La IL-12, secretada por los macrófagos, es mediadora principal de la producción de IFN- γ por las células NK, mientras que otras monoquinas como TNF- α , IL-1 β y IL-15, potencian los efectos de IL-12. Las monoquinas antes mencionadas reclutan LT CD4+ al sitio de infección y al actuar en ellos la IL-12 favorece su diferenciación en LTh1. Esta diferenciación se produce debido a que los macrófagos productores de IL-12 inducen en el LT CD4+ la fosforilación del transductor de señales y activador de la transcripción 4 (STAT-4), un factor transcripcional involucrado en la diferenciación de los linfocitos CD4+ a LTh1.

T. gondii tiene la capacidad de activar a los linfocitos T independientemente de IL-12, cuando se activa la vía clásica de presentación antigénica por moléculas MHC-I a los LT CD8+.

Virus Epstein-Barr (VEB)

Pertenece al grupo de los virus Herpes humanos; es un virus DNA. Causa el síndrome

de mononucleosis infecciosa (MNI) caracterizado por linfocitosis con linfocitos activados, fiebre, faringitis y linfadenopatías. El virus se une específicamente al receptor tipo 2 del complemento en los linfocitos B (LB), lo que produce su activación y proliferación.

En la MNI la mayoría de los linfocitos activados corresponden a LT CD8+, aunque los LT CD4+ y las células NK también se encuentran aumentadas. Los linfocitos reactivos que aparecen en la circulación se debe a que son estimulados por el reconocimiento de determinados antígenos del VEB en los LB, tales como NAs ("Epstein-Barr nuclear proteins") y LMPs ("latency membrane proteins"). La rápida proliferación de las células T activadas es responsable de la linfocitosis en sangre periférica, de las linfadenopatías, hepatoesplenomegalia y de la inflamación de las amígdalas y adenoides.

Virus Dengue

Es un virus RNA de la familia Togaviridae; que produce un síndrome febril que puede tener complicaciones sistémicas. El virus Dengue posee una gran capacidad de replicación en los LB y aumenta su proliferación, ya que aumenta la secreción de IL-6 en macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y linfocitos T.

Virus de Parainfluenza e Influenza

Son virus RNA; ambos son agentes causales de enfermedades respiratorias. Poseen distintas glicoproteínas de superficie que son

importantes en su interacción con el huésped: una hemaglutinina (H) que juega un rol importante en la absorción del virus a las células epiteliales respiratorias, una neuroaminidasa (N) que ayuda en la penetración del virus a la célula y una proteína de fusión (F) importante en la unión virus-célula. La inmunidad humoral se desarrolla en función al reconocimiento de las glicoproteínas de superficie por el receptor de los linfocitos B (BCR). Los linfocitos T CD8+ responden directamente a los determinantes antigénicos de H, N y F al igual que las células NK. Se ha encontrado aumento en la síntesis de diversas citoquinas en el sitio de infección tales como IL-2, IFN- γ , TNF- α/β , IL-6, IL-10, IL-8 e IL-11, las que promueven la linfocitosis e inhiben la replicación viral.

Citomegalovirus (CMV)

El CMV pertenece a la familia de los virus Herpes. Es un patógeno oportunista que puede producir infecciones persistentes incluso de por vida. En una primera infección por CMV se desarrolla una inmunidad antiviral específica LT CD4+. La estimulación de los LT CD4+ provoca la secreción de IFN- γ lo que lleva luego, a la producción de anticuerpos específicos por los LB y a la proliferación de los LT CD8+.

2.5.2. Linfopenia

Se define linfopenia como la disminución del recuento de linfocitos a cifras menores de 1.500/ μ L. En la tabla 11-7 se encuentran las principales causas de linfopenia.

Tabla 11-7. Causas de linfopenia

- Inmunodeficiencias de linfocitos B o T, SIDA.
- Destrucción de linfocitos: radioterapia, quimioterapia.
- Enfermedades hematológicas: linfoma de Hodgkin, aplasia medular, policitemia vera.

Alteraciones en la regulación de la apoptosis o muerte celular programada puede llevar a inmunodeficiencias, neoplasias y fenómenos autoinmunes. La apoptosis puede ser inducida vía unión ligando-receptor y por un mecanismo dependiente de mitocondrias.

Quimioterapia y radiación ultravioleta

La quimioterapia y la radiación UV inducen

apoptosis mediante alteración directa de las mitocondrias, sin necesidad de receptores. Entre los cambios se incluye la producción de poros de membrana que hacen perder el potencial transmembranal mitocondrial, lo que permite liberar proteínas reguladoras de la apoptosis (citocromo c, Apaf-1, y caspasa 9) que inician la activación de más caspasas, que llevan a la apoptosis de las células linfoides, y por lo tanto linfopenia e inmunodeficiencias.

Virus de la inmunodeficiencia humana

Es un virus RNA de doble hebra que pertenece a la subfamilia de los Lentivirus de la familia Retroviridae. El VIH infecta a los LT CD4+ lo que conduce a linfopenia, lo que a su vez altera la respuesta inmune. El virus ingresa al organismo directamente a través del torrente sanguíneo o a través de las mucosas. Las primeras células infectadas son las células dendríticas, éstas presentan antígenos a los LT CD4+. La glicoproteína (gp) de la envoltura viral se une a CD4 y un correceptor de quimioquinas de las células T (CXCR-4), luego se produce un cambio conformacional en la gp120 y otra región de la glicoproteína (gp41), lo cual permite la entrada del RNA viral.

La disfunción inmune se debe a que los LT CD4+, necesarios para iniciar una respuesta inmune, son destruidos y alterados funcionalmente, lo cual causa un estado inmunodeficiente muy susceptible a infecciones. La respuesta innata y humoral en infección VIH, no puede contrarrestar la linfopenia CD4+. Se ha descrito que cambios en la regulación de la apoptosis participa en la lisis linfocitaria. Se ha observado aumento en la expresión moléculas Fas y FasL, acompañado de disminución de proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl2 y BclXL y el concomitante aumento de proteínas pro-apoptóticas como BclXS y Bax.

Post-operatorio

La cirugía y la anestesia inhiben la inmunidad celular. Se presenta linfopenia asociada a apoptosis; aumenta la expresión de Bcl2. Además, la cirugía favorece un proceso inflamatorio neuroendocrino mediado por hormonas de estrés como cortisol y catecolaminas, así como también citoquinas inflamatorias tales como IL-6 y TNF- α .

Plasmodium falciparum

En la malaria, los niveles de FasL soluble están aumentados en etapas iniciales de la enfermedad y disminuyen con el tratamiento de la enfermedad. Esto sugiere que la linfopenia causada por el Plasmodium es mediado por el receptor FasL independiente de la apoptosis que inicia en las de mitocondrias.

3. ALTERACIONES FUNCIONALES DE LOS LEUCOCITOS

Las alteraciones funcionales de los leucocitos

constituyen un conjunto de síndromes caracterizados por trastornos estructurales o funcionales, lo que hace que ciertas infecciones no se controlen adecuadamente y se comporten de una manera inusual, lo que afecta el desarrollo del individuo, tanto por su frecuencia de ataque como por su severidad. Dentro de estas, se encuentran las alteraciones de granulocitos y linfocitos las cuales se describen a continuación.

3.1. Alteraciones funcionales de los granulocitos

Las alteraciones cualitativas de los granulocitos se clasifican en: defectos de la adhesión y quimiotaxis, trastornos de opsonización y fagocitosis y trastornos de la actividad microbicida, que incluyen los trastornos del metabolismo oxidativo y de los gránulos o lisosomas. Estos trastornos pueden ser constitutivos o secundarios a numerosas afecciones.

3.1.1. Defectos de la adhesión

a) Déficit de adhesión de los leucocitos tipo 1 (DAL-1). Es un desorden autosómico recesivo que se debe a mutaciones de un gen del cromosoma 21q22.3 que codifica la cadena común (CD18) de la familia integrina β_2 . Cada integrina β_2 es un heterodímero formado de una cadena α (CD11a, CD11b y CD11c) unido no covalentemente a una subunidad β común (CD18). Los heterodímeros $\alpha\beta$ de la familia integrina β_2 incluyen CD11a/CD18 (antígeno 1 asociado a función linfocitaria, LFA-1), CD11b/CD18 (antígeno 1 de macrófago, Mac1 o receptor 3 de complemento, CR3) y CD11c/CD18 (CR4). La expresión defectuosa de CD18 determina la no expresión o expresión muy baja de CD11a, CD11b y CD11c. Las mutaciones que resultan en la falla de producción de la subunidad β_2 funcional (mutaciones puntuales, inserciones y deleciones) causan DAL-1. La mutación en el gen que codifica para la cadena β_2 del complejo CD11/CD18 impide el ensamblaje normal del heterodímero $\alpha\beta$ y la traslocación posterior a la superficie lo que afecta la adhesión de neutrófilos a células endoteliales y microorganismos, comprometiendo los procesos de fagocitosis y puesta en marcha del metabolismo oxidativo.

Existen dos fenotipos clínicamente diferentes. Los pacientes con fenotipo severo (expresión de CD18 menor a 1% en leucocitos) se caracterizan por caída tardía del cordón

umbilical (más de 30 días), onfalitis, leucocitosis (mayor a 15.000/ μ L) en ausencia de infección y gingivitis severa con periodontitis y reabsorción ósea alveolar. Presentan infecciones cutáneas, de vía aérea superior e inferior, intestinales y perirectales recurrentes por *Staphylococcus aureus* o bacilos gram negativos. Las infecciones se caracterizan por ser necrotizantes, con tendencia a la ulceración y típicamente, no aparece pus en las lesiones.

Los pacientes con fenotipo moderado (expresión 1-30% de CD18 en los neutrófilos) son diagnosticados, en general, más tardíamente. En ellos, con frecuencia, la caída del cordón umbilical se produce normalmente, tienen un bajo riesgo de presentar infecciones severas y una sobrevivencia más larga. Sin embargo, presentan periodontitis, cicatrización retardada y leucocitosis.

El diagnóstico se basa en la demostración de un defecto de expresión de las moléculas CD11/CD18, mediante citometría de flujo. En la forma más severa, el pronóstico es grave, recomendándose trasplante de médula ósea.

En las formas más moderadas se ha utilizado profilaxis con cotrimoxazol y tratamiento precoz con antibióticos, procurando identificar al organismo responsable mediante cultivo o biopsia del tejido afectado.

b) Déficit de selectina o Déficit de adhesión de los leucocitos tipo 2 (DAL-2). Se debe a un defecto en el metabolismo de la fucosa, de herencia autosómica recesiva que conlleva una alteración en la adición de carbohidratos a las proteínas que son ligando para las selectinas, como es el caso de Sialyl Lewis X que se encuentra en las células endoteliales. La selectina juega un rol importante en la respuesta inflamatoria porque facilita la acción de otros importantes receptores de adhesión. Se asocia además con la ausencia del antígeno H en la superficie del glóbulo rojo, el cual origina el fenotipo de Bombay.

Los individuos que padecen esta deficiencia presentan infecciones bacterianas recurrentes incluyendo: neumonía, otitis media, periodontitis, celulitis localizada sin acumulación de pus, dimorfismo craneofacial, y déficit neurológico. A diferencia de DAL-1 la frecuencia y severidad de las infecciones tiende a disminuir con la edad.

A diferencia de **DAL- 1**, los granulocitos en esta patología tienen una fagocitosis y expresión de

CD11/CD18 normal.

Tanto, DAL-1 como DAL-2, son patologías características de deficiencia de moléculas de adhesión. Sin embargo, estudios actuales, revelan que en la patogenia de algunas neoplasias, artritis reumatoide, trasplantes e incluso en el resfrío común la participación de otras (nuevas) moléculas de adhesión es muy importante.

c) Déficit de la polimerización de la actina. Algunas formas de defecto de adhesión leucocitaria con disminución de CD11b se asocian a un trastorno de la polimerización de la actina, en presencia de cloruro potásico 0,6 M. Esta alteración se acompaña de un defecto de la organización de los filamentos de la membrana celular, lo que origina un trastorno de quimiotaxis asociado al defecto de adhesión de los neutrófilos.

3.1.2. Defectos de la quimiotaxis

a) Síndrome de hiperinmunoglobulinemia E (Hiper IgE) o Síndrome de Job. Es un síndrome, en la mayoría de los casos, de herencia autosómica dominante (AD), aunque se han descrito casos de herencia autosómica recesiva y muchos casos esporádicos. En los pacientes con herencia AD, el defecto genético se localiza en el brazo largo del cromosoma 4q21.

Es un síndrome multisistémico con un inmunofenotipo caracterizado por eccema desde el nacimiento, abscesos subcutáneos estafilocócicos recurrentes, abscesos pulmonares estafilocócicos, infecciones fúngicas y niveles elevados de IgE (>2000 UI/mL; valor normal: 0-180 UI/mL). Se presenta además, con compromiso del tejido conectivo como fascie tosca, hiperlaxitud, retención de dentadura primaria, fracturas óseas frecuentes y escoliosis.. Los granulocitos de estos pacientes tienen fagocitosis y acción microbicida normal.

Se postula que el defecto de la quimiotaxis se debe a un aumento de la histamina por la interacción de IgE con los mastocitos y esto interferiría con la función de los neutrófilos. El exceso de producción de IgE antiestafilocócica y una deficiencia en la síntesis de otros anticuerpos también estarían involucrados. Estudios actuales involucran a la IL-12 con los niveles elevados de IgE.

La mutación también alteraría la función de las células T supresoras.

En los hallazgos de laboratorio cabe destacar eosinofilia y niveles muy elevados de IgE (>2000 UI/mL).

El diagnóstico diferencial debe hacerse con la dermatitis atópica severa y con la Enfermedad Granulomatosa Crónica. No existe tratamiento específico.

b) Disquinesia ciliar o Síndrome de Kartagener. A diferencia del anterior, los pacientes presentan un defecto de la quimiotaxis de origen celular, por alteración de los microtúbulos.

La disquinesia ciliar primaria (DCP) es una enfermedad genética, fundamentalmente autosómica recesiva, con una prevalencia aproximada de 1/20.000 habitantes. Se caracteriza por una alteración en la motilidad de las estructuras ciliares del organismo. En un 50% de los casos cursa con *situs inversus*, conociéndose a la tríada formada por éste, la presencia de bronquiectasias y sinusitis como síndrome de Kartagener. Las estructuras ciliares se encuentran en una variedad de órganos y epitelios del cuerpo humano: vía aérea superior e inferior, células ependimales del sistema nervioso central (SNC), vasos deferentes, endometrio, cérvix y trompas de Falopio, células sensoriales olfatorias y vestibulares, lo que condiciona las manifestaciones clínicas de la enfermedad como son la bronquitis crónica, pansinusitis, otitis crónica, esterilidad masculina y embarazos ectópicos. En los casos que no se asocian a *situs inversus* es necesaria una alta sospecha clínica para su diagnóstico, al que se llega mediante estudios de actividad ciliar y ultraestructurales mediante biopsia de epitelio de vía aérea superior. En general, los pacientes que se diagnostican y tratan precozmente mantienen una función pulmonar normal y tienen un buen pronóstico a largo plazo.

La migración celular se puede medir *in vivo*, mediante la técnica de la ventana cutánea de Rebeck, que consiste en realizar una abrasión en la dermis del antebrazo y colocar un cubre de vidrio que se va cambiando periódicamente y se tiñe, para examinar las células que se le han adherido. En general, se estudia la quimiotaxis *in vitro*, con la cámara de Boyden, que dispone de dos compartimentos separados por un filtro, con poros de mm. Las células se ponen en el compartimiento superior de la cámara y un agente que estimula la movilidad en el inferior, tras un período de incubación, se ven las células que han atravesado el filtro.

c) Síndrome de Chediak Higashi (SCH). Es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por presentar albinismo oculocutáneo, trastornos neurológicos, infecciones piógenas recurrentes y linfomas tardíos en períodos de fase acelerada tardía.

Esta patología se debe a una mutación en el gen *LYST* ("lysosomal trafficking regulador gen") o *CHS1* que se encuentra en el cromosoma 1q42.1-q42.2. Este gen está involucrado en la generación normal de la estructura y función de organelos intracelulares y expresión de algunas moléculas de superficie de los leucocitos. Sin embargo, es aún desconocido el mecanismo por el cual *LYST* funciona y por lo tanto, la fisiopatología de (SCH) es aún poco clara. El defecto genético más frecuente es una proteína *LYST* truncada.

Los melanocitos oculares y cutáneos presentan melanosomas gigantes y aberrantes (macromelanosomas) con alteraciones de maduración. La fusión inapropiada de lisosomas con premelanosomas resulta en la destrucción temprana y dilución de la pigmentación. Es así, que la coloración del pelo es castaña clara a rubia con un brillo plateado muy característico. A la microscopía de luz el pelo tiene pequeños agregados de pigmentación fraccionada que son patognomónicos.

Son características las infecciones frecuentes y recurrentes ocasionadas por organismos catalasa positivos y negativos así como, la periodontitis. La causa de muerte más frecuente es la fase acelerada en la cual se produce hemofagocitosis e infiltración del tejido linfocítico. Clínicamente es indistinguible de otros síndromes hemofagocíticos. Se caracteriza por citopenias, fiebre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, hipofibrinogenemia e hipertrigliceridemia. La expresión en superficie de CTL-4 que es una molécula involucrada en la finalización de las respuestas T es anormal en esta patología, lo que puede explicar la fase acelerada. Los pacientes de más edad pueden desarrollar linfomas.

El diagnóstico se hace mediante la demostración en sangre periférica de leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos) con gránulos gigantes anormales. Estos gránulos gigantes también se observan en histiocitos, precursores eritroides, neuronas, células de Schwann y células tubulares renales. La neutropenia es frecuente debido probablemente

a destrucción intramedular. Las plaquetas también presentan gránulos gigantes con disminución de ADP y serotonina, que ocasiona trombopatía y tendencia a manifestaciones hemorrágicas.

La quimiotaxis de monocitos y neutrófilos está disminuida probablemente por la interferencia de los macrogránulos. La fagocitosis está normal o aumentada, pero el "killing" intracelular está disminuido debido a cantidades menores a las normales de enzimas de gránulos primarios.

Las células NK, aunque presentes en número normal tienen una citotoxicidad prácticamente ausente. La citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) de los linfocitos está disminuida, no así la de neutrófilos y monocitos. La función de linfocitos B generalmente está intacta.

La terapia y diagnóstico debe estar dirigido a bacterias habituales pero el tratamiento debe ser más prolongado y a más altas dosis de fármacos que las habituales.

La fase acelerada puede ser controlada con etopósido, corticoides y metotrexato intratecal. Sin embargo, en general es recurrente y refractaria a tratamiento a menos que se realice un trasplante de médula ósea, el único tratamiento que ha demostrado ser efectivo.

3.1.3. Defectos del metabolismo oxidativo

a) Déficit de mieloperoxidasa (MPO). La mieloperoxidasa es una hemoproteína de los gránulos azurófilos de neutrófilos y monocitos. Está compuesta por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas livianas ($\alpha 2\beta 2$), de 55-60 y 10-15 kDa, respectivamente. Cataliza la conversión de H_2O_2 a ácido hipocloroso.

El déficit de mieloperoxidasa es el trastorno hereditario más frecuente de los fagocitos. En el caso de déficit completo es de 1:4000 y en el incompleto de 1:2000. Es una patología autosómica recesiva con rasgos de expresión variables.

Numerosos estudios han demostrado que las bacterias y hongos en los neutrófilos son fagocitados normalmente y la ingestión es seguida por un estallido respiratorio normal. Sin embargo, la acción bactericida es un tanto tardía, alcanzando niveles normales sólo después de 1 a 3 horas. Por lo tanto, la mayoría

de los pacientes no presentan infecciones, ya que se mantiene intacto el metabolismo oxidativo dependiente de la NADPH oxidasa con producción de H_2O_2 normal o aumentada. Los síntomas clínicos que pueden presentar alguno de estos pacientes son principalmente, infecciones a diferentes cepas de *Candida*. Se han reportado infecciones mucocutáneas, meningéas, óseas y sepsis.

El diagnóstico puede hacerse con contadores electrónicos, que utilizan un marcador de peroxidasa para identificar los granulocitos. Estos pacientes presentan un defecto *in vitro* de la capacidad fungicida frente a *Cándida* y *Aspergillus*.

La actividad microbicida de los leucocitos polimorfonucleares se puede valorar mediante técnicas microbiológicas, examinando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que se obtienen tras incubar los microorganismos con células y suero. La prueba se realiza fundamentalmente con *Staphylococcus aureus*. También se pueden usar métodos citológicos basados en el cambio de coloración que se produce en los microorganismos al producirse la muerte del mismo. Las levaduras pierden su capacidad de teñirse con Giemsa y se distinguen por su tono claro en el interior del citoplasma celular. En otras ocasiones, se utilizan colorantes vitales como el azul de metileno o el azul tripano, que se captan exclusivamente por microorganismos muertos.

Sólo requieren tratamiento los pacientes que desarrollan infecciones.

El déficit de MPO también se observa en otras situaciones como embarazo, intoxicación por plomo, enfermedad de Hodgkin, pero es más comúnmente asociado con leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, mielofibrosis y síndromes mielodisplásicos.

b) Enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Es un síndrome poco común que resulta de defectos inherentes de la función de los granulocitos.

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es un trastorno del metabolismo oxidativo, que se caracteriza por defectos de la activación de la NADPH oxidasa, un complejo de seis proteínas, habiendo un defecto de producción de H_2O_2 y de ión superóxido provocando una disminución en la actividad microbicida de los granulocitos.

La reacción $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+$ requiere un citocromo b específico de los fagocitos y NADPH oxidasa. La NADPH oxidasa en su estado basal tiene dos componentes. Uno de ellos es un complejo asociado a membrana de los gránulos secundarios y un complejo citosólico. El complejo asociado a membrana contiene el citocromo b_{558} , compuesto por una cadena β glicosilada de 91 kD ($\text{gp91}^{\text{phox}}$) y una cadena α no glicosilada de 22kD (p22^{phox}). El complejo citosólico está compuesto por p47^{phox} , p67^{phox} , p40^{phox} y rac . Todos estos componentes son necesarios para la generación de superóxido, excepto p40^{phox} que tiene un rol regulador.

En la patogenia de EGC existen 4 genes involucrados, con dos patrones de herencia: (a) CYBB ($\text{gp91}^{\text{phox}}$, EGC ligada a X), (b) CYBA (p22^{phox} , EGC AR), (c) NCF1 (p47^{phox} , EGC AR), y (d) NCF2 (p47^{phox} , EGC AR).

El genotipo más común es el ligado al cromosoma X y da cuenta del 70% de los casos e involucra mutaciones en la cadena β del citocromo b_{558} , CYBB y $\text{gp91}^{\text{phox}}$. Es la consecuencia de la ausencia de p91^{phox} (X91^0), cantidades reducidas de proteína hipofuncionante (X91^-) o de cantidades normales de proteína no funcionante (X91^+). La forma autosómica recesiva corresponde al 35% de los casos. El 5% es causada por mutaciones en p22^{phox} . La falla de producción de cualquiera de las cadenas del heterodímero ($\text{gp91}^{\text{phox}}$ o p22^{phox}) previene la expresión significativa de la otra. Ya que ambas subunidades se requieren para estabilizar a la otra en la membrana. Un 25% es causada por defectos en p47^{phox} , principalmente debidas a la falla de expresión de la proteína (A47^0). Finalmente, menos del 5% de los casos se producen por deficiencia de p67^{phox} los que no tiene expresión de la proteína (A67^0).

Ya que en esta patología existe un defecto a nivel de producción de peróxido de hidrógeno y que los mecanismos distales de la vía bactericida se encuentran intactos principalmente, mieloperoxidas, este trastorno se manifiesta por un "killing" bacteriano defectuoso e infecciones por bacterias catalasa positiva.

La presentación clínica de esta patología es muy variable manifestándose en la mayoría de los casos en el período de lactante o preescolar. Sin embargo, un número no despreciable de pacientes se diagnostican tardíamente en la

infancia o en la edad adulta. La incidencia es de 1 en cada 1.000.000 de personas.

Los pacientes presentan infecciones recurrentes pulmonares, cutáneas, de ganglios, hepáticas y también osteomielitis. Las bacterias involucradas son principalmente, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia (Pseudomonas) cepacea*, *Serratia marcescens*, pero también hongos como *Nocardia* y *Aspergillus*. También son frecuentes los granulomas, especialmente, en ganglios linfáticos, hígado y pulmón. Los tractos gastrointestinal y urinario se comprometen frecuentemente, incluso en ocasiones son los sitios de presentación. Se han descrito granulomas en esófago, yeyuno, íleon, colon y recto que simulan una enfermedad de Crohn. La obstrucción del tracto de salida gástrica es una manifestación bastante común, en algunas series hasta de 32%. El 38% de los pacientes pueden tener compromiso del tracto genitourinario lo que incluye granulomas en vejiga, obstrucción de uréter e infecciones del tracto urinario.

El diagnóstico se confirma demostrando el trastorno del metabolismo oxidativo, para lo que clásicamente se ha utilizado la prueba de azul de tetrazolio. Este compuesto se reduce al activarse la NADPH transformándose en formazán y cambiando su color amarillo por un color azul oscuro, que se identifica en los granulocitos, o mediante colorimetría en extractos de polimorfonucleares, previamente activados. El consumo de oxígeno se puede medir por quimioluminiscencia. Actualmente, el metabolismo se mide por citometría de flujo, utilizando sustancias que al producirse el estallido respiratorio se oxidan y emiten fluorescencia, como la dihidrorodamina. El porcentaje de fluorescencia que se obtiene es proporcional al peróxido de hidrógeno producido. En los pacientes con trastornos del metabolismo oxidativo no se produce esta activación, está disminuida, o retrasada.

Las técnicas de "immunoblot", citometría de flujo y estudio molecular pueden diferenciar entre pacientes portadores de EGC ligada a cr X o AR, lo que es importante ya que la segunda forma tiene una evolución más benigna.

También es posible observar neutropenia, aumento en los niveles de inmunoglobulinas y aumento de células progenitoras CD34+ en médula ósea.

El tratamiento se basa en profilaxis antimicrobianas, uso de $\text{IFN-}\gamma$ y trasplante de precursores hematopoyéticos.

c) Defectos del glutatión. El glutatión reducido juega un importante papel en la protección del neutrófilo. Se conocen dos defectos del metabolismo del glutatión: defecto de glutatión reductasa y defecto de glutatión sintetasa, ambos se transmiten de forma autosómica recesiva y son extremadamente raros.

La glutatión reductasa tiene como misión proteger los efectos tóxicos del H_2O_2 sobre la NADPH oxidasa y los microtúbulos. El déficit del glutatión produce una acumulación tóxica de H_2O_2 y acorta el metabolismo oxidativo, aunque en general es suficiente para que la célula mantenga actividad bactericida, por lo que este trastorno no se acompaña de historia de infecciones. El pronóstico es bueno y no requiere tratamiento.

d) Déficit de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G_6PD). Es una de las enzimopatías más frecuentes en humanos y afecta a 400 millones de personas en el mundo. Es una patología ligada al cromosoma X. Esta enzima cataliza la reacción en la vía de las pentosas fosfato para generar NADPH, el cual sirve como dador de electrones en las biosíntesis reductoras. La función principal del NADPH es reducir la forma disulfuro del glutatión a la forma sulfhidrilo (reacción catalizada por glutatión reductasa).

Este es un trastorno que se caracteriza por la disminución de esta enzima en hematíes, y leucocitos, lo que ocasiona anemia hemolítica que es la manifestación más frecuente. Algunos pocos pacientes tienen una deficiencia severa de G_6PD (menos de 5%) con alteración del estallido respiratorio e infecciones severas. La disfunción de los neutrófilos es menos frecuente de lo esperado probablemente, porque tienen al menos 20% de actividad de G_6PD lo que es suficiente para mantener un estallido respiratorio normal. Se han descrito infecciones bacterianas pulmonares recurrentes y muerte por sepsis por *Chromobacterium violaceum* y a veces simula una EGC. El diagnóstico se hace mediante demostración del defecto del metabolismo oxidativo. El diagnóstico diferencial debe hacerse con otras alteraciones metabólicas como la EGC y los defectos del glutatión.

e) Deficiencia de catalasa: Esta enzima convierte al H_2O_2 en agua y oxígeno. Su

deficiencia puede provocar que los granulocitos sean más susceptibles al daño del H_2O_2 que lo normal. Los pacientes no presentan complicaciones severas por infección.

3.1.4. Defecto de los gránulos de los lisosomas

Déficit constitucional de los gránulos específicos (DCGE). Se trata de un trastorno de carácter autosómico recesivo muy raro, que ocasiona un efecto de maduración de las células, con ausencia de gránulos y de su contenido en lactoferrina y defensinas. El citoplasma de los granulocitos presenta apariencia de vidrio y el núcleo suele aparecer hiposegmentado. Se acompaña de un defecto de la capacidad de migración de las células. Los pacientes presentan infecciones recurrentes frente a diversos microorganismos patógenos, fundamentalmente como en todos los trastornos de los granulocitos: infecciones de partes blandas, sinusitis, bronquitis y neumonía.

3.2. Alteraciones funcionales de los linfocitos

Las alteraciones funcionales de los linfocitos se encuentran dentro de las inmunodeficiencias primarias (IDP), las cuales son enfermedades causadas por alteraciones cualitativas o cuantitativas de uno o más componentes específicos (linfocitos T y B) o inespecíficos (complemento y células fagocíticas) del sistema inmune que determinan una mayor susceptibilidad a infecciones. Están asociados a defectos genéticos del sistema inmune que se manifiestan generalmente en la infancia.

Dentro de este grupo de entidades se incluye, entre otras: inmunodeficiencias severas combinadas (defectos de cadena γ , Jak3, IL7-7R α , RAG-1 y RAG-2), deficiencia de expresión de MHC clase II, deficiencia de CD8 o ZAP-70, deficiencia múltiple de producción de interleuquinas, deficiencia de IL-2 y las deficiencias de expresión de moléculas del complejo CD3 (cadenas γ y ϵ).

3.2.1. Defectos en la expresión de moléculas MHC

Se llamó originalmente “Síndrome del linfocito desnudo”. Es una inmunodeficiencia heterogénea desde el punto de vista genético ya que puede producirse por mutaciones en distintas proteínas que promueven la transcripción de moléculas MHC clase II. Se hereda de forma autosómica recesiva.

El número de células T CD4+ en la mayor parte de los casos está disminuido, pero el recuento de CD8+ es normal. Se presenta con hipogammaglobulinemia y ausencia de respuesta de las células T a antígenos específicos, con respuesta normal a estímulos mitogénicos.

3.2.2. Defectos de activación y función de células T

Estos defectos, se caracterizan por la presencia de un número normal de células T pero que no son capaces de proliferar o producir citoquinas en respuesta a estimulación con mitógenos, antígenos u otras señales de activación del receptor de linfocitos T (TCR).

La caracterización a nivel molecular ha demostrado en algunos de estos casos expresión deficiente del complejo CD3/TCR debido a mutaciones que dan lugar a deficiencia selectiva de la subunidad γ o ϵ del CD3.

Otro de estos síndromes, es la denominada deficiencia de CD8 o de ZAP-70. La ZAP-70 es una proteína quinasa fundamental para los mecanismos de señalización intracelular del TCR. Los pacientes con esta deficiencia muestran valores normales o aumentados de linfocitos, con células CD4 aumentadas y ausencia de CD8. El timo muestra estructura normal, con linfocitos T doble positivos, CD4+ CD8+, LT CD4 normales y ausencia de CD8, demostrando que la ZAP 70 es crítica para la diferenciación intratímica de esta última subpoblación. *In vitro*, las células mononucleares de estos pacientes no responden al estímulo del TCR con anti-CD3, pero la respuesta es normal cuando se estimulan con PMA + ionomicina, evidenciando un defecto temprano de la estimulación del TCR.

3.2.3. Síndrome hiper IgM ligado al sexo

Se describió en 1961 en 2 varones que presentaban un cuadro clínico similar a la agammaglobulinemia ligada al X con concentraciones de IgM sérica muy elevada, ausencia de IgA e IgG muy baja (<150 mg/dL). Además de presentar infecciones piógenas recurrentes, son susceptibles a infecciones oportunistas en particular por *Pneumocistis carinii* y problemas autoinmunes, especialmente neutropenia recurrente, a menudo severa. La infección por *Criptosporidium* es causa frecuente de colangitis esclerosante con daño hepático severo. Aquellos pacientes que sobreviven más allá de la segunda década, presentan un mayor

riesgo de desarrollar cáncer, especialmente del tracto gastrointestinal, hígado y vesícula.

La causa de esta patología es un defecto molecular en un gen que codifica para el ligando del CD40 (CD40L), molécula presente normalmente en los linfocitos T activados, imprescindible para la diferenciación y cambio de isotipo de inmunoglobulinas en los linfocitos B. Es por eso que, a pesar de que el número de linfocitos es normal, los niveles plasmáticos de IgM se encuentran normales o aumentados mientras que los niveles de IgG, IgA e IgE se encuentran disminuidos.

El gen del síndrome de hiper IgM ligado al X se encuentra en el brazo largo del cromosoma X en posición q26. En la actualidad es posible efectuar diagnóstico prenatal y de portadoras.

Teniendo en cuenta que el defecto primario del síndrome se encuentra en los LT, en las últimas clasificaciones de la OMS, el síndrome ha sido incluido en las ID combinadas. Actualmente se han descrito 4 mutaciones genéticas que han dado origen a una nueva simbología de este síndrome. HIGM1 (CD40L), HIGM2 (AID), HIGM3 (CD40), y HIGM4 (Nemo).

3.2.4. Inmunodeficiencia común variable

El término Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) se usa para designar un grupo de síndromes aún no bien definidos, pero caracterizados por formación defectuosa de anticuerpos y en que se han excluido otros defectos de inmunidad humoral. El patrón hereditario es variado (autosómico recesivo, dominante, ligado a X) siendo lo más común los casos esporádicos.

En población de origen europeo es la más frecuente de las inmunodeficiencias primarias específicas. Afecta en igual proporción a hombres y mujeres, generalmente entre los 20 y 30 años. Su incidencia se estima entre 1:50.000 a 1:200.000.

Clínicamente se presenta con infecciones piógenas recurrentes que involucran oídos, nariz, bronquios y pulmones. Algunos pacientes pueden presentar infecciones con gérmenes inusuales como *Pneumocistis carinii*, micobacterias y hongos y en algunos casos enterovirus. Los pacientes son altamente susceptibles a otros patógenos entéricos como *Giardia lamblia* y a *Herpes simplex* y *zoster*. Existe una alta incidencia de enfermedades

malignas linforreticulares y gastrointestinales. Puede observarse una variedad de desórdenes autoinmunes (anemia perniciosa, anemia hemolítica, neutropenia). Los familiares de estos pacientes tienen una mayor incidencia de déficit de IgA, enfermedades autoinmunes y condiciones malignas.

La concentración de IgG y generalmente de IgA e IgM en el suero se encuentra reducida. El número de células B en general es normal aunque puede estar reducido, pero el defecto no se encuentra a nivel de la diferenciación sino más bien de la activación *in vivo* de las células B. Cerca del 60% de los pacientes tiene una respuesta proliferativa disminuida al estimular el TCR, sin embargo no existe una anomalía del mismo sino probablemente un defecto en la transducción de señales. En ausencia de una señal apropiada por linfocitos T no se produciría proliferación, diferenciación ni secreción de anticuerpos por las células B.

3.2.5. Deficiencia selectiva de IgA

Es una de las IDP más frecuentes. Se presenta en 1:700 individuos caucásicos y 1:18.500 japoneses. El patrón hereditario es variable, en algunas familias se ha demostrado herencia autosómica recesiva y asociación a algunos haplotipos HLA (Complejo Principal de Histocompatibilidad, MHC). Las características clínicas también son variables. La mayoría de los individuos son asintomáticos, otros tienen infecciones pulmonares. Su frecuencia es mayor en pacientes con enfermedad pulmonar crónica que en población normal.

El déficit de IgA se caracteriza por niveles ausentes o extremadamente reducidos de IgA sérica (< de 7 mg/dL) con IgG e IgM normal en mayores de 4 años de edad. Se supone que existe un defecto a nivel de la diferenciación de células B que expresan IgA a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. No se encuentran anomalías a nivel de células T.

La deficiencia de IgA podría tratarse, de una forma de expresión menos grave de la IDCv. Las deficiencias de subclases de IgG, de IgA con deficiencia de subclases de IgG y las deficiencias de función de anticuerpos, también podrían considerarse formas intermedias.

3.2.6. Deficiencia selectiva de subclases de IgG

Se han descrito pacientes con nivel IgG sérico

total normal y una o más subclases de IgG bajo lo normal. Puede asociarse a niveles bajos de IgA. El déficit de IgG₃ es más frecuente en adultos y de IgG₂ en niños. El nivel normal de IgG₄ varía ampliamente en personas sanas, por lo que es difícil interpretar una deficiencia selectiva de IgG₄.

3.3. Alteraciones funcionales secundarias de los leucocitos y en situaciones especiales

3.3.1. Sistema inmune fetal y neonatal

Tanto los linfocitos T CD4+ como los T CD8+ aparecen en hígado y bazo a las 14 semanas de gestación, luego se produce aumento progresivo hasta los 6 meses de vida extrauterina que declina gradualmente hasta llegar a los niveles del adulto durante la infancia. La relación CD4/CD8 es mayor durante la vida fetal que al término del embarazo.

Así, los linfocitos T en niños de término están aumentados en número y presentan una mayor expresión de CD38 (marcador timocitario) o CD45RA (marcador de linfocitos T *naïve* presente en el 90% de estos linfocitos a esta edad vs un 60% de representación en la misma población T en un adulto).

Existe además un déficit de IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- γ , comparado con la producción de los linfocitos T del adulto.

Por los factores ya mencionados y por la menor expresión de moléculas coestimuladoras, como por ejemplo CD40 de superficie, existe una menor colaboración para la función de los linfocitos B, que tienen una menor producción de anticuerpos.

En general, las respuestas T citotóxicas están disminuidas en los recién nacidos, promediando el 30 a 60% de aquella generada por las células adultas.

La concentración de IgM e IgA es baja al momento de nacer, por la falta de exposición antigénica. Respecto a la IgG, el neonato depende del paso transplacentario de este anticuerpo para protegerse contra ciertos patógenos.

Respecto a las concentraciones de los factores del Complemento y su actividad funcional están disminuidos incluso en recién nacidos de término y estas diferencias son aún más evidentes en prematuros.

A pesar de esta inmunosupresión observada en el recién nacido es importante destacar que la madre, a través de la leche materna, es capaz de proveer al recién nacido con anticuerpos y leucocitos. Dentro de estos últimos, el 90% corresponden a neutrófilos y macrófagos mientras el 10% restante son linfocitos.

3.3.2. Envejecimiento y sistema inmune

La senescencia inmunológica se caracteriza por un cambio en el número y competencia de las subpoblaciones linfocitarias y de las citoquinas que ellas producen, como asimismo por un cambio en el repertorio de los linfocitos (menos clones) y cambios en la regulación de la función de los monocitos/macrófagos.

3.3.3. Inmunidad y nutrición

Deficiencia de nutrientes específicos se han correlacionado con alteraciones de estas importantes barreras, entre otras, la deficiencia de vitamina A, riboflavina y piridoxina. La deficiencia proteica se asocia con atrofia generalizada de la piel y, a nivel celular, puede llevar a una depleción del número de linfocitos y de células plasmáticas en el espacio intersticial de las membranas mucosas. Estas células juegan un rol importante en la producción de IgA secretora, la principal inmunoglobulina de las mucosas.

3.3.4. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades crónicas

Es un hecho conocido que después de algunas infecciones, como por ejemplo el sarampión, el paciente que la ha experimentado queda propenso a tener otras infecciones, lo que da cuenta de un deterioro de la respuesta inmune. Este déficit suele ser transitorio en la mayor parte de las patologías infecciosas que lo producen, pero existen otras, como la infección por VIH que conducen a un deterioro progresivo del sistema inmune.

3.3.5. Inmunodeficiencia secundaria a enfermedades infiltrativas y tumorales

Las inmunodeficiencias secundarias (IDS) se refieren a inmunodeficiencias que se desarrollan por una variedad de condiciones patológicas (neoplasias), enfermedades metabólicas, desnutrición, drogas inmunosupresoras o infecciones de las células del sistema inmune (virus de inmunodeficiencia humana).

Por ejemplo, se han observado diferentes alteraciones en las respuestas inmunológicas de pacientes con cáncer, tanto *in vivo* como *in vitro*, dadas por su enfermedad de base, a las cuales se les pueden agregar las propias de las terapias antitumorales correspondientes.

Estos pacientes presentan una mayor susceptibilidad a infecciones, una menor respuesta en pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada y una menor respuesta de inmunoglobulinas específicas ante vacunaciones, entre otros defectos.

3.3.6. Inmunodeficiencia secundaria a terapia inmunosupresora

Las sustancias que actúan sobre las células en división (agentes alquilantes, antiproliferativos, inhibidores del metabolismo de las purinas) y las radiaciones ionizantes disminuyen la producción de linfocitos B y T en el timo y médula ósea.

Los linfocitos T de memoria que circulan en la sangre y la linfa son relativamente insensibles a los tratamientos inmunosupresores, pero pueden destruirse por irradiación linfoide total, drenaje prolongado del conducto torácico, procedimiento de aféresis repetidos e inyecciones de anticuerpos antilinfocitarios, que eliminan una parte de los linfocitos T de memoria.

Algunos inmunosupresores actúan sobre la presentación de antígenos a linfocitos T (IL-10, Deoxispergualina) o sobre las interacciones celulares generadoras de señales coestimuladoras (Anticuerpos anti-CD4, anti-LFA-1). Otros inhiben la transcripción de los genes de citoquinas por las células T activadas (Ciclosporina A, FK506, Glucocorticoides) o bloquean las señales de progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Rapamicina, Anticuerpos anti-CD25). Las moléculas que interfieren con el metabolismo de las purinas inhiben la expansión clonal de los linfocitos T activados (Azatioprina, Mizobirina, Brequinar, Mofetil micofenolato metabolizado al producto activo, el ácido micofenólico en el organismo). Los agentes alquilantes (Mostaza nitrogenada, Ciclofosfamida, Clorambucil) y el Metotrexato también actúan en este estado, pero sin ninguna especificidad frente a los linfocitos T. Además, algunos fármacos actúan sobre la diferenciación de linfocitos T y B activados por antígenos.

LECTURAS SUGERIDAS

Alteraciones cuantitativas

- Ahmed, K., Al-Matrouk, K.A., Martínez, G., Oishi, K., Rotimi, V.O., Nagatake, T., "Increased serum levels of interferon-gamma and interleukin-12 during human brucellosis". *Am J Trop Med Hyg*, 61(3): 425-7, 1999.
- Badley, A.D., Pilon, A.A., Landay, A., Lynch, D.H. "Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis". *Blood*, 96:2951-2964, 2000.
- Burke, F., Relf, M., Negus, R., Balkwill, F. "A cytokine profile of normal and malignant ovary". *Cytokines*, 8(7): 578-585, 1996.
- Dale, D., Person, R., Bolyard, A., Aprikyan, A., Bos, C., Bonilla, M., Boxer, L. Kannourakis, G., Zeidler, C., Welte, K., Horwitz, M. "Mutations in The gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia". *Blood*, 96 (7):2317-22, 2000.
- Denkers, E., Gazzinelli, R. "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during toxoplasma gondii infection". *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4): 569-588, 1998.
- Dornand, J., Lafont, V., Oliaro, J. "Impairment of Intramacrophagic. Brucella suis Multiplication by Human Natural Killer Cells through a Contact-Dependent Mechanism". *Infection and Immunity*, 72(4): 2003-2311, 2004.
- Fernandez-Prada, C., Zelazowska, E., Nikolich, M. "Interactions between Brucella melitensis and Human Phagocytes: Bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis". *Infection and Immunity*, 71(4): 2110-2119, 2003.
- Flo, T.H., Halaas, O., Lien, E., Ryan, L., Teti, G., Golenbock, D.T., Sundan, A., Espevik, T., "Human Toll-Like Receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B Streptococci or lipopolysaccharide". *Journal of Immunology*, 164: 2064-2069, 2000.
- Forestier, C., Moreno, E., Merece, S. "Interaction of Brucella abortus lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes". *Infections and Immunity*, 67(8): 4048-4054, 1999.
- Gamadia, L.E., Remmerswaal, E.B., Weel, J.F., Bemelman, F., van Lier, R.A., Ten Berge, I.J. "Remmerswaal, Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN- producing CD4 T cells in protection against CMV disease". *Blood*, 101: 2686-2692, 2003.
- Kaufmann, S. "Protection against tuberculosis: cytokines, T. Cells, and macrophages". *Ann Rheum Dis*, 61(Suppl II): 1154-1158, 2002.
- Kissel, K., Scheffler, S., Kerowgan, M., Bux, J. "Molecular basis of NB1 (HNA-2^a, CD177) deficiency". *Blood*, 99 (11):4231-3, 2002.
- Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Asakura, Y., Takahasbi, T., Ishikawa, S., Mitamura, H., Ogawa, S. "Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling". *J Am Coll Cardiol*, 16; 39(2): 241-6, 2002.
- Murdoch, C., Finn, A. "Chemokine receptors and their role in inflammation and infections diseases". *Blood*, 95(10): 3032-3043, 2000.
- Negus, R.P., Stamp, G.W., Relf, M.G., Burke, F., Malik, S.T., Bernasconi, S., Allavena, P., Sozani, S., Mantovani, A., Balkwill, F.R. "The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer". *J Clin Invest.*, 95(5): 2391-6, 1995.
- Radstake, T.R., van Lent, P.L., Pesman, G.J., Blom, A.B., Swep, F.G., Ronnelid, H., Adema, G.J., Barrera, P., van den Berg, W.B. "High production of proinflammatory and Th1 Cytokines by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and down regulation upon FcgammaR triggering". *Ann Rheum Dis.*, 63(6): 696-702, 2004.
- Rodenburg R.J.T., Van den Hoogen, F.H.J., Barrera, P., van Venrooij, W.J, van de Putte, L.B.A. "Superinduction of interleukin 8 mRNA in activated monocyte derived macrophage from rheumatoid arthritis patients". *Ann Rheum Dis.*, 58: 648-652, 1999.
- Stenger, S., Modlin, R.L. "T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis". *Curr Opin Microbiol.*, 2(1): 89-93, 1999.
- Trajkovic, V., Singh, G., Singh, B., Singh S., Sharma, P., "Effect of Mycobacterium tuberculosis-specific 10-kilodalton antigen on macrophage release of tumor necrosis alpha and

nitric oxide". *Infect Immun.*, 70(12): 6558-66, 2002.

Van Crevel, R., Ottenhoff, T. "Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*". *Clinical microbiology reviews*, 15: 294-309, 2002.

Alteraciones cualitativas

Cornejo, M. "Inmunodeficiencias primarias" En **Fundamentos de Inmunología básica y clínica**. Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Roseblatt, M., Vergara, U. (eds.), Cap. 30. Editorial Universidad de Talca, 2002

Gallin, J.I., Wright, D.G., Malech, H.L., Davis, J.M., Klempner, M.S., Kirkpatrick, C.H. "Disorders of phagocyte chemotaxis". *Ann Intern Med.* Apr;92(4):520-38, 1980.

Stiehm, R., Ochs, H., Winkelstein, J. **Immunological Disorders in infants and children**. Fifth Edition, Elsevier Saunders, 2004.

Wright, A.H., Douglass, W.A., Taylor, G.M., Lau, Y.L., Higgins, D., Davies, K.A., "Law SK. Molecular characterization of leukocyte adhesion deficiency in six patients". *Eur J Immunol* 25(3):717-22, 1995.

LEUCEMIAS AGUDAS

Miriam Campbell B. y Jorge Alfaro L.

Introducción

Leucemia linfoblástica aguda

1. Introducción

2. Patogénesis

3. Cuadro clínico

- 3.1. Aspectos generales
- 3.2. Órganos comprometidos

4. Laboratorio

5. Diagnóstico diferencial

6. Clasificación

7. Factores pronósticos

8. Tratamiento de LLA

- 8.1. Quimioterapia
- 8.2. Tratamiento de soporte
- 8.3. Resultados de tratamiento de LLA
- 8.4. Complicaciones del tratamiento de la LLA

Leucemias mieloides agudas

1. Introducción

2. Epidemiología

3. Etiología

4. Presentación clínica

5. Clasificación de las LMA

- 5.1. Clasificación según criterios FAB

5.1.1. Leucemia mieloide aguda con mínima diferenciación (M0)

5.1.2. Leucemia mieloide aguda sin maduración (M1)

5.1.3. Leucemia mieloide aguda sin maduración (M2)

5.1.4. Leucemia promielocítica aguda (M3)

5.1.5. Leucemia mielomonocítica aguda (M4)

5.1.6. Leucemia monoblástica aguda (M5)

5.1.7. Eritroleucemia (M6)

5.1.8. Leucemia megacarioblástica aguda (M7)

5.2. Clasificación según criterios OMS

5.2.1. LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes

5.2.2. LMA con displasia multilineal

5.2.3. LMA y síndromes mielodisplásicos relacionados a tratamiento

5.2.4. LMA no categorizada

6. Fisiopatología

6.1. Citogenética de las LMA

6.2. Marcadores moleculares en las LMA

7. Tratamiento

7.1. Quimioterapia

7.1.1. Quimioterapia de inducción

7.1.2. Consolidación/intensificación

7.1.3. Mantención

7.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)

RESUMEN

Las leucemias representan las neoplasias hematológicas más frecuentes. Se trata de enfermedades neoplásicas de causas no bien conocidas que se caracterizan por la transformación de células hematopoyéticas en la médula ósea en células cancerosas. Estas células proliferan e invaden la médula ósea, el tejido linfoide y la sangre periférica pudiendo llegar a otros tejidos. Según el tipo de células que proliferan se distinguen las leucemias linfocíticas y las mieloides.

Según el tipo celular y evolución de la enfermedad se les ha clasificado leucemias agudas y crónicas. En las agudas las células neoplásicas son células inmaduras (blastos), en las crónicas las células invasoras son células de aspecto más maduro.

En este capítulo se describen los dos tipos de leucemias agudas, linfoide (Leucemia linfoblástica aguda, LLA) y Leucemia mieloblástica aguda (LMA). Principalmente se describirán aspectos relativos a la fisiopatología y al diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas son enfermedades hematológicas malignas que resultan de la alteración en la proliferación y diferenciación de un grupo de células inmaduras, de estirpe mieloide o linfoide, que reemplaza las células hematopoyéticas normales de la médula ósea.

Las leucemias agudas linfoides son más frecuentes en los niños y las mieloides en los adultos.

Desde el punto de vista clínico se caracterizan por síndrome anémico, síndrome hemorragiparo asociado a la trombocitopenia y síndrome infeccioso explicado, en parte, por la neutropenia que, generalmente, presentan estos pacientes.

El laboratorio representa un importante apoyo en la etapa de diagnóstico y luego durante el control de la evolución de la enfermedad. En ese sentido los siguientes exámenes son muy importantes: Hemograma, mielograma, inmunofenotipo, cariograma y RT-PCR.

Este capítulo revisa especialmente la fisiopatología y diagnóstico de las leucemias agudas, linfoide y mieloide. En el capítulo 30 se revisan algunos aspectos técnicos, sin entrar en detalles, de los métodos que son utilizados en el estudio de estos pacientes.

No siendo el propósito de este libro, describir los protocolos de tratamiento quimioterápico,

solo se indica el tratamiento en términos generales para cada tipo de leucemia aguda.

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA

Myriam Campbell B.

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica (LLA) es la neoplasia más frecuente de la infancia, constituyendo un 35 a 40 % de los cánceres en la edad pediátrica, con una incidencia anual de 3 a 4 casos por cada 100.000 niños menores de 15 años. Se presenta en todas las edades con un "peak" entre los 4 y 6 años, algo más frecuente en varones. La causa sigue siendo desconocida, si bien en un número muy pequeño de casos se asocia a síndromes genéticos conocidos. Hasta mediados de los años 60 era una enfermedad fatal, 80% de los pacientes fallecían antes de 6 meses. Con la mejoría en el diagnóstico y en la calidad del tratamiento se ha logrado curación en más del 70% de los casos. Se espera a futuro un logro mayor, en especial aplicando terapias adaptadas según el riesgo, tanto para limitar la toxicidad en el grupo de bajo riesgo como para optimizar los resultados en los pacientes de riesgo mayor.

2. PATOGÉNESIS

En la LLA una célula progenitora linfóide sufre una alteración genética adquirida cuya consecuencia es una expansión clonal con detención de la diferenciación celular, proliferación, crecimiento descontrolado e invasión de la médula ósea; desde allí se disemina a sangre periférica, bazo, ganglios y el resto de los tejidos, haciéndose clínicamente detectable. Esta célula maligna o blasto leucémico comparte muchas de las características de los progenitores linfóides de modo que la mayoría de ellos tiene un fenotipo que corresponde a la etapa de diferenciación en la que se detuvo el desarrollo.

La etiología de esta alteración genética es aún desconocida y se comprende poco la compleja relación entre los factores genéticos, ambientales e inmunológicos que dan origen a la leucemia.

Hay factores clásicamente asociados a la patogénesis de la leucemia como la exposición a radiación ionizante, algunos químicos (benceno, pesticidas) o agentes alquilantes pero excepcionalmente se encuentran como antecedente en el paciente pediátrico. Del mismo modo hay condiciones genéticas que tienen un mayor riesgo de presentar leucemia como trisomía 21 (1 cada 95), anemia de Fanconi (1 cada 12), síndrome de Bloom (1 cada 8), agammaglobulinemia congénita, enfermedad de Kostman. Estos cuadros son muy poco frecuentes, a excepción de la trisomía 21, de modo que la mayoría de los niños que presentan leucemia son sanos previamente.

En un lactante gemelo con leucemia, ésta puede presentarse también en el segundo gemelo, y el estudio de esta situación ha dado importante información para explicar la patogénesis de la LLA. En ellos es muy frecuente que el blasto leucémico tenga una translocación que compromete el gen MLL ubicado en el cromosoma 11 región 23, el que se fusiona en especial con el gen AF4 presente en el cromosoma 4. Se ha logrado identificar en pares de gemelos un reordenamiento idéntico de MLL, siendo éste adquirido (sólo presente en los blastos y desaparece en la remisión). El desarrollo de la leucemia a pocos meses de nacer sugiere entonces que esta anomalía se habría producido *in útero*. La translocación más frecuente en LLA infantil es la t(12:21) con el gen de fusión TEL/AML1, se observa en el 20%

de los casos, con edades entre 2 a 5 años. Estudiando muestras de sangre de talón del período de recién nacidos de estos niños (en cartas de Gutrie) se demostró presencia de este gen de fusión, sugiriendo que se requiere un segundo evento leucemogénico postnatal para el desarrollo de la LLA. Al estudiar recién nacidos sanos se ha demostrado el gen de fusión TEL/AML1 en el 1% de ellos lo que es una frecuencia muy alta por lo que es indudable que en muchos casos no se produce este segundo evento. Así, aunque algunos mecanismos se han aclarado todavía hay muchas preguntas sin respuesta.

3. CUADRO CLÍNICO

3.1. Aspectos generales

Los pacientes pueden presentar un cuadro desde casi asintomático hasta muy grave; en la mayoría la historia es más bien de corta evolución, días o semanas (rara vez llega a meses) Los signos y síntomas reflejan la invasión medular y extramedular, especialmente importantes son las infiltraciones a nivel de hígado, bazo y ganglios; pero también los hay derivados de los trastornos funcionales del metabolismo patológico de los blastos. Los síntomas y signos más frecuentes pueden agruparse en 4 síndromes: anémico, hemorrágico, febril y tumoral:

Síndrome anémico. La proliferación de los blastos en la cavidad medular provoca desplazamiento del tejido normal y un trastorno del microambiente medular. Esto causa una anemia progresiva, sin caracteres regenerativos, es decir no se observan reticulocitos ni policromasia. La palidez de piel y mucosas es progresiva. Aparecen posteriormente: fatigabilidad, disnea de esfuerzo, cefalea, irritabilidad o somnolencia, taquicardia, soplos y, ocasionalmente, insuficiencia cardíaca.

Síndrome hemorrágico. Su patogenia radica principalmente en la acentuada disminución o virtual desaparición de las plaquetas, por destrucción y desplazamiento de los megacariocitos. Las hemorragias pueden presentarse en los sitios más diversos. Destacan las de piel y mucosas en forma de púrpura petequeal y equimótica, cuya intensidad varía desde algunas petequias irregularmente distribuidas hasta extensas hemorragias con o sin antecedentes de traumatismos. La epistaxis es frecuente y debido a su abundancia y

recurrencia suele ser el primer síntoma que motiva la consulta. Otros sitios pueden ser la retina y cerebromeningeas; la hemorragia digestiva, genitourinaria o pulmonar se ve rara vez al comienzo de la enfermedad.

Síndrome febril. La infiltración de la médula ósea produce neutropenia periférica con cifras en general inferiores a 500 granulocitos/ μL , lo que condiciona mayor susceptibilidad a infecciones. En un tercio de los pacientes es el cuadro febril de algunos días de evolución, en general asociado a otros síntomas (tos, odinofagia, dolor abdominal, etc.), lo que motiva la consulta y realización de exámenes. En el hemograma se encuentra neutropenia, que puede estar asociada con anemia, por lo que se plantea el diagnóstico de leucemia. Sólo en la mitad de los casos se describen blastos por lo que no hay que esperar su presencia para sospechar el diagnóstico. El síndrome febril prolongado con hemogramas repetidamente normales es muy poco probable que sea secundario a leucemia.

Síndrome tumoral. La patogenia está dada por la infiltración blástica de los diferentes órganos. Desde el punto de vista del diagnóstico son importantes las del hígado, bazo, ganglios y gónadas. La magnitud de la hepatomegalia es variable, desde palpaciones a nivel del reborde costal derecho, hasta grandes hepatomegalias que sobrepasan la línea media transversal a nivel del ombligo. La consistencia es dura, el borde neto y generalmente no es sensible. La esplenomegalia es también de tamaño variable llegando a veces a ocupar la fosa ilíaca izquierda. La mayoría de las veces se acompaña de hepatomegalia, siendo menos frecuente el crecimiento solitario del bazo. Los ganglios linfáticos también participan de los procesos infiltrativos, aunque no son frecuentes las grandes adenopatías periféricas. En general no tienen periadenitis y sólo son dolorosos cuando son tributarios de zonas infectadas. Algunos pacientes tienen ensanchamiento del mediastino generalmente dado por ganglios infiltrados o por el timo. A nivel de faringe y amígdala, el proceso infiltrativo puede tomar caracteres hiperplásticos con formaciones poliposas o bien ser del tipo necrótico con presencia de úlceras, hemorragia e infección.

3.2. Órganos comprometidos

Por su capacidad de diseminación, la leucemia puede comprometer cualquier órgano o sistema siendo los más relevantes los siguientes:

Compromiso osteoarticular. Es muy importante por su frecuencia, entre 25 a 30% de los niños se quejan de dolores osteoarticulares en los inicios del cuadro leucémico, generalmente de extremidades inferiores, nocturno y puede interrumpir el sueño. Los analgésicos producen alivio incompleto. El dolor puede estar originado por infiltración leucémica del periostio, infarto óseo o expansión de la cavidad medular por las células leucémicas. En la radiografía puede haber diversos tipos de lesiones osteoarticulares: infiltración y elevación periosteal, neoformación de hueso subperióstico, bandas transversales metafisarias radiolúcidas o radioopacas. Estas bandas parecen corresponder a períodos de detención del crecimiento óseo durante las fases activas de la enfermedad. Lesiones osteolíticas y fracturas patológicas se ven con alguna frecuencia, la mayor parte de las veces asintomáticas.

Compromiso de sistema nervioso central. Al diagnóstico ocurre en menos del 5% de los casos. El paciente puede estar asintomático y ser un hallazgo en el estudio del líquido cefalorraquídeo, o bien tener síntomas y signos secundarios a hipertensión endocraneana, tales como vómitos, cefalea, irritabilidad, rigidez de nuca, papiledema, y compromiso de nervios craneales, en especial tercero, cuarto y sexto par. También se puede presentar hemorragia como consecuencia de la trombocitopenia o por leucostasia en vasos sanguíneos cerebrales lo que lleva a la formación de trombos de blastos seguido de infarto y hemorragia. Otros síntomas menos frecuentes están dados por la infiltración del parénquima cerebral: hemiparesia, ataxia, hipotonía, hiperreflexia. Por compromiso de la médula espinal puede haber dolor dorsal y en extremidades inferiores con dificultad en la marcha. Otra manifestación de leucemia de SNC, más frecuente en la recaída, es el síndrome de obesidad hipotalámico, en el que por destrucción del núcleo ventromedial del hipotálamo, donde se encuentra el centro de la saciedad, se produce hiperfagia, sobrepeso y diabetes insípida.

Compromiso genitourinario. El compromiso de testículo se presenta en cerca de un 10% de los pacientes, generalmente como aumento de volumen uni o bilateral, no doloroso; el compromiso de ovario es raro. La infiltración del riñón es poco frecuente, en general asintomática, con ecotomografía es más fácil detectarla, pero no todo aumento de volumen se debe a leucemia; otros procesos son:

hemorragia, infección e hiperplasia tubular proximal. Ocasionalmente puede haber hipertensión, hematuria o insuficiencia renal.

Compromiso cutáneo. La infiltración leucémica de la piel es un hallazgo frecuente en lactantes, puede ser desde nodular hasta maculopapulosa, de color rojo-violáceo que se blanquea con la presión, por estar constituida en su mayor parte por capilares dilatados. Es asintomática y se llama leucemide.

4. LABORATORIO

Son comunes la anemia, neutropenia y trombocitopenia, sin embargo puede haber hemograma normal al diagnóstico (especialmente en los pacientes con dolor óseo). La anemia, con hemoglobina menor de 10 g/dL, se observa en más del 80% de los casos, normocítica y normocrómica con recuento bajo de reticulocitos. Los leucocitos pueden variar desde 100 a más de 1.000.000/ μ L (15 a 20% tiene más de 50.000/ μ L), generalmente asociado a neutropenia de grado variable (30% tiene menos de 500/ μ L). El recuento de plaquetas varía desde normal hasta casi ausentes, en 70% hay trombopenia menor de 100.000/ μ L, la severidad de la hemorragia se relaciona con el grado de trombocitopenia, siendo raro un sangramiento severo aún con plaquetas menores de 20.000/ μ L, a menos que haya fiebre e infección asociada. Tanto la anemia como la neutropenia se pueden presentar en forma aislada, no así la trombocitopenia. La presencia de blastos se observa en un 65- 70% de los casos. El diagnóstico definitivo de leucemia se hace con el mielograma. En éste se observa celularidad normal a aumentada, aunque también puede ser hipocelular, con muestra homogénea, megacariocitos disminuidos o ausentes y la celularidad está dada por blastos, generalmente 80 a 100%. Los linfoblastos son células inmaduras, con cromatina nuclear difusa, pueden tener uno o varios nucléolos, citoplasma basófilo, sin gránulos, a veces con vacuolas. En una médula normal se puede encontrar < 5% de células inmaduras; para diagnosticar leucemia se requiere más de 25%. Con la tinción de May-Grunwald -Giemsa o Wright, en el 95% de los casos es posible diagnosticar si la leucemia es de estirpe linfoblástica, sin embargo es muy importante realizar, en la muestra de médula ósea, estudios citoquímicos, inmunológicos, citogenéticos y moleculares que permiten una clasificación más completa del tipo de leucemia, lo que es fundamental para realizar un

tratamiento adecuado. En ocasiones la aspiración de médula ósea puede ser difícil de obtener, generalmente por alta adhesividad de los blastos o por fibrosis y en estos casos se requiere biopsia de médula ósea. La distinción entre leucemia linfoblástica con compromiso de ganglios y linfoma con invasión medular es arbitraria llamándola leucemia cuando tiene más de 25% de blastos en médula ósea y linfoma si el porcentaje es menor.

Otras alteraciones de laboratorio son secundarias al volumen de células leucémicas y la destrucción de ellas, como el aumento de ácido úrico sérico que refleja un aumento del catabolismo de purinas, lo que puede provocar nefropatía con consiguiente insuficiencia renal. Se observa al iniciar tratamiento en pacientes con gran volumen tumoral (hiperleucocitosis, gran visceromegalia) y debe usarse medidas de prevención de esta complicación (hidratación, alcalinización, inhibidores de xantina oxidasa, etc.). Por la lisis tumoral puede haber elevación del fósforo sérico con hipocalcemia secundaria. Por la infiltración ósea se puede presentar hipercalcemia. La lisis de blastos, la hematopoyesis inefectiva y el compromiso hepático se asocian con elevación de la deshidrogenasa láctica sérica.

En la radiografía de tórax se puede encontrar ensanchamiento del mediastino anterior, en especial en la leucemia de estirpe T.

Los trastornos de la coagulación son raros y se ven más bien asociados a infección.

5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Una historia y examen físico detallado, junto al hemograma y mielograma permite hacer el diagnóstico de LLA en más del 95% de los casos. Sin embargo, en algunos casos se debe analizar otros diagnósticos:

Púrpura trombocitopénico inmune. El PTI es la causa más frecuente de púrpura petequiral en los niños; pueden tener antecedente de infección viral previa. En general los leucocitos son normales y no hay evidencia de anemia, a menos que se asocie a sangramientos y en estos casos es regenerativa con reticulocitosis. No hay visceromegalia. En el hemograma se encuentran plaquetas grandes (jóvenes). La médula ósea muestra hematopoyesis normal con megacariocitos normales o aumentados.

Anemia aplásica. Estos pacientes, además de

la anemia arregenerativa, pueden tener hemorragias por la trombocitopenia y fiebre e infección asociados a la neutropenia. Rara vez tienen adenopatías y no presentan visceromegalia. El hemograma tiene pancitopenia persistiendo casi exclusivamente linfocitos, lo que puede hacer pensar en leucemia. El mielograma es muy hipocelular y no se observan blastos.

Síndrome mielodisplástico (SMD). Estos pacientes puede tener iguales síntomas con pancitopenia periférica, el mielograma generalmente es normo o hipercelular con signos de alteración de la maduración celular (displasia), es poco frecuente encontrar blastos y cuando están presentes son menos del 25%. Este síndrome comprende 4 cuadros: Anemia refractaria, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación y leucemia mielomonocítica juvenil. En los niños son más frecuentes los 2 primeros. Un 30% de los pacientes con SMD pueden presentar leucemia algunos meses después del diagnóstico.

Artritis reumatoide juvenil. Cerca de un 30% de los pacientes al inicio de la leucemia pueden tener dolores osteoarticulares, generalmente artralgiás pero a veces hay artritis, y pueden presentar fiebre, palidez, esplenomegalia. En el hemograma puede haber anemia normocítica leve y leucocitosis. Si no hay algún test claramente positivo para artritis reumatoide debe realizarse mielograma para descartar leucemia (siempre antes de iniciar tratamiento con corticoides).

Mononucleosis infecciosa y otras infecciones virales. Los pacientes pueden tener linfadenopatía generalizada, esplenomegalia, rash cutáneo, fiebre y linfocitosis. El diagnóstico diferencial se hace más difícil si está complicado con púrpura trombopénico o anemia hemolítica. En el hemograma la observación cuidadosa de los linfocitos jóvenes de la mononucleosis y enfermedades virales permite diferenciar de los blastos. Es útil la presencia de test positivo para detección de mononucleosis. En la mayoría de los casos se establece el diagnóstico con estos elementos pero ocasionalmente se requiere mielograma el que es normocelular y sin blastos.

Reacción leucemoide y neutropenia asociada a sepsis. Algunas infecciones, generalmente bacterianas y severas, pueden asociarse con elevado recuento de granulocitos en sangre periférica ($> 50.000/\mu\text{L}$) y en el recuento diferencial presentan células inmaduras, pero

siempre acompañado de formas maduras y con signos tóxicos y degenerativos (granulación patológica, vacuolas, cuerpos de Doehle, etc.). En general el diagnóstico se hace por una buena evaluación del hemograma en el que no hay hiato leucémico (células maduras y blastos sin formas intermedias), con hemoglobina y plaquetas normales. Muy rara vez se requiere mielograma el que muestra hiperplasia mieloide con maduración normal. La sepsis bacteriana también puede provocar neutropenia secundaria al consumo y detención de producción. El mielograma muestra una detención de la maduración en los precursores de los granulocitos y puede ser difícil diferenciar de algunos tipos de leucemia mieloide.

Neuroblastoma. El modo de presentación puede ser similar a leucemia y los neuroblastos pueden semejar linfoblastos. Cuando hay infiltración de la médula generalmente es en acúmulos o rosetas en cambio en la leucemia es difusa. El diagnóstico se facilita con los estudios de imágenes, por la aparición de tumor mediastínico o suprarrenal y con la detección de catecolaminas aumentadas.

6. CLASIFICACIÓN

En el niño el 97% de las leucemias son agudas y el 3% crónicas. La leucemia congénita es la que se presenta en las primeras 4 semanas de vida, es muy poco frecuente y generalmente de estirpe mieloide.

La LLA infantil abarca varios subgrupos que se diferencian por la clínica y su diferente biología. Se pueden clasificar por diferentes métodos, tales como morfología, citoquímica, inmunofenotipo, citogenética y análisis molecular, siendo todas estas técnicas complementarias.

Las leucemias, según las características morfológicas del blasto, tanto del núcleo (tamaño, nucléolo) como del citoplasma (cantidad, basofilia, presencia de gránulos) y utilizando la clasificación descrita por un comité de citólogos Franco-Américo-Británico (FAB) se diferencian en linfoblásticas (80%), mieloblásticas (15%) e indiferenciadas (5%). En las linfoblásticas se describen 3 subgrupos: **L1**, la más común en el niño (80%), con una célula pequeña, con núcleo regular sin nucléolo y poco citoplasma, **L2** son blastos de mayor tamaño, con nucléolos y abundante citoplasma, **L3** son células grandes con gran basofilia citoplasmática y vacuolas, es la menos frecuente (2-3%).

La importancia de las tinciones citoquímicas tales como PAS, fosfatasa ácida y esterasas ha sido sobrepasada por las técnicas inmunológicas, a excepción de la tinción de mieloperoxidasa que sigue utilizándose para identificar leucemia de estirpe mieloide (ver capítulo 30).

Los linfoblastos tienen reordenamientos de las inmunoglobulinas o de los genes receptores de las células T y expresan antígenos que corresponden al proceso normal de desarrollo de los linfocitos T y B, también pueden tener una expresión aberrante de ellos dando origen a fenotipos diferentes de los progenitores normales. Utilizando anticuerpos monoclonales, que reconocen determinados grupos moleculares de los antígenos intracelulares o de la membrana superficial se puede identificar las diferentes etapas de diferenciación celular y de cuál estirpe es el linfoblasto. En el niño el 80-85% de las LLA son de precursores B, que según su maduración incluye los grupos pro B, común, pre B y B madura. El 15 a 20% de las LLA son de estirpe T, con los subgrupos pro T, pre T, T intermedia y T madura. Esta identificación es fundamental para dar el tratamiento adecuado a cada grupo.

El estudio citogenético de la LLA actualmente detecta anomalías en el 90% de los casos. El uso de técnicas moleculares incluyendo la reacción de polimerasa en cadena reversa (RT-PCR), análisis de Southern blot e hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH) ha mejorado la calidad de este estudio y permite detectar translocaciones no identificables en el cariotipo y también diferenciar lesiones que citogenéticamente parecen iguales pero son diferentes a nivel molecular (ver capítulo 30). Las alteraciones pueden ser en el número y en la estructura de los cromosomas, se catalogan como hiperdiploide con más de 50 cromosomas, hipodiploide con menos de 46 cromosomas y pseudodiploide con 46 cromosomas con cambios estructurales de ellos. Algunas alteraciones se asocian a evolución

desfavorable por lo que es importante detectarlas para adecuar el tratamiento.

7. FACTORES PRONÓSTICOS

A medida que ha aumentado la intensidad de los tratamientos y la posibilidad de curación es más del 75%, ha cambiado la importancia de los factores pronósticos. Indudablemente hoy la calidad del tratamiento es uno de los aspectos más relevantes. Continúa siendo relevante el recuento inicial de leucocitos, con mayor probabilidad de curación si el recuento inicial es bajo 20.000 leucocitos/ μ L. La edad entre 2 y 10 años es también favorable, en cambio los lactantes menores de un año tienen peor pronóstico. Para algunos grupos de estudio el sexo masculino es desfavorable. En los últimos años los investigadores del grupo alemán Berlin Frankfurt Munster (BFM) y otros han demostrado la importancia de la respuesta inicial al tratamiento como una medida de la sensibilidad a los medicamentos y que se relaciona estrechamente con el pronóstico. Los análisis moleculares parecen prometedores no solo para el diagnóstico sino también para monitorear la respuesta a tratamiento. Así se está investigando intensamente para detectar enfermedad residual midiendo los productos de fusión de genes y los inmunofenotipos aberrantes en diferentes momentos del tratamiento. Estudios recientes muestran que tanto la presencia como el nivel de enfermedad residual pueden correlacionarse con el resultado del tratamiento. Las anomalías cromosómicas como t(9;22), t(4;11) y t(1;19) se relacionan con mal pronóstico en cambio la hiperdiploidía es favorable, ya que estos blastos acumulan más metotrexato y tienen mayor propensión a la apoptosis. Según el fenotipo las características del blasto también son diferentes y esto influye en el tipo de tratamiento que se debe usar, por ejemplo los blastos T requieren de una dosis mayor de metotrexato para lograr acumular más poliglutamatos y favorecer la apoptosis (tabla 12-LLA-1).

Tabla 12-LLA-1. Características clínicas y biológicas de LLA en niños

Estirpe blasto	Citogenética/ Molecular	Frecuencia (%)	Características
Linfoblasto B	Hiperdiploide	25	Edad < 10 años, pronóstico favorable
Linfoblasto B	TEL /AML1	25	Edad 2 a 8 años, pronóstico favorable
Linfoblasto B	t(9;22)	3	Edad mayor, leucocitosis, pronóstico desfavorable
B madura	t(8;14) ,otras 8q24	2-3	Mayor frecuencia: varones, enfermedad extramedular, hiperuricemia. Buen pronóstico con tratamiento intenso y de corta duración.
Pro B	t(4;11) /MLL Reordenado	4	La mayoría lactantes, con compromiso de SNC, leucocitosis, visceromegalia, pronóstico desfavorable
Pre B	t(1;19)/E2A-PBX1	5	Leucocitosis, compromiso de SNC, pronóstico menos favorable
Linfoblasto T	14q11, 7q35 ,7p14	10	Varones, hiperleucocitosis, masa mediastínica, compromiso de SNC, pronóstico ha mejorado con uso de metotrexato en alta dosis

8. TRATAMIENTO DE LLA

Desde los años 70 en adelante gracias al mayor conocimiento de la enfermedad, elaboración de nuevos fármacos, desarrollo de la terapia de apoyo y formación de los grupos de estudio cooperativos con utilización de protocolos de tratamiento, más del 70% de los pacientes pueden curar, llegando a ser adultos sanos y muchos de ellos con hijos también sanos. Por esto se debe ser optimista al enfrentar a la familia del paciente leucémico, con lo que se logra mayor cooperación del niño y del núcleo familiar en la realización del tratamiento.

El tratamiento tiene dos pilares, la **quimioterapia**, cuyo objetivo es hacer desaparecer el clon leucémico y la **terapia de soporte** que incluye el control de las complicaciones al diagnóstico y durante la quimioterapia.

Es fundamental que el niño sea atendido por un equipo pediátrico multiprofesional y capacitado para así ofrecerle las mejores posibilidades de curación.

8.1. Quimioterapia

El propósito de la terapia es curar a los niños, erradicando las células leucémicas y sus

progenitores. Se considera curado al paciente que se mantiene en remisión por más de 5 años. El tratamiento incluye cuatro fases con un objetivo específico para cada una: inducción de remisión, intensificación o consolidación, tratamiento del sistema nervioso central y terapia de continuación:

a) Inducción de remisión. Se considera remisión completa cuando la celularidad de la médula ósea es normal (< de 5% de blastos), el examen físico y los valores hematológicos son normales. Para inducir una remisión clínica se debe erradicar el 99% de las células leucémicas. Esto se logra en el 85% de los casos si se usan 2 drogas (Vincristina y Prednisona) y es > 97% si se agregan 2 drogas (Asparginasa y Antraciclina), en un período de 4 semanas. El 1 - 2 % de los pacientes no remiten, ya sea porque fallecen antes por infección o leucemia o bien porque son resistentes al tratamiento.

b) Intensificación. El objetivo es reducir la masa de células leucémicas antes que aparezca resistencia a drogas. Se utiliza inmediatamente después de obtenida la remisión, en general combina varias drogas algo diferentes a las usadas en la inducción. Tiene una duración variable de 4 a 6 meses. Inicialmente se usó sólo en pacientes con mal pronóstico pero Riehm y colaboradores del grupo BFM

demonstraron la importancia de esta fase para todos los pacientes, lo que fue confirmado, posteriormente, por el grupo de estudio norteamericano Cancer Children (CCG) y otros.

c) Tratamiento del SNC. A comienzo de los años 70, cuando se logró obtener remisiones prolongadas en el tratamiento de los niños con LLA, se observó que hasta el 50% presentó recaída en SNC. Por esto se desarrollaron diferentes formas de tratamiento “profiláctico” usando quimioterapia intratecal con Metotrexato (Mtx) y radioterapia craneoespinal y más tarde sólo craneal. La introducción de esta fase del tratamiento fue un gran avance terapéutico y actualmente se inicia en la inducción, con un número variable de dosis de Mtx intratecal, (en algunos estudios asociado a corticoides y Citarabina) y luego se completa en la intensificación con dosis altas de quimioterapia sistémica (Mtx +/-Citarabina) junto con varias dosis de quimioterapia intratecal, con o sin radioterapia craneal. Por los efectos adversos tardíos, asociados a radioterapia, se ha disminuido progresivamente la dosis desde 24 a 18 y luego a 12 Gy. Actualmente sólo se irradia un grupo seleccionado de pacientes (15 a 20%), sin que por esto haya aumentado la frecuencia de recaída en SNC. (< 5%). Esto ha sido posible gracias a los intensos tratamientos actuales.

d) Terapia de continuación. En los primeros pacientes que lograron remisión no se usó otro tratamiento y todos recayeron en 2 a 4 meses, por lo que se diseñó esta fase del tratamiento. Su objetivo es destruir los blastos leucémicos remanentes, y sus progenitores, afectando en menor medida a la médula ósea y preservando la respuesta inmune del paciente. Lo más usado es Mtx semanal con 6 Mercaptopurina diaria, en general por vía oral. Los pacientes con LLA de estirpe B que logran una mayor cantidad de poliglutamatos de Mtx en los linfoblastos, tienen mayor posibilidad de curación. Esto también sucede en los linfoblastos hiperdiploides y podría ser la causa del mejor pronóstico que tienen los niños con esta alteración citogenética. La adición de pulsos (Vincristina + Prednisona y otros) ha sido usado por muchos grupos, con algunos datos que sugieren su utilidad, pero aún sin demostrarla objetivamente. En los pacientes con mayor riesgo de recaída se ha usado Mtx en dosis mayores, en infusión, o bien uso repetido de drogas usadas en la inducción (Asparinas) o pares de drogas rotadas semanal o mensualmente. El tiempo óptimo que se debe tratar una LLA es entre

dos a dos años y medio.

El trasplante de células hematopoyéticas se utiliza en un grupo seleccionado de pacientes con LLA que tienen un mayor riesgo de fracaso con la terapia habitual (10 -15%) como por ejemplo los pacientes que remiten tardíamente o tienen t (9:22) entre otros (ver capítulo 16).

8.2. Tratamiento de soporte

La mayoría de las complicaciones al diagnóstico están relacionadas con los trastornos metabólicos y con la infiltración leucémica de los órganos no hematopoyéticos. También es importante el control de las infecciones, no sólo al diagnóstico sino también durante el tratamiento quimioterápico, y de las hemorragias cuando éstas se presentan.

a) Complicaciones metabólicas: son secundarias a la lisis de blastos, espontánea o inducida por la quimioterapia: hiperuricemia, hiperkalemia, hiperfosfatemia asociado a hipocalcemia, hiperfosfaturia. El aumento de la lisis celular genera liberación de DNA con aumento de catabolismo de las purinas en el hígado. Se produce una hiperuricemia con aumento de la excreción renal del ácido úrico lo que puede precipitar en los túbulos colectores renales y uréteres y producir insuficiencia renal aguda. Se evita esta complicación con hidratación, alcalinizada con bicarbonato, abundante y cuidadosa y con el uso de alopurinol (10 mg/k/día) ambos se usan antes de iniciar la quimioterapia y es de especial importancia en los pacientes con leucocitos sobre 100.000/ μ L ya que este grupo es el que tiene mayor riesgo de hiperuricemia.

b) Hiperleucocitosis. En los niños con más de 100.000 leucocitos/ μ L, los blastos pueden obstruir los vasos de microcirculación impidiendo el flujo sanguíneo, o que puede producir hipoxemia local, daño endotelial, infarto y hemorragia. Se puede afectar cualquier órgano pero generalmente los que dan sintomatología clínica son el sistema nervioso central y el pulmón. El tratamiento de la hiperleucocitosis consiste en instituir rápidamente la terapia que lleve a citorreducción. Si esto no se puede hacer por las complicaciones asociadas o si el paciente no responde rápido debe hacerse leucoféresis (o exsanguineotransfusión) o radioterapia de cráneo de inmediato. En el paciente con hiperleucocitosis hay que ser muy cauto con la transfusión de concentrados de glóbulos rojos,

para no aumentar la viscosidad sanguínea y agravar los síntomas.

c) Infiltración de órganos. La más severa aunque poco frecuente es la infiltración de estructuras mediastínicas que puede producir compresión traqueobronquial o síndrome de vena cava superior y llevar rápidamente a la muerte. El tratamiento es iniciar de inmediato la quimioterapia (generalmente con dosis bajas de corticoides) y si no responde se usa radioterapia local. La infiltración renal puede llevar a insuficiencia renal y la leucostasia pulmonar puede provocar distress respiratorio, en ambas situaciones se debe iniciar tratamiento citorreductor de inmediato.

d) Infección. Todo paciente leucémico con menos de 500 neutrófilos/ μL y fiebre debe considerarse séptico, aunque no tenga otros signos o síntomas. Esto es válido al diagnóstico y durante la quimioterapia. Se debe tomar cultivos y comenzar de inmediato tratamiento antibiótico de amplio espectro. Esta conducta agresiva ha evitado la alta mortalidad que se observaba cuando no se realizaba tratamiento “empírico” y es el estándar actual en todos los grupos de trabajo. Las drogas específicas a usar dependen de las instituciones y se basa en los patrones de resistencia antibiótica local. Generalmente incluye un agente anti-Gram negativo (betalactámico) + aminoglicósido +/- agente anti-Gram positivo, todos por vía parenteral. Si hay mucositis severa o esofagitis se puede asociar acyclovir; si el paciente presenta gingivitis necrotizante o infección perianal o signos de enteropatía neutropénica debe agregarse metronidazol o clindamicina. Se espera que el paciente se haga afebril en 72 hrs. y si esto no ocurre o si se agrava (ej: shock séptico) se debe adecuar el tratamiento ya sea agregando agente anti-Gram (+) o cambiando el aminoglicósido. Si a los 7 días el paciente continúa febril se debe suponer infectado por hongos, especialmente *Candida Albicans* o *Aspergillus*, y se debe agregar un antifúngico. El más efectivo para la enfermedad invasiva es la anfotericina B y debe usarse aunque no se identifique el hongo en los cultivos. La gravedad que pueden tener las infecciones bacterianas, y la alta mortalidad que se asoció a ellas en el pasado, llevó a desarrollar tratamientos antibióticos profilácticos con antibióticos orales no absorbibles como gentamicina, colistin, nistatina que son utilizados por la mayoría de los grupos. El riesgo de infección por *Pneumocystis carinii* en los niños con LLA es elevado cuando se realiza tratamiento

inmunosupresor intensivo y prolongado, como los que se realizan actualmente, produciendo neumonitis intersticial severa y a menudo fatal; esto llevó al uso profiláctico de sulfametoxazol-trimetoprim con lo que hoy este riesgo es mínimo. Además, se demostró que los pacientes que lo reciben tienen una reducción de la frecuencia de infecciones comparado con controles no tratados y rara vez tienen efectos adversos, por esto su uso está muy difundido. Entre las infecciones virales la varicela puede ser fatal en un niño con LLA, ya que con alta frecuencia se complica con neumonitis, hepatitis o encefalitis. Todo niño con LLA que presente varicela se debe tratar con acyclovir parenteral, con lo que se ha reducido la frecuencia de casos severos.

e) Trastornos hemorrágicos. En la LLA lo más frecuente al diagnóstico es la trombocitopenia y cuando se asocia a sangramiento, especialmente de mucosas, debe hacerse transfusión de plaquetas (una unidad cada 10 kilos de peso), con una frecuencia que dependerá de la severidad del sangramiento. Cuando hay sepsis puede haber coagulación intravascular, aunque es poco frecuente. Durante el tratamiento, en relación al uso de Asparaginasa, puede presentarse una coagulopatía por inhibición de la síntesis de proteínas que intervienen en la coagulación especialmente antitrombina III, proteína C y proteína S; se asocia a cuadros trombohemorrágicos en sistema nervioso central o periféricos. Cuando se ha instalado el cuadro, el tratamiento se realiza con transfusión de plasma fresco.

8.3. Resultados de tratamiento de LLA

Actualmente hay tratamientos muy efectivos para LLA los que logran una curación en más del 70% de los pacientes. Permanentemente los grupos tratan de identificar a los pacientes que requieren menos tratamiento y a los con mayor riesgo de recaída, analizando los factores pronósticos (que a su vez son dependientes del tratamiento usado) con el objetivo de dar a cada niño la mejor terapia con la menor toxicidad asociada (terapia de acuerdo al riesgo). En la tabla 12-LLA-2 se encuentran los resultados de los grupos más reconocidos. Los protocolos del grupo BFM han sido unos de los más ampliamente usados. En los países en desarrollo también se usan tratamientos intensos, en general basados en los grupos ya descritos.

Tabla 12-LLA-2. Resultados de tratamiento de LLA

Grupo	Años del estudio	Pacientes n	SLE a 5 años (e.s.) %
AIEOP	1991-95	1194	71 (1)
BFM 90	1990-95	2178	78 (1)
CCG 1800	1989-95	5121	75 (1)
COALL 92	1992-97	538	77 (2)
DFCI 91-01	1991-95	377	83 (2)
NOPHO III	1992-98	1143	78 (1)
SJCRH XIIIB	1994-98	247	81 (3)

SLE, supervivencia libre de enfermedad

El grupo nacional chileno (PINDA) ha realizado 3 protocolos consecutivos basados en los estudios del grupo BFM. El protocolo LLA PINDA 87, con 425 pacientes, tiene una supervivencia libre de eventos (SLE) a 5 años de 60%, el LLA PINDA 92 con 407 pacientes tiene SLE a 5 años de 67%, el protocolo LLA PINDA 96 con 723 pacientes a 5 años tiene una SLE de 73%. El protocolo actual se inició a fines del año 2002.

8.4. Complicaciones del tratamiento de la LLA

a) Infección. Es la complicación más frecuente y se asocia a la neutropenia (descrita antes).

b) Recaída. Es la complicación más temida y se presenta en el 25 a 30% de los pacientes. Consiste en una reaparición de la infiltración leucémica (medular o extramedular). La más frecuente es en médula ósea seguida por SNC y testículo. La aparición de ésta ensombrece el pronóstico. La recaída puede ser un hallazgo en exámenes de rutina o bien presentarse bruscamente con síntomas clínicos iguales a los que se observan al diagnóstico inicial.

Los pacientes que recaen deben recibir nuevamente quimioterapia sistémica y terapia específica de acuerdo al sitio y momento de la recaída. Los pacientes que recaen 6 meses después de terminado el tratamiento pueden tener nuevamente remisiones prolongadas con una posibilidad de curar de alrededor de 30%. En cambio los que recaen intratratamiento, en especial médula ósea en el primer año, aunque remitan tienen baja posibilidad de curar con la quimioterapia, por lo que en ellos se utiliza el trasplante de células hematopoyéticas.

c) Efectos tardíos del tratamiento. Con el gran

número de niños curados de LLA se ha hecho evidente que hay efectos tardíos secundarios a la quimioterapia y radioterapia. El reconocerlos ha sido muy importante para adecuar los tratamientos en uso tratando de evitar dicha toxicidad y también para cuidar la calidad de vida de los pacientes que ya la presentan:

Secuela en SNC. Los pacientes que reciben radioterapia de cráneo en dosis de 24 Gy o más, pueden presentar atrofia cerebral, dilatación de ventrículos y calcificaciones, demostrado en los estudios neurorradiológicos. Sin embargo, es muy raro el déficit neurológico. En cambio tienen una alta incidencia de déficit cognitivos que se traducen en trastornos de aprendizaje, especialmente si recibieron la radioterapia en los primeros años de vida. Esto es lo que ha motivado la disminución de las dosis en los protocolos actuales y el uso sólo en los pacientes con alto riesgo de recaída en SNC. Aún no está bien establecido el efecto tardío de la quimioterapia intratecal ni de las dosis elevadas de quimioterapia sistémica.

Crecimiento. Pueden presentar talla baja los niños que recibieron radioterapia de cráneo antes de los 4 años y en dosis de 24 Gy o más. En ellos se detecta un déficit de hormona de crecimiento. La ganancia de peso en cambio se mantiene estable y puede ser excesiva llegando a obesidad en un número importante de niños curados, está relacionada con muchos factores como los psicológicos y la sobreprotección familiar.

Cardíacos. Las antraciclina pueden producir cardiotoxicidad tardía con anomalía del llenado de ventrículo izquierdo y disminución de la contractibilidad. A menor edad del paciente el riesgo aumenta y se relaciona también con la

dosis total usada. Generalmente son asintomáticos pero deben ser evaluados, porque frente a grandes esfuerzos hacen insuficiencia cardíaca, como por ejemplo en relación a trabajo de parto o deportes intensos.

Gónadas. Si no se ha irradiado gónadas lo habitual es una pubertad normal con reporte de numerosos embarazos normales. El riesgo de enfermedades malignas en los descendientes ha sido igual que en la población general, y tampoco tienen mayor frecuencia de anomalías congénitas. La irradiación de testículos (recaída) requiere terapia de sustitución hormonal en la pubertad y se asocia a esterilidad.

d) Segunda malignidad. El riesgo es menor que en los tumores sólidos. Lo más frecuente es la presencia de tumores cerebrales, los que se han asociado a la radioterapia de cráneo usada, también puede haber cáncer de tiroides secundario a exposición a bajas dosis de radioterapia. Se ha observado también leucemia mieloide aguda relacionado con uso de epipodofilotoxinas y asociado a anomalías estructurales del cromosoma 11 en región q23, el riesgo es mayor si se usa en forma semanal.

LECTURAS SUGERIDAS

Campbell, M., Ferreiro, M., Tordecilla, J. *et al.* "Leucemia linfoblástica aguda. Características al diagnóstico en 100 niños". *Rev. chil. pediatr.*, jul. 1999, vol.70, no.4, p.288-293.

Campbell, M., Salgado, C., Becker A. *et al.* "Improved outcome in children with lymphoblastic leukemia in a developing country. Results of trial ALL PINDA 87". *Med Ped Oncol* 33: 88- 94, 1999. (Publicación en paralelo *Rev Chil Ped* 70(5); 405-414, 1999).

Ching-Hon, P. **Childhood Leukemias.** First Edition Cambridge University Press. The Edinburgh Building, Cambridge, UK, 1999.

Greaves, MA., Maia, A.T., Wiemels, J.L., Ford, A.M. "Leukemia in twins: lessons in natural history" *Blood*, 102 (7): 2321-2333, 2003.

Mahoney, Jr. D. "Acute lymphoblastic leukemia in childhood" en Oski, F., **Principles and Practice of Pediatrics.** Second Edition. Philadelphia. J.B. Lippincott Company, pp 1701-1709, 2000.

Margolin, J., Steuber, C., Poplack D. "Acute lymphoblastic leukemia" en **Principles and Practice of Pediatric Oncology.** Pizzo P., Poplack, D., Fourth edition. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, pp 488-544, 2002.

Ortega, J.J. "Leucemias agudas en niños" en **Tratado de Pediatría.** Cruz, M. Octava Edición. Madrid. Ediciones Ergon, pp 1482-1493, 2001.

Schrappé, M., Reiter, A., Zimmermann, M. *et al.* "Long term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL BFM study group from 1981 to 1995", *Leukemia* 14: 2205-22, 2000

LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

Jorge Alfaro L.

1. INTRODUCCIÓN

Se denomina leucemia mieloide aguda (LMA) a un conjunto de enfermedades neoplásicas, caracterizadas por la proliferación de células malignas, denominada blastos, que se acumulan en médula ósea y sangre periférica. De origen clonal, estos blastos poseen una destinación ("committed") mieloide. El diagnóstico según la Organización Mundial de Salud (OMS), requiere de la presencia de 20% o más de blastos en médula ósea. Este criterio de 20% entra a modificar lo estipulado por la clasificación Franco-Américo-Británico (FAB) que establecía un 30% como criterio diagnóstico.

El diagnóstico diferencial de una leucemia aguda se realiza mediante una serie de estudios complementarios entre sí: morfológico con tinción corriente de hemograma (May-Grunwald Giemsa), inmunofenotipo, citogenética, biología molecular y, en algunos casos citoquímico, es esencial para la correcta tipificación de una LMA. La información que se recolecta en la fase diagnóstica de la enfermedad es vital, pues permite seguir la respuesta al tratamiento y definir categorías pronósticas; esta información será importante en el establecimiento del pronóstico y tratamiento.

2. EPIDEMIOLOGÍA

La LMA aumenta su incidencia con la edad, con

menos de 1:100.000 habitantes/año para menores de 30 años a 14:100.000 a los 75 años, constituyendo la principal causa de leucemia aguda en adultos, a diferencia de los niños donde predominan las leucemias linfoblásticas.

3. ETIOLOGÍA

La etiología de las LMA es desconocida, existen factores genéticos predisponentes, que suelen observarse en enfermedades congénitas como la anemia de Fanconi, síndrome de Down, ataxia telangiectasia, y mayor probabilidad entre hermanos univitelinos. Como causa externa está descrito las radiaciones provenientes de accidentes nucleares, y algunos tóxicos como el benceno en trabajadores expuestos a este diluyente. No se han identificado virus como en variedades linfoblásticas de leucemia, tal como el HTLV-1 con el síndrome leucemia-linfoma o, el linfoma de Burkitt con el virus de Epstein Barr (VEB).

4. PRESENTACIÓN CLÍNICA

Los síntomas clínicos relacionados con la LMA derivan de la infiltración de la médula ósea con aparición de pancitopenia, y de la infiltración de algunos tejidos dependiendo de la variedad. Un 80% de los pacientes presentan anemia de intensidad variable, normocítica–normocrómica, púrpura cutáneo y en mucosas, asociados a la trombocitopenia en el 60% de los casos. La manifestación hemorrágica puede llegar a ser

más intensa cuando se presenta una coagulación intravascular diseminada (CID), con un importante componente fibrinolítico como ocurre en la LMA promielocítica (75–90% de los casos), pero que también puede ocurrir en las variantes M1, M2, M4, M5 (ver punto 5). La mitad de los pacientes presenta fiebre, que al diagnóstico debe ser atribuida a infección relacionada a neutropenia severa.

La mediana de leucocitos es de 15-20 x 10³/μL y en el 85% se observan blastos en la sangre periférica. En los casos pacientes de hiperleucocitosis (10% de los casos) con más de 100 x 10⁹/μL se producen síntomas a nivel de SNC y pulmón. En estos casos se producen alteraciones en el procesamiento de las muestras, por el metabolismo propio de los blastos, por ejemplo la medición de gases en sangre arterial se ve alterada y, no refleja la condición clínica del paciente.

A nivel de piel, se puede observar infiltración o leucemides, siendo más frecuente en las LMA M4 y M5, al igual que la hiperplasia de las encías.

5. CLASIFICACIÓN DE LAS LMA

5.1. Clasificación según criterios FAB

La clasificación más usada para las LMA es la FAB, diseñada en 1976 y, sujeta a varias modificaciones hasta quedar más o menos establecida como en la tabla 12-LMA-1.

Tabla 12-LMA-1 Clasificación FAB de las leucemias mieloides agudas

Sub tipo FAB	Denominación
M0	LMA con mínima diferenciación mioide
M1	LMA sin maduración
M2	LMA con maduración
M3	L. promielocítica aguda
M3v	L. promielocítica aguda variante microgranular
M4	L. mielomonocítica aguda
M4Eo	L. mielomonocítica aguda variante eosinófila
M5a	L. monoblástica aguda (> 80% monoblastos)
M5b	L. monocítica aguda (< 80% monoblastos)
M6	Eritroleucemia
M7	L. megacarioblástica

FAB, Franco-Américo-Británico; LMA, leucemia mioide aguda; L, leucemia.

La clasificación reconoce once subtipos, que se definen a continuación:

5.1.1. Leucemia mieloide aguda con mínima diferenciación (M0)

Los blastos leucémicos son muy indiferenciados, y constantemente son negativos para mieloperoxidasa (MPO), sudan negro. El diagnóstico se basa en la positividad de la mieloperoxidasa a nivel ultraestructural y el inmunofenotipo mieloide CD13 y/o CD33 por citometría de flujo. También son negativos para antígenos de diferenciación linfóide B y T. Serían aparentemente de peor pronóstico debido a que afecta a pacientes en edad avanzada y formas hipocelulares de esta enfermedad.

5.1.2. Leucemia mieloide aguda sin maduración (M1)

Se caracteriza por una infiltración de blastos mieloides, generalmente mayor a 90% de las células no eritroides. Se exige al menos un 3% de blastos mieloperoxidasa positivos. En ocasiones estos blastos pueden presentar bastones de Auer, que corresponden a gránulos primarios con forma de aguja. Esta forma de inclusión es considerada patognomónica de leucemia mieloide aguda. El inmunofenotipo característico es CD33 (+), CD13 (+), CD11b (+), MPO (+), El 10% puede expresar el marcador linfóide CD7 y TdT.

5.1.3 Leucemia mieloide aguda sin maduración (M2)

Es un grupo heterogéneo, que comprende todas aquellas LMA con 10% o más de elementos de diferenciación mieloide y menos de 20% de componente monocítico. Son frecuentes los bastones de Auer y algunos elementos displásicos. Un 18% de las LMA M2 poseen la t(8;21).

5.1.4. Leucemia promielocítica aguda (M3)

La leucemia promielocítica constituye el 10-15% de las LMA. Morfológicamente los blastos promielocíticos se caracterizan por la presencia de abundantes bastones de Auer, en empalizada. El núcleo del promielocito es lobulado o posee escotadura, siendo esto más evidente en la variante hipogranular de la enfermedad. Las células son MPO intensamente positivas y expresan CD33 y CD13, pero son negativas para HLA-DR. Esta característica es muy importante al momento del diagnóstico

diferencial con las otras variedades de LMA.

La citogenética de la LMA M3 es diagnóstica, y corresponde a la translocación recíproca de los cromosomas 15 y 17 t(15;17) (q22;q12), aunque existen variantes de menor frecuencia como la t(11;17) y la t(5;17). En la translocación típica está involucrado el gen *PML* en el cromosoma 15 y el Receptor alfa del ácido transretinoico en el cromosoma 17. Es a este nivel donde actúa de manera específica el ácido transretinoico, utilizado en el tratamiento de esta variedad de LMA y que, induce diferenciación de los blastos, disminuyendo los trastornos hemostáticos asociados a esta enfermedad y mejorando significativamente la sobrevida de los pacientes.

La diátesis hemorrágica asociada a la LPA es probablemente uno de los trastornos hemorrágicos más dramáticos de la medicina, donde se conjugan una serie de factores entre los que se encuentran una intensa activación de la fibrinólisis, asociada a la trombocitopenia y CID.

En la clasificación más reciente de las LMA patrocinada por la OMS (punto 5.2.), esta variedad pasa a constituir una LMA con alteración citogenética específica.

5.1.5 Leucemia mielomonocítica aguda (M4)

La variedad M4 posee una mezcla de blastos de origen monocítico y de origen granulocítico. Expresa intensamente HLA-DR y marcadores tanto mielocíticos (CD11b, CD13) como monocíticos (CD15, CD14). Para entrar en esta variedad debe tener más de 30% de blastos de origen granulocítico y más de 20% de monoblastos. Las alteraciones citogenéticas corresponden a trisomía 4, inv(3), del(5), t(6;9) que fusiona el gen *CAN* con el gen *DEK*. La variante eosinofílica de la enfermedad, FAB M4Eo es descrita por la OMS como LMA con alteración citogenética específica del cromosoma 16(16q;22) siendo más frecuente la inv(16) seguida de la t(16;16) y del(16). Corresponde al 5% de las LMA y a un 20% de las LMA M4.

5.1.6. Leucemia monoblástica aguda (M5)

Para su diagnóstico se requiere que al menos un 80% de las células no eritroides correspondan a blastos de origen monocítico. En la clasificación FAB se distinguen: (a) M5a variedad poco diferenciada o monoblástica,

donde el 80% de las células corresponde a blastos monocíticos, peroxidasa (-), esterasa (+) inhibición por fluoruro (+) y (b) variedad M5b o forma diferenciada, predomina los monocitos y promonocitos, con su característica forma de núcleo arriñonado y citoplasma grisáceo. En caso de observarse imágenes de eritrofagocitosis, puede encontrarse la translocación t(8;16).

Las leucemias monoblasticas se asocian con alta frecuencia a manifestaciones extramedulares, con infiltración importante de encías, ganglios, hepato-esplénica, pulmonar y compromiso de SNC, por lo que debe de administrarse quimioprofilaxis con intratecales en todos los casos.

El inmunofenotipo característico es CD13(+), CD33(+), CD14(+), CD68(+), CD4(+), HLA-DR(+).

5.1.7. Eritroleucemia (M6)

Es una proliferación mixta de eritroblastos y blastos de origen eritroide. El diagnóstico se basa en más de 50% de eritroblastos en médula ósea y al menos un 30% de las células no eritroides sean blastos. Corresponde a un 4% de las LMA. En médula ósea es posible observar una intensa displasia eritropoyética, megaloblastosis y PAS positivos. También es posible reconocer dos variedades: (a) M6a con maduración, que no posee hiato de maduración eritroide y (b) M6b sin maduración que posee más de un 25% de proeritroblastos y eritroblastos basófilos. El inmunofenotipo de los blastos expresa glicoforina A, hemoglobina A, CD71(+), CD36(+), expresión de antígeno de grupos sanguíneos A, B, Rh D. Las alteraciones citogenéticas suelen ser complejas afectando a los cromosomas 1, 5, 7, 8 y 21.

5.1.8. Leucemia megacarioblástica aguda (M7)

Esta variedad representa el 8% de las LMA. Afecta a niños con síndrome de Down y a adultos, como manifestación de mielodisplasias transformadas o evolución de mielofibrosis. Se asocia con frecuencia a fibrosis medular intensa, lo que dificulta la obtención de muestras por aspiración medular. Por esta característica se le denomina también *mielofibrosis aguda*. El diagnóstico de certeza requiere inmunohistoquímica, con positividad para glicoproteínas plaquetarias CD41 (GPIIb), CD42 (GPIb), CD61 (GPIIIa) y la evidencia ultraestructural de peroxidasa plaquetaria. También son útiles la presencia en superficie de FVIII, betatromboglobulina, factor 4 plaquetario. El pronóstico en el adulto es sombrío.

5.2. Clasificación según criterios OMS

El principio básico de esta clasificación es utilizar, no solamente los elementos morfológicos, sino toda la información disponible, incluida la genética, inmunofenotipo, y elementos clínicos y biológicos que definan, de ser posible, enfermedades específicas. El recuento de blastos se realiza en 200 células en frotis de sangre periférica y 500 células en los aspirados de médula ósea. Para propósito de la clasificación se denomina blasto a la célula inmadura y también a elementos más diferenciados pero reconocidamente neoplásicos, por ejemplo los promielocitos en las LPA y los monoblastos y promonocitos en las LMA mielo-monoblasticas. Estos son denominados "equivalentes blásticos" para propósitos de los recuentos y porcentajes.

La clasificación OMS identifica LMA en cuatro grupos (tabla 12-LMA- 2)

Tabla 12-LMA-2. Clasificación de las LMA según OMS

<p>LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes LMA con t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO) LMA con eosinófilos e inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22), (CBFB/MYH11) Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q11), (PML;RAR alfa) LMA con alteraciones 11(q23)</p>
<p>LMA con displasia de varias líneas Secundarias a SMD o SMP Sin antecedentes de SMD o SMP pero con displasia de al menos 50 % de las células, de al menos dos líneas celulares.</p>
<p>LMA y SMD relacionados a quimioterapia Tipo alquilante/radiación Relacionado uso de inhibidores de topoisomerasa</p>
<p>LMA no categorizadas LMA, mínimamente diferenciada LMA sin maduración LMA con maduración LMA mielomonocítica LMA monocítica Leucemia aguda eritroide Leucemia aguda megacarioblástica Leucemia aguda basofílica Panmielosis aguda con mielofibrosis Sarcoma mieloide</p>

LMA, leucemia mieloide aguda; SMD, síndrome mielodisplásico; SMP, síndrome mieloproliferativo.

La OMS recomienda análisis de cariotipo, hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH) y estudio con reacción de polimerasa en cadena (PCR) con transcriptasa reversa (RT-PCR), para definir génicamente algunas entidades. El umbral para una LMA se reduce a un 20% de blastos en médula o sangre y, en los casos de LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes, se considera LMA independientemente del porcentaje de blastos. Esta disminución de 30 a 20% se debe a que no existen diferencias en la respuesta terapéutica ni supervivencia global en todos aquellos pacientes que al diagnóstico poseen entre 20 y 29% de blastos, que en la previa clasificación FAB se denominaba como síndrome mielodisplásico (SMD) tipo anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-T).

5.2.1. LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes

El 30% de las LMA caen en esta categoría, existiendo una intensa asociación entre las alteraciones t(8;21), t(15;17), inv(16) o t(16;16) con la morfología. A manera de ejemplo esta

última alteración del cromosoma 16 se relaciona en un 30-100 % de los casos con una LMA M4Eo. Coincide además esta categoría con las LMA de buen pronóstico, pues en conjunto obtienen cerca de un 80% de supervivencia libre de enfermedad (SLE).

5.2.2. LMA con displasia multilineal

El diagnóstico es relativamente sencillo cuando el paciente tiene historia previa de SMD o síndrome mieloproliferativo (SMP) en los 6 meses previos a la crisis de LMA. La dificultad radica cuando es un cuadro *de novo*, en esta situación la presencia de displasia de varias líneas celulares sería el marcador más confiable. El criterio OMS exige 50% de las células de determinada línea con displasia. El pronóstico de esta variedad de LMA es malo, con escasa respuesta a los tratamientos quimioterápicos.

5.2.3. LMA y síndromes mielodisplásicos relacionados a tratamiento

Se reconocen dos tipos de entidades: (a) relacionada con agentes alquilantes y radiación

y (b) relacionada a inhibidores de topoisomerasa. En la primera situación la alteración ocurre a 4-7 años de la exposición del agente mutagénico; aproximadamente dos tercios presenta mielodisplasia y el porcentaje restante como LMA con elementos displásicos. En la segunda situación se presenta como LMA *de novo* con componente monocítico, siendo la latencia entre la exposición al agente y la enfermedad de 6 meses a 5 años.

5.2.4. LMA no categorizada

En esta categoría se encuentran todas las LMA no mencionadas en las categorías anteriores y es semejante a la clasificación FAB, sin embargo se ha omitido la LPA y se añaden categorías antes no mencionadas: el sarcoma granulocítico o cloroma, la mielofibrosis aguda y la leucemia basofílica aguda.

6. FISIOPATOLOGÍA

Más de 200 translocaciones cromosómicas y otras mutaciones han sido descritas en LMA, confirmando que se trata de una mezcla de diferentes enfermedades cuyo común denominador es la infiltración blástica de médula ósea, sangre y eventualmente otros tejidos. Para que esto se produzca se requieren de al menos dos eventos: Uno es el aumento de la proliferación celular y el otro la detención en la

maduración, así se tiene una célula de origen clonal que se encuentra detenida en una fase de alto potencial proliferativo, ocupa los espacios medulares, inhibe la hematopoyesis normal, y explica la velocidad de presentación clínica de la enfermedad.

Tal como se estudian las leucemias en su fase diagnóstica, las distintas técnicas empleadas muestran los blastos desde perspectivas diferentes y complementarias. El estudio citogenético permite clasificar a las LMA según categorías de riesgo, y los estudios moleculares acercan hacia los mecanismos involucrados y probablemente las nuevas formas terapéuticas que deberán desarrollarse a través de este conocimiento.

6.1. Citogenética de las LMA

Las actuales modalidades terapéuticas en pacientes menores de 60 años, ofrecen una probabilidad de un 80% de obtener remisión completa. Sin embargo solo un 70% se mantendrá en remisión a los 5 años de seguimiento, siempre y cuando corresponda a una de las categorías citogenéticas de buen pronóstico (tabla 12-LMA-3). Si las alteraciones citogenéticas son de mal pronóstico, este porcentaje cae a un 22%. Además globalmente los pacientes mayores de 60 años, poseen solo un 10% de sobrevida global a los 5 años.

Tabla 12-LMA-3. Clasificación pronóstica de las LMA, según análisis citogenético

Riesgo	Número	Recaída (%)	Sobrevida a 5 años %	Alteración citogenética/molecular	
Favorable	86	28	74	t(8:21) o AML1/ETO t(inv/del (16)(p13;q22) o MYH11/CBFβ	
Intermedio	A	17	49	18	
	B	457	50	10	
Desfavorable	RC tardía	207	70	12	
	Citogenética desfavorable	70	80	9	<ul style="list-style-type: none"> • >3 anormalidades clonales diferentes. • -7, -5 • del 5q, del 7q • Abn 3q • T(6;9)(q23;q34) o DEK/CAN • Abn 11q23 • T(9;22) o BCR/ABL

A, Riesgo citogenético favorable, pero con leucocitos > 20.000/μL, o alteración citogenética desfavorable adicional.

B, Sin citogenética favorable o desfavorable, pero con RC post inducción

RC, Remisión completa

Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group HOVON and Swiss Leukemia Group SAKK.

El conocimiento de las alteraciones genéticas que acompañan a una LMA permite establecer distinto origen patogénico y distinto pronóstico, el que hay que considerar al momento de diseñar la estrategia terapéutica.

t(8;21)(q22;q22) o AML1/ETO

En condiciones normales, el gen *AML1* (cromosoma 21q22) codifica para una proteína que une DNA en una secuencia conocida TGTGGT, para que esto se lleve a cabo requiere formar un heterodímero con CBF (cromosoma 16q22). Una vez que se ha formado el complejo, se reclutan coactivadores que permiten la transcripción. Esta señal se ve afectada en la t(8;21), donde el oncogén *ETO* (cromosoma 8q22) se une a *AML1* y bloquea la acción de los coactivadores, impidiendo que los genes “target” se activen.

La t(8;21) se encuentra aproximadamente en el 40% de las LMA FAB M2, pero no está restringida a este subgrupo.

t/inv/del(16)(p13;q22) o CBF-MYH11

Otra manera de afectar el rol fisiológico del heterodímero AML1-CBF es a través de la inversión del cromosoma 16 (p13;q22), o una t(16;16) (p13;q22). El resultado es una proteína quimérica CBF-MYH11 que inhibe directamente la transcripción mediada por AML1.

La inv(16) o t(16;16) es más frecuente en la LMA

FAB M4Eo, aunque no es patognomónica de esta variedad.

Alteraciones del cromosoma 11q23 o gen MLL (“Mixed lineage leukemia”)

Esta alteración puede verse en todos los tipos de LMA pero es más frecuente en las variedades FAB M4 y M5. Aunque se han descrito más de 30 diferentes locus que participan en esta translocación, las más frecuentes parejas de 11q23 son: 6q27, 9q22, 10p12, 17q21, 19p13.1. MLL interactúa con una antifosfolipasa denominada Sbf1, que tendría un rol de regulador positivo en la vía de señales de las kinasas.

Las alteraciones del cromosoma 11(q23), suelen observarse en el 6-8% de las LMA y en el 85% de las LMA secundarias al uso de inhibidores de topoisomerasa II.

6.2. Marcadores moleculares en las LMA

Desde el punto de vista molecular, existen varios marcadores identificados que poseen implicancias pronósticas (tabla 12-LMA-4). A diferencia de las alteraciones citogenéticas, las alteraciones moleculares son detectadas con técnicas más sensibles como la PCR. Entre estas alteraciones llama la atención las mutaciones de *FTL3*, que está en un 30% de las leucemias mieloides y, puede verse asociado a otras alteraciones citogenéticas. También es de interés la posibilidad de encontrar inhibidores más o menos específicos.

Tabla 12-LMA-4. Marcadores moleculares con significado pronóstico adicional al análisis citogenético

Marcador	Frecuencia (%)	Sobrevida	Referencia
<i>FTL3-ITD</i>	11-32	Desfavorable	Kondo et al, Fröhling et al
Mutación p53	4.5	Desfavorable	Nakano y et al
Duplicación en tandem <i>MLL</i>	8	NS	Döhner y et al
Alta expresión mRNA <i>BCL2</i> y <i>WT1</i>	36	Desfavorable	Karakas y et al
Alta expresión mRNA <i>Evl1</i>	10	Desfavorable	Van Waalwijk y et al
Mutación de <i>CEBPα</i>	11	Favorable	Preudhomme y et al

Activación de tirosina kinasa FLT3

Los receptores de membrana son esenciales para que la célula reciba los estímulos extracelulares y, genere una cascada de eventos intracelulares. De éstos, la familia de los receptores tirosina kinasa poseen un rol fundamental. Formados por un dominio extracelular que une al ligando, uno transmembrana y un intracelular con actividad intrínseca de tirosina kinasa, es decir activan mediante fosforilación a otras proteínas modulando de esta manera las vías mensajeras intracelulares.

FLT3 es un receptor de tirosina kinasa expresado en células hematopoyéticas inmaduras y de vital importancia para el desarrollo de las “stem cell” y del sistema inmune. Pertenece a la familia de receptores de tirosina kinasa clase III, que incluyen a FLT3, FMS, PDGFR y Kit. Se encuentra mutado en el 30-35% de las LMA, y está asociado a un peor pronóstico, aunque esta observación debe ser validada. La mutación más frecuentemente encontrada es la duplicación en tandem de pequeños fragmentos yuxtamembrana, que condiciona una actividad permanente constitutiva, produciendo junto a otros oncogenes activados el síndrome mieloproliferativo. También es posible que se encuentre alterado el sitio catalítico propiamente tal, mediante la sustitución D835Y, donde un ácido aspártico (D) es reemplazado por una tirosina (Y).

Existe un enorme interés en producir inhibidores de FLT3, tanto por su alta frecuencia de alteración en LMA, como por su asociación con peor pronóstico. En la actualidad existen varios productos reportados en ensayos clínicos fase I o II incluyendo: CEP-701, CT53518, SU5614, SU11248, PKC412. Cada uno de ellos disponibles oralmente con una potente inhibición de FLT3. Ninguno de ellos es absolutamente específico para FLT3, debiendo evaluarse en ensayos clínicos los efectos secundarios producto de la inhibición de otras proteínas y cuál va a ser su rol en el tratamiento de estas patologías.

C/EBP α (CCAAT “enhancer binding protein alpha”)

C/EBP α es un factor de transcripción que induce diferenciación granulocítica de los precursores mieloides. Al estar mutado, no se produciría la diferenciación, quedando las células detenidas en un estado de blasto. Su efecto se hace sentir

principalmente en células con diferenciación mielomonocítica. Estudios de transfección, muestran a C/EBP α regulando los promotores de varios genes específicos de los granulocitos.

La frecuencia de mutaciones de C/EBP α es mayor en la variedad FAB M2 con citogenética normal. La t(8;21) que también es más frecuente en esta variedad de LMA, produce una disminución de la función C/EBP α , a niveles que la hacen insuficientes para la diferenciación granulocítica. Esto hace pensar en una vía común en la patogénesis de la LMA.

Es posible encontrar esta mutación en el 15% de las LMA.

Expresión génica analizada mediante microarreglos

El microarreglo (“microarray”) corresponde a un técnica de biología molecular que permite observar la expresión de mRNA de miles de genes de una célula en especial, y formar patrones de genes que se expresan más, menos o igual que los controles. No analiza mutaciones génicas, a menos que éstas se correspondan con la expresión mRNA de uno o más genes, que deben ser analizados mediante programas estadísticos computacionales, donde se comparan miles de genes clasificados según rol en los procesos celulares.

Los resultados preliminares utilizando microarreglos en pacientes portadores de LMA indican que no existiría tanta heterogeneidad entre las LMA como se suponía. Más bien existe una redundancia en las vías que regulan la proliferación o maduración de los blastos leucémicos, sugiriendo la existencia de relativamente pocas vías o mecanismos para desarrollar el fenotipo leucémico y está la mayoría de ellos relacionados a alteraciones ya conocidas: t(15;17), t(8;21) e inv 16.

El aporte de esta técnica está dado por identificar grupos de pronóstico diferente, posibilita identificar nuevos genes relacionados a alteraciones específicas y requiere un escaso número de pacientes para lograr resultados estadísticamente significativos.

7. TRATAMIENTO

El tratamiento de las LMA no ha mostrado resultados tan espectaculares como los avances en el conocimiento inmunológico y génico de estas enfermedades. Excepto en LPA, la

quimioterapia se ha mantenido más o menos constante.

La LMA es una enfermedad rápidamente progresiva, al momento diagnóstico si no se trata es letal en el curso de días o semanas, por lo tanto de no existir una contraindicación de peso, el tratamiento debe ser rápidamente instaurado.

La quimioterapia en una LMA posee fase de inducción, consolidación o intensificación y mantención.

7.1. Quimioterapia

7.1.1. Quimioterapia de inducción

Los protocolos de quimioterapia de inducción incluyen una antraciclina más arabinósido de citosina, siendo la pauta más aceptada Daunorrubicina (DNR) 45–60 mg/m² por tres días y Ara-C 100–200 mg/m² en infusión continua por 7 días. Este esquema es conocido como 3+7. Con este esquema las tasas de remisión se encuentran entre 60–70%. Algunos aspectos referentes a modificaciones de este protocolo: **Tercer fármaco.** Se ha intentado añadir un tercer fármaco a este esquema, por ejemplo 6-tioguanina, sin embargo no ofrece ventajas en remisión completa (RC) respecto al esquema clásico y ha sido abandonado. El asociar etopósido en dosis de 75–100 mg/m² por 7 días ha sido intentado por el grupo inglés del “Medical Research Council” y el australiano (ALSG) sin añadir mejoras respecto al clásico 3+7, por lo tanto tampoco se utiliza en la fase de inducción. **Otras Antraciclinas,** como la doxorubicina (adriamicina), mitoxantrona (MTZ) e idarrubicina (IDR) pueden ser usadas e intercambiadas sin alterar la eficacia del tratamiento, en estos casos es importante considerar que la doxorubicina en estas dosis produce más mucositis y no debiera elegirse en LMA. La mitoxantrona posee resultados comparables. La idarrubicina no sería mejor que la daunorrubicina siempre que se usen dosis equivalentes, en este caso 12 mg/m² de IDR con 60 mg/m² de DNR. **Dosis de Ara-C,** en inducción no se ha demostrado que las dosis intermedias 500 mg o altas 1 a 3 g/m² mejoren la tasa de RC en LMA, estas dosis son útiles en los tratamientos de consolidación. Una variante que se utiliza es la intensificación “secuencial”, que consiste en determinar el porcentaje de blastos en el día + 15 de la quimioterapia, de ser mayor a un 5%, si indica altas dosis de Ara-C 1–3 g/m², cada 12 horas en infusiones de 1 hora por 6–8 dosis.

A modo de resumen, la fase de inducción de quimioterapia el esquema clásico de 3+7 sería el indicado usando la dosis máxima de DNR. En caso de no lograrse una rápida reducción de los blastos se puede intensificar de manera secuencial durante la inducción, logrando una mejor tasa de RC, cercana al 90 %.

7.1.2. Consolidación/ intensificación

Se habla de **consolidación** cuando se administra quimioterapia en pacientes en RC post-inducción con dosis semejantes o reducidas en relación a la inducción y de **intensificación** cuando se usa altas dosis de Ara-C (ADArA-C). En un trabajo donde se observa bien este efecto es en el publicado por el CALGB (Mayer y *et al*) en un estudio que incluyó 596 pacientes que habían obtenido RC; se trataron aleatoriamente en tres grupos con 100 mg/m², 400 mg/m² y 3 g/m². El grupo 100 y 400 recibió 5 días de tratamiento en infusión continua y el grupo de ADArA-C 6 dosis fraccionada cada 12 horas, días 1, 3, 5. La SLE a los 4 años fue de 21%, 29% y 44% respectivamente. Se administran entre 2–3 ciclos de quimioterapia de intensificación.

7.1.3. Mantención

La mantención o ciclos de quimioterapia durante los 2–3 años posteriores a la inducción de remisión no ha demostrado ser útil en LMA, a diferencia de la leucemia linfoblástica aguda.

7.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)

La mejor consolidación de una LMA es la quimioterapia ablativa y rescate con progenitores hematopoyéticos, ya sea alogénicos o autogénicos. Esta forma radical de tratamiento no es sin embargo inocua debido al alto riesgo del procedimiento, a la toxicidad de las drogas y, en el caso de un alotrasplante a la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Por esta razón se excluyen de trasplante en primera remisión completa aquellas LMA de buen pronóstico como son las con alteraciones citogenéticas recurrentes: t(15;17), t(8;21), t(16;16) e inv 16. Todas ellas deben ser consolidadas de la manera estándar, menos la t(15;17) que posee una modalidad propia de inducción, consolidación, mantención y rescate en caso de recaídas. Las otras LMA, en caso de tener menos de 50 años y contar con un donante familiar HLA compatible deben ser trasplantadas en primera remisión, que es donde se obtienen los mejores resultados a largo plazo. En

pacientes mayores, estaría indicado el trasplante con técnica no mieloablativa.

Al decidir qué paciente debe ser sometido a un TPH, es necesario considerar los factores pronósticos asociados, siendo **factores de mal pronóstico** los relacionados a LMA secundarias, mayores de 60 años, leucocitosis mayor a 50.000/ μ L, tipo FAB M0, M5, M6, M7, alteraciones citogenéticas 3q, -5, 5q-, -7, alt 11q23, t(9;22), dificultad para entrar en RC. En todos estos casos es indispensable someter al paciente a trasplante allogenico lo antes posible al alcanzar la remisión.

Trasplante autogénico. Existen pocos trabajos comparativos entre consolidación con autotrasplante vs. quimioterapia convencional, siendo la mayoría de ellos favorable a realizar el procedimiento. El éxito de esta modalidad terapéutica depende de la quimioterapia utilizada en la movilización, donde el objetivo central es tratar de obtener progenitores no contaminados.

LECTURAS SUGERIDAS

Baer, M. "Management of unusual presentations of acute leukemia". *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 7 (1); 275-292, 1993.

Bennett, J., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, H., Sultan, C. "Proposal for the classification of acute leukemias". *Br J Haematol*, 33, 451-459, 1976.

Bennett, J., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, H., Sultan, C. "Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0)". *Br J Haematol*, 78, 325-329, 1991.

Burnett, A., Goldstone, A., Steven, R., Hann, I., Rees, J., Gray, R., et al. "Randomized comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia in first remission: results of MRC AML 10 trial". *Lancet*; 351: 700-708, 1998.

Cassileth, P.A., Harrington, D., Appelbaum, F.R., Lazarus, H., Rowe, J., Paietta, E. et al. "Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission". *N Engl J Med*; 3639:1649-1656, 1998.

Fenaux, P., Vanhaesbroucke, C., Estienne, M.E., Preud'Homme, C., Paznierz, D., Facon, R., Millot, F., Bauters, F. "Acute monocytic leukemia in Adults: treatment and prognosis in 99 cases". *Br J Haematol*, 75, 41-48, 1990.

Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G. et al. "The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial". *Blood*; 92:2322-2333, 1998.

Harusseau, J., Cahn, J., Pignon, B., Witz, F., Milpied, N., Delain, M. et al. "Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myelogenous leukemia". *Blood*; 90:2978-2986, 1997.

Heim, S., Mitelman, F. "Cytogenetic Analysis in the diagnosis of acute leukemia". *Cancer*; 70: 1701-1709, 1992.

Löwenberg, B., Downing, J., Burnett, A. "Acute myeloid Leukemia". *N Engl J Med*; 341 (14): 1051-62, 1999.

Mayer, R.J., Davis, R.B., Schiffer, C.A., Berg, D.T., Powell, B.L., Schulman, P. et al. "Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia". *N Engl J Med*; 331: 896-903, 1994.

Reiffers, J., Stoppa, A., Michallet, M., Marit, G., Blaise, D. et al. "Allogeneic vs autologous stem cell transplantation vs chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia in first remission: the MGMT 87 study". *Leukemia*; 10:1874-1882, 1996.

Sandler, D.P. "Epidemiology of acute myelogenous leukemia". *Semin Oncol*; 14:359-364, 1987.

Valk, P., Verhaak, R., Beijnen, M. et al. "Prognostically useful gen-expression profiles in acute myeloid leukemia". *N Engl J Med*; 350:1617-28, 2004.

Vardiman, J., Harris, L., Brunning, R. "The world Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm". *Blood*, 100 (7); 2292-2302, 2002.

Zittoun, R., Mandelli, F., Willemze, R., De Witte, T., Labar, B., Resegotti, L. et al. "Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia". *N Engl J Med*; 332: 217-223, 1995.

SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS

Guillermo J. Ruiz-Argüelles, Guillermo J. Ruiz-Delgado y Guillermo Ruiz-Reyes

1. Introducción

2. Leucemia granulocítica crónica

- 2.1. Anatomía patológica
- 2.2. Etiopatogenia
- 2.3. Fisiopatología y cuadro clínico
- 2.4. Diagnóstico
- 2.5. Curso, tratamiento y pronóstico
- 2.6. Pronóstico

3. Policitemia vera

- 3.1. Patogenia
- 3.2. Epidemiología
- 3.3. Datos clínicos
- 3.4. Estudios de laboratorio
- 3.5. Diagnóstico
- 3.6. Tratamiento

4. Trombocitosis primaria

- 4.1. Patogenia
- 4.2. Datos clínicos
- 4.3. Estudios de laboratorio
- 4.4. Tratamiento

5. Mielofibrosis con metaplasia mieloide agnógena

- 5.1. Patogénesis
- 5.2. Epidemiología
- 5.3. Datos clínicos
- 5.4. Estudios de laboratorio
- 5.5. Tratamiento

RESUMEN

Los síndromes mieloproliferativos malignos son un grupo de padecimientos clonales que suponen la producción desordenada y descontrolada de elementos de la serie mieloide, eritroide o trombocítica en la médula ósea. La leucemia granulocítica crónica supone la proliferación principalmente de células mieloides y es la única de estas condiciones en la que ocurre la translocación recíproca y balanceada de material genético de los brazos largos de los cromosomas 9 y 22. La trombocitosis primaria supone la producción desordenada de megacariocitos y plaquetas; la policitemia rubra vera se caracteriza por producción aumentada de células eritroides, mieloides y megacariocitos, en tanto que en la mielofibrosis / metaplasia mieloide agnogénica hay producción exagerada de fibras de colágeno aparentemente en respuesta a la proliferación de elementos de serie trombocítica. Todos estos padecimientos están relacionados entre sí, y también con la leucemia aguda mieloblástica, en la que puede culminar la evolución natural de cualquiera de estas entidades. La necesidad que tenemos los médicos de encasillar en diagnósticos diferentes a condiciones patológicas relacionadas entre sí, ha hecho esta división un tanto artificiosa de los síndromes mieloproliferativos malignos.

1. INTRODUCCIÓN

Se llaman síndromes mieloproliferativos (SMP) crónicos los padecimientos caracterizados por mieloproliferación monoclonal que involucra linajes múltiples, que conservan un grado variable de maduración celular y que tienen el potencial para seguir una evolución clonal. Los SMP agudos corresponden a las leucemias agudas mieloblásticas. De manera simplista, se pueden reconocer, según la línea celular

mayormente afectada, cuatro variedades de SMP crónicos: (a) Policitemia vera (PV), (b) Trombocitosis primaria (TP), (c) Leucemia granulocítica crónica (LGC) y (d) Mielofibrosis primaria con metaplasia mieloide agnogénica (MF / MMA)

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) organiza las enfermedades mieloproliferativas según se indica en la tabla 13-1.

Tabla 13-1. Clasificación de las enfermedades mieloproliferativas según la OMS

Secuencia granulocítica crónica con cromosoma Philadelphia [t(9;22)(q34;q11), BCR/ABL] Policitemia vera Trombocitosis primaria Mielofibrosis primaria con metaplasia agnogénica Leucemia neutrofilica crónica Leucemia eosinofílica crónica / Síndrome hipereosinofílico Síndrome mieloproliferativo

Estas enfermedades mieloproliferativas crónicas son de naturaleza clonal, primitivas y no secundarias a un estímulo de tipo infeccioso u hormonal. Su patogenia es diferente de la de las leucoeritroblastosis reactivas (antes llamadas reacciones leucemoides) o de las eritrocitosis originadas, por ejemplo, por producción excesiva de eritropoyetina. El proceso proliferativo no está limitado en forma estricta a una sola línea hematopoyética, sino que

incluye en mayor o menor proporción a varias líneas celulares. En la figura 13-1 se señala la interrelación que existe entre todos los SMP crónicos y las leucemias agudas mieloblásticas. Las diversas líneas celulares implicadas en los SMP derivan de un ancestro común indiferenciado o pluripotencial y no a la célula comprometida para producir eritrocitos, granulocitos o trombocitos; en este sentido los SMP deben considerarse como padecimientos

maligros originados en las células pluripotenciales hematopoyéticas (CPH) o células troncales («stem cells»)

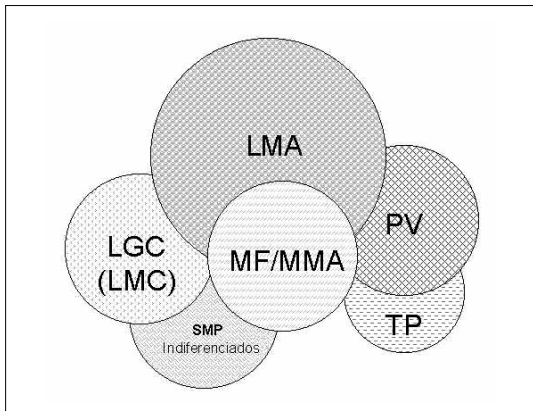


Figura 13-1. Interrelación de los síndromes mieloproliferativos agudos como la leucemia mieloide aguda (LMA) con los síndromes mieloproliferativos crónicos. Leucemia granulocítica crónica (LGC; Leucemia mieloide crónica, LMC), policitemia vera (PV), trombocitosis primaria (TP), mielofibrosis con metaplasia mieloide agnógena (MF/MMA) y síndromes mieloproliferativos (SMP) indiferenciados.

2. LEUCEMIA GRANULOCÍTICA CRÓNICA

La LGC, también llamada leucemia mieloide crónica (LMC) o leucemia mielógena crónica, es una proliferación neoplásica predominantemente de la serie granulocítica, aun cuando se observan alteraciones en la serie roja y en las plaquetas, lo que indica el origen de la entidad en la célula madre o pluripotencial. La enfermedad se ha relacionado con una anomalía cromosómica, la translocación balanceada recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 22 y 9: $t(9q+;22q-)$ que se denomina cromosoma Philadelphia (Ph1), y que se observa en más de 90% de los pacientes. La translocación genera el gen quimérico BCR/ABL que codifica la producción de una proteína con acción de kinasa de tirosina. A nivel internacional se considera que la incidencia es de 1 – 1.5 / 100.000 habitantes. La entidad se puede observar a cualquier edad, pero en los niños sólo constituye 3% de las leucemias en general; su frecuencia aumenta gradualmente y predomina en adultos entre los 40-50 años. Es más frecuente en varones que en mujeres con una relación de tres a dos. La LGC se puede clasificar clínicamente en: Típica (Ph1 presente), atípica (Ph1 ausente) y variedad juvenil (atípica del niño).

También ocasionalmente se pueden observar casos en los que predomina alguna célula madura, y existen al menos cuatro subtipos: Leucemia eosinofílica crónica, leucemia basofílica crónica, leucemia monocítica crónica y leucemia neutrofílica crónica.

2.1. Anatomía patológica

La célula proliferante no es una en especial, como en el caso de las leucemias agudas, sino todas las células hematopoyéticas, si bien predomina la serie granulocítica. El estudio de la médula ósea es de poca utilidad para el diagnóstico, ya que sólo se observa hiperplasia granulocítica inespecífica en ausencia de un cuadro clínico y de laboratorio característico. En ocasiones existe cierto grado de fibrosis, los elementos maduros de la serie granulocítica demuestran disminución de la fosfatasa alcalina leucocitaria y el hallazgo más consistente y específico es la presencia del Ph1. La proliferación de células se correlaciona con crecimiento esplénico y, en menor grado, hepático; también se pueden encontrar hematopoyesis extramedular en estos sitios. Pocas veces hay invasión a otros tejidos.

2.2. Etiopatogenia

La causa y el origen de la LGC no se conocen. Se sabe que la frecuencia aumentó en la población japonesa expuesta a la radiación atómica en 1945. Existe menos evidencia que en la leucemia aguda en relación con fármacos, agentes químicos o factores hereditarios como causas directas de la enfermedad. Se ha demostrado que existen genes alterados, que directamente se relacionan con presencia y permanencia de la entidad, los cuales se conocen como oncogenes; sin embargo, el porqué aparecen dichos genes o las alteraciones cromosómicas de la enfermedad no se ha aclarado con certeza.

2.3. Fisiopatología y cuadro clínico

En ocasiones (10 a 20%), el diagnóstico se hace cuando el paciente se encuentra asintomático, en un estudio rutinario, ya que en el hemograma por regla general se encuentran más de $30 \times 10^9/L$ leucocitos y es frecuente encontrar cifras superiores a $100 \times 10^9/L$. La anemia puede no existir y cuando se presenta suele ser moderada (menos de 10% de los pacientes requiere transfusiones inmediatamente después de realizado el diagnóstico); las plaquetas suelen estar aumentadas en la mitad de los casos y la

trombocitopenia al momento del diagnóstico es excepcional. Los síntomas más frecuentes

al diagnóstico se muestran en la tabla 13-2.

Tabla 13-2. Síntomas frecuentes en Leucemia granulocítica crónica

Síntoma	%
Debilidad	50-55
Hiporexia	35-40
Pérdida de peso	35-40
Molestias abdominales	30-35

En la exploración física se encuentra esplenomegalia en 95% de los enfermos y hepatomegalia aproximadamente en la mitad; es común la adenomegalia moderada. La púrpura o fiebre se reconocen en menos de una cuarta parte de los casos.

2.4. Diagnóstico

El diagnóstico se basa principalmente en los hallazgos del hemograma. Cuando la leucocitosis de causa no explicada, la proliferación de formas jóvenes de la serie mieloide, la trombocitosis, etc. se asocian con esplenomegalia, las posibilidades diagnósticas diferenciales son escasas. En ocasiones, las infecciones crónicas como la tuberculosis (en especial en ancianos), los tumores que invaden médula ósea o infecciones agudas pueden simular la enfermedad. La vigilancia adecuada y el estudio integral del individuo suelen ser suficientes para aclarar el diagnóstico. En casos de duda se puede recurrir a la determinación del Ph1, o bien de los niveles de fosfatasa alcalina leucocitaria y de vitamina B₁₂ sérica. La investigación del gen quimérico BCR/ABL empleando hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), tienen mayor sensibilidad que la investigación del Ph1 por medio de citogenética convencional, tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la enfermedad. La mielofibrosis primaria con metaplasia mieloide agnogénica, suele ser el diagnóstico diferencial más difícil de precisar, ya que a menudo cursa con gran esplenomegalia y leucocitosis. Sin embargo, la biopsia de médula ósea que demuestra fibrosis, así como una gran esplenomegalia no proporcional a la leucocitosis moderada en pacientes usualmente mayores de 50 años, son datos que permiten aclarar el diagnóstico.

2.5. Curso, tratamiento y pronóstico

Una vez que se detecta la enfermedad en forma clínica tiene una duración de aproximadamente 3 a 4 años. La enfermedad al inicio se mantiene estable y responde en forma adecuada y rápida al tratamiento (fase crónica) después de algunos años la respuesta es errática y la enfermedad se torna más agresiva y resistente (fase acelerada) para posteriormente en un lapso menor a un año transformarse en una enfermedad aguda con la presencia de numerosos blastos (más del 20%) que finalmente termina con la vida del enfermo (fase o crisis blástica). A veces existen otros cambios diferentes a los señalados; sin embargo, la mayoría de los sujetos mueren en esta fase por "crisis blástica". El tratamiento difícilmente cambia el destino del paciente; es muy probable que prolongue la vida en muchos casos y en definitiva mejora la calidad de ésta, por lo que siempre es recomendable. Un medicamento que se usaba es el agente alquilante conocido como busulfán; cada vez se usa menos por sus efectos adversos, aun cuando tiene la ventaja de su costo accesible; en un lapso variable entre dos y seis semanas se observa respuesta favorable en la mayoría de los casos tratados con este fármaco, lo que permite reducir o en muchas ocasiones suspender el tratamiento por períodos variables.

Los criterios utilizados para considerar a un enfermo con LGC en remisión clínica son los siguientes: (a) desaparición de síntomas, (b) ausencia de visceromegalia, (c) hemoglobina superior a 10 g/dL y (d) recuento leucocitario menor de 15 x 10⁹/L.

Otro medicamento que puede utilizarse es la hidroxiurea u otro agente alquilante como el melfalán, con resultados similares. En la

actualidad, muchos hematólogos prefieren utilizar hidroxurea, ya que la respuesta es más rápida y la toxicidad, menor y predecible. Otra opción terapéutica es el uso de una proteína humana recombinante denominada interferón alfa ($\text{rhIFN}\alpha$). Este producto, obtenido por medio de ingeniería genética, es capaz de mantener la remisión de la enfermedad y reducir la cantidad de células Ph1 positivas. Se utiliza a razón de 5 millones de unidades/ m^2 /día; algunos enfermos requieren dosis mayores o menores; tiene como inconveniente su alto costo, que se aplica en inyección subcutánea por tiempo prolongado y que puede causar efectos colaterales como fiebre, astenia, cefalea y dolor óseo. El $\text{IFN}\alpha$ en la actualidad es considerado el mejor tratamiento y puede combinarse con quimioterapia como la hidroxurea o mejor aún con arabinósido de citosina para potenciar su efecto. Esta es la única terapia que prolonga la fase crónica y la supervivencia, lo que es especialmente cierto en aquellos pacientes en los cuales se obtiene la remisión citogenética de la enfermedad. El mesilato de imatinib (STI-571) es un producto que inhibe selectivamente el crecimiento del clon Ph1; es el primer ejemplo de éxito de la terapia molecular del cáncer y en muchos sitios es el tratamiento de elección en pacientes con LGC; un inconveniente es su costo sumamente elevado. Sólo los pacientes con Ph1 responden al tratamiento con mesilato de imatinib.

El trasplante de médula ósea es la única opción verdaderamente curativa en esta enfermedad; sin embargo, su costo, la necesidad de un donante HLA idéntico, la enfermedad del injerto contra el huésped y la edad avanzada de muchos pacientes limitan la aplicación frecuente de esta modalidad de tratamiento. Si se reúnen las condiciones ideales, es la mejor opción terapéutica para los enfermos menores de 55 años que no obtienen o mantienen la remisión citogenética con el $\text{IFN}\alpha$. Los métodos modernos de acondicionamiento no mieloablativo para llevar a cabo el trasplante de médula ósea han permitido abaratar los costos y hacer el procedimiento en pacientes de mayor edad o debilitados. En México, el costo del tratamiento con imatinib durante seis meses es igual al costo de un trasplante de médula ósea, si se emplea un esquema de acondicionamiento no mieloablativo (mini-trasplante).

2.6. Pronóstico

Depende del tiempo de evolución antes del

diagnóstico y de la clasificación clínica de la entidad, ya que las variantes atípicas de ésta suelen tener un pronóstico peor. La llamada "variedad juvenil" es muy agresiva y presenta características clínicas atípicas como lesiones en piel, gran organomegalia y respuesta pobre al tratamiento. Hay individuos con supervivencias mayores a 10 años y quizá esto se deba a desaparición por reducción máxima del clon celular Ph1; sin embargo, la supervivencia habitual oscila entre los 3 y 4 años a partir del momento del diagnóstico si el paciente recibe sólo quimioterapia y mejora sensiblemente en aquellos pacientes que responden a $\text{IFN}\alpha$ o quienes reciben trasplante de médula ósea.

3. POLICITEMIA VERA

La PV, también llamada policitemia rubra vera o panmielosis, es una entidad proliferativa de la CPH, de inicio insidioso, curso crónico y causa desconocida. Está caracterizada por la proliferación excesiva y sostenida de células eritroides, granulocíticas y megacariocíticas en la médula ósea. La médula ósea es hiperplásica y su crecimiento no es secundario a ningún estímulo medular reconocido. La PV es una enfermedad clonal que se origina en la CPH; aproximadamente 25% de los sujetos con PV tiene una anomalía cromosómica reproducible y ha sido posible demostrar en algunos enfermos la presencia constante de esta anomalía en las células de las líneas hemopoyéticas mayores pero no en los tejidos no hemopoyéticos.

3.1. Patogenia

La anomalía fundamental es la hiperplasia de los precursores de glóbulos rojos, granulocitos y plaquetas en la médula ósea; como resultado de ello, hay producción excesiva de estas células y por tanto, aumento de su número en la sangre periférica. La sobreproducción de glóbulos rojos incrementa su cifra total en el cuerpo, de manera que el volumen eritrocítico está aumentado.

3.2. Epidemiología

La PV es un padecimiento raro en mexicanos; los escasos pacientes que hay tienen ancestros extranjeros, casi siempre caucásicos. Esto es confirmado por Ruiz-Argüelles y colaboradores quienes encontraron solamente 3 casos en una población de 8069 pacientes estudiados de junio de 1983 a marzo de 2001, lo que representa el 0.37%.

3.3. Datos clínicos

La PV es una enfermedad con numerosas manifestaciones. Los datos clínicos pueden relacionarse con las anormalidades cuantitativas o cualitativas de alguna de las tres series: roja, mielóide y plaquetaria. Es posible atribuir los síntomas y signos en gran parte al aumento de espacio vascular y volumen sanguíneo y a la lentitud del flujo de la sangre como resultado del aumento de la viscosidad de ésta. La PV es una entidad de las edades media y adulta; la mayoría de los casos se presenta entre los 40 y 70 años, con inicio más frecuente alrededor de los 50 años. Los varones padecen la entidad un poco más que las mujeres. Los síntomas son causados, principalmente, por el volumen sanguíneo aumentado y por las complicaciones trombóticas y hemorrágicas. El inicio puede ser insidioso y en ocasiones el diagnóstico se sospecha cuando el hemograma muestra hematocrito elevado. En algunos casos, el padecimiento sólo se diagnostica luego de que ocurre una complicación notable como hemorragia o trombosis. Los síntomas son inespecíficos y pueden referirse a cualquier órgano o sistema. La mayoría se relaciona con alteraciones circulatorias que resultan del aumento del volumen eritrocitario (VE). La hipervolemia e hiperviscosidad resultantes causan distensión vascular, alteración en el flujo sanguíneo e hipoxia tisular. La cefalea y los mareos son quejas frecuentes; también se presentan síncope, pérdida de memoria, incapacidad para concentrarse e irritabilidad. Los procesos vasculares cerebrales constituyen complicaciones importantes y pueden ser causa de muerte. Los síntomas cardiovasculares son habituales, siendo la disnea el más común. Los síntomas gastrointestinales son frecuentes: plenitud, sed, meteorismo y estreñimiento, además de úlcera péptica, hemorragia y trombosis. El dolor abdominal puede provenir de úlcera, crecimiento o infarto esplénico o bien trombosis mesentérica. La esplenomegalia se presenta en dos terceras partes de los enfermos. Junto con la esplenomegalia, los datos más sobresalientes en la exploración física son color rojo de piel y membranas mucosas, congestión de vasos conjuntivales e ingurgitación de venas de la retina. El color rojo de piel y mucosas es un dato notable en la mayoría de los pacientes; es más prominente

en la cara, especialmente en mejillas, oídos, labios y nariz pero también se nota en manos y pies, aunque en menor grado. La piel típicamente es de color rojo ladrillo, a menudo con un tinte cianótico que se marca más en la época de frío. Las complicaciones trombóticas se presentan en 30% de los enfermos y son causa importante de morbimortalidad.

3.4. Estudios de laboratorio

El dato más importante de la PV es el aumento en el VE. Conforme la enfermedad avanza, van apareciendo anisocitosis y poiquilocitosis que llegan a ser muy acentuadas, junto con presencia de ovalocitos, eliptocitos y formas en lágrima. Un dato muy importante es que aparecen eritroblastos en circulación. La leucocitosis es frecuente en cifras de 12 a 20 x 10⁹/L pero ocasionalmente puede llegar a 50 x 10⁹/L. En la gran mayoría de los casos, la fosfatasa alcalina de los leucocitos está aumentada, al igual que el número de plaquetas, 500 a 1.000 x 10⁹/L; en ocasiones se han informado marcadas como 3.000 a 6.000 x 10⁹/L.

Se han encontrado anormalidades cromosómicas; las más frecuentes son deleción del brazo largo del cromosoma 5 (5q-), ganancia de un 8 ó 9 y deleción del brazo largo del 20. La vitamina B₁₂ y la capacidad de fijación de la misma están aumentadas en muchos pacientes con PV no controlada. La necesidad de estudiar la médula ósea en la PV es controversial; algunos autores piensan que es determinante para efectuar el diagnóstico; otros dicen que no lo es. Casi siempre la médula ósea es hiper celular pero se ha informado como normal. Las tres series están hiperplásicas y reemplazan la grasa medular. Se han comunicado ligeros aumentos de reticulina o fibrosis o ambas.

3.5. Diagnóstico

En enfermos con valores elevados de las tres líneas celulares en sangre periférica, con esplenomegalia y sin datos que sugieran policitemia secundaria, es fácil hacer el diagnóstico de PV. Como no siempre es así, el Grupo de Estudio de PV desarrolló un conjunto de criterios diagnósticos (tabla 13-3).

Tabla 13-3. Criterios diagnósticos de policitemia vera

Criterios mayores	Criterios menores
Volumen eritrocítico: Varón: más de 36 ml/kg Mujer: más de 32 ml/kg Saturación arterial O ₂ igual o mayor de 92% Esplenomegalia	Trombocitosis mayor de 400 x10 ⁹ /L Leucocitosis: más de 12 x10 ⁹ /L FAL mayor de 100 B ₁₂ sérica mayor de lo normal y CLFB12 mayor de lo normal

FAL, fosfatasa alcalina de los leucocitos; CLFB12, capacidad libre de fijación de B₁₂.
 Se establece el diagnóstico si los tres criterios mayores están presentes o bien los dos primeros criterios mayores junto con dos menores.

3.6. Tratamiento

El objetivo de la terapéutica es reducir los volúmenes eritrocítico y sanguíneo por medios que: (a) tengan la menor posibilidad de dañar; (b) permitan la mayor supervivencia; (c) permitan una vida normal y (d) sean los menos costosos y no generen problemas al enfermo. Se han utilizado flebotomía, radiación y quimioterapia. Al momento del diagnóstico deben hacerse flebotomías para llevar los volúmenes eritrocítico y sanguíneo a lo normal lo más rápidamente posible, a fin de eliminar los síntomas del paciente. Se pueden efectuar flebotomías cada tres días hasta obtener hematocrito normal. Cuando hay trombocitosis grave, el mejor agente es anagrelide pero es caro. La hidroxiurea y el IFN α recombinante son también útiles en el tratamiento de los pacientes con PV y tienen menos efectos adversos que el fósforo radioactivo y el busulfán; ambos fármacos abaten las cuentas de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La hidroxiurea es mejor tolerada por los pacientes y más barata que el interferón. Se pueden emplear otros agentes mielosupresores como el fósforo radiactivo (32p), pero varios estudios han demostrado que el 32p que puede ser leucemogénico. La esplenectomía puede ser útil en las etapas tardías de la enfermedad.

4. TROMBOCITOSIS PRIMARIA

La TP también ha recibido los nombres de trombocitemia primaria, trombocitemia esencial, hemorrágica o idiopática; el padecimiento es clonal y es el prototipo de la trombocitosis autónoma.

4.1. Patogenia

Son característicos del padecimiento la

trombocitosis, el aumento de megacariocitos, del volumen megacariocítico total y del volumen medio megacariocítico. La producción de plaquetas puede ser incluso 15 veces mayor de lo normal. Se producen trombosis por el incremento del volumen plaquetario, aunado a una anomalía cualitativa de las plaquetas que las hace hiperagregables. La TE, aunque es un padecimiento raro, es más frecuente en México que la PV.

4.2. Datos clínicos

La TP es un padecimiento de la edad adulta, entre los 50 y 70 años, aunque puede observarse de los 21 a los 84 años de edad, siendo la mediana de la edad de presentación 61 años. Es ligeramente más frecuente en la mujer. El dato clínico más importante es la hemorragia y los síntomas que sugieren isquemia del sistema nervioso central e isquemia vascular periférica. Otros datos clínicos son: debilidad, cefalea, parestesias, mareos, alteraciones visuales y prurito. La manifestación vasoclusiva más característica es el síndrome de eritromelalgia en el que hay dolor localizado tipo quemadura, enrojecimiento y aumento de la temperatura en las porciones distales de las extremidades, que puede progresar a cianosis o necrosis de los dedos de pies o manos.

4.3. Estudios de laboratorio

El dato sobresaliente es el incremento en el recuento plaquetario, ya que habitualmente las plaquetas pasan de un millón 1 (1.000x10⁹/L); se han llegado a informar valores tan altos como 14.000x10⁹/L. Hay aumento de micro y de macroplaquetas, lo que refleja megacariocitopoyesis defectuosa. La leucocitosis casi nunca es mayor de 30x10⁹/L y la anemia es leve. En la médula ósea hay

aumento en la abundancia celular con acentuada hiperplasia megacariocítica. El cromosoma Philadelphia debe ser negativo. En ocasiones, es difícil establecer un diagnóstico inequívoco

de TP. De acuerdo con lo anterior, el diagnóstico de esta enfermedad es de exclusión y esto se logra si se cumplen los criterios que se indican en la tabla 13-4.

Tabla 13-4. Criterios diagnósticos de trombocitosis primaria

Recuento plaquetario mayor de $600 \times 10^9/L$.
Hemoglobina normal o volumen eritrocítico normal.
Presencia de hemosiderina en médula ósea o falta de respuesta a tratamiento con hierro.
Ausencia de cromosoma Philadelphia.
Fibrosis del colágeno de la médula ósea: ausente o menor a un tercio de la biopsia.
Sin causa de trombocitosis reactiva.

4.4. Tratamiento

Los pacientes con manifestaciones hemorrágicas o vasoclusivas deben tratarse inmediatamente con agentes mielosupresores para disminuir el recuento plaquetario y con antiplaquetarios. Si el sujeto está asintomático y tiene trombocitemia leve, la enfermedad puede seguir un curso benigno y no se requiere tratamiento. Los pacientes con TP pueden catalogarse en alto o bajo riesgo; los siguientes datos se asocian con alto riesgo: historia de trombosis o hemorragia, edad mayor de 60 años o recuento plaquetario mayor de $1\,000 \times 10^9/L$ (un millón de plaquetas). Los pacientes de alto riesgo deben recibir mielosupresión, en tanto que aquéllos con riesgo bajo pueden ser tratados con agentes antiplaquetarios como la aspirina. Es muy probable que el tratamiento de elección en TP en la actualidad sea el anagrelide, fármaco que además de inhibir la adhesividad y agregación plaquetarias, inhibe la trombopoyesis y es muy bien tolerado; su inconveniente es el costo alto. Otros mielosupresores como los alquilantes (melfalán, busulfán, etc.) pueden ser de utilidad. Si se requiere una reducción inmediata del recuento plaquetario, por ejemplo, en una hemorragia grave o antes de un procedimiento quirúrgico, debe efectuarse plaquetaféresis. El uso de agentes alquilantes produce la misma preocupación que en el caso de la PV, ya que pueden presentarse leucemia aguda y neoplasias gastrointestinales, sobre todo si se

utilizan en forma continua. También se han usado hidroxiurea e $\text{rhIFN-}\alpha$, los que no producen neoplasias secundarias. Igualmente se ha utilizado el pipobromán en pacientes de alto riesgo y la cuenta de plaquetas se ha reducido a menos de $600 \times 10^9/L$ y en muchos casos a menos de $400 \times 10^9/L$. Su bajo riesgo para trombosis, leucemia aguda y tumores sólidos lo cataloga como un tratamiento adecuado. La esplenectomía está contraindicada en este padecimiento.

5. MIELOFIBROSIS CON METAPLASIA MIELOIDE AGNOGÉNICA

Ha recibido nombres diferentes y los más comunes son osteoesclerosis, mielosis crónica no leucémica y otros. La MF/MMA está caracterizada por aparición y crecimiento de células mieloides en tejidos en que no se encuentran normalmente las células hemopoyéticas en el adulto. Tal hemopoyesis extramedular casi siempre se asocia con fibrosis de médula ósea, que muy a menudo se ha desarrollado en ausencia de causa evidente. Es por esto que los nombres más comúnmente utilizados para designar al padecimiento son mielofibrosis y metaplasia mieloide agnogénica. Parece que la MF / MMA, que daña la cavidad medular, trata de compensarse con hematopoyesis extramedular, siendo ésta la metaplasia mieloide agnogénica (MMA). Existen formas de MF / MMA secundarias a otros padecimientos mieloproliferativos,

incluyendo a algunas leucemias agudas como la leucemia aguda megacarioblástica (LMA, M7 según FAB). No se conoce la causa de la MF / MMA. Muchos casos suponen proliferación clonal de una célula troncal mieloide anormal pero "restringida". Como el tejido colágeno no es clonal, se ha especulado que la fibrosis es probablemente reactiva a la proliferación clonal de precursores granulocíticos y trombocíticos y se ha señalado que algunas sustancias producidas por estas células como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es en parte el responsable de la proliferación anormal del colágeno en la cavidad medular.

5.1. Patogénesis

Los estudios cromosómicos de colonias de células progenitoras hemopoyéticas han establecido que una anomalía citogenética clonal está presente en normoblastos, neutrófilos, macrófagos, basófilos y megacariocitos pero no en el tejido fibroso. Al inicio puede haber mielodisplasia o es posible que aparezca más tarde como un proceso patogénico dominante y lleve a granulocitopenia o trombocitopenia. A menudo se encuentra anemia que resulta de la combinación de eritropoyesis ineficaz, supervivencia acortada del glóbulo rojo y efectos de la esplenomegalia masiva sobre la distribución de los eritrocitos en la circulación. En algunos casos, la hemólisis puede constituir un factor importante.

5.2. Epidemiología

No se conoce con exactitud la incidencia de la MF/ MMA pero es posible que sea de entre 0.2 y dos pacientes/100.000 habitantes. Se considera mucho más frecuente en sujetos de raza blanca que en las poblaciones negra, japonesa o mexicana. La incidencia en varones y mujeres es aproximadamente igual. Es un padecimiento de la edad adulta y la vejez; la mediana al diagnóstico es aproximadamente de 60 años, aunque también se han informado casos en niños.

5.3. Datos clínicos

En los pacientes jóvenes, el curso casi siempre es más agresivo que en los adultos. Alrededor de 25% de los casos está asintomático al momento del diagnóstico, el cual se efectúa gracias al examen médico realizado por otra causa. En los pacientes sintomáticos se encuentran quejas inespecíficas como fatiga,

debilidad, disnea y palpitaciones. Puede haber pérdida de peso, pero es poco frecuente hallar anorexia y diaforesis profusa nocturna. También es posible que exista dolor en el cuadrante superior izquierdo del abdomen y plenitud posprandial inmediata. En unos cuantos enfermos, puede haber hemorragia caracterizada por equimosis fáciles. Es posible que el dolor óseo sea intenso, sobre todo en los miembros pélvicos. La esplenomegalia está presente casi en todos los pacientes al momento del diagnóstico. En una tercera parte, la esplenomegalia es leve; en otro tercio, el crecimiento es moderado y en el tercio restante, el incremento es marcado al grado que el borde inferior del bazo llega a la espina iliaca y el borde derecho cruza la línea media. Se encuentra hepatomegalia en dos tercios de los casos.

5.4. Estudios de laboratorio

La anemia está presente en la mayoría de los enfermos al momento del diagnóstico; en general, es leve a moderada al inicio y se acentúa más conforme la enfermedad progresa. El hallazgo típico del padecimiento es la presencia de eritrocitos en forma de lágrima y de eritroblastos. También se observan células fragmentadas, codocitos y con basofilia difusa. Los reticulocitos están un poco aumentados pero pueden presentar gran variación aun en un mismo caso. La supervivencia eritrocítica está acortada en casi todos los pacientes y esto origina que la bilirrubina indirecta esté aumentada. También se ha informado aplasia pura de serie roja en algunos casos. No siempre es posible atribuir la anemia a producción disminuida en una médula fibrótica. El recuento total de leucocitos está aumentado a expensas de los granulocitos. Es infrecuente observar cifras mayores a $50 \times 10^9/L$. En todos los pacientes se encuentran promielocitos y mielocitos y también una baja proporción de blastos. Es posible encontrar hipersegmentación, hiposegmentación (anomalía adquirida de Pelger-Huet) y granulación anormal en los neutrófilos. La MF / MMA constituye una de las causas de leucoeritroblastosis o anemia leucoeritroblástica. En la sangre periférica siempre se encuentran eritroblastos y granulocitos jóvenes, aunque sea en pequeña cantidad. Las plaquetas están aumentadas en una tercera parte o incluso en la mitad de los enfermos al momento del diagnóstico, pero conforme la enfermedad avanza va apareciendo trombocitopenia. Generalmente no se obtiene muestra cuando se aspira la médula ósea. Es necesario realizar biopsia medular para poder

demostrar la fibrosis. La tinción con plata demuestra de manera invariable la presencia de fibras de reticulina y en la mitad de los casos se encuentra gran aumento de tales fibras. No existe el mismo grado de fibrosis en toda la médula ósea. La anormalidad cromosómica más

frecuente es la trisomía del cromosoma 8, seguida en orden decreciente por trisomía del 9 y monosomía parcial o completa del 7. El diagnóstico de MF / MMA debe hacerse con base en los siguientes criterios mostrados en la tabla 13-5.

Tabla 13-5. Criterios diagnósticos de Mielofibrosis con metaplasia mieloide agnogénica

Esplenomegalia
Leucoeritroblastosis en sangre periférica
Presencia acentuada de poiquilocitos en forma de lágrima o de gota (dacriocitos) en sangre periférica
Fibrosis en la biopsia de hueso

5.5. Tratamiento

El tratamiento debe ser de apoyo y debe dirigirse a las complicaciones específicas. Muchos pacientes no necesitan tratamiento por períodos prolongados. Las principales indicaciones de la esplenectomía son esplenomegalia dolorosa por infartos esplénicos repetidos, trombocitopenia refractaria, anemia hemolítica refractaria e hipertensión portal. Algunos autores han sugerido que debe hacerse esplenectomía a todos los pacientes en cuanto se establece el diagnóstico de MF / MMA. El clorhidrato de anagrelide es una presentación oral de un derivado de imidazoquinazolina con actividad trombocitopénica en los humanos. Se ha demostrado que la droga es efectiva para disminuir las cuenta de plaquetas, interfiriendo con la maduración de los megacariocitos. El anagrelide administrado por vía oral abate las cuentas plaquetarias sin causar disminución significativa de los glóbulos blancos ni de los eritrocitos. La anemia puede mejorar con el empleo de eritropoyetina humana recombinante; si se debe principalmente a disminución en la producción eritrocítica, pueden utilizarse andrógenos. Cuando se demuestra que la anemia es hemolítica, está justificado administrar prednisona. La hidroxurea reduce el tamaño del hígado y del bazo y disminuye los recuentos de leucocitos y plaquetas, así como el grado de fibrosis medular, pero no mejora la anemia. También se han usado interferón alfa humano recombinante, busulfán y fósforo radiactivo, con efectos indeseables más frecuentes y graves. El trasplante de médula

ósea, cuando es posible, logra la remisión del padecimiento y la desaparición de la mielofibrosis.

LECTURAS SUGERIDAS

Del Cañizo, M.C., Orfao, A., Vidriales, B., López-Berges, M.C., San-Miguel, J.F., Ruiz-Argüelles, G.J. "Leucemias agudas megacarioblásticas". *Sangre (Barc)* 1993; 38:167-70.

Devine, S.M., Hoffman, R., Verma, A., Shah, R., Bradlow, B.A., Stock, W. *et al.* "Allogeneic blood cell transplantation following reduced-intensity conditioning is effective therapy for older patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia". *Blood* 2002; 99:2255-8.

Gilbert, H.S. "Current management in polycythemia vera". *Sem Hematol* 2001;38(Suppl 2): 25-8

Gilbert, H.S. "Diagnosis and treatment of thrombocytopenia in myeloproliferative disorders". *Oncology* 2001;15:989-96.

Gómez-Almaguer, D. "Leucemias crónicas" En **Fundamentos de Hematología**, Ruiz-Argüelles, G.J. (ed.), Editorial Médica Panamericana. Ciudad de México, 2003. pp. 261-278.

Guillhot, F., Chastang, C., Michallet, M. *et al.* "Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia". *N Engl J Med* 1997;337:223-229.

Labardini-Méndez, J. "Padecimientos mieloproliferativos crónicos y mielofibrosis" En **Fundamentos de Hematología**, Ruiz-Argüelles, G.J. (ed.), Editorial Médica Panamericana. Ciudad de México, 2003. pp. 246-260.

Lichtman, M.A. "Agnogenic myeloid metaplasia" In **Hematology**. Williams (ed.) Sixth Ed. New York. McGraw-Hill, 2001;1125-36.

Murphy, S., Lland, H. *et al.* "Essential thrombocythemia: an interim report from the Polycythemia Vera Study Group". *Sem Hematol* 1986;23:177-82.

Ozer, H. "Biotherapy of chronic myelogenous leukemia with interferon". *Semin Oncol* 1988;15:14-20.

Parker, L.S. "Thrombocytosis" In **Wintrobe's Clinical Hematology**. Tenth Ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 1999;1648-60.

Ruiz-Argüelles, G.J., Marín-López, A., Lobato-Mendizábal, E., Gamboa-Ojeda, I., Sánchez-Anzaldo, F.J. "El cromosoma Philadelphia lesiona la célula totipotencial: Trombocitosis primaria t (9q+22q-)". *Rev Invest Clin (Méx)* 1984; 36:49-51.

Ruiz-Argüelles, G.J., Marín-López, A., Lobato-Mendizábal, E., Ruiz-Argüelles, A., Nichols, W.L., Katzmann, J.A. "Acute megakaryoblastic leukemia: A prospective study of its identification and treatment". *Brit J Haematol* 1986; 62:55-63.

Ruiz-Argüelles, G.J., López-Martínez, B., Ramírez-Cabrera, J.M., Reyes-Nuñez, V., Rodríguez-Cedeño, H., Garcés-Eisele, J. "Molecular monitoring of the treatment of patients with *BCR/ABL* (+) chronic myelogenous leukemia". *Rev Invest Clin Méx* 2001; 53:235-239.

Ruiz-Argüelles, G.J., López-Martínez, B., Lobato-Mendizábal, E., Ruiz-Delgado, G.J. "An addition to geographic hematology: Chronic myeloproliferative diseases are infrequent in Mexican Mestizos". *Int J Hematol*, 2002, 75:499-502.

Ruiz-Argüelles, G.J., Ruiz-Delgado, G.J., Gómez-Almaguer, D. "Algunas consideraciones sobre el tratamiento actual de la leucemia granulocítica crónica". *Revista Hematol* 2002; 2:114-116.

Ruiz-Argüelles, G.J. "Foro Clínico: El efecto de injerto contra tumor en leucemia granulocítica crónica". *Rev Invest Clin Mex* 2002, 54:154-160.

Ruiz-Argüelles, G.J. "What is the dose of STI-571 needed to induce a molecular remission in chronic myeloid leukemia". *Haematologica* 2002; 87: ELT15.

Ruiz-Argüelles, G.J., Gómez-Almaguer, D., López-Martínez, B., Cantú-Rodríguez, O.G., Jaime-Pérez, J.C., González-Llano, O. "Results of an allogeneic non-myeloablative stem cell transplantation program in patients with chronic myelogenous leukemia". *Haematologica* 2002; 87: 894-896.

Schafer, A.I. "Thrombocytosis and essential thrombocythemia" In **Hematology**. Williams (ed.) Sixth Ed. New York. Mc Graw-Hill. 2002;1541-9.

Silverstein, M.N., ReMine, W.H. "Splenectomy in myeloid metaplasia". *Blood* 1979;53: 515-18.

Talpaz, M., Kurzrock, R. *et al.* "Recent advances in the therapy of chronic myelogenous leukemia". *Important Adv Oncol* 1988; 297-321.

Tefferi, A. "Chronic myeloid disorders: Classification and treatment overview". *Sem Hematol* 2001;38(Suppl 2):1-4.

Tefferi, A., Silverstein, M.N. "Myeloproliferative disorders and Myelodysplastic Syndromes". In **Hematology 1997**, Education Program, American Society of Hematology. San Diego, CA. December 5-9, 1997;166-176.

SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS

Pablo Bertin C-M., Mauricio Ocqueteau T., Alejandro Majlis L. y Carmen Salgado M.

1. Introducción

Leucemia linfática crónica

1. Introducción

2. Fisiopatología

3. Clínica

4. Laboratorio

5. Tratamiento

- 5.1. Tratamiento según estados de la clasificación de Rai y Binet
- 5.2. Estrategias terapéuticas
- 5.3. Criterios de respuesta a tratamiento

Linfomas

Linfoma de Hodgkin

1. Introducción

2. Patología

3. Etapificación

4. Tratamiento

- 4.1. Tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, etapa precoz
- 4.2. Tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, etapa avanzada

5. Valoración de las masas residuales en la enfermedad de Hodgkin

Linfomas no Hodgkin del adulto

1. Introducción

2. Patogenia

3. Patología

4. Historia Natural

- 4.1. Linfomas de bajo grado
- 4.2. Linfomas de grado intermedio
- 4.3. Linfomas de alto grado

5. Diagnóstico

- 5.1. Anatomía patológica
- 5.2. Citogenética, biología molecular y citometría de flujo

6. Diagnóstico de extensión

7. Tratamiento

- 7.1. Manejo de los linfomas de bajo grado (LBG)
- 7.2. Manejo de los linfomas de grado intermedio
- 7.3. Manejo de los linfomas de alto grado

Linfoma no Hodgkin Pediátrico

1. Introducción

2. Epidemiología

3. Etiología

4. Clasificación

5. Clínica

6. Diagnóstico y etapificación

7. Factores pronósticos

8. Tratamiento

- 8.1. Terapia de apoyo
- 8.2. Tratamiento específico

Gammopatías monoclonales

1. Introducción

2. Estudio inmunológico de las gammopatías monoclonales

- 2.1. Pesquisa de una proteína monoclonal
- 2.2. Identificación de una proteína monoclonal
- 2.3. Cuantificación de inmunoglobulinas
- 2.4. Viscosidad sérica
- 2.5. Beta-2 microglobulina
- 2.6. Proteína C reactiva
- 2.7. Interleuquina-6
- 2.8. Estudios inmunológicos en orina

3. Gammapatía monoclonal de significado incierto

- 3.1. Aspectos generales
- 3.2. Evolución de las MGUS en el tiempo

4. Mieloma múltiple

- 4.1. Conceptos preliminares
 - a) Incidencia
 - b) Patogenia
 - c) Manifestaciones clínicas
 - d) Pronóstico

5. Variedades infrecuentes de mieloma múltiple y otras gammapatías

- 5.1. Mieloma "indolente"
- 5.2. Leucemia de células plasmáticas
- 5.3. Mieloma osteoesclerótico
- 5.4. Plasmocitoma extramedular
- 5.5. Plasmocitoma óseo solitario
- 5.6. Macroglobulinemia de Waldenstrom (MW)
- 5.7. Enfermedad de cadenas livianas
- 5.8. Amiloidosis primaria
- 5.9. Enfermedad por cadenas pesadas

6. Diagnóstico diferencial entre MGUS y MM

7. Tratamiento

- 7.1. Terapia de apoyo
- 7.2. Tratamiento citotóxico

RESUMEN

La leucemia linfática crónica (LLC), los linfomas, y las gammapatías monoclonales malignas (GMM), son incluidas en los síndromes linfoproliferativos.

En este capítulo se describen los avances en fisiopatología y diagnóstico. El tratamiento solo es planteado en términos generales, pues no es el propósito de este libro.

INTRODUCCIÓN

Los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) incluyen una variedad de enfermedades: leucemia linfática crónica (LLC), linfomas, y mieloma múltiple y otras gammapatías monoclonales.

En los últimos años se han realizado importantes avances en fisiopatología y diagnóstico de estas enfermedades. El diagnóstico junto con considerar las manifestaciones clínicas, requiere de la citología e inmunofenotipo, y en algunos casos del estudio citogenético y molecular.

Este capítulo revisa los aspectos más relevantes de la fisiopatología de cada una de estos SLPC, como también las estrategias diagnósticas. Respecto a los aspectos metodológicos de las pruebas de laboratorio utilizadas en diagnóstico se recomienda revisar el capítulo 30.

LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

Pablo Bertin C-M.

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfática crónica (LLC) es una neoplasia monoclonal de linfocitos B que expresan CD5, que se caracteriza por la acumulación de estos linfocitos en los tejidos linfáticos, hematopoyéticos y en sangre periférica. Es la leucemia más frecuente en el mundo occidental. Afecta mayoritariamente al sexo masculino 2:1 y su incidencia aumenta notablemente sobre los 60 años.

La causa de LLC es desconocida. Se describe, a diferencia de otras leucemias, una tendencia familiar. No está asociada a radioterapia ni quimioterapia previa.

Su evolución es variable con sobrevida media entre 2 y 12 años, lo que ha permitido agrupar a los pacientes según factores pronósticos que permiten predecir el curso de la enfermedad.

A diferencia de otras neoplasias, su diagnóstico no siempre implica tratamiento. La necesidad de tratamiento se fundamenta en el estadio y los factores pronósticos. Hasta la fecha no hay tratamiento curativo para este tipo de leucemia, pero los tratamientos han evolucionado obteniéndose mayores porcentajes de remisión completa (RC) y prolongación de sobrevida en pacientes con enfermedad avanzada.

2. FISIOPATOLOGÍA

La LLC es una neoplasia de linfocitos morfológicamente maduros. En 95% de los casos es de estirpe B. Es la leucemia más frecuente en el mundo occidental (25-30% de los casos), al menos en países anglosajones. No hay datos confiables de incidencia en nuestro medio.

Es una enfermedad que habitualmente se presenta después de los 60 años y su frecuencia aumenta con la edad. Es rara en pacientes menores de 40 años.

No está asociada a radiación, quimioterapia o factores ambientales. Es una enfermedad caracterizada por acumulación de linfocitos más que por proliferación de éstos. Esto se relaciona

con alteración de la apoptosis y la expresión de BCL-2. La mayoría de las células se encuentran en la fase G0 del ciclo celular.

Es frecuente la asociación con fenómenos autoinmunes y de ellos los más frecuentes son la anemia hemolítica autoinmune y la trombocitopenia autoinmune que pueden aparecer en el curso de la evolución y estar ausentes al momento del diagnóstico.

El diagnóstico diferencial debe incluir a otros síndromes linfoproliferativos crónicos y en la actualidad el método de elección es la citometría de flujo que puede realizarse en médula ósea o sangre periférica.

Se han descrito múltiples alteraciones citogenéticas clonales siendo la más frecuente la delección 13q. La siguen en orden decreciente la delección 11q, trisomía 12, delección 17p, delección 6q y traslocaciones de 14q. Con los métodos de estudio actual se puede encontrar alteraciones citogenéticas clonales en 80% de los pacientes. El método recomendado es la técnica de FISH. El cariotipo es de poco rendimiento por la dificultad en obtener mitosis.

Estudios recientes han demostrado que la existencia o ausencia de mutaciones del gen VH de la cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) tienen carácter pronóstico. La ausencia de mutación en estos genes es considerada de mal pronóstico.

En estudios realizados por "microarrays" de DNA ha aparecido el nivel de expresión de ZAP-70 como pronóstico y esta expresión tiene una buena correlación con la presencia o ausencia de mutación del gen de cadena pesada de Ig, por lo tanto también tiene valor pronóstico.

3. CLÍNICA

En la actualidad un número importante de pacientes consulta antes de tener síntomas, habitualmente por hallazgo de linfocitosis en el hemograma solicitado por alguna enfermedad no relacionada. Los síntomas clásicos incluyen fatigabilidad, baja de peso e infecciones bacterianas recurrentes especialmente respiratorias.

Para formular el diagnóstico se requiere linfocitosis absoluta de 5000 x μ L persistente por más de un mes.

Los criterios diagnósticos aceptados por el grupo internacional de trabajo de LLC (1989) son los siguientes:

- a) Linfocitosis sobre 10.000 x μ L con linfocitos de aspecto maduro.
- b) Aspirado de médula ósea con más de 30% de linfocitos.
- c) Linfocitosis periférica que expresa fenotipo B consistente con LLC.

El diagnóstico se confirma si al criterio (a) se agrega el (b) o el (c). Si la linfocitosis es menor a 10.000/ μ L deben estar presentes los criterios (b) y (c).

El grupo de trabajo del "National Cancer Institute" (1996) recomienda los siguientes criterios diagnósticos:

- a) Linfocitosis mayor de 5000/ μ L con menos de 55% de las células atípicas; (i) las células deben expresar marcadores B con antígenos de diferenciación CD19, CD20, CD23 y CD5; (ii) expresar cadena liviana monoclonal y (iii) baja densidad de Ig de superficie.
- b) Aspirado de médula ósea con más de 30% de linfocitos.

Al examen físico es posible encontrar adenopatías, siempre debe evaluarse bilateralmente las zonas cervicales, supraclaviculares, axilares e inguinales. Debe pesquisarhepato o esplenomegalia.

Existen dos sistemas de etapificación para los pacientes que permiten con la evaluación física inicial más el hemograma asignarlos a un grupo determinado. Los sistemas de etapificación o estadios han tenido una gran utilidad en la evaluación de pacientes individuales para determinar progresión de enfermedad y respuesta al tratamiento. Sin embargo su mayor utilidad es que ha permitido evaluar el pronóstico y efectividad de tratamientos en pacientes que de otra manera serían muy heterogéneos. Estos dos sistemas son el de Rai que comprende 5 estadios y el de Binet que tiene 3 estadios. Posteriormente el de Rai fue revisado y se asignó 3 grupos de pacientes según riesgo. En la tabla 14-LLC-1 se muestra la clasificación de Rai original y modificada.

Tabla 14-LLC-1. Sistema de clasificación de Rai para la LLC

Estado	Clasificación	Descripción	Sobrevida	media (años)
0	Bajo riesgo	Linfocitosis		>10
I	Riesgo intermedio	Linfocitosis*, linfadenopatía		>8
II	Riesgo intermedio	Linfocitosis + esplenomegalia, Linfadenopatía	+/-	6
III	Alto riesgo	Linfocitosis + anemias	+/-	2
IV	Alto riesgo	Linfocitosis + trombocitopenia Anemia +/- esplenomegalia Linfadenopatías	+/- +/-	2

*Linfocitosis: recuento de linfocitos >5.000/ μ L.

Anemia: hemoglobina <11g/dL.

Trombocitopenia: plaquetas <100x10³/ μ L.

Una versión más simplificada que la original propuesta por Rai, es hoy en día aceptada por los investigadores y consta de tres grupos con diferencias significativas de sobrevida entre cada grupo, es la propuesta por Binet (tabla 14-LLC-2),

y se basa en el número de áreas comprometidas, el nivel de hemoglobina, y el recuento de plaquetas. Esta clasificación resulta ser más práctica para la evaluación de las decisiones clínicas.

Tabla 14-LLC-2. Sistema de clasificación de Binet para LLC

Estado	Recuentos sanguíneos	Áreas involucradas	Sobrevida media (años)
A	Hb >10 g/dL y plaquetas >100x10 ⁹ / μ L.	<3	>10
B	Hb >10 g/dL o plaquetas >100x10 ³ / μ L.	>3	7
C	Hb 10 g/dL o plaquetas <100x10 ³ / μ L o ambos.	Cualquier número	2

El curso de la enfermedad depende del estado y los factores pronósticos del paciente y la mayoría de los casos es estable o lento en los estados iniciales, sin embargo algunos casos no son predecibles, lo que ha motivado la búsqueda de otros factores pronósticos.

Es importante consignar en cada visita del paciente los síntomas y los hallazgos al examen físico con especial énfasis en cuanto a palidez, peso, adenopatías y visceromegalia.

4. LABORATORIO

Para plantear el diagnóstico de LLC históricamente los elementos más importantes han sido el hemograma con observación del frotis sanguíneo y la biopsia de médula ósea.

Basado en la morfología se describen tres tipos de LLC: (a) la forma típica tiene un 90% de células pequeñas, (b) la forma prolinfocítica tiene entre 11 y 54% de prolinfocitos y (c) la forma atípica con morfología heterogénea pero menos de 10% de prolinfocitos. A estos criterios, que mantienen su vigencia, se debe agregar la citometría de flujo (tabla 14-LLC-3) estudio citogenético por FISH β 2 microglobulina (β_2 m) y LDH. Deseable es agregar ZAP-70 como predictor de mutación de genes VH de la cadena pesada de Ig y CD38.

Entre los exámenes de imágenes son útiles la radiografía de tórax y la tomografía axial compuesta (TAC) o ecotomografía abdominal.

En casos especiales y con la sospecha

diagnóstica se debe obtener recuento de reticulocitos y prueba de Coombs. Es frecuente en estos pacientes la hipogammaglobulinemia por lo que deben medirse.

La biopsia de médula ósea puede mostrar infiltrado nodular, intersticial o difuso con sobrevidas medias de 90, 46 y 28 meses, respectivamente.

El tiempo de doblaje de linfocitos es útil tanto

del punto de vista pronóstico como referencia para el inicio de tratamiento. Si el tiempo de doblaje es inferior a un año debe considerarse inicio de tratamiento.

El nivel de β_2m es inversamente proporcional al pronóstico y de alguna manera traduce masa tumoral.

Tabla 14-LLC-3. Diagnóstico por citometría de flujo de síndromes linfoproliferativos crónicos B

	CD5	CD23	CD43	CD25	CD10	CD11c
LLC-B	+	+	+	-	-	+/-
LPL	-	-	+/-	-	-	-
LCEM	-	-	-	-	-	-
LCV	-	-	+	+	-	+
LCM	+	-	+	-	+/-	-
LCF	-	+/-	-	-	+/-	-

LLC-B, leucemia linfática crónica B. LPL, leucemia prolinfocítica. LCEM, linfoma células esplénicas marginales. LCV, leucemia células velludas. LMC, linfoma células del manto. LCF, linfoma folicular.

El estudio realizado por Dohner y colaboradores sobre las alteraciones citogenéticas más frecuentes en LLC (deleción 17p, deleción 11q, trisomía 12, cariotipo normal y deleción 13q), mostró medianas de sobrevida de 32, 79, 114, 111 y 133 meses, respectivamente.

Hasta la fecha no hay oncogenes específicos en LLC. Habitualmente hay sobre-expresión de *BCL-2* y raramente *BCL-3*. Las mutaciones de *P53* se asocian a progresión de la enfermedad. El estudio en pacientes con LLC familiar, y sus familiares no afectados hasta la fecha no ha demostrado genes de predisposición específicos.

5. TRATAMIENTO

El tratamiento en LLC varía desde la periódica observación clínica con tratamiento de episodios intercurrentes de complicaciones infecciosas, inmunológicas o hemorragias a una variedad de opciones terapéuticas que incluyen corticoesteroides, agentes alquilantes, análogos de las purinas, quimioterapia combinada, anticuerpos monoclonales y trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

LLC es una enfermedad hasta ahora no curable, se presenta en personas mayores y la mayoría de las veces su progresión es muy lenta por lo que, en general, su tratamiento es conservador. Los meta-análisis de estudios randomizados controlados no demuestran ventajas en la sobrevida en tratamiento precoz comparado a terapia diferida en pacientes con estados tempranos de la enfermedad como tampoco en el uso de quimioterapia combinada incorporando antraciclinas comparado a monoterapia con agentes alquilantes en pacientes con estados avanzados.

Una variedad de factores clínicos deben ser tomados en cuenta en pacientes en diferentes estados para decidir la necesidad de terapia. Entre ellos debemos tener presentes β_2m , tiempo de doblaje linfocitario, citogenética, CD38 y Zap-70.

Las complicaciones infecciosas bacterianas en la enfermedad avanzada se asocian a hipogammaglobulinemia. Las infecciones por Herpes Zoster son frecuentes. El diagnóstico temprano de infecciones permite un tratamiento oportuno lo cual incide en la sobrevida de los pacientes.

Las segundas neoplasias y las leucemias secundarias pueden ocurrir en un porcentaje pequeño de pacientes. La transformación a linfoma de células grande (Síndrome de Richter) empeora el pronóstico con supervivencia inferior a un año, un 20% de los pacientes tienen mejor supervivencia con quimioterapia combinada.

La anemia hemolítica y trombocitopenia autoinmune pueden ocurrir en pacientes con LLC en cualquier estado. Estos pacientes deben recibir esteroides en lo posible antes de la quimioterapia. Tratamientos alternativos incluyen gammaglobulina endovenosa, ciclosporina, esplenectomía e incluso radioterapia del bazo.

5.1. Tratamiento según estados de la clasificación de Rai y Binet

a) Pacientes estado 0 de Rai o A de Binet

Es el estado indolente, de bajo riesgo, por naturaleza. No está indicado el tratamiento. Meta-análisis de 6 estudios randomizados que comparan terapia inmediata versus terapia diferida con clorambucil no demuestran diferencias en la supervivencia a 10 años. Uno de ellos reporta aumento de neoplasias secundarias en los pacientes tratados. Aún no existen resultados con el uso de Fludarabina o anticuerpos monoclonales en este estado.

Si en este estado hay factores de mal pronóstico se debe vigilar a los pacientes en forma más frecuente para determinar progresión a otro estado y necesidad de tratamiento.

Pacientes estado I y II de Rai y B de Binet

La observación está indicada para los pacientes asintomáticos. En los pacientes con grandes adenopatías debe usarse hidratación y alopurinol para prevenir el síndrome de lisis tumoral (SLT) antes de comenzar quimioterapia. Entre estos últimos se utilizan:

- Agentes alquilantes orales (Clorambucil o Ciclofosfamida) con o sin corticoides.
- Análogos de las purinas: Fludarabina, 2 CDA o Pentostatina. El tratamiento con análogos de purinas está asociado a efectos tóxicos: infecciones en neutropenia, herpes. Anemia hemolítica y trombocitopenia persistente. Estos pacientes deben recibir profilaxis con trimetopim-sulfa y aciclovir durante la terapia y hasta 6 meses después de finalizada ésta.

- Quimioterapia combinada:

CVP: ciclofosfamida + vincristina + prednisona.

CHOP: ciclofosfamida + doxorubicina + vincristina + prednisona

Fludarabina + ciclofosfamida

Fludarabina + clorambucil

Fludarabina + ciclofosfamida

Fludarabina + ciclofosfamida + rituximab

Se podría referir radioterapia localizada en áreas de grandes masas y/o radioterapia esplénica para tratar el hiperesplenismo.

Los anticuerpos monoclonales (Alemtuzumab Campath-1H y Rituximab Mabthera) están bajo estudios clínicos.

El TPH está bajo estudios clínicos.

c) Pacientes estado III y IV de Rai y C de Binet

Básicamente la indicación es la misma que para el estado anterior. En general requieren más medidas de soporte transfusional.

5.2. Estrategias terapéuticas

a) Agentes alquilantes

El de uso más común en LLC es el clorambucil que produce su efecto antitumoral uniéndose en forma covalente al DNA, RNA y proteínas celulares. Ha sido usado por 50 años y la dosis diaria recomendada es de 0.1 mg/kilo o intermitentemente cada 2 semanas en dosis de 0.4 mg/kilo que puede aumentarse en 0.1 según toxicidad hasta obtener la máxima respuesta. La tasa de respuesta es de 40-60% con 4-10% de respuesta completa.

b) Análogos de nucleósidos

La fludarabina es el análogo más usado en LLC y ha mostrado actividad significativa. Su mecanismo de acción es a tres niveles: ocasiona quiebres del DNA, induce apoptosis y es tóxico para las mitocondrias. Está disponible en forma inyectable y oral, la droga parece ser igualmente activa en forma endovenosa (ev) que oral pero como la absorción oral es 50% debe aumentarse la dosis. La dosis ev recomendada es de 25 mg/m² por día por 5 días cada 4 semanas. La respuesta es de 45% en pacientes que antes no han recibido tratamiento con 3 a 20% de respuesta completa. Se asocia a intensa mielosupresión e infecciones.

c) Corticoesteroides

Son linfotóxicos y actúan sobre células con mutaciones de *P53*. Se usan asociados a quimioterapia o como paliativo. Dosis usuales son de Prednisona 1 mg/kilo hasta el control de los síntomas y disminución progresiva hasta llegar a días alternos.

d) Anticuerpos monoclonales

Rituximab. Anticuerpo monoclonal murino humanizado contra el antígeno de superficie CD20, que juega un rol importante en la activación, proliferación y diferenciación de las células B. Su actividad antitumoral sería a través de la activación de complemento, citotoxicidad mediada por anticuerpos y también inducción directa de la apoptosis. La dosis usual es de 375 mg/m² semanal por cuatro semanas o asociada a quimioterapia.

Alemtuzumab. Anticuerpo monoclonal murino humanizado contra el antígeno de superficie CD52. Los mecanismos de acción son iguales a rituximab. La dosis usual es de 30 mg, tres veces a la semana por 12 semanas. Puede usarse por vía endovenosa o subcutánea. Se asocia frecuentemente a infecciones oportunistas.

e) Radioterapia

Inicialmente muy usada en el tratamiento de LLC para tratar grandes masas o gran esplenomegalia con hiperesplenismo. Actualmente se utiliza en ambas indicaciones cuando éstas no responden a la quimioterapia y combinada con quimioterapia en el síndrome de Richter.

f) Esplenectomía

Indicada en pacientes con hiperesplenismo que

no ha respondido a la quimioterapia o anemia hemolítica o trombocitopenia autoinmune que no responde a corticoides.

g) Trasplante de progenitores hematopoyéticos

Como LLC es una enfermedad incurable con los tratamientos convencionales, existe interés en esta enfermedad, especialmente en los pacientes jóvenes. Además con los avances recientes en la identificación de factores biológicos de riesgo que indican enfermedad agresiva (genes VH no mutados, Zap70, deleciones 11q y 17p) es posible identificar pacientes con muy mal pronóstico con tratamiento convencional que podrían beneficiarse de TPH. El TPH análogo tiene mortalidad de 11% con sobrevida a tres años de 79% y recaída de 41% en el mismo período. No es curativo. El TPH alogénico tiene mortalidad de 40% con sobrevida a tres años de 55% y recaída de 25% en ese período. Podría haber efecto injerto versus leucemia.

5.3. Criterios de respuesta a tratamiento

Como en todas las neoplasias hematológicas se sabe que si no hay RC no hay posibilidad de curación. Hasta ahora los tratamientos previos a fludarabina no han sido significados curación. Con fludarabina y los tratamientos combinados basados en éste fármaco han aumentado el número de pacientes que obtienen RC; no se sabe aún si esto aumentará la SLE.

La tabla 14-LLC-4. Muestra los criterios aceptados de respuesta en LLC.

Tabla 14-LLC-4. Criterio de respuesta clínica en LLC (NCI-CLLWG)

Remisión completa	Remisión parcial	Avance de la enfermedad
<ul style="list-style-type: none">• No síntomas• No hepatoesplenomegalia, o linfadenopatía• Estructura normal de la médula ósea.	<ul style="list-style-type: none">• Disminución del recuento de linfocitos en un 50% o más.• Disminución de las linfadenopatías y/o esplenomegalia en un 50% o más.	<ul style="list-style-type: none">• Aumento de la infiltración.• Aumento de la hepatoesplenomegalia.• Aumento del recuento de linfocitos más de un 50%.• Transformación en otra enfermedad más agresiva.

Es importante al enfrentarse a un paciente determinado establecer el estado, los factores pronósticos, edad, enfermedades asociadas y performance status antes de decidir si el paciente requiere o no tratamiento. Estableciendo el pronóstico del paciente se tendrá una estimulación de sobrevida muy confiable. A más larga sobrevida, menos necesidad de tratamiento.

LECTURAS SUGERIDAS

Cheson, *et al.* National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for CLL. *Blood*; 87:4990-4997, 1996.

Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E. Monserrat, E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.*;348(18):1764-75, 2003.

Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., Lichter, P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.*;343(26):1910-6, 2000.

Neoplastic Diseases of the Blood. Wiernik. 3rd. Ed. Churchill Livingstone. O'Brian and Keating. *Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia.*

Rassenti, LZ, Huynh, L, Toy, TL, Chen, L, Keating, MJ, Gribben, JG, Neuberger, DS, Flinn, IW, Rai, KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med.*; 351(9):893-901, 2004.

Wintrobe's Clinical Hematology, Johnston J, Chapter 92. Chronic Lymphocytic Leukemia. P2429-2463.

www.cancer.gov/cancertopics/pdq

www.hematology.org

www.asheducationbook.org

www.bloodmed.com

LINFOMAS

LINFOMAS DE HODGKIN

Alejandro Majlis L.

1. INTRODUCCIÓN

En 1832 Thomas Hodgkin describió en 7 pacientes una enfermedad primitiva de los ganglios linfáticos diferente a los procesos reactivos de éstos, ocasionados por alteraciones inflamatorias. En un estudio posterior se confirmó que sólo 4 de los 7 enfermos tenían la enfermedad de Hodgkin (Linfoma de Hodgkin), correspondiendo 2 de los casos a sífilis y linfosarcoma.

En 1892 Sternberg describió la célula considerada como patognomónica del Linfoma de Hodgkin y Reed perfiló sus características de multinuclearidad y gigantismo denominándose desde entonces estas células, necesarias para realizar el diagnóstico de Linfoma de Hodgkin, células de Reed-Sternberg (R-S). Los trabajos de Seif y Spriggs, en 1967, definieron la naturaleza maligna de la enfermedad y el origen clonal de la misma mediante estudios citogenéticos.

La incidencia de esta enfermedad tiene un carácter bimodal con mayor incidencia a los 25 años y con un nuevo aumento pasados los 55 años. Es posible que este aspecto tenga una relación epidemiológica con mayor implicación en jóvenes del virus de Epstein Barr (EBV) y de la forma de esclerosis nodular con implicación mediastínica. La mayor incidencia, por otra parte, en jóvenes plantea problemas especiales respecto a la toxicidad del tratamiento sobre todo por la afectación de la función reproductiva genital originada por la quimioterapia, la del aparato cardiovascular y la relacionada con el desarrollo óseo cuando la quimioterapia se aplica en etapas en las que éste no ha finalizado.

A partir de los años 50 y hasta los años 70 se logró la curación del 75% de los casos. Este éxito terapéutico, sólo similar al conseguido en Medicina en la diabetes mellitus o la anemia de Biermer, ha sido la conjunción de una definición precisa en cuanto a la difusión y extensión de la enfermedad y a la aplicación de técnicas terapéuticas eficaces, radioterapia y quimioterapia tipo (MOPP), tanto en la enfermedad ganglionar como en las formas diseminadas.

La idea fundamental que dirigió el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin fue considerar que su difusión se realizaba por contigüidad y de una manera precisa de unos grupos ganglionares a otros y por otra parte que sobre el territorio ganglionar comprometido, las radiaciones tenían un efecto dosis letal para el tumor. Los radioterapeutas Gilbert, Peters y Kaplan aplicaron estos conceptos a los enfermos, definiendo para ello, previamente y con toda precisión, la extensión patológica de cada caso clínico, haciendo de la laparotomía una técnica fundamental durante esta etapa en la que el dominio de la radioterapia fue absoluto y prácticamente exclusivo para los estadios no diseminados.

2. PATOLOGÍA

La clásica célula asociada con linfoma de Hodgkin es la célula de R-S cuyo origen ahora se sabe proviene de una población monoclonal de linfocitos B, posiblemente derivada de centro germinal. El ambiente alrededor de la célula neoplásica varía desde predominancia de linfocitos pequeños en Hodgkin predominio linfocítico a una extensa fibrosis colágena en

Hodgkin esclerosis nodular. El fenotipo clásico de la célula de R-S es CD15 (+), CD30 (+), CD45 (-). El diagnóstico diferencial del linfoma de Hodgkin del linfoma B rico en células T o del linfoma anaplásico CD30 (+) puede ser difícil y se requiere revisión por un experto hematopatólogo.

La clasificación WHO/OMS (tabla 14-LH-1), agrupa bajo la denominación de linfoma de Hodgkin clásico a los subtipos esclerosis nodular, celularidad mixta, variante linfocito depletado o rico en linfocitos para destacar sus similitudes patológicas y clínicas y distinguirlos del linfoma de Hodgkin nodular predominio linfocítico. El linfoma de Hodgkin esclerosis nodular es el más común de los subtipos (60-80%), se presenta generalmente en mujeres jóvenes, con masa mediastínica. El subtipo celularidad mixta es el segundo más frecuente (15-30%), y se presenta con mayor habitualidad en hombres mayores. El linfoma Hodgkin nodular predominio linfocítico difiere de los otros subtipos en que la célula maligna es inmunofenotípicamente similar a otros linfomas B, expresa CD20(+) pero no expresa CD30.

Tabla 14-LH-1. Linfoma de Hodgkin (Clasificación OMS/ WHO)

<p>Predominio linfocítico nodular Linfoma de Hodgkin clásico Esclerosis nodular Celularidad mixta Rico en linfocitos Depleción linfocitaria</p>

Los estudios citogenéticos en el linfoma de Hodgkin es posible realizarlos en el 80% de los casos y aproximadamente la mitad presenta anomalías cromosómicas. Las alteraciones numéricas pueden afectar a todos los cromosomas excepto al 13 y al Y, sin embargo las alteraciones estructurales afectan, particularmente, a los cromosomas 12 y 13 en su brazo corto.

Las citoquinas segregadas por las células de R-S y por las del estroma tienen una expresión clínica, biológica, inmunológica e incluso en las implicaciones del EBV y con los oncogenes.

Los datos histopatológicos que se encuentran en el ganglio linfático del Linfoma de Hodgkin sugieren un proceso de naturaleza inflamatoria

e inmune. Las manifestaciones clínicas B, como fiebre y sudoración, es posible que se deban a la acción de ciertas citoquinas, así como la presencia de eosinofilia.

Las citoquinas que se producen en el Linfoma de Hodgkin corresponden a la IL-1 μ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, TNF α , TNF β y el GM-CSF. En el citoplasma de la célula de R-S se ha demostrado transcripción de mRNA para IL-5 el cual es un factor de crecimiento de los eosinófilos, que correspondería en estos casos con la presencia en sangre periférica de eosinofilia y con la infiltración de eosinófilos en el ganglio linfático. Los eosinófilos y las células de R-S expresarían el antígeno CD23 que es el receptor para la IgE, la cual también se encuentra elevada en estos casos de Linfoma de Hodgkin

En la célula de R-S se expresa el CD25 o antígeno TAC que es la cadena liviana del IL-2R que muestra una alta afinidad por esta proteína y que permite la internalización de la IL-2. Los pacientes con síntomas B tienen niveles de IL-2R más altos que los que no presentan síntomas B y éstos se encuentran más elevados en los estadios IVB.

La IL-6 es una citoquina pluripotente que está implicada en la diferenciación terminal de las células B y en la secreción de moléculas de Ig. La IL-6 se ha mostrado como un factor de crecimiento en el plasmocitoma, linfoma de células T y enfermedad de Castelman. En la célula de R-S se detecta mRNA específico para IL-6 y ello se ha observado también mediante tinción con anticuerpo anti-IL-6. La producción de IL-6 podría proceder de la propia célula de R-S, o lo que es más probable, de linfocitos T CD4 activados que rodean a esta célula y que pueden estimularla mediante la producción de esta citoquina.

La IL-9 es un factor de crecimiento de células T que tiene efecto sobre la eritropoyesis y la megacariocitopoyesis. Mediante la técnica de Northernblot se ha encontrado la IL-9 en el linfoma Ki-1 y en el linfoma de Hodgkin, ambos procesos con antígeno CD30+. Es posible que la IL-9 tenga un papel en el crecimiento de los linfomas anaplásicos, ya que el gen de esta citoquina se encuentra en el cromosoma 5q 31 a 35 y un número importante de estos linfomas presentan una traslocación que afecta al cromosoma 5q35.

3. ETAPIFICACIÓN

Las clasificaciones para determinar el estadio son descripciones anatómicas de los sitios con afectación tumoral, que nos indican la mayor o menor extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico. La determinación de la extensión de la enfermedad en pacientes diagnosticados de enfermedad de Hodgkin, así como en la mayoría de los tumores malignos, cumple varios objetivos: Ofrece información pronóstica de gran importancia para planificar el tratamiento y sirve para comunicar de forma uniforme los resultados de los tratamientos,

favoreciendo la comparación entre ellos.

No obstante, no hay que olvidar que un sistema de estadiaje es un intento de establecer categorías con límites precisos dentro de una enfermedad (el cáncer) difícil de delimitar y donde, para hacerlo manejable, necesariamente hay que omitir detalles clínicos. Por todo ello, cualquier clasificación debe estar sujeta a cambios y perfeccionamientos según se progrese en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad y de las técnicas de detección de la diseminación, así como en el conocimiento de sus factores pronósticos. Así, una clasificación clínica no debe ser el único parámetro a tener en cuenta para planificar el tratamiento, sino que además, deben considerarse otra serie de características, tanto del tumor como del paciente, que en ocasiones son de gran importancia.

La primera clasificación clínica, para la enfermedad de Hodgkin, fue desarrollada en 1965 en la Reunión de Rye que, basándose en la clasificación previa de Peters dividía la enfermedad en cuatro estadios según estuvieran afectas una (I) o más regiones linfáticas (II) por arriba o debajo del diafragma, afectación linfática a ambos lados del diafragma (III) o afectación difusa o diseminada de uno o más órganos o tejidos extralinfáticos (IV). Cada estadio era clasificado como A o B, según la ausencia o presencia de síntomas constitucionales (fiebre, sudoración nocturna, prurito y/o pérdida de peso) y como E para describir la afectación localizada de un órgano o sitio extralinfático.

El sistema de clasificación, aceptado internacionalmente en la actualidad, para la enfermedad de Hodgkin, es el llamado sistema de Ann Arbor (tabla 14-LH-2), donde se introdujeron tres modificaciones a la clasificación de Rye: a) Se introduce la letra E, para indicar los órganos afectados por extensión directa de la enfermedad desde los ganglios linfáticos adyacentes, y dejaba de considerarse equivalente a la enfermedad diseminada. b) La afectación esplénica se suscribe con la letra S, y c). Deja de considerarse el prurito como síntoma constitucional.

Tabla 14-LH-2. Clasificación Etapificación Ann Arbor

Estadio I: Área ganglionar única (I) u órgano o sitio extranodal único (IE)
Estadio II: Dos o más regiones ganglionares al mismo lado del diafragma (II), o extensión localizada extraganglionar con una o más regiones ganglionares al mismo lado del diafragma (IIE).
Estadio III: Compromiso ganglionar a ambos lados del diafragma (III) el cual puede estar acompañado por extensión extralinfática localizada (IIIE) o compromiso esplénico (IIIS).
Estadio IV: Compromiso de uno o más tejidos u órganos extra ganglionares (médula ósea), con o sin compromiso ganglionar.

A: Asintomático.

B: Fiebre $>38^{\circ}$ C, sin foco infeccioso.

Sudoración nocturna.

Pérdida de peso $>10\%$ del basal en los últimos 6 meses.

E: Enfermedad extraganglionar.

X: Enfermedad voluminosa (>10 cm diámetro mayor, masa mediastínica $>1/3$ diámetro torácico)

El estudio incluye historia de síntomas B, examen físico, tomografía axial computada (TAC) de tórax, abdomen y pelvis y a veces de cuello, hemograma con velocidad de sedimentación eritrocitaria (VHS), perfil bioquímico con LDH y biopsia de médula ósea. El cintigrama de galio es útil al diagnosticar áreas ocultas al TAC y en la evaluación de respuesta al tratamiento, sobre todo en masas residuales.

Recientemente se ha incorporado la tomografía por emisión de positrones (PET scan) utilizando fluodeoxiglucosa basado en aumento del metabolismo de la glucosa en tumores malignos. El PET scan en linfoma de Hodgkin ha logrado aumentar el estadio en el 58% de los casos catalogados como estadio I-II clínico. La negativización del examen en el curso de quimioterapia se correlaciona con buen pronóstico e identifica casos refractarios o recaídas en forma temprana.

4. TRATAMIENTO

La realización de la laparotomía es hoy una rareza en la determinación del estadio del linfoma de Hodgkin; ello se debe a la precisión de las técnicas radiológicas para la valoración de las lesiones, a la combinación de radioterapia y quimioterapia en las formas con gran masa tumoral e incluso en estadios I y II, y asimismo a la introducción de ciertos protocolos de quimioterapia eficaces y menos tóxicos que el mecloretanuria, vincristina, prednisona y procarbocina (MOPP).

El MOPP «clásico» que fue durante mucho tiempo el protocolo de referencia, ha quedado prácticamente relegado como tratamiento de primera línea. Ello se debe a la mayor eficacia de otros protocolos como el doxorubicina, becomicina, vinblastina, dacarbocina (ABVD) y sobre todo a la menor toxicidad, particularmente sobre la esfera reproductiva y sobre la capacidad leucemogénica.

Por último, ha sido importante la precisión de los factores pronósticos que influyen en la evolución de la enfermedad y el impulso dado a los tratamientos de rescate. La introducción de la quimioterapia de intensificación con trasplante de médula ósea o de célula germinal hematopoyética periférica consigue una supervivencia libre de recaída entre un 20-50% de los casos en un grupo heterogéneo de pacientes que comprende enfermedad primaria refractaria, recaída refractaria, segunda remisión completa o recaída posterior a la segunda remisión completa. Asimismo se ha suscitado la introducción de la intensificación como tratamiento de primera línea en formas en estadio IV con particular mal pronóstico y como primer tratamiento de rescate en las recaídas que han sido tratadas previamente con quimioterapia.

El estadiaje clínico de la enfermedad de Hodgkin, es decir examen físico y TAC de tórax, abdomen y pelvis, da que el 90% de los pacientes son catalogados como etapa precoz (Ann Arbor I-II). El cintigrama de galio es de

ayuda frente a masas sospechosas y en la evaluación de la respuesta a tratamiento. En la experiencia de MD Anderson, el cintigrama de galio resulta positivo en el 93% de los casos previos a quimioterapia correlacionándose a la vez con la supervivencia libre de enfermedad (SLE), el 30% de los pacientes con galio positivo post-quimioterapia tienen recaída frente al 3% de aquellos con galio negativo post-tratamiento. Sin embargo la laparotomía exploradora es el procedimiento que con más exactitud informa de la extensión de la enfermedad sobre todo por la posibilidad de encontrar enfermedad esplénica o hepática oculta. En general se considera que 1/3 de los enfermos clínicamente en etapas I o II pasan a etapas avanzadas después de la etapificación quirúrgica, elevándose a 50% en los casos con síntomas constitucionales. Después de realizar todos los procedimientos de etapificación incluido el quirúrgico, el 60% de los pacientes se catalogan como etapa avanzada (estadios III-IV). Está claro que la laparotomía exploradora agrega en la etapificación del paciente; sin embargo hay que considerar la morbilidad quirúrgica inmediata y el incremento en el riesgo de infecciones neumocócicas post esplenectomía.

La primera modalidad terapéutica con éxito fue la radioterapia. En estadios precoces patológicos, I-A, I-B, II-A y II-B sin compromiso mediastínico los mejores resultados con

radioterapia corresponden al grupo de Kaplan de la Universidad de Stanford en que la radioterapia nodal total dio prácticamente un 100% de remisión completa (RC) con 80% de SLE prolongada, con una supervivencia global de 85-88% dado por la posibilidad de rescate con quimioterapia de los pacientes que recaen. Sin embargo, estos resultados no se han reproducido en otros centros, reportándose el doble de tasa de recaída comparada a la serie de Stanford. En general, en estadios patológicos (EP) I-II la SLE después de tratamiento con radioterapia es de 80% con variaciones de acuerdo con factores pronósticos tales como histología (celularidad mixta) y elevada velocidad de sedimentación especialmente post-tratamiento. Ya que 20- 30% de los pacientes con estadios clínicos (EC) I-IIA tienen enfermedad abdominal oculta, el resultado a largo plazo de la población tratada solo con radioterapia da una tasa de recaída que fluctúa entre 14 a 39%, llegando en la serie de Milán a 41%.

De esta manera se iniciaron una serie de investigaciones tanto en EE.UU. como en Europa tratando de individualizar el tratamiento de las etapas tempranas según factores de riesgo. De la necesidad de obtener los mejores resultados con la menor toxicidad, se clasifican los linfomas de Hodgkin en grupo de etapa precoz y etapa avanzada (tablas 14-LH-3 y 14-LH-4).

Tabla 14-LH-3. Estratificación del Linfoma de Hodgkin para tratamiento

Etapa precoz
Estadio I/II
Sin enfermedad voluminosa
Sin síntomas B
Etapa avanzada
Estadio III/IV
Estadio II con enfermedad voluminosa
Síntomas B

Tabla 14-LH-4. Factores de mal pronóstico en linfoma Hodgkin avanzado

Albúmina: < 4 g/dl
Hemoglobina: <10.5 g/dl
Sexo masculino
Estadio IV
Edad: ≥ 45 años
Recuento glóbulos blancos: > 15.000/μL
Recuento de linfocitos: <600/μL o <8% del total de los leucocitos

4.1. Tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, etapa precoz

En pacientes con estadio patológico I-II se ha comparado radioterapia en manto sola con radioterapia en manto más quimioterapia consistente en el protocolo MOPP. La SLE fue de 67% en el grupo de radioterapia (RT) contra 91% en el grupo de RT + quimioterapia (QT), siendo la sobrevida de 90% y 95%, respectivamente, diferencia no significativa. Este último punto remarca el hecho de que los pacientes que recaen post RT se rescatan exitosamente con QT en el 85% de los casos. El análisis multivariable demostró que RT sola, enfermedad voluminosa y síntomas B se relacionaban con riesgo de recaída. La experiencia con estudios randomizados con estadiaje clínico IA-IIA entre RT ya sea en manto con o sin extensión a área para-aórtica, o irradiación nodal subtotal con protección de pelvis, comparándolo con quimioterapia (MOPP o ABVD), la SLE a 10 años fue de 62% en el grupo de RT contra 88% en el grupo de terapia combinada. Nuevamente la sobrevida global es similar. De esta manera, la laparotomía no tiene indicación actualmente en el manejo habitual del linfoma de Hodgkin, recomendándose terapia combinada. Varios estudios han demostrado que quimioterapia breve (2-4 ciclos) seguido de radioterapia es altamente efectivo en etapas precoces de linfoma de Hodgkin con SLE >94% con media de seguimiento 2-3 años. Dentro de las opciones de quimioterapia, ABVD ha demostrado ser mejor que MOPP y menos tóxico e igualmente efectivo que MOPP/ABV constituyendo el tratamiento estándar actual. En relación al número de ciclos (2 vs. 4) o campo de radioterapia (campo comprometido vs. campo extendido) están en curso trabajos randomizados para su definición.

Los pacientes con etapa precoz pero con factores de mal pronóstico (tabla 14-LH-4) requieren 6 ciclos de quimioterapia con radioterapia sobre las áreas de gran volumen.

4.2. Tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, etapa avanzada

Se considera enfermedad de Hodgkin avanzada, los estadios IV, masa mediastínica superior a 15 cm y los estadios IIIB, sobre todo con compromiso de ganglios pélvicos.

En estos casos el esquema estándar es ABVD por 6-8 ciclos y la radioterapia juega un

importante rol; en los pacientes con enfermedad avanzada y con gran masa, tratados únicamente con quimioterapia, el 75% de las recaídas ocurren exclusivamente en sitios de compromiso inicial de la enfermedad, con menos de 10% de recaídas tanto en sitios de compromiso inicial como nuevos sitios de enfermedad y solo 15% de recaídas solo en sitios no comprometidos inicialmente. En contraste en enfermos tratados con quimioterapia y radioterapia sobre las áreas inicialmente comprometidas, en la experiencia del Southeastern Cancer Study Group, las recaídas en el área irradiada son menos del 3%. Regímenes de quimioterapia nuevos, se están estudiando y se comparan con la experiencia de ABVD. Un esquema poco tóxico pero bastante activo es el esquema etopósido, vinblastina, doxorubicina (EVA), con un seguimiento de 10 años en casos de enfermedad avanzada, logra remisión completa en un 94% de los casos con SLE de 73%. El régimen de Stanford V (medoretamina, doxorubicina, vinblastina, bleomicina, etopósido, prednisona y RT en sitios comprometidos) implica quimioterapia semanal por 12 semanas, alternando agentes mielotóxicos con agentes no mielotóxicos, además de radioterapia en sitios de enfermedad voluminosa. Con este esquema se logró SLE de 89% con seguimiento medio de 5 años. El otro esquema proviene del grupo cooperativo alemán que ha estudiado un régimen de dosis escalonado y acelerado en etapas avanzadas; randomizó ciclofosfamida, vincristina, procarbocina, prednisona (COPP)/ABVD vs. Bleomicina, etipósido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbocina, prednisona (BEACOPP) vs. BEACOPP con dosis escalonadas. La SLE a 5 años fue 69% vs. 76% vs. 87%, sin embargo la sobrevida global a 5 años fue 83% vs. 88% vs. 91%. Están en curso estudios randomizados entre ABVD más/sin RT vs. BEACOPP más/sin RT para poder definir la mejor terapia en casos avanzados.

5. VALORACIÓN DE LAS MASAS RESIDUALES EN LA ENFERMEDAD DE HODGKIN

La enfermedad o masa residual es la lesión que permanece estable después de un tratamiento y requiere que se establezca el criterio de malignidad o de lesión fibrosa benigna residual

La enfermedad de Hodgkin es una neoplasia que responde muy bien a los tratamientos con quimioterapia y/o radioterapia, con un índice de respuestas completas (RC) que oscila entre

el 70-100% de los casos. A pesar de ello, un 10-20% de los pacientes en RC recaen de su enfermedad, de donde se deduce que quedaba enfermedad tras el tratamiento. Por otra parte, en algunos pacientes tras el tratamiento persisten imágenes radiológicas residuales de difícil valoración, y donde la decisión de continuar o suspender el tratamiento es muy importante.

Por todo ello, en los últimos años está tomando gran importancia definir la respuesta al tratamiento tan precisamente como sea posible, con el fin de poder detectar, por una parte, aquellos pacientes en los que persiste enfermedad a pesar de una remisión completa clínica y, por otra, diferenciar si unas imágenes residuales tras un tratamiento representan residuos fibróticos, enfermedad activa persistente o ambos.

El problema de la masa residual, tras un tratamiento en la enfermedad de Hodgkin, se presenta con relativa frecuencia, sobre todo cuando existen volúmenes tumorales importantes (Bulky) y/o afectación mediastínica. La única manera de llegar a un diagnóstico correcto de las características de la masa residual es la obtención de material histológico por biopsia. Sin embargo en múltiples ocasiones, la masa residual es pequeña, los pacientes han sido irradiados o la obtención de material fibrótico plantea dudas sobre lo adecuado de la muestra, todo lo cual limita su interpretación.

La presencia de una masa residual en el mediastino, tras un tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia afecta a un 64% de los pacientes, pero es más frecuente, entre el 83-88%, en los pacientes con masa «Bulky» mediastínica. La gammagrafía con galio-67 es el método más útil para reevaluar la masa residual, en pacientes diagnosticados de enfermedad de Hodgkin, tras el tratamiento, siendo además el método más sencillo y menos invasivo de hacerlo, a la vez que monitoriza la respuesta al tratamiento. Varios estudios han valorado el significado de una gammagrafía positiva, con galio-67, tras el tratamiento con quimioterapia y radioterapia. El PET scan da información de compromiso ganglionar y a futuro puede validarse como estudio de rutina en masa residual.

Tratamiento de las recaídas

El tratamiento de las recaídas de pacientes

tratados inicialmente con radioterapia pueden ser con quimioterapia convencional y buenos resultados. En caso de recaída post-quimioterapia o refractario a los esquemas de primera línea, la intensificación de dosis con trasplante autólogo logra remisiones completas prolongadas en el 50% de los casos de segunda RC y alrededor de 10-15% de los casos linfoma de Hodgkin primario refractario. El mejor índice pronóstico es demostrar quimiosensibilidad, lo que se logra con dos a cuatro ciclos de esquemas de rescate como ASHAP [doxorubicina (Adriamycin), metilprednisolona (Solumedrol), arabinósido de citosina a dosis altas y cisplatino (platino)], Ifosfamida-VP-16, a la vez que se logra movilizar y recolectar los progenitores hematopoyéticos para el trasplante autólogo. El trasplante autólogo en recaída de linfoma de Hodgkin es el tratamiento estándar de las recaídas post- quimioterapia.

Se están investigando los trasplantes alogénicos, ablativos y no mieloablativos; los resultados son promisorios en los casos que tienen donante.

LECTURAS SUGERIDAS

Armitage, J.O., "Early bone marrow transplantation in Hodgkin's disease". *Ann Oncol*, 5 Suppl 2: 161-3, 1994.

Bonadonna, G., Zucali, R., Monfardini, S. "Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboximide versus MOPP". *Cancer*, 36: 252-259, 1975.

Branson, K., *et al.*, "Role of Nonmyeloablative Allogeneic Stem-Cell Transplantation After Failure of Autologous Transplantation in Patients With Lymphoproliferative Malignancies". *J Clin Oncol*, 20(19): 4022-4031, 2002.

Brizel, D., Prosnitz, L., Winer, E. "Combination Chemotherapy with and without adjuvant radiotherapy for advanced Hodgkin's disease: The Duke University and Southeastern Cancer Study Group Experience. Adjuvant Therapy of Cancer VI", ed. S. SE. Philadelphia: W B Saunders. 610-622, 1990.

Brusamolino, E., Lazzarino, M., Orlandi E. "Early-stage Hodgkin's Disease: Long-term results with radiotherapy alone or combined radiotherapy and chemotherapy". *Ann Of Oncol* 1992, 1994. 5((Suppl. 2)): 101-106.

- Canellos, G., "Current Therapeutic Strategies in Hodgkin's Disease". *Ann Of Oncol* 3(Suppl 4): 67-68, 1992.
- Canellos, G.P., et al., "Primary systemic treatment of advanced Hodgkin's disease with EVA (etoposide, vinblastine, doxorubicin): 10-year follow-up". *Ann Oncol*, 14(2): 268-272, 2003.
- Canellos, G., Anderson, J., Propert, K. "Chemotherapy of Advanced Hodgkin's Disease with MOPP, ABVD, or MOPP Alternating with ABVD". *N Engl J Med*, 327((21)): 1478-84, 1992.
- De Vita, V., Simon, R., Hubbar, S. "Curability of advanced Hodgkin disease with chemotherapy, long term follow-up of MOPP treated patients at the National Cancer Institute". *Ann Inter Med*, 92: 587-595, 1980.
- Diehl, V., et al., "Standard and Increased-Dose BEACOPP Chemotherapy Compared with COPP-ABVD for Advanced Hodgkin's Disease". *N Engl J Med*, 348(24): 2386-2395, 2003.
- Federico, M. et al., "High-Dose Therapy and Autologous Stem-Cell Transplantation Versus Conventional Therapy for Patients With Advanced Hodgkin's Lymphoma Responding to Front-Line Therapy". *J Clin Oncol*, 21(12): 2320-2325, 2003.
- Front, D., et al., "Aggressive non-Hodgkin lymphoma: early prediction of outcome with 67Ga scintigraphy". *Radiology*, 214(1): 253-7, 2000.
- Hasenclever, D., et al., "A Prognostic Score for Advanced Hodgkin's Disease". *N Engl J Med*, 339(21): 1506-1514, 1998.
- Hodgkin, T., "On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen". *Med Chir Trans*, 1832. 17: 64-114.
- Horning, S., et al., "Vinblastine, Bleomycin, and Methotrexate: An effective adjuvant in favorable Hodgkin's disease". *J Clin Oncol*, 6: 1822-1831, 1988.
- Horning, S.J., et al., "Stanford V and radiotherapy for locally extensive and advanced Hodgkin's disease: mature results of a prospective clinical trial". *J Clin Oncol*, 20(3): 630-7, 2002.
- Jucker, M., Abts, H., Li, W. "Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease". *Blood*, 77: 2413-2418, 1991.
- Kaplan, H., **Hodgkin's Disease**. 2nd ed. ed. Cambridge: Harvard University Press. 1980.
- Munker, R., et al., "Contribution of PET imaging to the initial staging and prognosis of patients with Hodgkin's disease". *Ann Oncol*, 15(11): 1699-1704, 2004.
- Reece, D., Connors, J., Spinelli, J. "Intensive therapy with cyclophosphamide, carmustine, etoposide, cisplatin and autologous bone marrow transplantation for Hodgkin's disease in first relapse after combination chemotherapy". *Blood*, 83: 1193-1199, 1994.
- Rodriguez, J., et al., "ASHAP: a regimen for cyto-reduction of refractory or recurrent Hodgkin's disease". *Blood*, 93(11): 3632-6, 1999.
- Steif, G. and Springs, A. "Chromosome changes in Hodgkin's disease". *SNCl*, 39: 557-570, 1967.
- Sternberg, C., "Über eine Eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukemia verlaufende Tuberculose der lymphatickonn apparats". *Z Heilk*, 19: 21-90, 1898.
- Tesch, H., Feller, A., Jucker, M. "Activation of cytokines in Hodgkin's disease". *Ann Oncol*, 3(suppl 4):13-16, 1992.
- Weiner, M., Leventhal, B., Cantor, A. "Gallium-67 scans as an adjunct to computed tomography scans for the assessment of a residual mediastinal mass in pediatric patients with Hodgkin's disease. A Pediatric Oncology Group study". *Cancer*, 68: 2478-80, 1991.
- Willett, C., Linggood, R., Meyer, J. "Results of treatment of stage IA and IIA Hodgkin's disease". *Cancer*, 59: 1107-1112, 1987.

LINFOMAS NO HODGKIN DEL ADULTO

Alejandro Majlis L.

1. INTRODUCCIÓN

Los linfomas no Hodgkin (LNH) son un grupo de tumores del sistema linfoide que involucran a las poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune.

El incremento de su frecuencia en un 150% desde 1940 hasta los últimos años de la década de los 80, establece un importante problema de salud pública. Este espectacular aumento en frecuencia no se puede atribuir solamente a la epidemia del SIDA, sino que algunos agentes etiológicos parecen tener una creciente importancia. En la actualidad se conocen algunos datos epidemiológicos de gran interés que pudieran explicar este crecimiento. Por ejemplo, se ha observado un mayor número de casos en poblaciones en contacto con herbicidas, asociándose este factor sobre todo con linfomas foliculares de células grandes. Algo parecido ocurre con los pesticidas, sin embargo estos factores no explican el aumento observado en áreas urbanas donde se ha visto también un incremento. Volviendo a los herbicidas existe un curioso paralelismo entre el momento de su incremento en uso y el aumento en la incidencia de estos linfomas. Otros factores como radiación, factores nutricionales, ingesta medicamentosa, etc., no se han podido relacionar con tanta fidelidad como los factores anteriormente aludidos. El papel de algunos virus y de estados de inmunodeficiencia en la linfomogénesis parece decisivo.

2. PATOGENIA

La acción de los distintos agentes etiológicos produce, como consecuencia, una serie de alteraciones genéticas que constituyen la base de los mecanismos patogénicos de la enfermedad.

En el proceso de reordenamiento normal, ya sea del gen de las inmunoglobulinas (Igs) en el caso de los linfocitos B o de los receptores T (TCR) en los linfocitos T, se ponen en marcha una serie de mecanismos enzimáticos por recombinasas que actúan en diferentes puntos en la secuencia de la producción de esos receptores. Errores en esas recombinasas por

diferentes causas, pueden provocar reordenamientos genéticos anormales, que son los que, eventualmente, producen la transformación maligna en un punto donde se ha producido un bloqueo en la diferenciación normal de estas células.

El reordenamiento cromosómico anormal, antes aludido, puede ser provocado por diferentes factores, se ha visto que exposiciones intensas incluso de corta duración a pesticidas pueden incrementar la formación de dichos reordenamientos, por ejemplo causando una inversión en el cromosoma 7 (Inv 7), t(13, q35), que afectaría a los genes de los TCR.

Es posible que exista cierta especificidad de agentes en relación a distintos reordenamientos que podría explicar la distinta frecuencia de linfomas en diferentes localizaciones geográficas. Los procesos de reordenamiento principalmente ocurren a nivel en que la secuencia variable (V) del gen de la inmunoglobulina se une a las secuencias de unión (J) y de diversidad (D) genómica y en el punto de cambio de isotipo de Ig que tiene lugar en los linfocitos B periféricos maduros.

Estos dos fenómenos son gobernados por la activación o inhibición de otras estructuras genómicas como oncogenes activadores y supresores y por diferentes citoquinas que transmitirían las señales. Entre éstas parece ser que la IL-4, IL-5, IFN- γ y TGF- α podrían intervenir en el proceso de cambio de isotipo de Igs.

Estas lesiones genéticas, en un tiempo fueron atribuidas al azar, sin embargo recientemente se han conocido otros mecanismos que a través de la producción de daño oxidativo pudieran tener un papel primordial.

El hecho que determinados genes y no otros sean los que se ven involucrados se debe a mecanismos conformacionales moleculares en momentos fisiológicos donde se están produciendo fenómenos normales. Por ejemplo el reordenamiento de los receptores hace que se aproximen geoméricamente, al plegarse y abrirse segmentos genómicos muy alejados espacialmente. Translocaciones cromosómicas específicas son asociadas directamente con subtipos de linfomas de células B. El estudio de estas translocaciones han dado importante información en los mecanismos patogénicos de los linfomas. Las translocaciones más frecuentes son: (a) t(14;18) que resulta en la sobreexpresión del gen *BCL-2*, presente en 85% de

los linfomas foliculares, (b) t(11;14) con sobre-expresión de ciclina D1, presente en prácticamente todos los linfomas del manto, (c) t(8;14), t(2;8) y t(8;22) de los linfomas Burkitt, con fusión de un gen de cadena pesada (H, "heavy") o liviana (L, "light") de Ig al gen promotor de factor de transcripción *C-MYC*. El gen de factor de transcripción *BCL6*, capaz de reordenamiento con múltiples genes, se encuentra preferentemente en linfomas de células grandes difuso, y se asocia a la sobre-expresión de mRNA para *BCL-6* de buen pronóstico, comparado con *BCL-6* negativo; y (d) t(2;5) (p23;q35), que fusiona el gen *ALK* con nucleofosmina, se asocia a linfoma anaplástico

Ki-1 (CD30) positivo, con buen pronóstico.

En la tabla 14-LNH-A-1 se describen las alteraciones cromosómicas mejor conocidas hoy en día y que se relacionan directamente con determinados grupos específicos de linfoma. Todas estas alteraciones que, sin duda, pueden tener lugar al azar o continuamente a lo largo de la vida de un individuo, no tendrían mayor importancia si funcionaran efectivamente otros mecanismos reguladores. En algunas circunstancias el equilibrio impuesto por estos mecanismos reguladores se interrumpe y da lugar a la limfomagénesis.

Tabla 14-LNH-A-1. Principales alteraciones citogenéticas en linfomas no Hodgkin

Translocación	Tipo de linfoma	Frecuencia	Oncogén	Función
t(8;14) (q24;q23.3)	Burkitt	100%	<i>C-MYC</i>	Factor de transcripción
t(8;22) (q24;q32.3)	Burkitt	100%	<i>C-MYC</i>	Factor de transcripción
t(2;8) (p11-p12;q24)	Burkitt/ Inmunoblástico	20%	<i>C-MYC</i>	Factor de transcripción
t(14;18) (q32;p21)	Folicular Difuso células grandes	90% 30%	<i>B-CL-2</i>	Anti-apoptosis
t(11;14) (q13;q32)	Linfoma del manto	50%	<i>BCL-1</i> (ciclina D1)	Regulador ciclo celular
t(2;5) (p23;q35)	Anaplástico K1			
t(3;14)	Difuso células grandes		<i>BCL-6</i>	Factor de Transcripción

En primer lugar con la edad se altera la inmunidad celular o más concretamente la función de las células T supresoras, de igual modo la respuesta humoral hacia antígenos exógenos disminuye y paradójicamente se produce un aumento de fenómenos autorreactivos o autoinmunidad. Con estos fenómenos se produce un desbalance entre células B y T que da lugar a que las células T no sean capaces de regular las células B. Este hecho puede predisponer a una mayor y progresiva

autonomía de estas células B con las consecuencias lógicas en la linfomagénesis.

Las diferentes inmunodeficiencias asociadas como la enfermedad de Wiscott-Aldrich, ataxia telangiectasia, inmunodeficiencias ligadas al cromosoma X, etc., se han asociado desde hace muchísimo tiempo con una mayor incidencia de linfomas. A la vista de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune es más sencillo explicarse la asociación.

Actualmente se sabe que algunos virus tienen un importante papel, en la linfomogénesis así por ejemplo, el virus de Epstein-Barr (EB) participa en la transformación maligna de linfomas Burkitt, en linfomas de alto grado inmunoblástico asociado con el SIDA, Linfoma de Hodgkin y el virus HTLV-1 en el síndrome de leucemia-linfoma T asociado.

El caso del linfoma Burkitt, que es el mejor conocido, puede servir de paradigma para explicar la acción de otros virus en la producción de la neoplasia linfoide. En el linfoma Burkitt en un 80% de los casos se produce la translocación **t(8;14) (q24, q32)** y en casi todos los restantes la translocación t(2; 8) ó t(8; 22). Las secuencias genéticas involucradas son, por un lado, los genes de las cadenas pesadas de las Igs en el cromosoma 14 o de las cadenas livianas kappa (K) y Lambda (λ) en los cromosomas 2 y 22, respectivamente y la secuencia del protooncogén *C-MYC* situado en el cromosoma 8. Esta translocación pone en contacto el citado *C-MYC* con secuencias promotoras de las cadenas H de las Igs. La distribución de los puntos donde se produce la translocación marca una diferencia fenotípica y patológica estableciéndose dos tipos de linfomas Burkitt: el endémico y el esporádico.

El endémico, que ocurre en África Ecuatorial, se asocia uniformemente con la infección por virus de EB y en estos casos no se produce reordenamiento del *C-MYC*, ocurriendo la mayor parte de los puntos de desprendimiento fuera de la secuencia genómica del *C-MYC*. En cambio en el linfoma Burkitt esporádico las translocaciones ocurren por encima o dentro de la unidad de transcripción *C-MYC* en el cromosoma 14 y en este caso *C-MYC* se encuentra reordenado. La asociación con el virus EB en este caso es sólo del 20-30% en EE.UU y en algunos países de Sudamérica es el 50-60%.

¿En qué condiciones se produce la transformación maligna en el caso de linfoma Burkitt endémico?. Una infección mantenida (malaria) produce un incremento de precursores B sobre todo células pre-B y para su regulación una continua presencia de células T para intentar controlar el proceso; por otro lado el continuo estímulo a la proliferación que el virus de EB produce sobre las células B, proporciona el marco ideal de posibilidad de linfomogénesis, es decir un descontrol de la exagerada proliferación de células B las cuales tienen que continuamente reordenar sus genes de Igs. Esto hace probable un incremento en lesiones y

reordenamientos genéticos que involucran a *C-MYC*.

Otra paradigmática alteración genética sería la producida por la translocación **t(14;18) (Q32, Q21)** presente en un 85% de los linfomas foliculares y en un 20-40% en los difusos de células grandes. En este caso el protooncogén *BCL-2* situado en el cromosoma 18 y que codifica una proteína situada a nivel de la membrana mitocondrial, tiene como función normal la inhibición de la apoptosis o muerte celular programada. Este gen está inactivado en la mayoría de las células normales del cuerpo y solo está activado en algunos tipos de células tales como las neuronas y en las células progenitoras de la médula ósea, donde la inhibición de la muerte celular es un proceso fundamental necesario para mantener estas células. La mantención de la homeostasis de las demás células requiere un balance entre proliferación y muerte.

En el caso de la t(14,18) el oncogén *BCL-2* se pone en contacto con regiones promotoras del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Esto trae como resultado la expresión normal del gen *BCL-2* y la sobreexpresión de su proteína, la cual a su vez produce una inhibición de la apoptosis, lo cual es una característica de los linfomas de bajo grado. Estos linfomas se caracterizan por su ritmo proliferativo bajo y se pueden entender conceptualmente como desórdenes de acumulación de células más que de proliferación. Sin embargo, la larga duración de la vida de las células conlleva una mayor posibilidad de producción de lesiones genéticas que, eventualmente, llevarían a la transformación maligna celular. Otra lesión genética, la t(11; 14), pone en contacto el locus *BCL-1* que es el mismo gen llamado Prad-1, de gran importancia en la progresión celular a través del ciclo celular. Esta translocación se ha asociado con linfomas del manto (centrocíticos de Kiel) hasta en un 73% de los casos.

Otras translocaciones como la t(14;19) donde se involucra el oncogén *BCL-3*, o la t(10;14) o la t(2;5), son translocaciones asociadas a subtipos concretos de linfoma.

3. PATOLOGÍA

La clasificación histopatológica es el primer eslabón para poder conocer la historia natural de la enfermedad y el pronóstico en este grupo tan heterogéneo de neoplasias.

A lo largo de las últimas décadas han ido apareciendo diferentes clasificaciones que inciden más o menos en aspectos morfológicos o aspectos inmunológicos. La clasificación de Rappaport que aún siendo limitada, fue ampliamente usada y gozó de gran predicamento en EE.UU por su utilidad clínica. Las clasificaciones más usadas son la “Working formulation” (WF), sobre todo en EE.UU y la clasificación de Kiel, prácticamente limitada a Europa.

Desde el punto de vista conceptual y biológico, es más precisa y completa la clasificación de Kiel, al partir de conceptos de desarrollo antigénico de los linfocitos e incorporando conceptos inmunológicos e histogénicos coherentes. Divide a la población en dos grupos de riesgo y la última versión que se indica en la tabla 14-LNH-A-2, incorpora nuevas entidades con particularidades propias.

Tabla 14-LNH-A-2. Clasificación de Kiel de los linfomas no Hodgkin

<p>Linfomas de células B</p> <p>Bajo grado</p> <ul style="list-style-type: none"> Linfoma linfocítico y plasmocítico Leucemia de células peludas Linfoma linfoplasmocitoide plasmocítico Linfoma plasmocítico Linfoma centroblástico-centrocítico Centrocítico <p>Alto grado</p> <ul style="list-style-type: none"> Centroblástico Inmunoblástico Burkitt Linfoblástico Tipos raros <p>Linfomas de células T</p> <p>Bajo grado</p> <ul style="list-style-type: none"> Linfoma linfocítico (CLL) y plasmocítico Micosis fungoide Linfoepiteloideo (Linfoma de Lennert) Angioinmunoblástico(AILD, LgX) Zona T Células pequeñas pleomórfico (HTLV -/+) <p>Alto grado</p> <ul style="list-style-type: none"> Células medianas y grandes pleomórfico (HTLV -/+) Inmunoblástico (HTLV -/+) Células grandes anaplástico (K-1 +) Linfoblástico

La WF (tabla 14-LNH-A-3) en realidad no es una clasificación sino una reordenación por sub-grupos de linfomas en torno a tres grupos generales de linfomas de diferente historia natural y pronóstico. Si desde el punto de vista patológico no es tan correcta como la clasificación de Kiel, a efectos clínicos sí es

bastante reproducible y útil. Un gran problema es que, recientemente, se han incorporando nuevas entidades clínico patológicas y otras que no están recogidas específicamente en esta clasificación y cuya presencia se difumina entre los distintos grupos de ésta.

Tabla 14-LNH-A-3. Clasificación de los linfomas no Hodgkin según la “Working Formulation” (1992)

<p>Bajo grado</p> <ul style="list-style-type: none">Linfoma Linfocítico difuso de células pequeñasLinfoma linfocítico plasmocitoideLinfoma folicular de células pequeñas hendidasLinfoma folicular mixtoLinfoma del mantoLinfoma monocitoide células B <p>Grado intermedio</p> <ul style="list-style-type: none">Linfoma folicular de células grandesLinfoma difuso de células pequeñas hendidasLinfoma difuso mixtoLinfoma difuso células grandes hendidasLinfoma difuso células grandes no hendidasLinfoma de Lennert <p>Alto grado</p> <ul style="list-style-type: none">Inmunoblástico plasmocitoideInmunoblástico células TInmunoblástico epiteliodeInmunoblástico células clarasLinfoblásticoLinfoma de células pequeñas no hendidas (Burkitt y no-Burkitt)Linfoma de células T Aild-Like LinfomaAnaplásico K-1Leucemia-Linfoma de células T del adultoMiscelánea: Angiotrópico, Micosis fungoide, Histiocítico, Compuesto

Sin duda las diferencias entre ambas clasificaciones ha llevado a que no exista concordancia entre patólogos de ambos continentes y que se hable un lenguaje distinto, sobre todo en entidades nuevas y que los resultados no se puedan comparar. En respuesta a esto un grupo de patólogos formó un Grupo Internacional de Estudio de los Linfomas,

principalmente como un foro para la discusión de estas nuevas entidades, dando lugar a una nueva clasificación que abarcara las dos clasificaciones previas, así como las nuevas entidades, naciendo la “Revised European-American Lymphoma” (R.E.A.L.), la que fue base de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) (tabla 14-LNH-A-4).

Tabla 14-LNH-A-4. Clasificación WHO/ R.E.A.L.

Neoplasias de precursores células B

- Leucemia/Linfoma linfoblástico precursor B
Neoplasias células B maduras
- Leucemia linfocítica crónica células B/Leucemia prolinfocítica/ Linfoma de linfocitos pequeños.
- Linfoma linfoplasmocitoide (Inmunocitoma)
- Linfoma de células del Manto
- Linfoma centro folicular, predominio folicular (Subtipo linfoma centro folicular, difuso células pequeñas)
- Linfoma células B zona marginal
Extranodal (linfoma MALT)
Nodal (células B monocitoide)
- Linfoma células B zona marginal esplénico (linfocitos peludos circulantes)
- Leucemia células peludas
- Plasmocitoma/Mieloma
- Linfoma difuso células grandes B
- Linfoma Burkitt / Leucemia células Burkitt

Neoplasias de células T y “Natural Killer”

Neoplasia de precursores células T

- Linfoma linfoblástico de precursor células T

Neoplasias de células T maduras (periféricas) y “Natural Killer”

- Leucemia Linfocítica crónica de células T/ leucemia prolinfocítica
- Leucemia linfocítica de grandes gránulos
- Micosis fungoides/ síndrome de Sezary
- Linfoma de células T periféricas, inespecífica
- Linfoma angioinmunoblástico
- Linfoma angiocéntrico
- Linfoma anaplástico de células grandes (células T y nulas)

Linfoma de Hodgkin

- Predominio linfocítico nodular
- Linfoma de Hodgkin clásico
Esclerosis nodular
Celularidad mixta

4. HISTORIA NATURAL

Conforme la WF los LNH se dividen en tres grupos de riesgo diferenciado: bajo grado, grado intermedio y alto grado.

4.1. Linfomas de bajo grado

En los linfomas de bajo riesgo de malignidad, los más frecuentes sin duda son los linfomas foliculares (mixtos o de célula pequeña hendida) que constituyen en torno a un 50% de los pacientes. En este caso las células neoplásicas,

que corresponden a linfocitos B, forman agregados foliculares que tienden a recordar los folículos linfoides normales. Sus características citológicas se parecen a algunas de las células del centro germinal normal. Como se describirá en el punto 7 (tratamiento) estos linfomas tienen un poder proliferativo pequeño y se presentan en la mayoría de las ocasiones en estadios avanzados III o IV del sistema Ann Arbor en más del 80% de los casos.

A pesar de lo extenso de su afectación, sólo en torno a un 10-15% de los pacientes presentan

síntomas constitucionales. La médula ósea se encuentra muy frecuentemente afectada macroscópicamente con característicos infiltrados paratrabeculares.

Como ya se indicó, estos linfomas foliculares se caracterizan por presentar una traslocación (14,18) en un 85-90% de los casos y el gen *BCL-2* involucrado en esta anormalidad genética representa no solo una marca para poder localizar y diagnosticar la enfermedad sino que su amplificación, por efecto de la traslocación, ocasiona una inhibición de la apoptosis lo cual acarrea la acumulación progresiva de células de larga duración.

Otra entidad de este grupo es el linfoma de linfocitos pequeños que difiere solo formalmente de leucemia linfática crónica; esta neoplasia expresa CD5 en la mayor parte de los casos y puede representar un bloqueo en la maduración terminal de una célula B hacia una célula plasmática. Con frecuencia estos pacientes presentan con hipogammaglobulinemia e inmunodeficiencia humoral además de los fenómenos autoinmunes.

El grupo de los linfomas linfoplasmocitoides como enfermedad Waldenström (específicamente cuando secreta IgM) representan un paso más en la maduración del linfocito y suelen presentar con adenopatías periféricas generalizadas y afectación hepatoesplénica y de médula ósea.

Muy recientemente se ha introducido el concepto de linfoma de MALT que representa un grupo de linfomas que suelen ocurrir en áreas extranodales tales como el estómago y el pulmón. Antiguamente fueron denominados pseudo-linfomas.

En estudios recientes se conoce que las células en estos linfomas son monoclonales y CD5 negativas. Estos linfomas tienden a recaer en áreas extranodales, pero usualmente no se diseminan a la médula ósea o a ganglios linfáticos y usualmente tienen un buen pronóstico. La entidad recientemente descrita como linfoma monocitoide B se considera por algunos como la variedad ganglionar de estos linfomas MALT extranodales.

4.2. Linfomas de grado intermedio

Los linfomas del grupo intermedio de malignidad también abarcan a otras tantas entidades histopatológicas diferenciadas, sin embargo su comportamiento clínico y su

respuesta al tratamiento parece ser mucho más homogénea.

El paradigma de este grupo por su frecuencia lo constituye el linfoma difuso de células grandes de la WF, centroblástico en la clasificación de Kiel. Este grupo de linfomas se presenta en áreas extranodales hasta en un 40% de los casos. Al igual que su mayor poder proliferativo, la frecuencia de síntomas B es también mucho mayor que en los linfomas de bajo grado. Estos linfomas, a diferencia de los de bajo grado de malignidad, en un 30-40% de los casos presentan en estadios I-II de Ann Arbor y no infrecuentemente la presentación es extranodal.

Otro grupo denominado linfoma del manto ("mantle cell lymphoma") sería conceptualmente la forma inicial de lo que en su variedad difusa se ha denominado, linfoma linfocítico intermedio en EE.UU y linfoma centrocítico en la clasificación de Kiel. Su historia natural, pronóstico y tratamiento son actualmente motivo de discrepancias y amplio debate. Característicamente expresan CD5 y con mayor proporción a otros tipos de linfomas las cadenas livianas de las Igs son de tipo lambda (λ).

4.3. Linfomas de alto grado

Los linfomas de alto grado de malignidad como el linfoblástico y Burkitt con sus distintas variedades son muy poco frecuentes en los adultos, por lo que son escasos los estudios que se han publicado.

Son linfomas con un alto grado de proliferación y con gran frecuencia se diseminan precozmente al sistema nervioso central, médula ósea y sangre periférica.

El linfoma linfoblástico presenta un inmunofenotipo de células T inmaduras en más del 85% de los casos, expresando Tdt (desoxitimidin transferasa terminal) junto a los marcadores de células T CD2 y CD7; el 15% restante de los linfomas linfoblásticos corresponde a estirpe celular B expresando IgM citoplasmática junto a antígeno pan B CD19, CD20 junto a CD10 (CALLA). Dentro de la presentación clínica, el mediastino está comprometido hasta en un 50% de los casos, existiendo alto riesgo de compromiso extranodal, principalmente en el sistema nervioso central. Además de la diseminación frecuente al sistema nervioso central (SNC), médula ósea y sangre periférica, en los varones, los testículos son frecuentemente afectados, ya

sea en el momento de su presentación o en la recidiva de la enfermedad.

El linfoma Burkitt difiere en su presentación clínica dependiendo de su variedad endémica o no endémica. En su forma endémica es frecuente su presentación en grandes masas ganglionares en la región mandibular sobre todo en los niños. En la forma no endémica sin embargo su presentación más frecuente es en forma de grandes adenopatías, sobre todo en el abdomen o bien afectación intestinal a nivel ileocecal. La afectación primaria de otros órganos como la mama, tiroides, riñones o huesos no es rara y como se mencionó la recidivas o diseminación al (SNC) son frecuentes.

5. DIAGNÓSTICO

5.1. Anatomía patológica

El diagnóstico histológico es el primero que realiza el patólogo y es el que permite clasificar el tumor. Sin embargo debido a la dificultad de este cometido, al existir gran variabilidad en el diagnóstico entre patólogos e incluso en el mismo patólogo, era necesario utilizar otras técnicas más objetivas. Gracias al reciente desarrollo tecnológico, varias metodologías que permiten aportar información complementaria y valiosísima al diagnóstico morfológico, han sido utilizadas y son mencionadas en el punto 5.2.

5.2. Citogenética, biología molecular y citometría de flujo

La **citogenética** (ver capítulo 30) es una técnica de difícil realización y que probablemente será sustituida con otras más sencillas de hacer e interpretar. En el punto 2 se mencionaron algunas de estas alteraciones como la t(8,14), t(2,8) o t(8,22) en el linfoma Burkitt y la t(14,18) en los linfomas foliculares o las expresadas en la tabla 14-LNH-A-1 y que son relacionadas con determinados tipos morfológicos de linfomas y lo que es también importante con características clínicas y pronósticas. Por tanto, mediante este método se consigue información valiosa de determinadas alteraciones genéticas que, a su vez, proporciona medios de conocer la biología del tumor y en muchos casos su pronóstico.

Con sondas de DNA y RNA y mediante las técnicas “**Southern Blot**” o “**Northern Blot**” se puede determinar la presencia de

reordenamientos genéticos de segmentos génicos conocidos como oncogenes o genes que codifican las Igs, TCR, etc. (ver capítulo 30). Con estas técnicas se puede conocer y definir la naturaleza de pequeñas poblaciones celulares que constituyen muchas veces la población neoplásica. Su utilidad práctica se destaca cuando se analizan derrames pleurales o ascíticos sospechosos o cuando se analiza un aspirado de médula ósea y un aspirado de un nódulo o masa a cualquier nivel. Estas técnicas pueden detectar una célula maligna entre 100 células y esta sensibilidad ha sido multiplicada apreciablemente mediante la técnica reacción de la **polimerasa en cadena (PCR)** que es capaz de encontrar un célula entre 100.000 o más y que se vislumbra como una técnica que debe ser rutinaria. Mediante sondas conocidas es posible determinar mediante la técnica de PCR si un determinado fragmento genético se encuentra reordenado en el material estudiado. Este método presenta extraordinaria importancia cuando se estudia la presencia de enfermedad residual mínima. En el trasplante de médula ósea, así como en otras circunstancias se están llevando a cabo trabajos realmente importantes a este respecto, que pueden cambiar muchos conceptos formalmente establecidos hasta ahora, como son los criterios de curación y significados de alteraciones genéticas mantenidas.

La **citometría de flujo** es una técnica que se aprovecha de las propiedades visuales de la tecnología del láser y de computadores automatizados que distribuyen las poblaciones celulares, frente a distintas propiedades como el tamaño, o la birrefringencia cuando previamente se han teñido con colorantes que marcan ácidos nucleicos, antígenos de membrana, u otras moléculas de forma que se puedan conocer las diferentes poblaciones que forman parte del tumor analizado (ver capítulo 30). Con esta tecnología se puede conocer el contenido de DNA, la fracción de células que se encuentran en fase proliferativa activa, y en los distintas fases del ciclo celular. Estas proporciones varían entre diferentes tumores y concretamente existen claras diferencias entre los distintos grupos del linfomas de WF y sus propiedades proliferativas y contenidos en el DNA y RNA. Estas propiedades son tan interesantes que numerosos trabajos han correlacionado las características propias de estos tumores con el pronóstico. Por otra parte, utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos, diferentes antígenos expresados en la membrana o en

citoplasma de las células neoplásicas pueden ser detectados, ya sea en tejido fresco, o en parafina, o en un líquido corporal. Estos antígenos son expresados en diferentes momentos dentro del ciclo celular y también dependiendo de si la célula se encuentra en forma activada o latente. Algunos antígenos detectados por anticuerpos monoclonales como el Ki-67 o PCNA (“Proliferative Cellular Nucleolar Antigen”), se correlacionan con el poder proliferativo del tumor. Otros anticuerpos como Ki-1 sirven para definir células que muy posiblemente representen una entidad clinicopatológica diferenciada. Otros anticuerpos monoclonales sirven para poder conocer el inmunofenotipo de las células al expresar éstas determinados antígenos de un cierto linaje celular. Su caracterización permite conocer el tipo celular o línea inmunofenotípica de la neoplasia estudiada y su diferente biología y/o pronóstico.

Con los métodos antes mencionados se puede definir con mayor precisión las características biológicas de estas células, comparado con el solo análisis morfológico de ellas. Finalmente, la técnica de “microarray” (microarreglo) ha sido usada para definir la expresión génica de varias neoplasias linfoides y compararlas con la expresión génica en poblaciones linfoides normales. Esta técnica se ha aplicado a linfomas de células grandes con el fin de identificar patrones de expresión génica que se correlacionen a pronóstico, lo que permitiría focalizar las terapias en relación a genes activados o inhibidos, lo que se correlacionaría a pronóstico.

6. DIAGNÓSTICO DE EXTENSIÓN

La evaluación pretratamiento de estos linfomas va enfocada a conocer su extensión y aquellos factores pronósticos que permiten saber el riesgo y por tanto ajustar el tratamiento conforme a éste. Esta evaluación consiste en términos generales en las siguientes pruebas diagnósticas:

- a) Historia completa y examen físico con especial interés en presencia de adenopatías, aumento del tamaño de órganos como el hígado y el bazo, exploración del anillo de Waldeyer, testículos, presencia de lesiones dérmicas, examen neurológico completo, etc.
- b) Perfil sanguíneo y bioquímico con especial interés en la LDH, β_2 microglobulina y albúmina.
- c) Radiografía de tórax.
- d) TAC (Tomografía axial computarizada) de

abdomen y/o tórax, dependiendo de los hallazgos de la radiografía de tórax.

e) Biopsia bilateral de médula ósea.

f) Otras pruebas opcionales serían: Radiografías del tracto digestivo en pacientes con sangre oculta en heces o afectación del anillo de Waldeyer.

g) Punción lumbar con citología, así como TAC craneal en pacientes que presenten hallazgos neurológicos, linfoma testicular, linfoma linfoblástico o que tengan afectación de médula ósea por linfoma del grupo intermedio o alta de la WHO.

h) Pruebas de funcionalidad pulmonar y cardiaca serán realizadas en aquellos pacientes donde bien la radioterapia o drogas como adriamicina van a administrarse.

i) Pruebas de biología molecular o análisis de inmunofenotipo, al igual que marcadores de proliferación se realizarán en la medida de las posibilidades diagnósticas del centro.

7. TRATAMIENTO

7.1. Manejo de los linfomas de bajo grado (LBG)

a) LBG estadio I-II

La lenta progresión de los linfomas foliculares y su clasificación como linfomas de bajo grado, al dar la impresión de ser «tumores de buen pronóstico», se han convertido en los principales obstáculos para el avance en la búsqueda de su curación. La realidad es que la supervivencia global a 10 años es solo 40%, la que varía entre 70% en etapas I-II y 30% en etapas IV. Si bien el pronóstico en etapas precoces es favorable, el pronóstico a mediano plazo es malo en las etapas avanzadas que son las más comunes, ya sea por la natural progresión de la enfermedad, como por su transformación a un linfoma más agresivo, linfoma difuso de células grandes, siendo el riesgo de transformación de 44% a 5 años y 67% a 10 años. Esta transformación determina mayor resistencia a tratamiento con una supervivencia post-transformación de 20% a 2 años.

Últimamente se tiende a enfocar a los linfomas foliculares desde sus inicios como una enfermedad sistémica. A través de la etapificación clínica, examen físico, radiografía de tórax, tomografía computada de abdomen y pelvis y biopsia de médula ósea en cresta iliaca bilateral, el 15% de los linfomas foliculares son catalogados en etapas I-II. Si a esto se le agrega laparotomía exploradora, se encuentra

enfermedad abdominal oculta en 40-60% de los casos, es decir solo el 6% de los pacientes son realmente etapas I-II. En el 85%-90% de los linfomas foliculares se encuentra la t(14;18), pudiéndose detectar aún en etapas tempranas a través de PCR en sangre y médula ósea. Esta técnica es capaz de detectar entre 1/100.000 hasta 1/1.000.000 de células con el reordenamiento de *BCL-2*-JH. Según estudios realizados en Hospital MD Anderson (MDACC) en linfomas foliculares en etapas iniciales (I-II), se encontró que el 73% de los casos fueron positivos en la detección de este reordenamiento en la sangre. Esto indicaría que la enfermedad es sistémica desde sus inicios.

Si bien es cierto que los estadios precoces son raros, fue en esta población donde primero se vio la posibilidad de una prolongada supervivencia libre de enfermedad. Dentro de los primeros intentos terapéuticos estuvo la radioterapia, ya sea con campos limitados al área afectada o con extensión regional o aún como radioterapia nodal completa (RNC). El utilizar campos irradiados restringidos requiere un estudio de etapificación agresivo, con laparotomía y esplenectomía. De lo contrario si la etapificación es solo clínica, se recomienda radioterapia nodal completa para tratar la enfermedad oculta. Sin embargo la RNC presenta severa toxicidad gastrointestinal y medular, incluyendo mielodisplasia, lo que hace difícil su aplicación. En la experiencia sin laparotomía de etapificación del Hospital St Bartholomew con radioterapia (RT) solo sobre las áreas afectadas, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 10 años fue de 50% y la supervivencia actuarial a 5 años fue de 79%. En Princess Margaret con RT sobre campos afectados o RT regional, la SLE a 10 años fue de 53% y la supervivencia específica por enfermedad fue de 74%. En Stanford, con una población tratada más joven que el promedio en que 1/3 fue sometida a etapificación quirúrgica, la SLE a 10 años fue de 54%. Visto de otra manera, en etapas precoces los linfomas foliculares tratados con RT a 10 años tienen un 50% de recaídas y un 25% de ellos fallecen a causa de la enfermedad.

En un intento por mejorar los resultados se ha agregado quimioterapia. En la experiencia de MDACC se utilizó COP-Bleo (Ciclofosfamida, Oncovin, Prednisona-Bleomicina) y en los pacientes con factores de riesgo tal como LDH elevada, masa voluminosa o compromiso extranodal se agregó doxorubicina (CHOP-Bleo), administrándose RT solo en los sitios

comprometidos. La SLE y la supervivencia global a 5 años fue de 74% y 89%, respectivamente, lo que es claramente superior a la SLE de 40-50% que se obtiene con RT sola. La experiencia de St Bartholomew con quimioterapia más RT es similar. Es decir, con el enfoque de terapia asociada actualmente se está obteniendo que un importante porcentaje de linfomas foliculares en etapas precoces se mantengan sin evidencia de enfermedad por tiempo prolongado; si esto corresponde a «curación» requiere de un seguimiento más prolongado.

b) LBG estadio III-IV

Frente a la gran mayoría de los linfomas de bajo grado que se estadifican como etapas III-IV (>85%), inicialmente cayó un manto de pesimismo (enfermedad incurable) y de abandono (“watch/wait”, w/w abstención terapéutica, observación) a pesar de ser una entidad ampliamente respondedora a un gran espectro de drogas ya sea como monoquimioterapia (clorambucil, ciclofosfamida, fludarabina, prednisona) o en combinación (COP, CHOP, ESHAP), a la vez que responden a RT y terapias biológicas (interferón, anticuerpos monoclonales).

Entre los tratamientos con monoquimioterapia, el clorambucil es tal vez el más ampliamente difundido, demostrando que es bien tolerado, con respuestas de ≈70%, con un 30% de remisiones completas y con una duración media de la remisión típicamente de 2 años, pero con la mayoría de los pacientes eventualmente falleciendo de linfoma.

En el “National Cancer Institute” de EE.UU se comparó en etapas III-IV, la política de “watch/wait” (w/w) contra terapia agresiva (PROMACE-MOPP) más RT en aquellos pacientes que alcanzaron remisión completa. La población se randomizó equilibradamente y es comparable en cuanto a edad, sexo, e histologías, excepto en relación a síntomas B que predominan en el grupo tratado. A los 5 años, solo el 35% de los pacientes en w/w no han requerido algún tratamiento y el 15% han transformado a una histología más agresiva (tabla 14-LNH-A-5). La supervivencia global es similar, reflejando probablemente el rescate que se obtiene al tratar la progresión pero la SLE es 12% en w/w contra 51% en tratamiento precoz y la posibilidad de estar continuamente libre de enfermedad solo se logra con tratamiento precoz (51% vs. 0%). Hay que destacar que solo en la población libre

de enfermedad se puede eventualmente hablar de «curación» (tabla 14-LNH-A-6). Igualmente hay que destacar que la calidad de vida es superior para los enfermos que recibieron tratamiento precoz ya que 51% han logrado la remisión continua mientras que la mayoría de los w/w han recibido tratamiento continuo debido a los pobres resultados de la quimioterapia en este grupo en el momento de la progresión. En la experiencia con poli-quimioterapia se observa posiblemente una

respuesta más rápida y sobre todo en pacientes de mayor riesgo esta puede ser mejor, lo cual es difícil de probar en un estudio, ya que, posiblemente, frente a un enfermo de riesgo (ej. síntomas B, masa mediastínica, compromiso extranodal) se escoja poli-quimioterapia con doxorubicina. En MDACC con estadios avanzados (IV) tratados con CHOP se obtuvo un 77% de remisiones completas pero con una curva de continua recaída.

Tabla 14-LNH-A-5. Distribución por estadio Ann Arbor de la población en observación y en tratamiento precoz (Estudio SWOG)

Estadios Ann Arbor	En observación (%)	En tratamiento (%)
III- A	16	20
III-B	0	2
IV- A	82	62
IV- B	2	16

Tabla 14-LNH-A-6. Resultados entre observación y tratamiento precoz en Linfomas no Hodgkin grado bajo, seguimiento medio 5 años, estadios III-IV

	En observación	Tratamiento precoz
Número pacientes	41	43
Pacientes vivos	83%	84%
Pacientes fuera de tratamiento	31%	58%
Pacientes vivos sin enfermedad	12%	51%
Pacientes continuamente libres de enfermedad	0%	51%

c) Nuevas estrategias

El sello de los linfomas foliculares es la t(14;18), presente en el 85% de los casos, esta traslocación causa una transposición del gen *BCL-2*, que normalmente se encuentra en el cromosoma 18 banda 21 a un nuevo lugar en el cromosoma 14, al lado de la banda q32 justamente próximo al gen de la cadena pesada de Ig («JH»). Este cambio genera un nuevo cromosoma con la traslocación t(14;18), en donde el gen *BCL-2* se activa, posiblemente como consecuencia de la proximidad con las secuencias promotoras de inmunoglobulinas, (JH). Este reordenamiento ocurre dentro de una zona pequeña del *BCL-2*, llamada «mbr» (“major breakpoint región”) en el 85% de los casos y en un 10% ocurre el punto de quiebre denominado

mcr (“minor clust región”). Se ha comprobado, por PCR, la presencia del gen en todas las etapas clínicas, previo tratamiento. En aquellos en que eran positivos previo tratamiento (CHOP) en que clínicamente se lograba remisiones completas, la mayoría persistían positivos para bcl-2 por PCR. Tanto en la experiencia de Griben como de Cabanillas se demuestra que el régimen CHOP es incapaz de inducir remisiones completas moleculares. La importancia de ésta se puede inferir de dos estudios; en el primero Griben demostró que pacientes sometidos a megadosis de quimioterapia con radioterapia seguido de trasplante autólogo de médula ósea lograban negativizar el PCR en médula ósea en un 57%. Ninguno de estos casos recayó después de un seguimiento de 6 años. En cambio en los pacientes en que el PCR postrasplante era

persistentemente positivo, 71% recayeron. En otro grupo los resultados de PCR fluctuaron entre positivo y negativo. Su evolución demostró una frecuencia de recaída intermedia de 36%. Estos resultados no demuestran, definitivamente, si las células de linfoma residuales provienen del

tumor no erradicado o provienen de la médula reinfundida, pero sí demuestran que la persistencia de positividad por PCR después de trasplante es el más firme indicador pronóstico de recaída (tabla 14-LNH-A-7).

Tabla 14-LNH-A-7 Relación entre remisión molecular y clínica (n:134).

Categorías postratamiento	n	Recaídas (%)
Gupo 1: PCR negativo inmediatamente persistentemente post-ABMT	58	0
Gupo 2: PCR post-ABMT pero revierte a normal varios meses después.	19	0
Grupo 3: PCR positivo persistentemente post-ABMT.	35	71
Grupo 4: PCR fluctuante entre positivo y negativo post-ABMT una muestra positivo y otra negativo al mismo tiempo.	22	36

ABMT, Trasplante Autólogo de Médula Ósea.

Dentro de las drogas activas en linfomas foliculares, destaca la Fludarabina, con alta actividad como agente único o en combinación en terapias de primera línea o tratamiento de recaídas post CHOP. El esquema FND (Fludarabina, mitoxantrona, Dexametasona), logra excelente respuestas clínicas con alto porcentaje de remisiones moleculares.

Las terapias con inclusión de anticuerpos monoclonales rápidamente han ganado aceptación como un importante componente en los tratamientos de los linfomas de células B, tanto de bajo grado como agresivos. Estos anticuerpos tienen varios mecanismos de acción incluido activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, bloqueo de receptor y activación de apoptosis. Rituximab (Mabthera) un anticuerpo monoclonal anti-CD20, induce respuesta completa y parcial en 50 a 60% de los linfomas foliculares indolentes, con sobre 40% de posibilidad de responder en caso de recaída tratada nuevamente con el anticuerpo. Dado la baja posibilidad de mielosupresión o efectos adversos, comparado a esquemas de quimioterapia, es una buena opción en pacientes con recaída de linfoma de bajo grado.

La no existencia de toxicidad cruzada con quimioterapia, los diferentes mecanismos de acción y la sinergia tanto *in vitro* como *in vivo*, han llevado a múltiples trabajos de combinación de quimioterapia con Rituximab. En todos ellos, se ha demostrado un beneficio en términos de respuestas totales, SLE y remisiones moleculares. Últimamente se ha demostrado que la mantención cada 6 meses con Rituximab por 2 años ha resultado en una alta tasa de SLE.

Anticuerpos murinos incorporando radioinmunoterapia con ^{131}I (tositumomab) o Yttrium90 (90Y) (ibritumomab) han dado buenos resultados en trabajos de investigación al igual que antígeno CD22 o anticuerpos anti-idiotipo.

7.2. Manejo de los linfomas de grado intermedio

Los linfomas de grado intermedio, definidos de acuerdo a la WF, o agresivos según OMS/WHO fueron el primer grupo de enfermedades linfoproliferativas que lograron ser curables, y es donde en los últimos 25 años ha habido un gran número de ensayos clínicos e investigación. El más común de los linfomas de este grupo es el linfoma difuso de células

grandes, que constituye el 33% de todos los linfomas. La mayoría (90%) son de estirpe celular B. El linfoma folicular de células grandes, es también de grado intermedio aunque tiende a comportarse ligeramente más indolente que su contraparte difusa, pero se considera de grado intermedio. Hay consenso en que estas dos patologías son curables, aun en etapas avanzadas. En cuanto al linfoma inmunoblástico considerado en la WF como de alto grado, su comportamiento clínico y su respuesta a tratamiento difiere poco del linfoma difuso de células grandes, por lo que se considerará, al igual que el linfoma de células grandes K-1 positivo, en este grupo para fines de evaluación y terapéutica. En este grupo de linfomas si se obtiene remisión completa y se mantiene por más de tres años, la posibilidad de recaída es muy escasa, por lo tanto la mayoría de los pacientes después de este periodo se pueden considerar curados. Hay que hacer la salvedad que los linfomas foliculares de células grandes pueden tener recaídas más tardías. En cuanto a los linfomas difusos mixtos ocurren más infrecuentemente, la mayoría son de estirpe celular T y pueden ser incluidos en la categoría de linfomas de células T periféricos, siendo el linfoma de Lennert una variación de este subtipo. La experiencia es escasa y la potencialidad de cura es menor. En cuanto a los linfomas difusos de células pequeñas hendidas, son tumores muy particulares por lo que nos referiremos a ellos en forma separada.

Antes de evaluar la terapia de los linfomas de grado intermedio es importante considerar clasificarlos según factores pronósticos. El conocido estadiaje Ann Arbor por sí solo no es adecuado. Bastantes estudios han confirmado que aspectos clínicos como LDH, Beta2-microglobulina (β_2m), masa y tamaño tumoral, estado funcional ("performance status"), número de sitios extranodales y número de sitios nodales correlacionan bien con el pronóstico de los linfomas de células grandes. Muchos de estos factores son interrelacionados. Es así como los niveles de β_2m y LDH pretratamiento reflejarían la masa tumoral y algunas características inherentes al tumor en su relación con el huésped y la respuesta inmunológica de este hacia la neoplasia correlacionándose claramente con el pronóstico.

En el último tiempo se ha validado el uso del «International Index», un sistema de estratificación sencillo y capaz de predecir la supervivencia de enfermos con linfoma de grado intermedio. Éste es el resultado de un estudio cooperativo entre 16 instituciones de EE.UU,

Europa y Canadá en que se analizaron 2031 pacientes con diagnóstico de linfoma difuso mixto, difusos de células grandes o inmunoblástico, todos tratados con esquemas basados en doxorubicina. El sistema se elaboró con el fin de predecir la supervivencia global basándose en aspectos clínicos que reflejaran el crecimiento y potencial invasivo del tumor (estadio Ann Arbor, LDH, número de sitios de enfermedad extranodal), la respuesta del paciente al tumor ("Performance Status") y la capacidad del paciente de tolerar el tratamiento intensivo (edad, "performance status"). El análisis concluyó que cinco características pretratamiento tenían significancia; edad (≤ 60 vs >60 años), estadio Ann Arbor (I-II vs III-IV), número de sitios de enfermedad extranodal (≤ 1 vs >1), "performance status" (0/1 vs ≥ 2) y LDH (normal vs elevada). Cada una de estas variables se asocian en forma independiente y comparable con el riesgo de fallecer del paciente, por lo que el riesgo relativo puede ser caracterizado por la adición de los diferentes factores de riesgo presentes al momento del diagnóstico. De esta manera se configuran 4 grupos de riesgos basados en el número de factores desfavorables, relacionándose su puntuación con la obtención de remisión completa y la supervivencia libre de recaída y supervivencia global (tabla LNH-A-8). Una observación importante es la relación existente entre obtención de remisión completa y la supervivencia tanto libre de enfermedad como global. El inconveniente de este sistema es el uso de variables subjetivas como son estado funcional ("performance status") además de que discrimina en diferentes grados de riesgo; bajo, bajo-intermedio, alto-intermedio y alto, lo cual dificulta la decisión terapéutica para aquellos grupos intermedios. La β_2m ha demostrado utilidad en discriminar como factor pronóstico cuando su valor es >1.5 veces el valor normal entre pronóstico muy favorable (83% SLE a 3 años, con 93% sobrevivida global) y muy mal pronóstico (24% SLE a 3 años, con 46% sobrevivida global). La expresión de la proteína *BCL-2* en linfomas de células grandes B ha sido reportado como factor adverso, mientras la expresión de *BCL6* se correlaciona con mejor resultado. La utilidad de un índice de riesgo, es agrupar los casos por histología y factores de riesgo en enfoques terapéuticos diferentes, lo que permite discriminar en la intensidad de la terapia de acuerdo con pronóstico. De esa manera se pueden comparar resultados en estudios de poblaciones de riesgo similar tratados con terapias de baja intensidad (CHOP o similar) intermedio (Mabthera CHOP) o alto riesgo (trasplante).

Tabla 14-LNH-A-8. Distribución de los grupos de riesgo de acuerdo a la puntuación de “International Index”, correlación con remisión completa (RC) post-tratamiento, supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global

International Index	Riesgo	RC %	SLE a 5 años (%)	Sobrevida global a 5 años (%)
0,1	Bajo	87	70	73
2	Bajo-Intermedio	67	50	51
3	Alto-Intermedio	55	49	43
4,5	Alto	44	40	26

Manejo de los linfomas de grado intermedio

La mayoría de la literatura publicada hasta ahora, se basa en el estadio Ann Arbor y de esta manera se ha visto que en enfermedad localizada (AA I-II) el manejo solo con radioterapia da una SLE de 25-30%, cuando se agrega quimioterapia la supervivencia global y la SLE se incrementan a 60-90%, pero como se vio antes persiste la discrepancia en la definición a través de AA de enfermedad mínima o voluminosa. La literatura parece apoyar la idea de que etapas AA I-II sin enfermedad voluminosa pueden ser curados en un 75-80% con una combinación de quimioterapia que contenga doxorubicina. La dosis de quimioterapia puede ser reducida de los usuales 6 ciclos a 3, consolidando luego con radioterapia sobre los sitios comprometidos.

En cuanto al tratamiento de las etapas avanzadas de linfomas de células grandes no hay duda del papel de la quimioterapia, la que se inició al principio de la década del 70 utilizando ciclofosfamida, vincristina, prednisona con (C-MOPP) o sin procarbazona, (COP). Luego se agregó adriamicina creándose el CHOP llegando a ser el régimen más ampliamente conocido y luego en los mediados de los 80 se crearon regímenes intensos basados en las hipótesis de Goldie y Coldman que suponía la aparición espontánea vía mutación de células tumorales

resistentes a una o más drogas, independiente de la exposición de esta célula a una determinada droga. Al exponer la población tumoral al máximo de drogas posibles precozmente se evita la supervivencia y posterior progresión de células tumorales resistentes. La otra hipótesis en boga en ese período fue la de Hryniuk y Bush concerniente a la intensidad de dosis que postulaba que la muerte de la célula tumoral se relacionaba a la intensidad de un programa de tratamiento, calculado por los miligramos de droga por semana. De esta manera se crearon regímenes llamados de tercera generación basados en estas dos teorías; máximo número de drogas, a dosis máxima en un período de tiempo mínimo. Los regímenes creados obtenían RC en el rango de 70-80% pero con un seguimiento escaso y una edad media de 45 años, reportándose diferentes tasas de recaída, en un rango de 30-40%. En vista de esta discordancia el SWOG realizó un estudio randomizado en 899 pacientes con linfomas de grado intermedio o alto, excluyendo los linfoblásticos, entre CHOP, m-BACOD, MACOP-B y ProMACE-CytaBOM. La randomización fue homogénea en relación a edad, histología y factores de riesgo. La respuesta a tratamiento fluctuó entre 80 y 87%, con RC entre 44 y 56%, sin diferencia significativa en cuanto a supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (tabla 14-LNH-A9).

Tabla 14-LNH-A-9. Relación entre tratamiento, remisión completa molecular y recaída de enfermedad

Tratamiento	n	RC molec	Recaídas en RC molec	Fallas molec	Recaídas en fallas molec
CHOP-B	20	4(20)	0	16(80)	5(31)
ATT	23	19(83)	0	4(17)	2 (50)
Total	43	23	0	20	7(35)

RC, remisión completa; (), porcentaje; molec, molecular

El gran avance de los últimos años es la incorporación de los anticuerpos monoclonales. El uso de anticuerpo anti-CD20 (Rituximab = Mabthera) ha demostrado mejor SLE y sobrevida global. La combinación Rituximab con esquema tipo CHOP se ha convertido en el estándar para linfoma agresivo con factores de riesgo como edad avanzada. El grupo francés GELA demostró en un estudio fase III en Linfomas células grandes CD20 (+) en edades entre 60 y 80 años Rituximab-CHOP versus CHOP remisión completa (75 vs 63%), SLE a 2 años (57% vs 38%) y sobrevida global a 2 años (70% vs 57%) favoreciendo la combinación Rituximab CHOP sobre CHOP solo, considerándose actualmente la combinación Rituximab-CHOP el esquema sobre el que se debe comparar nuevos protocolos terapéuticos.

Esto ha llevado a investigar el uso de intensificación con altas dosis de quimioterapia seguido de trasplante autólogo de células troncales hematopoyéticas (TCTH-A), como parte de la terapia inicial en pacientes con factores de mal pronóstico. En esta línea, recientemente se presentó la experiencia del "Groupe Ouest-Est des Leucémies et des Autres Maladies du Sang" (GOELAMS) en 197 pacientes con Linfoma no Hodgkin agresivo, descartando linfoblástico, manto y Burkitt, con máximo 2 factores de riesgo según IPI (Índice de Pronóstico Internacional). Se randomizó entre CHOP x 8 vs. quimioterapia inducción seguido de autotrasplante. El resultado fue similar en pacientes con bajo IPI, es decir bajo riesgo, y mejor SLE y sobrevida global en pacientes de alto riesgo. Esto confirma la hipótesis que al diferenciar las terapias según factores de riesgo, debe intensificarse el tratamiento en la población de alto riesgo, quedando el esquema CHOP o similar para riesgos bajos. Están en curso investigaciones con

intensificación de dosis junto a uso de anticuerpos monoclonales.

Terapia de rescate

A pesar de los avances, tanto en el conocimiento de la enfermedad como de su tratamiento, persiste una población ya sea refractaria a la terapia inicial o que presentan recaída. Esto ha derivado en la investigación de los regímenes llamados de rescate principalmente con altas dosis de quimioterapia con soporte de TCTH-A. En este punto lo fundamental es la «sensibilidad» del tumor a la quimioterapia. La supervivencia de los pacientes que son primariamente refractarios a su quimioterapia inicial es prácticamente cero. De la misma manera en los enfermos que han recaído, pero permanecen respondedores a los tratamientos de rescate (recaída sensible) la SLE a 3 años es alrededor de 36% contra 14% en pacientes resistentes a terapia, siendo la variable quimiosensible o quimiorresistente el más importante factor en relación a predecir la respuesta a TCTH-A. En cuanto a qué quimioterapia usar, al principio de la década de los 80, se inició una serie de protocolos ensayando drogas sin resistencia cruzada con la quimioterapia inicial, generalmente en base a doxorubicina. El primer régimen llamado MIME (Metil-GAG, Ifosfamida, Metotrexato, y Etoposido) dio una RC de 33% con una supervivencia a 3 años de 20%. Posteriormente, basándose en la observación del sinergismo entre platino y altas dosis de Ara-c se ideó el régimen DHAP (Dexametasona, altas dosis de Ara-c, Platino) obteniéndose RC prolongada en 29%. El más reciente esquema de rescate, fundamentalmente para pacientes tratados previamente con CHOP o regímenes similares, es la integración de dos regímenes MINE (Mesna, Ifosfamida, Mitoxantrona, Etoposido)

llegando a máxima respuesta y luego cambiar a ESHAP (Etopósido, Solomedrol, altas dosis de Ara-c, Platino) consolidando con altas dosis de quimioterapia (BEAC) y TCTH-A. La respuesta global a 28 meses es de 44% de RC mantenidas con 50% de supervivencia. Si se desglosa la población en linfomas intermedios o transformados, se encuentra que los LGI tienen a 22 meses una supervivencia de 58% con 55% de RC mantenidas en contraste con los linfomas transformados en que la supervivencia es 38% a 14 meses con solo 20% de RC mantenidas a 8 meses. Hay que destacar que estos resultados se obtienen en pacientes respondedores a la inducción con MINE-ESHAP como requisito para la consolidación con TCTH-A. Los no respondedores tanto como los transformados tienen un peor pronóstico.

Ahora bien, qué papel juega en las recaídas sensibles una mayor intensificación con TCTH-A, es una pregunta con una respuesta clara. En 1988 se inició el estudio cooperativo entre Europa, Australia y USA, denominado estudio de PARMA. En este estudio, se trataron 163 pacientes con LNH grado intermedio y 52 pacientes con alto grado, todos en recaída postterapia con Doxorubicina. Los pacientes fueron tratados con DHAP (Dexametasona, altas dosis de Ara-C, Platino); aquellos que respondieron después de dos cursos de quimioterapia (recaída sensible) fueron randomizados entre 4 cursos más o consolidación con BEAC (BCNU, Etopósido, Ara-C, Ciclofosfamida) seguido de TCTH-A. De 215 pacientes enrolados, el 58% fue sensible al tratamiento de rescate, 25% tuvo remisión completa y 34% remisión parcial, y por lo tanto randomizados. La SLE a 5 años fue de 46% en el grupo trasplantado y 12% en el grupo de quimioterapia sin trasplante ($p=0.001$) y la supervivencia global fue 53% y 32%, respectivamente ($p=0.038$). Se concluyó que en los pacientes en recaída, sensibles a quimioterapia, el tratamiento con altas dosis de quimioterapia con TCTH-A mejora la SLE y la supervivencia global en comparación a la terapia «estándar». La experiencia de agregar anticuerpos monoclonales a los esquemas de rescate y de consolidación mejora los índices de respuesta y eventualmente la sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global.

Como se indicó antes, son los pacientes que no alcanzan remisión completa en los primeros ciclos de tratamiento los que tienen pocas posibilidades de lograrlo con los subsiguientes

ciclos, siendo esto válido tanto en casos sin previo tratamiento como a aquellos en recaída. Esto ha llevado a plantear la opción de trasplante alogénico, especialmente no mieloablativo (mini-trasplante) como una opción en casos primariamente refractarios o recaídas postrasplante. La experiencia es alentadora, con SLE sobre 50%, lo que abre una nueva opción a pacientes de muy mal pronóstico.

7.3. Manejo de los linfomas de alto grado

Corresponden a esta categoría el linfoma de células pequeñas no hendidas, linfoma linfoblástico y linfoma inmunoblástico. Tal como se mencionó anteriormente, el linfoma inmunoblástico, a pesar de ser agresivo y con alta fase S, se considera una variante de los linfomas difusos de células grandes, y se trata como tal.

El linfoma de células pequeñas no hendidas, consistente de dos variantes patológicas, tipo Burkitt y no Burkitt, que no difieren en su presentación clínica ni en la respuesta a tratamiento, siendo más frecuente en niños, pero en relación a infección por HIV, su frecuencia ha aumentado en la población adulta relacionándose claramente a las alteraciones inmunológicas secundarias a la infección por este virus. Este tumor de células B, tiene el más alto índice de crecimiento dentro de las neoplasias, siendo su diagnóstico una emergencia oncológica, por lo que se debe iniciar tratamiento a la brevedad. Dado su gran sensibilidad a la quimioterapia y su alto índice mitótico, estos pacientes tienen elevado riesgo de complicarse con síndrome de lisis tumoral, por lo que todas las medidas profilácticas deben tomarse y en caso de complicarse se deben implementar medidas de sostén tales como hemodiálisis e ingreso a una unidad de cuidados intensivos, con lo que se logran claras posibilidades de curación. Dada la alta tendencia a compromiso del SNC, es mandatorio su evaluación inicial y énfasis en la profilaxis durante el tratamiento. En MDACC se ha usado un esquema de HyperCVAD con buena tolerancia y respuesta similares a esquemas más complicados y tóxicos (BFM).

Los linfomas linfoblásticos, son tumores de células T, cuya frecuencia no es superior al 5% de los linfomas en adulto, siendo el linfoma más frecuente en niños. Frecuentemente se presenta en hombres jóvenes, con masa mediastínica, y síndrome de vena cava superior. El compromiso

de médula ósea es frecuente y biológicamente es la misma entidad que la leucemia linfoblástica aguda de células T y debe tratarse como tal. El uso de esquemas tipo CHOP dan una supervivencia inferior a 10% a dos años, con una media de 17 meses. Recientemente, en estas dos entidades, se ha comunicado del uso de altas dosis de Ara-c y Metotrexato alternando con altas dosis fraccionadas de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina junto a terapia intratecal, producen RC en un rango de 80-90% con SLE a 2 años de alrededor 60-70%.

Manejo de Linfoma del Manto

Esta entidad recién es reconocida a partir de la clasificación REAL, en que se une morfología y origen de la célula neoplásica. La clasificación de la OMS la describe como de tamaño intermedio con cromatina nuclear irregular, es la contraparte de células normales de los folículos primarios y de la zona del manto de los folículos secundarios. La arquitectura del ganglio es generalmente difusa, pero puede ser nodular debido al crecimiento centrípeto de las células desde la zona del manto, obliterando los folículos germinales (simula Linfoma folicular) y de ahí la confusión en clasificaciones antiguas al calificarlo de linfoma de bajo grado. El inmunofenotipo es: CD20(+), CD5(+), CD10(-), CD23(-). Citogenéticamente, la marca es la t(11;14)(q3;q32), con sobre-expresión de ciclina D1, la que acorta la fase G1, facilitando el paso a fase S.

Clínicamente, se presenta en estadios avanzados, III-IV, con compromiso medular (92%) y gastrointestinal (88%) el que es en forma difusa y multicéntrico. En este último caso destaca el compromiso de colon en la forma de papulosis linfomatoide (80%) y gástrico (60%). El Linfoma del Manto es una enfermedad sistémica, con compromiso usual gastrointestinal, médula ósea/ sangre y adenopatías.

Los esquemas basados en doxorubicina clásicos (CHOP, ASHAP) dan una supervivencia libre de enfermedad de 1.5 años con una supervivencia global de 3 años. Análogos de Purinas (Fludarabina) no demuestran mejores resultados; las respuestas son cortas, con recaídas continuas, precoces a diferencia de Linfomas foliculares de bajo grado. En agregar Rituximab a los esquemas CHOP no mejoraron los resultados. El esquema HyperCVAD que

combina ciclofosfamida fraccionada con doxorubicina, vincristina y dexa, alternando con dosis altas de metotrexato y ARA-C son los primeros en lograr altas tasas de remisiones completas con supervivencia libre de enfermedad francamente superior a esquema CHOP. El esquema HyperCVAD mejora sus resultados al agregar Rituximab, con remisión completa de 87%, con supervivencia libre de enfermedad a 3 años de 67% y supervivencia global de 81%. Otras estrategias como quimioterapia altas dosis secuenciales incluyendo Rituximab han dado resultados similares a R-HyperCVAD. Nuevas estrategias como trasplante alogénico no mieloablatoivo ha dado excelentes resultados en una población de alto riesgo o recaída y junto con los agresivos esquemas de primera línea actualmente disponibles, permiten buena opción de "curación" sobre todo en pacientes menores de 65 años.

Manejo Linfomas de Zona Marginal

El término linfoma de zona marginal (MZL) comprende 3 subtipos, nodal, primario esplénico, extranodal y de tipo linfoma asociado a mucosa (MALT), este último el más frecuente y conocido como linfoma MALT gástrico. La célula neoplásica es un linfocito maduro, típicamente expresan CD20(+), CD79(+), CD5(-), CD10(-), CD23(-), y expresan el antígeno asociado a zona marginal CD21 y CD35. La demostración de restricción de cadena liviana de Inmunoglobulina es importante en la diferenciación con procesos inflamatorios crónicos. La no expresión de CD5 permite la diferenciación con linfoma del manto y linfoma de linfocitos pequeños, la no expresión de ciclina D1 lo diferencia con linfoma de manto y la no expresión de CD10 los diferencia de linfomas foliculares. El más estudiado y frecuente linfoma MALT gástrico, se origina en una infección crónica por *H Pylori*, lográndose regresión completa post erradicación con antibióticos del agente causante. Es importante recalcar que la involución post erradicación del *H Pylori* tarda no menos de 6 meses en hacerse evidente, por lo que su seguimiento y controles endoscópicos deben ser cada 6 meses. Las otras manifestaciones clínicas de esta variedad de Linfoma comparten el comportamiento clínico de lesión indolente y de buen pronóstico vital aun con persistencia de lesión. Salvo en el caso gástrico, en que el tratamiento es antibióticos, no está definido el tratamiento, sugiriendo manejo local, cirugía o radioterapia y no esquemas agresivos de quimioterapia.

LECTURAS SUGERIDAS

Alizadeh, A.A., *et al.*, "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling". *Nature*, 403(6769): 503-11, 2000.

Branson, K., *et al.*, "Role of Nonmyeloablative Allogeneic Stem-Cell Transplantation After Failure of Autologous Transplantation in Patients With Lymphoproliferative Malignancies". *J Clin Oncol*, 20(19): p. 4022-4031, 2002.

Cavalli, F., *et al.*, "MALT Lymphomas". *Hematology*, 2001. 2001(1): 241-258.

Coiffier, B., *et al.*, "Aggressive lymphoma: improving treatment outcome with rituximab". *Anticancer Drugs*, 13 Suppl 2: S43-50, 2002.

Coiffier, B., *et al.*, "CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma". *N Engl J Med*, 346(4): 235-42, 2002.

Davis, T.A., *et al.*, "Rituximab Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Non-Hodgkin's Lymphoma: Safety and Efficacy of Re-Treatment". *J Clin Oncol*, 18(17):3135-3143, 2000.

Escalon, M.P., *et al.*, "Nonmyeloablative Allogeneic Hematopoietic Transplantation: A Promising Salvage Therapy for Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma Whose Disease Has Failed a Prior Autologous Transplantation". *J Clin Oncol*, 22(12): 2419-2423, 2004.

García-Manero, G. and Kantarjian, H.M. "The hyper-CVAD regimen in adult acute lymphocytic leukemia". *Hematol Oncol Clin North Am*, 14(6): 1381-96, x-xi, 2000.

Gianni, A.M., *et al.*, "Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen)". *Blood*, 2003. 102(2): 749-755.

Gribben, J.G., *et al.*, "Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow". *Blood*, 83(12):3800-7, 1994.

Harris, N.L., *et al.*, "The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting Airlie House, Virginia". *Hematol J*, 1(1): 53-66, 2000.

Khouri, I.F., *et al.*, "Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma". *J Clin Oncol*, 1998. 16(12): 3803-9.

Khouri, I.F., *et al.*, "Nonablative Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Advanced/Recurrent Mantle-Cell Lymphoma". *J Clin Oncol*, 2003. 21(23): 4407-4412.

López-Guillermo, A., *et al.*, "Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma". *Blood*, 93(9): 3081-7, 1999.

Majlis, A., *et al.*, "Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants". *J Clin Oncol*, 15(4): 1664-71, 1997.

Majlis, A., *et al.*, "Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants". *J Clin Oncol*, 1997. 15(4): 1664-71.

McLaughlin, P., Hagemester, F.B., Grillo-Lopez, A.J. "Rituximab in indolent lymphoma: the single-agent pivotal trial". *Semin Oncol*, 26(Suppl 14): p. 79-87, 1999.

Milpied, N., *et al.*, "Initial Treatment of Aggressive Lymphoma with High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem-Cell Support". *N Engl J Med*, 350(13): 1287-1295, 2004.

Mounier, N., *et al.*, "Prognostic Factors in Patients With Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma Treated by Front-Line Autotransplantation After Complete Remission: A Cohort Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte". *J Clin Oncol*, 22(14): 2826-2834, 2004.

Rosenwald, A., *et al.*, "The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma". *N Engl J Med*, 346(25): 1937-47, 2002.

Shapiro, M., *et al.*, "Complete remission in advanced blastic NK-cell lymphoma/leukemia in elderly patients using the hyper-CVAD regimen". *Am J Hematol*, 74(1):46-51, 2003.

Thomas, D.A., *et al.*, "Hyper-CVAD program in Burkitt's-type adult acute lymphoblastic leukemia". *J Clin Oncol*, 17(8): 2461-70, 1999.

Zucca, E., *et al.*, "Nongastric marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue". *Blood*, 2003. 101(7): 2489-2495.

LINFOMA NO HODGKIN PEDIÁTRICO

Carmen Salgado M.

1. INTRODUCCIÓN

Los linfomas no Hodgkin (LNH) pediátricos representan un grupo heterogéneo de enfermedades que difieren del adulto en que son casi siempre diseminados, difusos y de alto grado de inmadurez, de línea T o B, con frecuente compromiso extranodal, medular o Sistema nervioso central (SNC).

En las últimas décadas el tratamiento quimioterápico ha mejorado considerablemente la supervivencia, y más recientemente una mejor caracterización clínica y biológica ha permitido la identificación de diversos subtipos de LNH, que difieren en su pronóstico y tratamiento.

En el futuro el mejor conocimiento de la patogenia molecular de estos tumores permitirá desarrollar estrategias específicas al tipo celular del tumor lo que ofrecerá una esperanza para mejorar la supervivencia de los pacientes en etapas avanzadas o resistentes, y reducir los efectos adversos asociados al tratamiento.

2. EPIDEMIOLOGÍA

Los linfomas son la tercera neoplasia más frecuente en pediatría, después de las leucemias y tumores del SNC. Es uno de los pocos tumores pediátricos cuya incidencia ha aumentado en las últimas 3 décadas por razones aún no bien dilucidadas.

Hay una extensa variación geográfica en la incidencia de los LNH del niño a través del mundo, desde 6,1/millón niños (<15 años) en Inglaterra y Japón a 90,1/millón reportado en África, particularmente en relación a incidencia de linfomas a células B.

En EE.UU los linfomas corresponden al 13% de los cánceres pediátricos, representando los LNH el 60% de ellos. En Chile, por los datos registrados en el Programa Infantil de drogas antineoplásicas (PINDA), los LNH corresponden al 7,5% de todas las neoplasias en menores de 15 años, con una incidencia anual de 25 casos.

Existe un claro predominio del sexo masculino con una relación de 2:1 según las distintas casuísticas. La mayor incidencia es entre los 7 a 10 años, pudiendo ser afectadas todas las edades.

3. ETIOLOGÍA

Como en la mayor parte de los cánceres, la etiopatogenia continúa siendo un tema de múltiples investigaciones; pero hay algunos hechos que están involucrados en su patogenia:

a) Alta actividad del tejido linfoide durante la infancia y la adolescencia. Esto se traduce en un alto índice de reordenamiento molecular para producir inmunoglobulinas (Igs) específicas y otros factores requeridos para la respuesta inmune normal. La transformación maligna puede ocurrir en cualquiera de las subpoblaciones de las células linfoides cuando se producen defectos genéticos secundarios a delección, mutación o traslocación, lo que puede interrumpir el reordenamiento normal de los genes.

b) Rol viral. Hay evidencias que incriminan a los virus en la patogenia de algunos linfomas; así el retrovirus HTLV-1 se ha involucrado en una forma de síndrome leucemia/linfoma a células T del adulto, particularmente en Japón hecho que no se ha encontrado en los LNH-T del niño.

El virus de Epstein Barr (VEB) ha sido fuertemente ligado a linfomas B, basado en el descubrimiento de presencia de copias del VEB en el genoma del DNA de las células del linfoma de Burkitt africano asociado a títulos altos de anticuerpo (VCA) en la gran mayoría de los casos de regiones tropicales (95%), en contraste con regiones templadas donde sólo se ha demostrado en 20-25% de los casos. El

conocido tropismo del VEB por las células B asociado a infecciones repetidas especialmente malaria, y desnutrición, producirían una inmunosupresión en las células T e hiperplasia de células B que potenciarían el efecto de infección por el VEB; una consecuencia de ello sería un aumento en la posibilidad de cambios genéticos incluyendo la traslocación característica que compromete el brazo largo del cromosoma 8 (región q23; q32) como parte de la t(8:14) (q24; q32); t(2:8)(p12;q24) y t(8:22) (q24;q11) que se ve en 85% de los casos; esto permite plantear que dichos tumores se originan como consecuencia de cambios genéticos y la infección viral inmortalizaría células con una traslocación específica.

Las traslocaciones cromosómicas comprometen el oncogén *C-MYC* localizado en el brazo largo del cromosoma 8 y los genes de Igs, lo que es característico en linfoma Burkitt.

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) como resultado de una profunda depleción de células T helper predispone a una variedad de tumores incluyendo linfoma B, linfoma Hodgkin, LNH-T y Sarcoma de Kaposi. Las características de los linfomas asociados a VIH son habitualmente la localización extranodal especialmente de piel.

En los LNH-T las anomalías cromosómicas son heterogéneas.

En el linfoma anaplásico de células gigantes en niños se ha descrito una traslocación específica t(2:5)(p23;q 35) en más del 80% de

los casos que produce una fusión de los genes de nucleofosfomina (NPM) del cromosoma 5 con el gen de tirosina kinasa ALK del cromosoma 2, cuya consecuencia aún no está bien definida, éste es encontrado en la mayoría de las proliferaciones celulares de células T o nulas, favoreciendo una proliferación celular con disminución de la apoptosis.

c) Inmunodeficiencias. Varias de las inmunodeficiencias congénitas y adquiridas se asocian con LNH: Ataxia telangectásica, Síndrome de Wiskott Aldrich, inmunodeficiencia severa combinada, agammaglobulinemia, deficiencia de IgA, e Inmunodeficiencias secundarias a trasplantes de órganos.

4. CLASIFICACIÓN

Han existido varias clasificaciones (Rappaport, Kiel, "Working formulation") cuyo mayor problema ha sido la diversidad de criterios para su diagnóstico lo que implicaba formulaciones de diversos nombres para similares entidades y con dudosa validez práctica y científica en cada una de ellas.

En la actualidad, en la práctica pediátrica hay un mayor consenso para utilizar la clasificación REAL ("Revised European American Lymphoma Classification") diseñada en 1993, que es una actualización del esquema de Kiel, incorporando el inmunofenotipo y dividiendo los LNH en neoplasias de células B o T y clasificándolas como de alto o bajo grado de malignidad (tabla 14-LNH-P-1).

Tabla 14-LNH-P-1. Comparación de clasificación de Kiel y REAL para LNH Pediátrico

Kiel	REAL
Burkitt's	Burkitt's (42%) Células B alto grado Tipo Burkitt's (4%)
Linfoblástico B	Precursor B linfoblástico (5%)
Linfoblástico T	Precursor T linfoblástico (20%)
Centrobástico B Inmunoblástico	Difuso células gigantes B (3%) (Mediastínico esclerosante primario 0.4%)
Pleomórfico y células grandes T	Periférico células T inespecífico y células grandes T
Anaplásico a células gigantes (Ki-1 +)	Anaplásico células gigantes T o nulas (Ki-1 +)

REAL = "Revised European American Lymphoma classification"

En niños prácticamente todos los LNH son difusos y predominantemente de 3 tipos:

a) Linfoma linfoblásticos

En general corresponden al 24-30% de los LNH y hay 2 categorías: (i) precursores células T (90%) y (ii) precursores de células B (5%). Desde el punto de vista morfológico son indistinguibles de la LLA; son TdT (+) y los precursores de células T co-expresan (CD2, CD3, CD7, CD5, los precursores de células B co-expresan (CD19, CD22, Cd79 y en menor proporción CD10 y HLA-DR.-Clínicamente comprometen mediastino, ganglios periféricos, piel, hueso con o sin compromiso de médula ósea o SNC.

b) Linfoma a células B maduras Burkitt's o tipo Burkitt's

Corresponden al 42-50% de los casos; son característicamente de células redondas pequeñas con nucleólos múltiples y abundante citoplasma basofílico y con vacuolas.

Inmunológicamente expresan Ig de superficie y otros marcadores de células B y son TdT (-). La mayor parte de los casos tienen una traslocación que compromete el oncogén C-MYC: t(8:14), t(2:8) y t(8:22) que se ve en 15% de los casos. Comprometen predominantemente abdomen y ganglios periféricos.

c) Linfoma anaplástico de células gigantes

Representan el 10-15% de los LNH en niños.

El diagnóstico se basa en los criterios morfológicos por células de gran tamaño pleomórficas con nucleos múltiples y uno o más nucleólos muy prominentes y en la expresión en las células tumorales de los antígenos CD30 (Ki-1), EMA y del receptor de IL2. La traslocación t(2:5)(p23;q35) ha sido descrita en más del 80% de los casos y puede ser detectado por PCR e inmunohistoquímica. Las células expresan marcadores de células T o nulas. Desde el punto de vista clínico se caracterizan por compromiso ganglionar periférico, mediastínico o intraabdominal, por la frecuencia de síntomas B y compromiso extranodal, en particular piel y pulmón.

5. CLÍNICA

Los LNH pediátricos se presentan generalmente con evidencia de enfermedad generalizada. Son

neoplasias de crecimiento muy rápido, siendo el tipo de tumor que más frecuentemente se asocia a emergencias oncológicas, ya sea por compresión del tumor en estructuras vecinas (síndrome de compresión de vena cava superior), o por liberación de metabolitos que conducen a alteraciones metabólicas severas (síndrome de lisis tumoral). Pueden comprometer cualquier grupo ganglionar o compromiso extranodal, siendo los más habituales: hueso, piel, médula ósea, testículos y SNC. Habitualmente la clínica de presentación se correlaciona con el subtipo celular de LNH. A continuación se describen los sitios más frecuentes de presentación de LNH pediátrico en EE.UU, Europa y Chile:

- **Compromiso Abdominal.** Es la presentación más frecuente de los LNH tipo Burkitt's, manifestándose como masa abdominal de rápido crecimiento, que se inicia más comúnmente en el íleon terminal, pudiendo dar síntomas sugerentes de una invaginación intestinal o sangramiento, con o sin perforación del intestino, con rápida invasión del mesenterio e infiltración del riñón, hígado y bazo.

- **Compromiso mediastínico.** Se presenta en el 25-30% de todos los LNH, especialmente en el linfoma linfoblástico y algunos linfomas a células gigantes. Pueden presentar derrame pleural de tipo hemorrágico y síntomas de obstrucción de vena cava superior, como: disnea, obstrucción respiratoria, ingurgitación yugular, edema facial y derrame pericárdico.

Habitualmente se asocia a adenopatías supraclaviculares, y tiene alta tendencia a comprometer médula ósea y SNC.

- **Enfermedad localizada.** Cualquier grupo ganglionar puede comprometerse, siendo más frecuentes la región de cabeza y cuello, incluyendo anillo de Waldeyer y huesos faciales y compromiso cutáneo.

- **Compromiso del SNC.** El compromiso del SNC primario es raro excepto postransplante de órganos, pero el compromiso secundario a la diseminación de la enfermedad es frecuente, particularmente en el linfoma linfoblástico y el linfoma tipo Burkitt's. Se manifiesta por síndrome de hipertensión endocraneana o síndrome meníngeo, compromiso de nervios craneanos o convulsiones.

En la tabla 14-LNH-P-2 se resumen las características histológicas, inmunológicas,

citogenéticas y clínicas de los LNH pediátricos.

Tabla 14-LNH-P-2. Características histológicas, inmunológicas, citogenéticas y clínicas de los LNH pediátricos

Características	Linfoblástico	Tipo Burkitt's	Anaplástico a células gigantes
Localización típica	Mediastino anterior y medio	Abdomen	Ninguna específica
Citomorfoloía	L1 - L2	L3	—
Histología	Linfoblástico	Células pequeñas no clivadas	Células grandes plemórficas
Inmunofenotipo	Línea T (90%) Línea B (5%) TdT (+)	IgS (+) Línea B TdT (-)	Línea T o nula CD 30(+)
Citogenética	Heterogéneo	t (8:14) t (2:8) t (8:22)	t (2.5)

LNH, linfomas no Hodgkin; L1, L2, L3, clasificación FAB; IgS = inmunoglobulina de superficie

6. DIAGNÓSTICO Y ETAPIFICACIÓN

Después de una anamnesis cuidadosa y exhaustivo examen físico, las investigaciones deben estar destinadas a establecer, lo más rápido posible, el diagnóstico y la extensión de la enfermedad para iniciar el tratamiento adecuado.

A menos que el diagnóstico se pueda establecer por la citología de un derrame corporal o médula ósea, la biopsia de la masa debe realizarse por el método menos invasivo si no se trata de una masa resecable, obteniendo material necesario para estudio histológico, de inmunofenotipo, citogenético y de biología molecular. Una vez certificado el diagnóstico, todos los pacientes

deben ser sometidos a estudios de médula ósea (mielograma), punción lumbar para estudio de líquido cefalorraquídeo (LCR), estudios de imágenes: radiografía tórax, tomografía axial computarizada, (TAC), de abdomen y del sitio primario del tumor; cintigrama óseo, resonancia nuclear magnética (RNM) cerebral en caso sospechoso de compromiso de SNC y exámenes de laboratorio que incluyen: Hemograma, estudios de función hepática y renal, deshidrogenasa láctica, ácido úrico, calcemia, fosfemia y electroforesis de proteínas.

En la tabla 14-LNH-P-3 se muestra la etapificación más usada para el LNH del niño. Todos los tumores primarios mediastínicos y abdominales difusos se consideran etapa III.

Tabla 14-LNH-P-3. Etapificación Murphy modificada para LNH pediátrico

Etapas	Características
I	Tumor único nodal o extranodal, excepto abdomen y mediastino.
II	Un tumor extranodal con compromiso ganglionar regional. Tumor abdominal resecable. Dos o más áreas ganglionares al mismo lado del diafragma.
III	Tumor primario intratorácico. Tumor abdominal difuso, no resecable. Tumor epidural o paraespinal. Dos áreas ganglionares a distinto lado del diafragma.
IV	Cualquiera de los anteriores con compromiso inicial del SNC o médula ósea (< 25% blastos).

7. FACTORES PRONÓSTICOS

Con el tratamiento quimioterápico agresivo actual, la posibilidad de curación es sobre 70% en los distintos subtipos de LNH. Cada tipo requiere un tratamiento específico por lo que el más significativo factor pronóstico en la actualidad parece ser la elección de la terapia correcta, basado en un meticolosa definición del tipo de tumor. Otros factores importantes son:

- Etapa clínica. Pacientes en etapas avanzadas (III o IV) tienen peor pronóstico, debiendo utilizar terapias más intensas para aumentar la sobrevida.
- Los hechos clínicos que persisten como factores adversos en la actualidad son:
 - En LNH-B, (i) la presencia de infiltración de médula ósea >70%, el compromiso inicial del SNC y los niveles elevados de LDH; (ii) la falta de respuesta precoz al tratamiento (persistencia de masa tumoral >30% después de los primeros ciclos de quimioterapia).
 - En el LNH anaplástico el compromiso inicial de mediastino, piel, óseo, pulmonar y la presencia de síntomas B.

8. TRATAMIENTO

Con los avances obtenidos en los últimos años especialmente en lo relacionado a un mejor conocimiento de la biología de estos tumores la sobrevida libre de enfermedad (SLE) de estos pacientes ha alcanzado cifras, en los distintos

grupo de trabajo, cercanas al 80% en los diferentes subgrupos de LNH.

El tratamiento tiene dos pilares fundamentales: la terapia de apoyo y la terapia específica.

8.1. Terapia de apoyo

Es común en todo tipo de LNH y en general, en todo paciente con cáncer. Contempla el manejo de las complicaciones de la enfermedad (síndrome anémico, hemorragíparo, infeccioso, alteraciones metabólicas, nutricionales y psicológicas) y de su tratamiento.

Especial mención requiere el manejo de la prevención y manejo del SLT, que es frecuente de observar en este tipo de tumor, cuyo tratamiento adecuado permite evitar la nefropatía por ácido úrico, que aparece como consecuencia de la rápida destrucción de la células tumorales. La prevención se realiza mediante una hidratación vigorosa, antes del inicio de la quimioterapia con 3000-4000 mL/m²/día; diuresis forzada (Furosemda 0,5-1 mg/Kg) si fuera necesario con el objeto de mantener una diuresis entre 100-250 ml/m²/h; alcalinización de la orina y el uso de alopurinol. El uso profiláctico de urato oxidasa (uricozime) una enzima uricolítica natural que cataliza la oxidación de ácido úrico a alantoina que es 5-10 veces más soluble que el ácido úrico y fácilmente excretada por el riñón y ampliamente usada en los protocolos de los franceses (SFOP) ha reducido los riesgos de lisis terapéutica especialmente en LNH-B en etapas avanzadas; por lo que se considera útil su uso en la

actualidad frente a pacientes con alto riesgo de SLT, como pacientes con grandes masas abdominales, y/o hiperleucocitosis.

8.2. Tratamiento específico

El tratamiento específico debe plantearse de acuerdo al subtipo de LNH y a su etapa clínica, y factores pronósticos. Consta de tres pilares:

- a) **Cirugía.** En general debe reservarse para biopsia o resección de masas residuales después de un tratamiento intensivo. La cirugía inicial extensa está fuertemente contraindicada, especialmente en localizaciones mediastínicas y abdominales extensas.
- b) **Radioterapia.** Probablemente tenga un rol en el control de la enfermedad refractaria y en pacientes con linfoma primario del SNC.
- c) **Quimioterapia.** Es la modalidad de tratamiento en todos los tipos de LNH considerando que se trata de una enfermedad generalizada y su protocolo está directamente relacionado al tipo y etapa clínica del linfoma. Muchos esquemas de tratamiento se han empleado en el tratamiento de los LNH:

Etapas localizadas. Requieren terapia menos intensa que etapas avanzadas, excepto en linfomas linfoblásticos. Tanto los grupos americanos Pediatric Oncology Group (POG) y Children's Cancer Study Group (CCSG) han reportado cursos cortos de quimioterapia (aproximadamente 6 meses) usando los protocolos clásicos con Ciclofosfamida, Vincristina, Metotrexato y Prednisona (COMP) o Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona (CHOP), con sobrevividas superiores al 90%. En el caso de los linfomas linfoblásticos los estudios del POG reportaron resultados inferiores, por lo que actualmente todos los grupos cooperativos han excluido este tipo de linfoma de los cursos cortos de quimioterapia, utilizando regímenes de mayor duración tipo leucemia linfoblástica.

Etapas avanzadas:

- **Linfomas linfoblásticos.** El uso de regímenes de quimioterapia intensa similares a la leucemia linfoblástica ha permitido alcanzar sobrevivida libre de eventos entre 75-90%. Los mejores resultados se han obtenido con protocolos

como BFM 90, LSA2 L2 modificado, St Jude RH y LMT- 81. La profilaxis del SNC con quimioterapia intratecal (QT IT) y altas dosis de metotrexato es necesaria en todos los pacientes en etapas avanzadas, pudiendo omitirse la radioterapia de cráneo excepto en pacientes con compromiso inicial del SNC.

- **Linfomas B.** Con protocolos modernos la sobrevivida es cercana al 90%. (Protocolos de la SFOP; BFM y POG). La quimioterapia útil consiste en regímenes intensos de corta duración (6 meses) utilizando agentes alquilantes junto a otros agentes activos como metotrexato en dosis intermedias o altas, vincristina, antraciclinas, etopósido y dosis altas de aracytin, especialmente en pacientes con factores adversos. La Radioterapia local no juega ningún rol y la profilaxis del SNC con drogas intratecales parece ser suficiente. El manejo de complicaciones al ingreso y durante el tratamiento es fundamental.
- **Linfomas anaplásticos a células gigantes.** Los mejores resultados se han obtenido con protocolos similares a células B (Protocolos BFM, SFOP, Ingleses). Se debe estratificar el tratamiento de acuerdo a factores de riesgo, siendo los factores de mayor riesgo el compromiso inicial de mediastino, piel y/o visceral.

Las futuras estrategias de tratamiento están dirigidas a utilizar la menor intensidad de quimioterapia posible, sin disminuir la efectividad, con el objeto de evitar toxicidad a corto y largo plazo. Se utilizarán terapias específicas (anticuerpos monoclonales de mayor uso en los linfomas de alto grado del adulto) y se evaluará el uso de técnicas de detección de enfermedad residual en la evolución y tratamiento de los pacientes.

LECTURAS SUGERIDAS

Eden, O.B. "Lymphomas". In **Pediatric Hematology**. Lilleyman, J., Hann, I., Blanchette, V. (eds.) Churchill Livingstone. HarcourBrace and Company; pp. 565-573, 1999.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H. *et al.* "A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A proposal From the International Lymphoma Study Group". *Blood* 84(5); 1361-1382, 1994.

GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Mauricio Ocqueteau T.

1. INTRODUCCIÓN

Las discrasias de células plasmáticas (CPs) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por una expansión de CPs monoclonales, es decir, con origen en un clon celular singular, en la médula ósea, y por la producción de una inmunoglobulina monoclonal, también llamada proteína o componente M (CM). Las inmunoglobulinas monoclonales producidas por las CPs patológicas suelen migrar en la fracción gamma (γ) cuando son sometidas a una electroforesis, razón por la cual estas discrasias son también denominadas gammapatías monoclonales. En términos generales, la proteína monoclonal –al igual que ocurre con las Igs normales– está constituida por dos cadenas pesadas de igual clase y subclase (cadenas H) y dos cadenas ligeras del mismo tipo (cadenas kappa, κ ó lambda, λ). Sin embargo, en algunas discrasias es posible detectar sólo a un fragmento de la molécula de Ig, como ocurre en la enfermedad por cadenas pesadas o livianas, con expresión exclusiva de las cadenas λ , α ó μ en el primer caso y κ ó λ en el segundo (también conocida como enfermedad de Bence-Jones). Así, salvo estas últimas excepciones, las Igs comprometidas en estas entidades son estructuralmente similares a su contrapartida normal, estando presentes en cantidades elevadas simplemente por el gran número de CPs clonales que las originan. Desde el punto de vista funcional se ha logrado demostrar, en ensayos *in vitro*, actividad de anticuerpo contra distintos antígenos, principalmente de origen bacteriano y, más aún, contra proteínas autólogas (factores de coagulación, antígenos eritroides, proteínas del SNC, etc). Sin embargo, en la inmensa mayoría de los pacientes no se logra demostrar una actividad específica de la inmunoglobulina monoclonal.

Desde un punto de vista clínico, el hecho de tener su origen en un clon celular único - monoclonal- no necesariamente significa que se trate de una neoplasia, si bien el concepto inverso es válido para todos los cánceres (es decir, todos ellos son de origen monoclonal), dado que existen diversos ejemplos de expansiones monoclonales que nunca llegan a constituir una neoplasia, al menos clínicamente

Hvizdala, E.V., Berard, C., Callihan, T., *et al.* "Lymphoblastic lymphoma in children. A randomized trial comparing LSA2-I2 with the A-COP + therapeutic regimen. A Pediatric Oncology Group study". *J Clinical Oncology* 6(1); 26-33, 1988.

Link, M.P., Shuster, J.J., Donaldson, S.S. *et al.* "Treatment of children and young adults with early stage non-Hodgkin's lymphoma". *New England Journal of Medicine* 337(18): 1259-1266, 1997.

Murphy, S.B. "Classification, staging and results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas dissimilarities from lymphomas in adults". *Seminars Oncol* 7;332-339, 1980.

Patte, C., Michon, J., Frappaz, D. *et al.* "Therapy of Burkitt and other B-cell acute lymphoblastic leukaemia and lymphoma, experience with LMB protocols of the SFOP in children and adults". *Baillieres Clinical Haematology* 7(2): 339-348, 1994.

Pinkerto, C.R. "The continuing challenge of treatment for non Hodgkin's lymphomas in children". *British Journal of Haematology* 107(2); 220-234, 1999.

Reiter, A., Scrappe, M., Ludwig, W.D. *et al.*, "On behalf of the Berlin-Frankfurt-Munster Group; Intensive ALL-type therapy without local radiotherapy provides a 90% EFS for children with T-cell lymphoblastic lymphoma". *Blood* 95(2); 416-421, 2000.

Reiter, A., Schrappe, M. *et al.* "Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: a report of the BFM group trial NHL-BFM90". *Blood* 94(10): 3294-3306, 1999.

Reiter, A., Schrappe, M., Tiemann, M. *et al.* "Successful treatment strategy for Ki-1 anaplastic large cell lymphoma of childhood, a prospective analysis of 62 patients enrolled in three consecutive BFM Group". *J Clinical Oncology* 12(5): 899-908, 1994.

Sandlund, J.T., Downing, J.R., Crist, W.M. "Non-Hodgkin's lymphoma in childhood". *New England Journal of Medicine* 334(19); 1238-1248, 1996.

Sandlund, J.T., Pui, C.H., Roberts, W.M. *et al.* "Clinical features and treatment outcome for children with CD30+ large cell non-Hodgkin's lymphoma". *J Clin Oncol.* May;12(5):895-8, 1994.

evidente. El ejemplo más característico de expansión de CPs que permanece bajo control sin progresión hacia tumor de crecimiento continuo se denomina gammapatía monoclonal de significado incierto (más conocida por sus siglas anglosajonas MGUS, “monoclonal gammopathy of undetermined significance”),

mientras que el ejemplo más genuino de proliferación de CPs que escapa a los mecanismos de control y desarrolla una enfermedad maligna lo constituye el mieloma múltiple (MM). La incidencia de las distintas gammapatías monoclonales está representada en la tabla 14-GM-1.

Tabla 14-GM-1. Incidencia y frecuencia relativa de las diferentes formas de Gammapatía Monoclonal

Gammapatía Monoclonal	Incidencia	Frecuencia relativa
MGUS	1 – 5%	65 – 70%
Mieloma Múltiple	3 – 5*	12 – 20%
Macroglobulinemia de Wäldeñstrom	< 1*	1 – 4%
Enfermedad de Cadenas Livianas	< 1*	< 1%
Enfermedad de Cadenas Pesadas	< 1*	< 1%
Amiloidosis	< 1*	2%
Crioglobulinemia	< 1*	< 1%

* Número de casos nuevos/100,000 habitantes por año.

2. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Dado que el capítulo 30 se refiere a los métodos de estudio de las GM, aquí sólo se aplicará, resumidamente, un esquema operacional para el estudio de las GM (tabla 14-GM-2).

2.1. Pesquisa de una proteína monoclonal

La proteína monoclonal se detecta por una imagen muy particular en el estudio electroforético de las proteínas séricas y/o urinarias, electroforesis que puede realizarse en soportes de acetato de celulosa o agarosa. La imagen consiste en una fracción proteica concentrada, de mayor o menor intensidad, dependiendo de su concentración, y de límites muy netos con migración desde las globulinas α 2 hasta las globulinas γ . En el densitograma es característica la presencia de una curva aguzada, elevada y de base estrecha, en relación con el sitio de migración de la proteína monoclonal.

El componente monoclonal corresponde al producto de la secreción de muchas células provenientes de un clon único de células plasmáticas. Son proteínas homogéneas, idénticas entre sí, lo que explica su migración puntual en la electroforesis de proteínas (EFP). Mediante la EFP pueden diferenciarse los componentes monoclonales de los policlonales, correspondiendo estos últimos a respuestas inmunológicas fisiológicas a las estimulaciones antigénicas importantes como son las infecciones.

En ocasiones existiendo una neoplasia monoclonal de células plasmáticas, el CM no aparece en la EFP séricas. Esta circunstancia puede observarse en la enfermedad de cadenas livianas, mieloma IgD, enfermedad de cadenas pesadas y en el mieloma no secretor, afección en la cual la proteína monoclonal, indetectable en sangre y orina, puede observarse e identificarse en el interior de los plasmocitos de la médula ósea por inmunofluorescencia directa.

Tabla 14-GM-2. Estudio inmunológico de las GM

<p>En sangre (suero)</p> <ul style="list-style-type: none">• Electroforesis de proteínas• Inmunolectroforesis de proteínas• (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, κ, λ)• Inmunofijación de inmunoglobulinas• (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, κ, λ).• Cuantificación de inmunoglobulinas• Viscosidad sérica• β_2-microglobulina• Proteína C reactiva (PCR)• IL-6 <p>En orina</p> <ul style="list-style-type: none">• Proteinuria• Proteinuria 24 hrs.• Electroforesis de proteínas (orina concentrada)• Inmunolectroforesis de proteínas (cadenas livianas κ y λ = proteínas de Bence Jones)• Inmunofijación de cadenas livianas de inmunoglobulinas

2.2. Identificación de una proteína monoclonal

Frente a la pesquisa de un CM electroforético o aún sin detectarlo claramente cuando se sospecha un mieloma múltiple, macroglobulinemia, amiloidosis u otras enfermedades relacionadas, se debe realizar una inmunolectroforesis o una inmunofijación de inmunoglobulinas séricas.

Inmunolectroforesis. Esta técnica es muy útil para la identificación de la proteína monoclonal, es decir la clase de cadena pesada y el tipo de cadena liviana de la inmunoglobulina comprometida. Brevemente, consiste en una electroforesis sérica seguida de una inmunoprecipitación de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas que contiene la muestra empleando antisueros poli, tri y monovalentes en geles de agarosa.

Inmunofijación. Esta técnica, permite objetivar con bastante certeza la cadena pesada y liviana de la inmunoglobulina monoclonal del paciente, empleando al igual que la inmunolectroforesis, la muestra a investigar (en 6 diferentes posiciones) en placas de agarosa para obtener, por electroforesis, la separación de las proteínas de acuerdo con su carga neta. En la segunda etapa se aplican los anticuerpos

monoespecíficos en 5 de los 6 trazados electroforéticos para que la fijación ocurra. El informe y por ende el diagnóstico se facilita puesto que el procedimiento permite comparar el nivel de migración del CM, si lo hay, con las líneas de precipitación de las cadenas monoclonales comprometidas.

La inmunofijación puede realizarse en suero, orina, líquido cefalorraquídeo, etc. y posee una mayor sensibilidad y poder de resolución que la inmunolectroforesis.

2.3. Cuantificación de inmunoglobulinas

La cuantificación o dosificación de inmunoglobulinas se realiza mediante técnicas de inmunodifusión radial y últimamente por nefelometría. Su medición permite establecer un índice pronóstico (enfermedad benigna o maligna), mantener un control evolutivo del tratamiento y detecta precozmente el inicio de una inmunodeficiencia.

2.4. Viscosidad sérica

Los pacientes portadores de una GM pueden evolucionar con síntomas de hiperviscosidad. La hiperviscosidad se define en base al aumento de la viscosidad relativa del suero sanguíneo comparada con el agua. El valor normal es de

1.8, es decir el suero sanguíneo es hasta 1,8 veces más viscoso que el agua. Las manifestaciones clínicas suelen aparecer con cifras de 5 a 6 y comúnmente esto ocurre cuando el CM corresponde a IgM, IgG₃ e IgA.

2.5. Beta-2 microglobulina

Esta proteína que forma parte de la estructura de las moléculas clase I del Sistema Principal de Histocompatibilidad (cadena liviana del heterodímero) se encuentra en la superficie de todas las células nucleadas. Puede medirse en suero como en orina y sus niveles constituyen un factor pronóstico en los síndromes linfoproliferativos, particularmente en el MM. Los pacientes con niveles elevados tienen una supervivencia significativamente más corta que los portadores de GM con niveles normales. Las cifras elevadas se relacionan con activación y destrucción de linfocitos. Los valores normales son 1.15-2.03 mg/L. Como se excreta por el túbulo renal puede aumentar en las insuficiencias del riñón.

2.6. Proteína C reactiva

La cuantificación de la PCR sérica es empleada comúnmente para objetivar la presencia de un proceso inflamatorio, aunque inespecíficamente. Los niveles de esta proteína se elevan en los pacientes con GM particularmente en el MM.

La IL-6 estimula la producción de PCR y la medición de ésta, por lo tanto, indirectamente refleja los niveles de IL-6. Su valor normal es hasta 0.6 mg/dL.

2.7. Interleuquina-6

Siendo la IL-6 un factor de crecimiento de la célula plasmática tumoral, un aumento de su nivel sérico, constituye un índice de malignidad, severidad y, por ende, de mal pronóstico de las GM. La IL-6 sérica es indetectable en sujetos sanos o en MGUS, (<1 pg/mL), a diferencia de los enfermos con gammopatías monoclonales malignas (GMM), en los cuales los niveles pueden ser de 20, 30 o más pg/mL.

2.8. Estudios inmunológicos en orina

Estos estudios inmunológicos deben realizarse en orina total de 24 horas, porque es importante conocer el total de la proteinuria diaria y porque para varias técnicas se requiere concentrar la orina 50, 100 ó 200 veces, para pesquisar

concentraciones mínimas de las proteínas monoclonales excretadas.

La electroforesis de proteínas ha de hacerse con orina concentrada, particularmente cuando la proteinuria es pequeña, para destacar el CM urinario en el trazado electroforético, para lo cual se utilizan soportes de acetato de celulosa o agarosa. La inmunoelectroforesis y/o inmunofijación de proteínas urinarias tienen por objeto identificar las proteínas de Bence Jones, que como se dijo corresponden a las cadenas livianas monoclonales κ o λ de las moléculas de inmunoglobulinas. Las proteínas de Bence Jones pueden observarse durante la evolución de una GM típica y en la enfermedad de cadenas livianas en la cual hay una gran producción de cadenas livianas κ o λ monoclonales.

3. GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO

3.1. Aspectos generales

La MGUS es la alteración clonal más frecuente de las CPs, presente entre un 1% y un 5% de la población mayor de 50 años y hasta en un 10% de los mayores de 80 años cuando se analiza la presencia de una proteína monoclonal con técnicas como la electroforesis de acetato. Sin embargo, si se utilizan técnicas de mayor sensibilidad estas cifras se elevan aún más. Así, se han reportado incidencias de hasta un 5% en individuos sanos entre 22 y 65 años y de 7-8% sobre los 55 años cuando se utiliza electroforesis de acetato de alta resolución. Esta entidad se caracteriza por la proliferación de un clon singular -o en un 2 a 3% de los casos de dos clones diferentes- de CPs, con la capacidad de producir una proteína monoclonal, pero en ausencia de elementos sugerentes de MM, macroglobulinemia, amiloidosis, etc. En términos generales, los pacientes con MGUS presentan un componente-M < 3g/dL, menos de un 10% de CPs en médula ósea, escasa o nula cantidad de proteína-M en la orina y ausencia de compromiso sistémico como lesiones óseas, anemia, hipercalcemia o compromiso de la función renal.

3.2. Evolución de las MGUS en el tiempo

Desde el punto de vista evolutivo, la MGUS puede dar origen a un MM característico, situación que se observa, sin embargo, en sólo una minoría de los pacientes. En el clásico estudio de la Clínica Mayo, de 241 pacientes seguidos durante 24 a 38 años, 42 de ellos

(17,4%) desarrollaron un MM, 7 (2,9%) una macroglobulinemia y 8 (3,3%) una amiloidosis primaria; un 10% adicional de pacientes incrementaron el componente monoclonal en suero, aunque sin llegar a tener elementos clínicos de enfermedad. Considerando esta información, la tasa actuarial de transformación de las MGUS es de 14% a 10 años y de 29% a 20 años, para los casos con IgG como proteína-M, y de 18% y 37%, respectivamente, para aquellas MGUS IgA. Sin embargo, tanto en el estudio de la Clínica Mayo como en otros no se ha podido establecer patrones que permitan predecir con claridad qué grupo de enfermos tiene un mayor riesgo de sufrir progresión a MM. Por esta razón, y desde el punto de vista clínico, la progresión desde una entidad benigna a una maligna está definida por dos grupos de signos, que requieren necesariamente de un seguimiento estrecho del paciente: (a) Un aumento sostenido en la cantidad del componente monoclonal detectable en el suero y (b) la aparición de dolores óseos con lesiones líticas óseas no detectadas previamente. La aparición de cualquiera de estos signos es evidencia suficiente para evaluar la enfermedad como progresiva, de modo que se requiere una intervención terapéutica en la mayoría de los casos que la presentan.

4. MIELOMA MÚLTIPLE

4.1. Conceptos preliminares

El MM es una neoplasia de la línea linfocítica B caracterizada por la acumulación en médula ósea de una población clonal de células de esta estirpe en su estadio final de diferenciación, es decir, de células plasmáticas, y por la producción de lesiones osteolíticas (y el dolor óseo secundario a ellas) que, junto a la presencia e incremento del componente M (ya sea en suero y/u orina), representan los hallazgos patológicos más frecuentes de la enfermedad. Las primeras observaciones sobre esta enfermedad fueron realizadas por Henry Bence-Jones en el año 1845, aunque los términos de mieloma múltiple o enfermedad de Kahler no fueron introducidos sino hasta los años 1873 y 1889, respectivamente. A continuación se resumen algunas características epidemiológicas, biológicas y clínicas más relevantes de la enfermedad:

Incidencia

El MM tiene su mayor incidencia durante la 7ª y 8ª década de la vida, si bien un número

significativo de casos son diagnosticados en edades más tempranas (un 15% de los casos tienen menos de 50 años). El número de casos nuevos por cada 100.000 habitantes y año es de 3 a 5, por lo que el MM constituye aproximadamente el 1% de todas las neoplasias y el 10% de las neoplasias hematológicas. En USA esto representa alrededor de 14.000 casos nuevos al año, con una incidencia mayor en la población de raza negra.

Patogenia

La mayoría de los tumores de células B se origina a partir de células B del centro germinal (CG) o post-CG. En el CG es donde las células B modifican su DNA a través de una hipermutación somática y selección antigénica, junto al reordenamiento de las cadenas pesadas. En el caso tanto de las MGUS como en MM las CPs clonales son, mayoritariamente, células B post-CG en las que destaca una baja tasa proliferativa hasta etapas avanzadas de la enfermedad. Por otro lado, estudios recientes de nuestro grupo muestran que las CPs clonales presentes en los pacientes con MM presentan una expresión significativamente mayor de moléculas asociadas a proliferación celular como IL-6 y Ki67 al compararlas con las CPs normales policlonales. Este hecho demuestra que, si bien la proporción de células en ciclo celular activo en el MM es relativamente baja comparada con otros tumores, esta proporción es de todos modos mayor que en las CPs normales. En el mismo sentido, la proporción de CPs en fase S de ciclo celular es levemente superior en los pacientes con MM que en las CPs de sujetos normales. Estos datos parecen avalar el hallazgo de una mayor tasa proliferativa en las CPs clonales que las normales. Sin embargo, quizá el dato más llamativo es la importante diferencia en la proporción de CPs con apoptosis espontánea, claramente inferior en los pacientes con MM que en las CPs de sujetos normales. Una posible interpretación que resulta de la combinación de esta información es que, mientras el balance entre la actividad proliferativa versus la apoptosis espontánea está en un relativo equilibrio en las CPs de sujetos normales, este equilibrio está claramente desviado en las CPs de pacientes con mieloma hacia un mayor crecimiento neto de la población celular, tanto por una leve mayor proliferación como, en forma muy significativa por una importante disminución de la muerte celular espontánea en esta entidad. Esta situación biológica está presente en otras entidades neoplásicas de baja agresividad como el linfoma

no Hodgkin folicular, en que se ha demostrado que el elemento más importante no es, al menos en los primeros años de la enfermedad, un incremento en la proliferación celular sino una inhibición de la apoptosis dada por la sobreexpresión genética y funcional del gen *bcl-2* en ese caso en particular. Toda esta información biológica, muy sucintamente mencionada a continuación, está cobrando gran relevancia en la planificación y diseño de nuevas estrategias terapéuticas, como será comentado en la sección de tratamiento del MM.

Papel de IL-6 y vía de la ciclina D1. Durante la última década ha quedado demostrado por diversos grupos que uno de los factores de crecimiento más importantes para las CPs en el MM es la IL-6, que se acompaña, además, de un aumento en la expresión de la fracción soluble de su receptor. El origen de este aumento y su acción es tanto autocrino (origen en las propias CPs) como paracrino -a partir del estroma medular- y ocurre en respuesta a otras citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) o el interferón alfa (IFN α). Así, en etapas iniciales de la enfermedad, las CPs son dependientes de IL-6 para su proliferación, de modo que la suspensión de esta citoquina en estudios *in vitro* se acompaña de una reducción en la tasa proliferativa de las células tumorales y de un aumento de su apoptosis espontánea. A medida que la enfermedad avanza, y probablemente como consecuencia de alteraciones adicionales en genes reguladores del ciclo celular, esta dependencia de IL-6 se pierde y las CPs son capaces de mantener un ritmo proliferativo elevado aún en su ausencia. Recientemente se ha demostrado que los niveles elevados de IL-6 estimulan la expresión de ciclina D1, con un aumento consecuente en la proporción de CPs reclutadas a ingresar al ciclo celular y, por tanto, a un aumento en la proliferación celular. Apoyando esta vía se ha encontrado una asociación entre los niveles de expresión de ciclina D1 y la masa tumoral, junto a un incremento en antígenos asociados a proliferación celular -como, por ejemplo, Ki67 que ya ha sido mencionado- y a una mayor inmadurez celular. Por el contrario, se ha descrito variantes de IL-6 con menor afinidad por la gp-130 (constituyente esencial del receptor de IL-6) que se asocian a un “down regulation” en la expresión de ciclina D1, lo que se acompaña a su vez de una menor tasa proliferativa y de un aumento en la apoptosis en las CPs en líneas celulares. Finalmente, resulta interesante la observación de que en casos de MGUS las CPs no tendrían niveles incrementados de IL-6, lo

que apoya el papel de esta vía regulatoria en el crecimiento tumoral en esta enfermedad. A nivel clínico resulta interesante que la proteína C reactiva (PCR) es regulada en su producción precisamente por la IL-6, por lo que la medición de este marcador se correlaciona con los niveles de la interleuquina estimuladora y, por lo tanto, de la actividad tumoral.

Genes supresores de tumores. Existen algunas evidencias preliminares sobre el papel de genes supresores en el caso del MM. Así, se ha encontrado mutación de p53 en un subgrupo de pacientes, aunque con baja frecuencia. Otro gen supresor es p16, que compete con la ciclina D1 en su unión a CDK4/CDK6, inhibiendo la actividad kinasa de este complejo. Esto resulta en un aumento en la defosforilación de pRb (gen de retinoblastoma) y en un aumento del arresto celular en fase G1 (es decir, limita la capacidad proliferativa). La inactivación de este gen, presente en una serie de tumores, ha sido descrita en algunos casos de MM, tanto a nivel estructural (cromosómico) como por hipermetilación, con la consiguiente pérdida de acción represora sobre el complejo ciclina D1/CDKs, como se ha evidenciado tanto en líneas celulares de MM como en casos al momento del diagnóstico. Un tercer gen supresor en estudio es p21, también inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y que contribuyen a mantener pRb en estado defosforilado. Se ha podido demostrar que en la mayoría de los casos de MM este gen se encuentra expresado en forma constitutiva y que esta expresión aumenta con el uso de dexametasona (droga conocidamente inductora de apoptosis en CPs mielomatosas) y disminuye con niveles elevados de IL-6. Todos estos datos ponen en evidencia la importancia del balance entre el estímulo proliferativo inducido por citoquinas particularmente IL-6, sobre la vía de las ciclinas, por un lado, y del efecto contrario dado por las proteínas inhibidoras de estas kinasas, como p16 y p21 por otro, en la regulación del ciclo celular en las CPs del MM.

Apoptosis de CPs. La apoptosis (muerte celular programada) es un proceso complejo en su regulación. Una de las familias de genes más ampliamente estudiados en los últimos años es la familia de BCL-2, dentro de la cual existen genes con acción pro-apoptótica (BAX, BCL-X_(S)) y otro con función antiapoptosis (BCL-2, BCL-X_(L), Mcl-1). En el caso del MM no está aún bien caracterizado el estatus de esta familia de genes. Sin embargo, se han encontrado diferencias en la expresión de BCL-2 entre CPs de pacientes

con MM y MGUS versus las CPs de plasmocitosis reactivas, con menor expresión en estas últimas y mayor expresión en MM en estadios avanzados. Además, el grupo de la Clínica Mayo ha reportado recientemente que las CPs de MGUS tendrían un índice apoptótico mayor que en casos de MM. Por otro lado, diferentes estudios han mostrado que BCL-2, BCL-X_(L) y Mcl-1 están expresados en prácticamente el 100% de las líneas celulares de MM y la inhibición de ellos (por ejemplo por medio de la utilización de oligonucleótidos “anti-sense”) induce una rápida apoptosis en las células tumorales. Una segunda vía de regulación de apoptosis en MM, aparentemente independiente de BCL-2, está constituida por la vía de APO/FAS (CD95). Al respecto, se ha podido ver que la apoptosis inducida por el ligando de CD95 (CD95L) se correlaciona con los niveles de CD95 expresados en las CPs en forma independiente del estatus de BCL-2. En términos generales, y como se mencionó al inicio del apartado de patogenia, la apoptosis espontánea en las CPs clonales en el MM está disminuida con respecto a las CPs normales, lo que, a igual o mayor nivel de proliferación celular, resulta finalmente en una ganancia neta de masa tumoral.

Papel del estroma en las discrasias de CPs.

Durante los últimos años se ha puesto especial énfasis en el papel que parece jugar el estroma en MM a través de la acción paracrina de IL-6 (producida por las células dendríticas del estroma), el posible rol de la infección por virus Herpes tipo 8, o el importante rol de la vía de RANK/OPG, que será desarrollado más adelante.

c) Manifestaciones clínicas

Dolor óseo. El síntoma más típico y frecuente del MM es el dolor óseo, que se puede encontrar en un 70-75% de los pacientes en el momento del diagnóstico. Esta incidencia parece haberse reducido en las últimas décadas debido probablemente al diagnóstico precoz, siendo actualmente de alrededor de un 40%; sin embargo, persiste como un problema importante, ya que puede condicionar fracturas en hueso patológico en hasta un 80% de los casos durante la evolución de la enfermedad. Este dolor se debe a la presencia de lesiones (osteoporosis, osteólisis o fracturas patológicas) generalmente de fácil reconocimiento por medio de métodos radiológicos convencionales y en que nuevas técnicas como la resonancia magnética han mejorado aún más su detección.

Sus localizaciones más frecuentes comprenden estructuras propias del esqueleto axial, es decir, el cráneo (imagen de “apolillamiento”), la columna vertebral (aplastamientos vertebrales y fracturas), las costillas, la pelvis y los huesos largos a nivel proximal. Estas lesiones tienen un origen multifactorial, destacando en su generación el reclutamiento y activación de osteoclastos secundaria a la presencia de citocinas como el TNF, la interleuquina-1 beta (IL-1 β) o IL-6, previamente conocidas como “osteoclast activating factor” (OAF). Recientemente se ha descrito al menos otras dos vías de activación de osteoclastos importantes en este proceso, como son el sistema RANKL/OPG y la proteína inflamatoria de macrófagos o MIP-1. El primer sistema ha cobrado gran relevancia en el último tiempo, ya que RANKL corresponde al receptor de activación del ligando de NF- κ B (factor nuclear κ B) que parece ser una vía crucial en el crecimiento de las CPs clonales y se ha convertido en un novedoso e interesante blanco terapéutico para pacientes de mal pronóstico. Así, RANK está presente en precursores monocíticos y osteoclastos y su activación gatilla la diferenciación y actividad osteoclástica. Esta acción pro-reabsorción ósea es contrarrestada por moléculas como osteoprotegerina u OPG, que antagoniza su efecto y protege de la reabsorción ósea. En este sentido, existen evidencias de que las células estromales de médula ósea en el MM expresan más RANKL y menos OPG, logrando como efecto neto un aumento de la reabsorción ósea final al provocar un desbalance en este equilibrio entre reabsorción/protección. Por último, se ha demostrado que si bien en las fases iniciales de la enfermedad la actividad osteoblástica está preservada, y aún aumentada, durante la evolución ésta se deprime progresivamente. Las bases bioquímicas y moleculares de esta inhibición no están claras, por lo que no serán ahondadas en este libro.

Manifestaciones neurológicas. Con relativa frecuencia existen en el MM otras dos manifestaciones clínicas asociadas a la patología ósea, como son la hipercalcemia y las alteraciones neurológicas. Estas últimas se presentan frecuentemente como radiculopatías o como un síndrome de compresión medular, motivadas por la compresión de una raíz nerviosa por una lesión vertebral o por el compromiso, ya sea traumático (secundario a una fractura por aplastamiento) o por el crecimiento de un plasmocitoma (tumor de CPs) a la cavidad medular, respectivamente. Si bien

existen casos en que la manifestación neurológica es dependiente de una polineuropatía secundaria a la presencia de paraproteinemia, esta situación es más bien excepcional. En estos casos la proteína anómala actuaría como anticuerpo dirigido contra determinantes antigénicos de la mielina.

Hipercalcemia. La presencia de hipercalcemia ($>10,5$ mg/dL tras corrección por los niveles de albúmina) ocurre en alrededor de un tercio de los pacientes. Dentro de su patogenia se ha descrito una alteración en el balance entre la actividad osteoclástica (reabsorción ósea) y la osteoblástica (formación ósea), de modo que la primera prevalece sobre la segunda (este punto se comentó más extensamente en el apartado i). Este desbalance estaría explicado por la presencia y mayor actividad de ciertas interleucinas hasta hace poco denominadas como “osteoclast activating factors” (OAF) y que hoy sabemos corresponden esencialmente al TNF y a la IL- 1β , ambos influenciados estrechamente por la actividad de IL-6 y a la vía de RANKL/OPG.

Síntomas generales. En los pacientes con MM es frecuente la presencia de síntomas constitucionales, tales como astenia, pérdida de peso, fatigabilidad, etc., muchas veces relacionados a la presencia de anemia y, en algunas oportunidades, al estado de hipermetabolismo que implica la enfermedad tumoral, como ocurre durante la progresión de la enfermedad o en los infrecuentes casos de leucemia de CPs.

Síndrome anémico. El valor medio de la hemoglobina (Hb) en la mayor parte de las series de pacientes con MM al diagnóstico es de alrededor de 10,5 g/dL, existiendo grados variables de anemia en el 60-70% de los casos. Además, alrededor de un 20-25% de ellos presentan anemia severa, con valores de Hb inferiores a 8,5 g/dL. La anemia en el MM es de origen multifactorial en que, además del mecanismo clásico de anemia de enfermedades crónicas, existen otros factores de importancia, como son: (a) reemplazo de la hematopoyesis normal por CPs tumorales, (b) actividad regenerativa disminuida del tejido hematopoyético residual, (c) insuficiencia renal, (d) deficiencia de hierro, y (e) disminución de la sobrevida del glóbulo rojo. Además, en los últimos años ha quedado de manifiesto el papel de la eritropoyetina (Epo) y otras citocinas en la patogenia de la anemia en el MM, sugiriéndose que en estos enfermos existiría una respuesta

inadecuada a la Epo (para el grado de anemia) y/o una respuesta proliferativa disminuida de las células eritropoyéticas a niveles normales de esta sustancia. Por último, se ha demostrado que algunas citocinas (IL-1, TNF, TGF e IFN- γ) pueden disminuir tanto la eritropoyesis como la producción de Epo.

Insuficiencia renal. La falla renal es un rasgo característico del MM y es uno de los factores pronósticos más importantes, representando la segunda causa de muerte en estos pacientes. Aproximadamente un 30% de los pacientes presentan niveles de creatinina ≥ 2 mg/dL al momento del diagnóstico, incidencia que aumenta durante el curso de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los enfermos son asintomáticos. Su etiología es también multifactorial, influyendo en ella la eliminación de cadenas ligeras, hipercalcemia (estas dos causas presentes en un 90% de los casos afectados) e hiperuricemia, deshidratación, infecciones urinarias a repetición, hiperviscosidad, uso de drogas nefrotóxicas (especialmente antibióticos), amiloidosis e infiltración tumoral. El término “riñón mielomatoso” se usa para designar la formación de cilindros tubulares y está invariablemente asociado a la presencia de proteinuria de Bence-Jones (cadenas ligeras monoclonales en la orina).

Infecciones bacterianas. Constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en el MM, siendo su incidencia global entre 0,5 y 3 episodios infecciosos por paciente/año (alrededor de 7 a 15 veces superior a la población normal de la misma edad). La causa más importante es la alteración de la inmunidad humoral, tanto por depresión de la producción normal de inmunoglobulinas (hipogammaglobulinemia) como por un hipermetabolismo de las mismas. Otros factores que parecen influir en la predisposición a las infecciones incluyen: (a) supresión de la producción de anticuerpos y de la proliferación de células B por parte de los monocitos/macrófagos estimulados por las CPs mielomatosas; (b) reducción en la producción de interleucina 4 (IL-4), responsable de la activación inicial de las células B en reposo; (c) presencia de células T con actividad inmunosupresora; (d) defectos en la inmunidad celular (disminución de células CD4 y alteración de las células NK); (e) alteración funcional de la actividad del complemento; (f) presencia de granulocitopenia, secundaria tanto a infiltración medular como al tratamiento quimioterápico; y (g) insuficiencia renal.

Los focos y agentes más frecuentemente comprometidos son el pulmonar (neumococo) y el urinario (bacilos gram negativos). Si bien la mayor parte de las infecciones en el MM son de origen bacteriano ($\approx 90\%$), también se reconocen en estos pacientes infecciones de origen viral (Herpes Zoster) y fúngicas (*Cándida Albicans*, etc).

Otras manifestaciones clínicas. El síndrome de hiperviscosidad es menos frecuente que en otros síndromes linfoproliferativos (por ejemplo Macroglobulinemia de Waldenström), pero puede presentarse en algunos casos de mielomas IgA o IgG₃. Otro problema de relativa frecuencia lo constituye la amiloidosis, presente en alrededor de un 10-15% de los casos, generalmente mielomas Bence-Jones con excreción de cadena ligera lambda.

d) Pronóstico

La evolución de los pacientes portadores de MM es muy variable, con casos que cursan con una enfermedad agresiva que los lleva a la

muerte en pocos meses y otros con un curso estable y sobrevida que puede superar incluso los 10 años, situándose la mediana de supervivencia en torno a los 3 años. Esta variabilidad en el curso clínico se debe a la presencia de diferentes factores pronósticos, entre los que destacan el estado general, la edad, la presencia de insuficiencia renal, la anemia, la hipercalcemia y la hipoalbuminemia. En cuanto al tipo de MM, parecen ser de peor pronóstico el IgD y el Bence-Jones. La clasificación pronóstica más utilizada hasta ahora es la de Durie-Salmon, resumida en la tabla 14-GM-3. En los últimos años se han reconocido nuevos factores pronósticos como el nivel de beta-2-microglobulina, de IL-6, proteína C reactiva, la actividad proliferativa de las CPs (el llamado "labelling index"), la expresión de ciertos antígenos en las células plasmáticas, las alteraciones cromosómicas –particularmente la monosomía del cromosoma 13-, la hipodiploidía y la expresión del gen de resistencia múltiple a drogas (MDR-1), algunos de los cuales serán revisados brevemente.

Tabla 14-GM-3. Criterios de Etapificación de Durie-Salmon

Estadio I (baja masa tumoral: $< 0,6 \times 10^{12}/m^2$)	
Hemoglobina > 10 g/dL	
IgG < 5 g/dL; IgA < 3 g/dL; Bence Jones $< 4g/24h$	
Nivel de calcio normal	
Presencia de máximo una lesión osteolítica	
Estadio II (masa tumoral intermedia: $0,6 - 1,2 \times 10^{12}/m^2$)	
Criterios intermedios entre estadio I y III	
Estadio III (alta masa tumoral: $> 1,2 \times 10^{12}/m^2$)	
Hemoglobina $< 8,5$ g/dL	
IgG > 7 g/dL; IgA > 5 g/dL; Bence Jones > 12 g/24h	
Nivel de calcio > 12 mg/dL (ajustado por la albúmina sérica)	
Presencia de lesiones osteolíticas múltiples	
A	Creatinina < 2 mg/dL
B	Creatinina ≥ 2 mg/dL

$\beta 2$ -microglobulina. La $\beta 2M$ es hoy en día uno de los factores pronósticos más relevantes y se correlaciona estrechamente tanto con la masa tumoral, el compromiso renal y la clasificación de Durie-Salmon. Sin embargo, como factor independiente es capaz de predecir la supervivencia mejor que cualquiera de los otros parámetros, por lo que debe estar incorporado en los protocolos de estudio y tratamiento en todos los pacientes.

Proteína C reactiva. La concentración de la PCR es un reflejo de la actividad de IL-6, un factor fundamental en la proliferación y sobrevida de las CPs. El valor predictivo de este parámetro parece ser independiente de la $\beta 2M$, lo que ha permitido construir algoritmos de estratificación de riesgo basados en estos dos parámetros fácilmente disponibles en la mayoría de los laboratorios en nuestro país y de bajo costo.

Índice proliferativo de las CPs. El PCLI (“plasma cell labelling index”) refleja la actividad proliferativa de las CPs que suele incrementarse con la progresión de la enfermedad. La supervivencia de los pacientes con PCLI < 3% es de 56 meses, que disminuye a 19 meses cuando este valor es $\geq 3\%$.

Citogenética. Las alteraciones de la composición cromosómica tienen un reconocido valor en enfermedades hematopoyéticas como las leucemias. Hasta hace pocos años la información en el MM era escasa debido a que este es un tumor de células esencialmente maduras con baja tasa proliferativa y menor posibilidad de obtener metafases analizables. Sin embargo, entre un 30 y 50% de los pacientes tienen un cariotipo anormal (20-30% al diagnóstico y 35-60% postratamiento o durante su evolución). Por otro lado, con técnicas de mayor sensibilidad como hibridación *in situ* (FISH) o citometría de flujo se puede observar cantidades anormales de DNA (aneuploidías de DNA) en hasta un 80% de los casos. Las alteraciones más frecuentemente encontradas son traslocaciones (51%) y trisomías (45%). De particular interés ha resultado el valor pronóstico ominoso de la pérdida de un cromosoma 13 (monosomía 13) o de alteraciones de 11q. Por último, en los últimos 2 años se ha puesto énfasis a la caracterización de “patrones genotípicos” utilizando tecnologías moleculares de última generación como los métodos de microarreglos (“microarrays”), que permiten evaluar en una misma muestra varios cientos o incluso miles de genes y comparar este patrón en las distintas entidades que comprenden las gammapatías clonales. Además, esta forma de caracterización genotípica permitirá en un futuro no sólo predecir el comportamiento más o menos agresivo en un paciente en particular, sino localizar aquellos grupos de genes que tienen mayor relevancia en la patogenia de la enfermedad y, por tanto, podrían permitir el diseño de estrategias terapéuticas más específicas que la quimioterapia convencional.

5. VARIETADES INFRECUENTES DE MIELOMA MÚLTIPLE Y OTRAS GAMMAPATÍAS

5.1. Mieloma “indolente”

Corresponde a pacientes con criterios diagnósticos inequívocos de mieloma pero en ausencia de anemia, insuficiencia renal, hipercalcemia o lesiones líticas múltiples. Estos pacientes tienen usualmente niveles de proteína

M > 3g/dL pero < de 4,5g/dL y > 10% de CPs atípicas en médula ósea. Estos pacientes suelen ser asintomáticos y no requieren tratamiento hasta que se evidencie una progresión de la enfermedad, lo que ocurre con una mediana de 26 meses.

5.2. Leucemia de células plasmáticas

Los pacientes con esta inhabitual presentación (< 5% de los pacientes) tienen un recuento absoluto de CPs $\geq 2 \times 10^6/\mu\text{L}$. Se debe diferenciar entre la variedad *de novo* y la transformación en LCP de un mieloma previamente conocido. El tratamiento de estos pacientes suele ser ineficaz y la mediana de supervivencia es de sólo 2 meses.

5.3. Mieloma osteoesclerótico

La principal característica de esta enfermedad es la presencia de una polineuropatía inflamatoria crónica desmielinizante causante de gran incapacidad motora. Esta alteración aparentemente es secundaria a una inmunoglobulina con toxicidad para las fibras nerviosas periféricas. Además, en esta variedad es frecuente la asociación de alteraciones endocrinológicas (síndrome de POEMS). La médula ósea de estos pacientes usualmente tienen proporciones normales de CPs (< 5%) y el diagnóstico debe confirmarse con la biopsia de una lesión lítica. Desde un punto de vista bioquímico, y comparado con los pacientes con MM clásico, estos pacientes suelen exhibir niveles más elevados de IL-1 β , TNF- α e IL-6, pero niveles inferiores de TGF- β , con un desbalance que favorece las citoquinas proinflamatorias.

5.4. Plasmocitoma extramedular

Esta rara entidad suele afectar con mayor frecuencia el tracto respiratorio superior aunque ocasionalmente afecta el tracto digestivo y otros órganos, en ausencia de criterios diagnósticos de un MM convencional. El tratamiento, al igual que en el caso de un plasmocitoma óseo solitario, es con radioterapia, con lo cual se observan excelentes resultados, incluyendo la curación en muchos de ellos.

5.5. Plasmocitoma óseo solitario

Corresponde a una lesión osteolítica única constituida por CPs clonales, en ausencia de infiltración en médula ósea. Suelen tener cantidades pequeñas de componente M ya sea

en suero y/o en orina, la que desaparece tras radioterapia sobre la lesión. Lamentablemente sólo un 50% de estos casos puede ser curado, dado que la otra mitad de los pacientes evoluciona hacia un MM clásico en los años siguientes. En este sentido, una experiencia preliminar de nuestro grupo muestra que, aún en ausencia de criterios clásicos de MM en médula ósea, en aproximadamente un 50% es posible demostrar la presencia de CPs clonales en médula ósea por medio de citometría de flujo, sugiriendo que desde un comienzo se trata de un MM con manifestación primariamente tumoral y no infiltrativa.

5.6. Macroglobulinemia de Waldenström (MW)

Entidad descrita por primera vez en 1944 por Waldenström en 2 pacientes con fatiga, sangramiento de mucosas, adenopatías y anemia normocómica asociada a un aumento de la viscosidad plasmática secundaria la presencia de grandes cantidades de proteína IgM circulante. A nivel de médula ósea se observa una infiltración de células linfoplasmocitoides productoras de la proteína IgM monoclonal, con frecuente presencia de basófilos tisulares (mastocitos) que ayudan en el diagnóstico. La edad media de presentación es sobre los 60 años, siendo más frecuente en el sexo masculino. Si bien la presencia de hiperviscosidad es la regla, sólo un 20% presenta síntomas relacionados a ella (cefalea, alteraciones visuales, etc.). En todo caso, elevaciones de sobre 4 veces el valor normal confiere un riesgo de complicaciones clínicas que obligan a considerar la plasmaféresis como una de las medidas terapéuticas. En alrededor de un 10% de los casos se observa una neuropatía desmielinizante sensitivo-motora crónica a nivel periférico; en la mitad de estos casos la paraproteína IgM está dirigida contra los epitopes carbohidratos de la glicoproteína asociada a la mielina (MAG). En términos generales la MW tiene una evolución larvada, con una mediana de supervivencia de alrededor de 5 años.

5.7. Enfermedad de cadenas livianas

La enfermedad de cadenas livianas o mieloma de Bence Jones se caracteriza por la producción monoclonal exclusivamente de la cadena ligera kappa o lambda, en ausencia de la cadena pesada correspondiente. En esta entidad es frecuente la asociación a daño renal de diversa magnitud secundario al paso de esta

inmunoglobulina a través de la membrana glomerular. Además, y especialmente cuando la cadena ligera es de tipo lambda, la deposición de esta proteína a nivel del glomérulo y mesangio puede dar origen a una amiloidosis renal capaz de producir un síndrome nefrótico frecuentemente irreversible.

5.8. Amiloidosis primaria

Se caracteriza por la formación de fibrillas con configuración espacial de tipo β a partir de cantidades variables de cadenas ligeras monoclonales, siendo mucho más frecuente de observar en casos de clonalidad λ . Al igual que el MM, la amiloidosis suele presentarse durante la séptima década de la vida (mediana 62 años) y se caracteriza clínicamente por fatigabilidad, baja de peso, compromiso del estado general y alteraciones neurovegetativas (parestesia, mareo, síncope, etc) que resultan progresivas y muy limitantes; asimismo, un tercio de los pacientes presenta síndrome nefrótico. Esta enfermedad suele ser tratada en forma similar al MM; sin embargo, la respuesta suele ser pobre, con compromiso progresivo que lleva inexorablemente a la muerte.

5.9. Enfermedad por cadenas pesadas

Corresponden a enfermedades linfoproliferativas infrecuentes caracterizadas por la producción monoclonal de Igs que carecen de cadenas ligeras. El primer reporte fue hecho en un caso de cadena pesada γ y se conoce por enfermedad de Franklin. Sin embargo, dentro de estos síndromes es más frecuente la enfermedad por cadenas α o enfermedad de Seligmann. El menos frecuente (alrededor de 30 casos reportados) compromete a la cadena μ .

Cadenas pesadas γ . La edad media es de 60 años y usualmente se presenta con un cuadro semejante a un linfoma agresivo, con adenopatías, compromiso del estado general, anemia, fiebre y hepatoesplenomegalia y raramente –a diferencia del MM tradicional- con lesiones osteolíticas. Si bien hay casos de evolución prolongada, la enfermedad suele cursar agresivamente, con una mediana de supervivencia de alrededor de 12 meses.

Cadenas pesadas α . La mayor parte de los pacientes son de origen mediterráneo, con una presentación en edades más precoces que las otras variantes (segunda a tercera década de la vida). La enfermedad compromete frecuentemente el tracto digestivo, con

síndrome de malaabsorción como síntoma habitual de presentación y tiene una evolución agresiva y fatal.

Cadenas pesadas μ . En esta entidad es frecuente encontrar hepatoesplenomegalia y, en cambio, es infrecuente la presencia de lesiones osteolíticas. La electroforesis de proteínas puede ser normal, pero en dos tercios de los casos se observa proteinuria monoclonal. El curso clínico puede ser variable, con evolución incluso durante varios años.

6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE MGUS Y MM

Además de la dificultad para definir el grupo de pacientes con riesgo de progresar hacia un tumor clínico, la diferenciación inicial entre MGUS y MM en algunos pacientes puede presentar dificultades, dado que los parámetros clínicos hasta ahora utilizados no son suficientes para discriminar correctamente en todos los casos, razón por la cual el diagnóstico se realiza en presencia de un grupo de criterios clínicos como los definidos por el "Committee of the Chronic Leukemia-Myeloma Task Force", 1973 (tabla 2). Asimismo, la cantidad de componente-M sérico suele ser uno de los parámetros de mayor utilidad, dado que, mientras mayor sea éste, mayor es la probabilidad de que se trate de un proceso maligno. Los niveles de hemoglobina, el porcentaje de CPs en médula ósea, la presencia de hipercalcemia, lesiones líticas óseas, afectación renal, etc., se utilizan en el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades. Sin embargo, existen casos de MGUS

que presentan, por ejemplo, valores de componente-M mayor de 3g/dL mantenidos en el tiempo, nivel utilizado como punto de corte en el caso de la IgG. Una característica que parece tener importancia en el diagnóstico diferencial es el índice de proliferación celular ("labelling index"), que corresponde a la cuantificación del número de CPs en fase de síntesis de DNA durante el ciclo celular, aunque este método presenta una tasa de falsos negativos elevada (hasta un 30% en la evaluación de pacientes con MM). Por último, los niveles de IL-6, citoquina relacionada a la proliferación de las CPs, están incrementados en una minoría de los pacientes portadores de MGUS, mientras que se elevan en el 35% a 42% de los portadores de MM. Recientemente nuestro grupo ha reportado el valor del patrón inmunofenotípico evaluado por medio de citometría de flujo como la metodología con menor índice de error en esta discriminación. Así, mientras en el MM las CPs son siempre clonales en ausencia de CPs normales, en prácticamente el 100% las MGUS es posible demostrar la coexistencia de CPs clonales –del todo similares a las CPs presentes en pacientes con MM– con CPs policlonales inmunofenotípicamente normales. Más aún, con este tipo de metodología es posible evidenciar la naturaleza aneuploide de las primeras junto a la diploide de las segundas (figura 14-GM-1). Resulta interesante cómo este hecho explicaría la diferencia –muchas veces utilizada como otro criterio clínico diferencial– en la presencia de hipogammaglobulinemia residual en el MM pero no en las MGUS, que mantienen una producción basal normal de Igs por parte de estas CPs residuales.

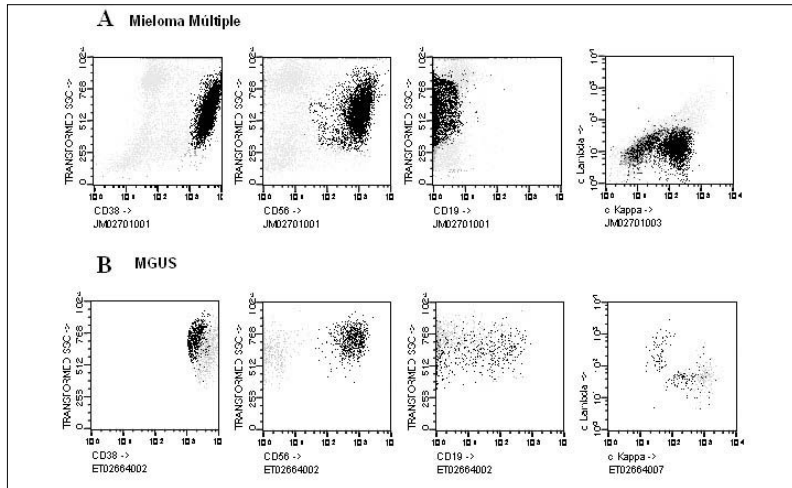


Figura 14-GM-1. Diferencias genotípicas de CPs de MM y MGUS. (A): en los pacientes portadores de un mieloma múltiple se observa sólo una población de células plasmáticas cuyo patrón inmunofenotípico más frecuente es el representado en esta figura, con expresión intensa de CD38 y CD56, en ausencia del antígeno CD19 propio de las células linfoides B, incluidas las CPs normales. Por último, la expresión citoplasmática de sólo una cadena liviana de las Igs (restricción de cadena liviana) demuestra la naturaleza clonal de estas células. (B): se observa la coexistencia de dos subpoblaciones de CPs. La primera es enteramente similar a las células mostradas en A y corresponden al componente de CPs clonales; la segunda población, generalmente minoritaria, presenta un patrón diferente, con expresión clara de CD19 en ausencia de CD56 y, a nivel citoplasmático, tanto la cadena kappa como lambda. Esta última corresponde a la fracción de CPs normales policlonales y la coexistencia de estas dos subpoblaciones de CPs es el patrón inmunofenotípico más característico de los pacientes con MGUS. Debido a que la figura no es a color en A las poblaciones de interés aparecen en negro y en B en negro y plomo.

De cualquier modo, y en un sentido clínico práctico, es importante señalar que sigue siendo fundamental el seguimiento clínico de los pacientes, con mediciones periódicas de su

componente-M sérico y evaluación de posibles síntomas relacionados, para intentar pesquisar los casos de MM verdadero (tabla 14GM-4) o aquellos casos de MGUS en transformación.

Tabla 14-GM-4. Criterios diagnósticos de Mieloma Múltiple

Criterios Mayores
Plasmocitoma en biopsia tisular
Plasmocitosis medular $\geq 30\%$
Cuantificación de la Proteína Monoclonal
IgG > 3500 mg/dL
IgA > 2000 mg/dL
Bence Jones ≥ 1 g/24h
Criterios menores
Plasmocitosis medular 10 – 29%
Proteína M presente en niveles inferiores a los descritos en criterios mayores
Lesiones osteolíticas
Disminución en las Inmunoglobulinas no comprometidas en el componente M
IgM < 50 mg/dL
IgA < 100 mg/dL
IgG < 600 mg/dL

El diagnóstico se confirma con al menos un criterio mayor y uno menor o tres criterios menores.

7. TRATAMIENTO

El detalle del tratamiento en esta enfermedad es complejo y excede los objetivos de esta publicación, por lo que nos remitiremos a un resumen conceptual de los elementos más importantes:

7.1. Terapia de apoyo

Considerando la naturaleza crónica y hasta ahora no curable de esta enfermedad y las múltiples alteraciones clínicas que puede producir, resulta fundamental la evaluación constante y el tratamiento de complicaciones como el dolor óseo y fracturas patológicas, anemia, hipercalcemia, etc. Junto a esto, el apoyo psicológico resulta fundamental como lo es en cualquier patología de carácter crónico, especialmente en las de naturaleza neoplásica, y no se deben escatimar medios para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

7.2. Tratamiento citotóxico

Los pacientes inicialmente asintomáticos usualmente tienen una masa tumoral relativamente baja y una velocidad de progresión lenta. En este grupo no se ha demostrado un beneficio en términos de mediana de supervivencia con tratamiento citotóxico precoz. Por esta razón en etapas iniciales de la enfermedad sólo está indicado un seguimiento cercano, usualmente evaluando parámetros sencillos como hemograma y cuantía del componente M mediante una electroforesis de proteínas. Por el contrario, en aquellos pacientes sintomáticos y/o con enfermedad de alta masa tumoral o progresiva está justificado el tratamiento, dado que mejora en forma significativa tanto la calidad como la mediana de supervivencia. El tratamiento considera dos formas esencialmente distintas como son:

Dosis convencionales. Las drogas clásicamente más utilizadas son la combinación de Melfalán (usualmente 0,2 mg/Kg) y Prednisona (usualmente 2 mg/Kg) dados durante 4 días cada 4 a 6 semanas. Esta terapia suele ser relativamente bien tolerada y poco tóxica y permite un buen control de la enfermedad tanto en términos subjetivos como objetivos. Así, alrededor de un 50-70% de los pacientes logra

una disminución en su sintomatología después de 3 a 6 meses de tratamiento, lo que suele acompañarse de una reducción en la masa tumoral, pero muy infrecuentemente de una desaparición del componente M, que se mantiene evidente en la mayoría de los casos. En aquellos casos que no responden a estas medidas o que se presentan con alteraciones agudas como insuficiencia renal una segunda alternativa consiste en quimioterapia endovenosa. Si bien existen diferentes protocolos en este sentido, una de las combinaciones de drogas más utilizadas son la Vincristina, Adriamicina y Dexametasona (VAD), que resulta en un rápido alivio sintomático en hasta dos tercios de los casos, con escasa toxicidad a la médula ósea normal. Sin embargo, debe enfatizarse que con cualquiera de estas alternativas terapéuticas la remisión completa de la enfermedad (ausencia de componente monoclonal en suero y desaparición de la plasmocitosis medular) sólo se logra entre un 5 y 8% como máximo.

Dosis altas y trasplante de médula ósea. Dado que el incremento menor de dosis de agentes alquilantes no ha logrado un impacto mayor en la sobrevida de los pacientes, se ha intentado un aumento mayor –en dosis capaces de producir aplasia medular- apoyado por una reconstitución de la médula ósea a través de trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogos (recolectados del mismo paciente previamente). Así, la experiencia inicial del grupo francés demostró recientemente que este tipo de terapia es capaz de lograr una remisión completa de la enfermedad (ausencia de plasmocitosis medular y desaparición del componente M) en hasta un 50% de los pacientes, logrando una significativa mayor sobrevida comparado con dosis convencionales. Esta experiencia preliminar ha sido repetida por diversos autores y se considera hoy en día que, si bien no logra una curación de la enfermedad, obtiene un incremento tanto en la sobrevida libre de progresión como en la sobrevida global de alrededor de un año comparado con la terapia de dosis convencional (SLP 32 vs 20 meses y SG 54 vs 42 meses). Más aún, un grupo multicéntrico internacional ha demostrado recientemente que el trasplante “en tandem” (dos trasplantes autólogos seguidos) logra mejorar todavía más estos resultados. Esto ha significado que en pacientes jóvenes (hasta 60 o incluso 65 años) con enfermedad agresiva el trasplante de médula ósea sea, actualmente, la alternativa de elección en casi todos los grupos clínicos. Con respecto al trasplante alogéneo

-esto es, a partir de un donante histocompatible relacionado- la experiencia es menor esencialmente por la edad de la mayoría de los pacientes (lo que disminuye la probabilidad de disponer de un donante) y por la toxicidad propia de él, que en distintas series llega incluso al 50%. Sin embargo, tanto la ausencia de contaminación tumoral de la médula ósea injertada como el posible efecto de ésta sobre las CPs tumorales residuales (efecto “injerto contra mieloma”) han logrado la curación de un reducido número de pacientes y puede ser una alternativa a evaluar en grupos seleccionados de pacientes. Una alternativa actualmente en activa evaluación es el uso del llamado trasplante no mieloablativo o “minitrasplante”, que consiste en un condicionamiento (terapia pre-trasplante) reducido y esencialmente inmunosupresor enfocado a permitir una “coexistencia” entre la médula ósea del huésped y la del donante, siendo esta última la encargada de lograr el efecto antitumoral. Una ventaja de esta modalidad es su bajo perfil de toxicidad, con mortalidad que se ha reducido hasta un 10 a 15% y que permite su uso en personas mayores. Sin embargo, su real utilidad en MM está aún por definirse.

Otras drogas. Otras vías terapéuticas interesantes de cara al futuro lo constituyen drogas que modulan la respuesta inmune o la actividad celular como respuesta a las CPs tumorales. En esta línea de pensamiento están drogas como la Talidomida y el Revimid, que en diferentes ensayos clínicos han logrado respuestas en hasta un tercio de pacientes con MM refractarios o progresivos ante terapias tradicionales y están siendo objeto de estudios en primera línea actualmente. Otra droga de gran interés es el inhibidor de proteosoma Velcade, que actúa en la vía de RANKL/OPG mencionada previamente y que ha logrado respuesta en pacientes refractarios a toda terapia, incluyendo trasplante, talidomida, etc. Por último, y en términos generales, esperamos que el conocimiento cada vez más íntimo de las vías regulatorias del crecimiento y apoptosis de las CPs mielomatosas, así como del papel y vías de acción del estroma medular, nos lleven a dar un paso hacia el diseño de terapias más orientadas a la patogenia de la enfermedad y permitan, en un futuro la curación de los pacientes que la sufren.

LECTURAS SUGERIDAS

Advances in Biology and Therapy of Multiple Myeloma. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 248-278, 2003.

Davies, F.E., Dring, A.M., Cheng, L., *et al.* “Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis” *Blood* 102 (13): 4504-4511, 2003.

Fenton, R., Jacobson, J., Kuehl, W.M., *et al.* “New insights into role of microenvironment in multiple myeloma”. *Lancet*;355:248-50, 2000.

Hallek, M., Bergsagel, P., Anderson, K.C. “Multiple myeloma: increasing evidence for multistep transformation process”. *Blood* 91:3-21, 1998.

Kawano, M.M., Mihara, K., Huang, N. *et al.* “Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal-cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis”. *Blood*;85:487-94, 1995

Klein, B., Zhang, X.J., Lu, Z.Y., Bataille, R. “Interleukin-6 in human multiple myeloma”. *Blood*; 85:863-72, 1995

Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V. *et al.* “A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance”. *N Engl J Med*; 346:564-92, 2002.

Kyle, R.A. “The gammopathies”. *Seminars in Hematology* 32(1):4-79, 1995

Kyle, R.A. “Monoclonal gammopathies” In **Clinical Immunology: Principles and Practice**, Rich, R.R., Fleischer, T., Schwartz, B.D., Shearer, W.T., Strober, W., (eds.) Mosby-Year Book, Inc USA. capítulo 116 pp 1801-1811, 1996.

Lemoli, R.M., Martinelli, G., Zamagni, E. *et al.* “Engraftment, clinical and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy”. *Blood*;95:2234-9, 2000.

Lichstentein, A., Tu, Y., Fady, C. *et al.* “Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells”. *Cell Immunol* 162:248-55, 1995.

Longo, D.L. "Plasma cell disorders" In **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 14th Ed Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.J., Longo, D.L., (eds.), capítulo 114, pp. 712-718 McGraw-Hill, USA, 1998

Ocqueteau, M., Orfao, A., Almeida, J., Blade, J., Gonzalez, M., Garcia-Sanz, R., Lopez-Berges, C., Moro, M.J., Hernandez, J., Escribano, L., Caballero, D., Rozman, M., San Miguel, J.F. "Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma". *Am J Pathol*. 152(6):1655-65, 1998.

Orfao, J., Mateo, G., Ocqueteau, M., *et al.* "Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance". *Almeida Pathol Biol* (Paris).47(2):119-27, 1999.

Vescio, R.A., Hong, C.H., Cao, J. *et al.* "The hematopoietic stem cell antigen, CD34, is not expressed on the malignant cells in multiple myeloma". *Blood* 84:3283-90, 1994.

SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICOS

Juan Tordecilla C. e Iván Palomo G.

- 1. Introducción**
- 2. Clasificación de los SMD**
- 3. Patogénesis de los síndromes mielodisplásicos**
- 4. Diagnóstico**
 - 4.1. Alteraciones morfológicas
 - 4.1.1. Alteraciones citológicas generales
 - 4.1.2. Alteraciones morfológicas en los diferentes tipos de SMD
 - 4.2. Alteraciones citogenéticas
 - 4.3. Alteración molecular
 - 4.4. Alteraciones inmunológicas
 - 4.5. Alteraciones enzimáticas
 - 4.6. Cultivos de médula ósea
- 5. Síndromes mielodisplásicos en pediatría**
- 6. Evaluación diagnóstica de mielodisplasia**
- 7. Tratamiento de los SMD**
 - 7.1. Estrategias generales de tratamiento
 - 7.2. Tratamiento de los SMD en pediatría

RESUMEN

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de hemopatías clonales. Su patogenia es desconocida; se han descrito diversas anomalías, tanto de la biología de la "stem cell", como de su control funcional por el microambiente medular, así como numerosas alteraciones citogenéticas y moleculares, ninguna de las cuales ha resultado específica. La expresión clínica está dominada por las consecuencias de una combinación variable de citopenias periféricas, en el contexto de una médula ósea hiperplásica con signos de displasia.

Los SMD se han clasificado en 5 tipos: Anemia refractoria (AR) AR con sideroblastos en anillo, AR con exceso de blastos, AR con exceso de blastos en transformación y leucemia mielomonocítica. Más recientemente la OMS propuso algunas modificaciones.

La aplicación sistemática del estudio citogenético de los SMD es importante debido a que aporta información complementaria a la citología.

Este capítulo trata sobre las características de laboratorio, tanto de sangre periférica como de médula ósea, de los diferentes tipos de SMD y algunos aspectos de su patogenia.

1. INTRODUCCIÓN

Los SMD, son probablemente el grupo de enfermedades hematológicas clonales de mayor frecuencia. Este hecho y su tendencia a evolucionar a Leucemia mieloide aguda (LMA), ha convertido a este grupo heterogéneo de enfermedades en foco de numerosos estudios, cuyos principales objetivos han sido clarificar su etiopatogenia, desarrollar clasificaciones con valor pronóstico y biológico, y además evaluar distintas modalidades de tratamiento.

Se estima que la incidencia de los SMD es de 4-12/100.000 habitantes por año, pudiendo llegar a 30/100.000 habitantes por año en los individuos mayores de 70 años. La aparición en la edad pediátrica y en el adulto joven es rara y con poca frecuencia se han descrito algunos casos de SMD familiar.

2. CLASIFICACIÓN DE LOS SMD

En 1975, el grupo Francés-Americano-Británico (FAB), realizó una clasificación de las leucemias agudas (LA), reconociendo que no todos los pacientes con citopenias en sangre periférica y displasia en médula ósea progresaban a LA.

Realizaron una distinción entre LA con inicio rápido y un grupo de alteraciones que presentando algunas características de LA, a diferencia de éstas, rara vez necesitaban tratamiento inmediato; a este grupo de desórdenes, que afectaba a pacientes mayores de 50 años les denominaron Síndromes Mielodisplásicos.

En 1980 el grupo FAB revisó una serie más grande de pacientes con el propósito de determinar las alteraciones morfológicas específicas de ellos. Esto condujo a una definición amplia de los SMD en cinco subgrupos (tabla 15-1). Los criterios empleados en esta clasificación se basan en el porcentaje de blastos en médula ósea y en sangre periférica, número absoluto de monocitos circulantes, presencia de bastones de Auer, porcentaje de sideroblastos en anillo, todo junto con rasgos morfológicos dishemopoyéticos de grado variable. Los cinco grupos son los siguientes: anemia refractoria (AR), AR con sideroblastos en anillo (ARS), AR con exceso de blastos (AREB), AR con blastos en transformación (AREB-t) y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).

Tabla 15-1. Clasificación FAB de los Síndromes Mielodisplásticos

Subgrupo	Blastos sangre periférica %	Blastos en médula ósea %	Sideroblastos médula ósea %	Monocitos (/μL)	Grado de disheritropoyesis
AR	< 1	< 5	< 15	<1x10 ³	+
ARS	< 1	< 5	> 15	<1x10 ³	+
AREB	< 5	5-20	Variable	<1x10 ³	++
AREB-t	< 5	21-29*	Variable	Variable	+++
LMMC	< 5**	0-20	Variable	>1x10 ³	++

* Algunos autores consideran la aparición de bastones de Auer.

** En ocasiones > 5%

Aunque esta clasificación ha tenido una aceptación generalizada, tiene algunas limitaciones, como por ejemplo, que no considera el cariotipo. Por esta razón, a principios del año 2001, un comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación (tabla 15-2).

Existe además otro grupo de SMD que son secundarios a exposiciones de diversos elementos, como benceno, metales pesados, pesticidas, radiación ionizante, tolueno, sustancias utilizadas en quimioterapia y que son dañinas para la médula ósea, etc

3. PATOGENESIS DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICOS

La mielodisplasia está considerada como una

familia de desórdenes clonales caracterizada por hematopoyesis inefectiva y susceptibilidad a leucemia aguda en un plazo variable.

La proliferación clonal es la consecuencia de una mutación somática adquirida que confiere una ventaja proliferativa a estas células. Esta clonalidad puede ser determinada por análisis citogenético y por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de las anomalías cromosómicas, análisis por *southern blot* de alteraciones genéticas e inactivación del cromosoma X.

Aunque la celularidad medular habitualmente está aumentada en la mielodisplasia, hay discrepancia con las citopenias periféricas lo que estaría explicada por un aumento en la muerte celular programada (apoptosis).

Tabla 15-2. Clasificación de la OMS para los Síndromes Mielodisplásticos

Subtipo morfológico	Blastos en sangre periférica (%)	Blastos médula ósea (%)	Sideroblastos médula ósea (%)	Displasia
AR	< 1	< 5	< 15	Solo eritroide
ARS	< 1	< 5	≥ 15	Solo eritroide
Citopenia refractaria con displasia multilineal*	< 1	< 5	Indiferente**	Al menos de 2 líneas hematopoyéticas***
AREB	1-20	5-20	Indiferente	Indiferente
Tipo 1	1-20	5-10		
Tipo 2	11-20	11-20		
Síndrome 5q-	< 5	< 5	Indiferente	Indiferente
SMD inclasificable	< 1	< 5	Indiferente	Solo 1 línea no eritroide

* Bicitopenia o pancitopenia

** si ≥ 15% se denomina citopenia refractaria con displasia multilineal con sideroblastos en anillo

*** se considera displasia de una línea si ≥ 10% de células de esa línea presentan displasia

AR, anemia refractaria; ARS, AR con sideroblastos en anillo; AREB, AR con exceso de blastos

Varias citoquinas o ligandos que tienen propiedades pro-apoptóticas como la interleuquina 1b (IL-1b) factor de necrosis tumoral (TNF) y el ligando de fas (Fas-L), estarían no regulados en la mielodisplasia.

En la mielodisplasia las células pluripotenciales hematopoyéticas (CPH) son genéticamente inestables y susceptibles de lesiones como una mutación dominante sobre el resto de las células normales y como estas células muestran una evolución clonal tienen tendencia a múltiples mutaciones genéticas y a desarrollar leucemia. Debe existir un evento genético inicial desconocido sobre la CPH que forma parte de una patogénesis con múltiples etapas, lo que va seguido de una inestabilidad cariotípica clonal.

Actualmente no se conocen defectos genéticos que estén específicamente asociados con la mielodisplasia, aunque hay anormalidades cromosómicas y moleculares recurrentes. Hay una relativamente alta frecuencia de mutaciones del gen RAS y específicamente del N-RAS que está asociada con una transformación rápida a leucemia.

Existe una incidencia aumentada de Leucemia mielomonocítica juvenil en pacientes con Neurofibromatosis tipo 1 lo que ha proporcionado algunas claves que implican la presencia de un gen RAS anormal en la característica hipersensibilidad de las células leucémicas al factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF). Hay pérdida de la heterocidad del gen NF-1, así que la regulación normal del RAS por la neurofibromina, se pierde resultando en la activación de esta vía. También se han descrito mutaciones puntuales del gen p53; los pacientes con un clon anormal están marcados por un isocromosoma 17q tienen a menudo una mutación del p53 en estas células. Otras mutaciones han sido descritas en los genes NRAS y NB1.

En los blastos de tipo mielóide existe expresión de la glicoproteína p170 y está incrementada en los pacientes con SMD, lo que representa la acción del gen de resistencia múltiple a drogas.

4. DIAGNÓSTICO

Las manifestaciones clínicas en los pacientes afectados de SMD generalmente son consecuencia del grado de citopenia existente. Los síntomas más frecuentes incluyen fiebre y sangramiento. En un tercio de los casos puede encontrarse esplenomegalia, casi siempre relacionada con el diagnóstico de LMMC.

4.1. Alteraciones morfológicas

4.1.1. Alteraciones citológicas generales

Un elemento fundamental en el diagnóstico son las alteraciones morfológicas cualitativas en una o más series hematopoyéticas que aparecen tanto en sangre periférica como en médula ósea (tabla 15-3) y deben estar presentes, como mínimo, en el 10% de las células de cada una de las series.

a) Sangre periférica

Aparecen una o más citopenias, siendo la anemia la más frecuente, se observa en alrededor del 85% de los casos, acompañada de macrocitos moderada, además puede encontrarse doble población.

Es frecuente encontrar eliptocitos, esquistocitos, punteado basófilo y eritroblastos. Estas alteraciones reflejan la eritropoyesis anormal que resulta de un desbalance entre la proliferación y diferenciación eritroide, y la apoptosis.

Las alteraciones granulomonocitarias en el momento del diagnóstico están presente en alrededor del 50% de los pacientes. Es frecuente encontrar neutropenia acompañada de hipolobulación (Pseudo-Pelger) y de hipogranulación, con el consiguiente defecto funcional de estas células. La leucocitosis con incremento absoluto de monocitos ($>1 \times 10^9/L$) se relaciona con la existencia de LMMC.

La trombocitopenia está presente en el 30% de los casos al momento del diagnóstico. Las plaquetas son gigantes, anormalmente alargadas e hipogranulares. Raramente puede observarse trombocitosis, la que se asocia con delección del brazo largo del cromosoma 5, lo que confirma el síndrome 5q.

Tabla 15-3. Alteraciones morfológicas observadas en los SMD

	Sangre periférica	Médula ósea
Diseritropoyesis	Macrocitosis moderada Normocromía Poiquilocitosis Punteado basófilo Células rojas nucleadas Aumento de eritroblastos	Cambios megaloblásticos Multinuclearidad Fragmentación nuclear Alteraciones citoplasmáticas Sideroblastos en anillo
Disgranulopoyesis	Anomalías Neutropenia Pseudo Pelger-Huet Hipo o hipergranulación Distribución irregular de la cromatina nuclear	Hiperplasia Hipogranulación Granulaciones mixtas Aumento de la basofilia citoplasmática Anomalías nucleares Presencia de blastos con o sin alteraciones nucleares
Dismegacariopoyesis	Trombocitopenia Plaquetas alargadas Hipogranulación Hipergranulación	Micromegacariocitos Megacariocitos con pequeños núcleos múltiples redondeados Núcleos bilobulados Hipogranulación Reducción del número de megacariocitos

b) Médula ósea

La médula ósea generalmente se presenta hiper celular, pero hay un pequeño porcentaje de pacientes que puede presentar médula ósea hipocelular.

La serie eritroide generalmente se encuentra hiperplásica, con alteraciones estructurales citoplasmáticas, entre las que destacan la presencia de vacuolas y la basofilia intensa, alteraciones nucleares e incremento del número de eritroblastos hasta en un 50%. En esta diseritropoyesis suele observarse glóbulos rojos macrocíticos, que pueden ir acompañados de glóbulos rojos normo y microcíticos.

Los eritroblastos presentan displasia, tanto en el núcleo como en el citoplasma, y pueden ser PAS+.

La serie granulocítica usualmente está aumentada y muestra las alteraciones morfológicas descritas en sangre periférica. Adicionalmente se observan granulaciones

mixtas y la persistencia de basofilia citoplasmática. Las características y porcentaje de blastos son factores determinantes en la clasificación y les confiere un valor pronóstico. La serie megacariocítica frecuentemente está aumentada a expensas de micromegacariocitos. La dismegacariopoyesis está presente en la mitad de los pacientes en el momento del diagnóstico, se encuentran alteraciones de tamaño, nucleares y citoplasmáticas.

4.1.2. Alteraciones morfológicas en los diferentes tipos de SMD

a) Anemia refractaria

Corresponde al 10 a 15% de los casos. La anemia es el principal hallazgo. En sangre periférica se observa: macrocitosis, poiquilocitosis y anisocitosis moderada. Maduración megaloblastoide, glóbulos rojos nucleados displásticos. Reticulocitopenia, a veces puede existir un aumento en el porcentaje de reticulocitos, policromasia, el recuento de blancos es normal o levemente disminuido < 1%

de blastos y las alteraciones disgranulopoyéticas son menores. El recuento plaquetario es normal o levemente disminuido; en la médula ósea se encuentra celularidad normal o aumentada, puede ser hipocelular; se observa también hiperplasia eritrocítica con diseritropoyesis (maduración megaloblastoide) formas bizarras, gigantes y multinucleadas. Pueden verse sideroblastos. Disgranulopoyesis leve: hipo o hiperplasia granulocítica, disociación de maduración núcleo-citoplasmática. La dismegacariocitopoyesis es leve. Se han descrito casos con citopenia refractaria sin diseritropoyesis.

b) Anemia refractaria con sideroblastos en anillo

Su diagnóstico es excepcional y debe siempre descartarse una enfermedad constitucional como una citopatía mitocondrial. Corresponde al 1 a 2 % de los niños. Sangre: desde el punto de vista de la serie roja hay una combinación de macrocitosis y microcitosis con hipocromía. Ocasionalmente hay sólo macrocitosis. Hay numerosos siderocitos. La disgranulopoyesis es leve, el recuento de blastos es bajo y la cifra de glóbulos blancos es normal o ligeramente disminuida. Las alteraciones de los megacariocitos son leves, el recuento plaquetario es normal o bajo. Médula ósea: La celularidad está moderada o marcadamente hiper celular. Hiperplasia eritrocítica marcada. Los sideroblastos anillados corresponden al >15% de todas las células nucleadas, tienen un mínimo de 5 gránulos y cubren al menos el 30% de la circunferencia del núcleo. La granulopoyesis es normal o hay leve disgranulopoyesis.

La cifra de blastos corresponde a >5% de todas las células nucleadas. La dismegacariopoyesis es discreta. Los depósitos de hierro están marcadamente aumentados.

c) Anemia refractaria con exceso de blastos

Se observa entre un 20 a 25% de los casos de mielodisplasia. Los enfermos pueden presentarse con síntomas de anemia, fiebre o manifestaciones hemorrágicas. Sangre: La anemia puede ser macrocítica o microcítica. Pueden verse sideroblastos. Pueden existir

glóbulos rojos displásticos circulando. Granulocitos displásticos están siempre presentes. Hiposegmentación nuclear, neutrófilos hipogranulares, granulación anormal. Basófilos y eosinófilos con hipogranulación. Pueden existir hasta 5% de blastos. Médula ósea: Hiposegmentación nuclear (Pseudo-Pelger-Huet) o hipersegmentación, pseudonucléolo, hipogranulación, granulación anormal, aspecto monocitoide. La cifra de blastos está entre 5 a 20%. Existe franca dismegacariopoyesis, hiper o hipoplasia de megacariocitos, formas bilobuladas o mononucleares, aumento de los micromegacariocitos, vacuolización citoplasmática y acúmulos de megacariocitos.

d) Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

Corresponde a un 25 a 30% de los casos. Los pacientes en este grupo presentan transformación desde un SMD a una leucemia aguda, habitualmente en un corto período. Sangre: Anemia macrocítica. Existe franca disgranulopoyesis y dismegacariopoyesis. Granulocitos anormales y puede haber aumento de los monocitos. Médula ósea: habitualmente hiper celular, pero puede ser normo o hipocelular. Existe disgranulopoyesis y dismegacariopoyesis. La cifra de blastos está entre 20 a 30%. Se pueden observar bastones de Auer.

4.2. Alteraciones citogenéticas

Las alteraciones del cariotipo están presentes en el 30-50% de los SMD.

La investigación de la citogenética en la médula ósea, suplementada con FISH es esencial en la evaluación de una mielodisplasia.

Se ha observado una mayor incidencia de la pérdida total o parcial de cromosoma, seguida por la existencia de trisomías (tabla 15-4). Las translocaciones son menos frecuentes y afectan fundamentalmente a los cromosomas 1, 3, 5, 7 y 17. Las alteraciones complejas, denominadas así porque incluyen más de tres cromosomas ocurren en el 15% de los SMD primarios y 50% en los SMD secundarios. Son más frecuentes las alteraciones de los cromosomas 5 y 7.

Tabla 15-4. Alteraciones citogenéticas más frecuentes en los SMD

Alteración	Localización
Delección parcial de un cromosoma	5q, 20q, 7q, 11q, 12q, 13q
Pérdida de un cromosoma	Monosomía 7 y 17, pérdida del Y
Ganancia de un cromosoma	Trisomía 8, 11, 21
Translocaciones	t(3; 3) (q21; q26) t(1; 7) (p11; p11) t(5; 17) (p11; p11) t(7; 17) (p11; p11) t(5; 7) (q11; p11)
Alteraciones complejas	Involucran a más de dos cromosomas
Otras	iso (17q) inv (3) (q21; q26)

Recientemente se ha estudiado el acortamiento de la longitud de los telómeros en el momento del diagnóstico, esto indicaría un peor pronóstico en el paciente. También se ha informado un discreto incremento en la actividad de la telomerasa, en el 60% de los pacientes, lo que también implicaría mal pronóstico.

La aplicación sistemática de estudios citogenéticos en los SMD es importante, ya que aporta información complementaria a la citología y permite el establecimiento de entidades citológica-citogenéticas. FISH (ver capítulo 30) permite observar alteraciones que no son detectadas por citogenética convencional.

En los casos que se detectan cariotipos complejos se puede aplicar FISH multicolor, tales como M-FISH o SKY ("Spectral Karyotyping") que permiten detectar mayor número de alteraciones citogenéticas. Si se emplea HGC (Hibridación Genómica Comparada) se puede detectar ganancias o pérdidas de material genético.

En el último tiempo se han presentado estudios en SMD con tecnología de microarreglos ("micro- array") de expresión, lo cual permite conocer los mecanismos moleculares implicados en estos síndromes y así establecer conductas terapéuticas específicas. Además es

capaz de discriminar SMD de bajo riesgo, alto riesgo y población normal.

Hoy en día, la aplicación de estas técnicas es limitada, debido a su elevado costo económico.

Las anormalidades citogenéticas no están asociadas con un subtipo específico de mielodisplasia a diferencia de la leucemia mieloide aguda.

4.3. Alteración molecular

Las mutaciones más frecuentes son las que comprometen a la familia del gen RAS (tabla 15-5). Éstas se han identificado hasta en el 40% de los pacientes estudiados, la más común es la de los N-RAS que presenta alta asociación transformación a leucemia aguda. Le sigue en orden de frecuencia las mutaciones en el gen FMS, presente en el 10% de los pacientes con SMD. Ambas mutaciones son más frecuentes en LMMC.

También se ha observado la expresión de la glicoproteína p-170; en blastos con fenotipo mieloide inmaduro se encuentra aumentada en el 50% de los pacientes con SMD de alto riesgo. Esta proteína es codificada por gen de resistencia a multidroga (MDR-1), lo que puede explicar la pobre respuesta al tratamiento quimioterápico en esta patología.

Pueden observarse alteraciones en los genes bc12 y p53 que participan en el mecanismo de regulación de la muerte celular (apoptosis), al

encontrarse alteradas, llevaría a una apoptosis excesiva y prematura.

Tabla 15-5. Alteraciones moleculares más frecuentes en los SMD

Gen	Tipo de Alteración	Frecuencia (%)
RAS (N ó K)	Mutación puntual (codón 12-13-61)	10 - 40
FMS	Mutación puntual (codón 969 ó 301)	5 - 10
P53	Mutación (por delección de un alelo)	5
MDR 2		70
BCL 2	Sobre-expresión de proteínas	30
MDR 1		30

4.4. Alteraciones inmunológicas

Con respecto a la inmunidad humoral, un tercio de los pacientes con SMD presentan un aumento de las inmunoglobulinas séricas, con aumento de los valores de IgG e IgA.

Los estudios inmunofenotípicos de los pacientes con SMD siguen siendo por el momento escasos. La mayor parte de la información disponible se centra en el estudio de precursores blásticos, especialmente CD34+, cuando el paciente sufre evolución a leucemia aguda. También existe relación entre la disminución de la expresión de CD11b o el aumento de la expresión de los antígenos CD34, HLA-DR, CD13 y CD33 en médula ósea y el riesgo de transformación a leucemia aguda.

Aunque los trabajos en este ámbito son escasos, sugieren la utilidad del inmunofenotipo en la caracterización diagnóstica de los pacientes con morfología y citogenética dudosa.

4.5. Alteraciones enzimáticas

Se ha encontrado aumento en los niveles séricos de la enzima láctico deshidrogenasa (LDH); según algunos investigadores esto podría conferir valor pronóstico independiente.

En algunos pacientes se ha observado ausencia de la enzima glutation-transferasa-theta-1, que participa en la desintoxicación de cancerígenos ambientales; esta ausencia incrementa el riesgo de adquirir SMD secundarios.

4.6. Cultivos de médula ósea

En cultivos de médula ósea de pacientes con AR, ARS y LMMC se ha observado incremento en el número de las unidades formadoras de colonia de granulocitos-monocitos (GM-CFU), pero se encuentran disminuidas en pacientes con AREB y AREB-t.

5. SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICOS EN PEDIATRÍA

Los SMD constituyen un grupo heterogéneo de hemopatías clonales infrecuentes en niños. Su frecuencia es de 1,7 casos por millón de niños en riesgo.

La primera clasificación de SMD en niños se estableció atendiendo a la existencia de condiciones genéticas predisponentes o de antecedentes de quimioterapia precedentes. Según esto se clasifican como se indica en la tabla 15-6.

Tabla 15-6. Clasificación de los SMD pediátricos

- SMD asociado a enfermedad genética o alteraciones cromosómicas (30%).
 - Síndrome de Down
 - Neurofibromatosis
 - Síndrome de insuficiencia medular congénita
 - SMD/LAM con anomalías en 5q y 7q
- SMD secundarios a quimioterapias previas
- SMD primarios
 - Clasificación FAB: AR, ARSA, AREB, AREB-t, LMMC
 - Clasificación OMS: AR, AREB I y II, LMMJ (SMD7SMP)

En la infancia los SMD corresponden a un grupo heterogéneo de desórdenes clonales de la célula madre ("stem cell") hematopoyética caracterizados por hematopoyesis inefectiva asociada con médula ósea frecuentemente hipercelular, muerte celular intramedular aumentada y citopenias periféricas de severidad variable.

Estos pacientes evolucionan en un 20 a 30 % de los casos a una leucemia aguda habitualmente de tipo mielóide en un plazo menor de 2 años, a diferencia de los adultos, y la progresión de la enfermedad está caracterizada por expansión del clon anormal e inhibición de la hematopoyesis normal. La incidencia es relativamente baja representando un 3 a 5 % de las enfermedades hematológicas malignas de la niñez. Otras estadísticas la refieren como fase previa en 15% de las leucemias mieloides agudas y en general la cifra aceptada es de 0.5 a 1 por 1.000.000 de niños menores de 15 años. Existe un predominio en los varones. El primer intento sistemático para la clasificación fue aportado por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB) en 1982 (tabla 15-1). Sin embargo y a pesar de ser la clasificación más ampliamente aceptada, es parcialmente aplicable en niños. En la actualidad y luego de un consenso internacional, el grupo catalogado como LMMC ha sido reemplazado por el de Leucemia mielomonocítica juvenil, que incluye la previamente llamada leucemia mielomonocítica crónica, la leucemia mielóide crónica juvenil y el síndrome de monosomía 7 infantil, debido a sus similitudes clínicas y biológicas que sugieren variables de la misma enfermedad. Otro factor importante de considerar en los niños es que los SMD están asociados, en un alto porcentaje de casos, a una enfermedad con anomalías constitucionales como son la anemia de Fanconi, la enfermedad

de Shwachman-Diamond, la neurofibromatosis tipo 1, el síndrome de Down, las neutropenias congénitas severas incluida la Enfermedad de Kostmann y la trisomía 8. Además deben incluirse los pacientes con alteraciones displásicas y antecedentes de terapia citotóxica así como la anemia aplásica que haya recibido tratamiento inmunosupresor.

También se han descrito casos familiares de mielodisplasia, sin aparente enfermedad congénita ni anomalía genética, en que más de un miembro de la familia ha desarrollado mielodisplasia o leucemia mielóide aguda. Hay reportes de hermanos con mielodisplasia y monosomía 7. En varios casos el desarrollo de la enfermedad ha sido asociada con la evolución de una anomalía citogenética en la médula ósea, a menudo monosomía 5 ó 7.

Leucemia mielomonocítica juvenil

La leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) es una rara anomalía clonal de las CPH que se manifiesta como una enfermedad mieloproliferativa en los niños y es probablemente un puente entre trastorno mieloproliferativo y mielodisplasia. Existe proliferación de la línea granulocítica y monocítica así como también anomalías de la serie eritroide y megacariocítica. Se le ha denominado también leucemia mielóide crónica juvenil, síndrome de monosomía 7 infantil, leucemia crónica juvenil y leucemia mielomonocítica crónica.

La incidencia de LMMJ es alrededor de 1.3 por 1.000.000 de niños menores de 15 años, constituye un 2% de las leucemias en el niño y un 20-25% de SMD pediátricos. El 75% de los casos se presenta en niños menores de 3 años

y en un 10% de los casos está asociado a neurofibromatosis tipo 1.

El hemograma y mielograma siempre muestra proliferación mielomonocítica. Hay infiltración hepática, esplénica, ganglionar, dérmica y del tracto respiratorio.

Una de las características más relevantes de la LMMJ es su habilidad para formar espontáneamente colonias de granulocito-macrófagos y su marcada sensibilidad al factor de crecimiento granulocito-macrófago (GM-CSF) confirma el diagnóstico. Existe hipergammaglobulinemia policlonal y puede confundirse con enfermedades infecciosas como Epstein-Barr, Citomegalovirus, Herpes 6 y Micoplasma.

Diagnóstico. De acuerdo a la recomendación actual se exigen los siguientes requisitos para el diagnóstico: Hallazgos clínicos sugerentes: Hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, palidez, fiebre y rash cutáneo; laboratorio: recuento de leucocitos $> 10.000/\mu\text{L}$, recuento de monocitos $> 1.000/\mu\text{L}$, presencia de precursores mieloides en sangre periférica, hemoglobina fetal aumentada para la edad ($> 10\%$); médula ósea: $< 20\%$ de blastos, cromosoma Filadelfia (-) y no existencia de rearrreglo bcr-abl; anormalidad clonal citogenética, incluida la monosomía 7 hipersensibilidad *in vitro* al GM-CSF de los progenitores mieloides. Se requieren todos los criterios de laboratorio y al menos 2 de los criterios medulares para hacer el diagnóstico. El pronóstico depende de la edad, de la profundidad de las citopenias encontradas, del número de blastos y de las alteraciones citogenéticas. En la actualidad el tratamiento de elección en la mayoría de los casos de mielodisplasia es el trasplante de médula ósea pero existen situaciones en que la quimioterapia y/o el tratamiento de sostén dan una mejor sobrevida a los pacientes. En el último tiempo ha habido una preocupación mayor para esta heterogénea enfermedad lo que ha llevado a un mejor registro, al aumento de casos reportados y a un mejor diagnóstico y manejo. Así se han llevado a cabo 2 simposios del grupo europeo de trabajo en SMD en la infancia (1997 y 2000), en los que diferentes grupos internacionales, con un alto volumen de pacientes, han reportado sus resultados. En un trabajo retrospectivo de Niemeyer y colaboradores, publicado en 1997 y en el que analiza 110 pacientes pediátricos con LMMC da una sobrevida de 39% a 5 años a los pacientes

sometidos a trasplante de médula ósea y de sólo un 6% para los no trasplantados. Los factores pronósticos fueron la edad, el recuento plaquetario y la hemoglobina fetal al diagnóstico. Passmore y colaboradores mostraron su experiencia en 1995 con 68 niños mielodisplásticos y la sobrevida global a 5 años fue de 31.9%. En su grupo encontró un 55% de alteraciones citogenéticas siendo la más común el compromiso del cromosoma 7 y como factores pronósticos adversos se destacó el recuento plaquetario ($< 33.000/\mu\text{L}$), la cifra de hemoglobina fetal ($> 15\%$) y las alteraciones citogenéticas complejas desarrollando un sistema de «score» para evolución pronóstica de sobrevida. En una publicación reciente de Luna-Fineman y colaboradores en San Francisco con 167 pacientes con SMD y trastornos mieloproliferativos, los niños fueron reclasificados de acuerdo a la recomendación actual: mielodisplasias, leucemia mielomonocítica juvenil y trastornos mieloproliferativos asociados. La sobrevida total fue de 25% a 16 años y la transformación a leucemia se observó en un 32% de los casos. Los hallazgos pronósticos favorables fueron la edad menor de 2 años y la hemoglobina fetal $< 10\%$. En nuestro país la experiencia publicada también es escasa y los casos fueron clasificados de acuerdo a FAB. Se ha observado una alta evolución a leucemia aguda y una sobrevida de 47% a 5 años haciendo la salvedad que eran sólo 17 pacientes y la mayoría correspondieron a anemia refractaria. En el grupo PINDA (Programa Infantil Nacional de Cáncer) ha habido preocupación constante por este tipo de pacientes y aunque el número es pequeño no existe un consenso sobre el diagnóstico, su clasificación y menos aún en el tratamiento. Actualmente se usa un protocolo de trabajo como una herramienta para intentar clasificar en forma adecuada a estos pacientes y sugerir un tratamiento acorde. El protocolo considera los cinco tipos de SMD de la clasificación FAB y se agrega el grupo de leucemia mielomonocítica juvenil. Recientemente la OMS ha propuesto para los SMD y mieloproliferativos infantiles usar el término citopenias refractarias cuando se cumplen al menos 2 de los siguientes criterios diagnósticos: síndrome citopenia mantenida inexplicada (anemia, neutropenia o trombocitopenia), mielodisplasia morfológica al menos bilineal, anormalidad citogenética clonal adquirida en células hematopoyéticas, blastos aumentados ($> 5\%$).

En la tabla 15-7 se enumeran las categorías diagnósticas de enfermedad mielodisplásica y mieloproliferativas en niños.

Tabla 15-7. Categorías diagnósticas de Enfermedad Mielodisplástica y Mieloproliferativa en niños

<p>Enfermedad mielodisplástica/mieloproliferativa Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) Leucemia mielomonocítica crónica secundaria (LMMC) Leucemia mieloide crónica BCR-ABL negativa (LMC cromosoma Filadelfia negativo)</p> <p>Síndrome de Down Trastorno mieloproliferativo transitorio Leucemia mieloide aguda en Down</p> <p>Síndrome mielodisplástico Citopenia refractaria (< 2% blastos en sangre y < 5% en médula ósea) Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) (2- 19% de blastos en sangre y 5 - 19% de blastos en médula ósea) Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-T) (20 - 29% de blastos en sangre o médula ósea)</p>

Los síndromes mielodisplásticos primarios de los niños se asocian con anomalías citogenéticas en un 50% de los casos y en un 90% en pacientes con mielodisplasia inducida por terapia.

En los niños con mielodisplasia hay una marcada predominancia de monosomía 7, pero también se observa esta anormalidad en niños con leucemia o mielodisplasia que ocurre en pacientes con desórdenes medulares congénitos. La delección del cromosoma 5 es raro en niños a diferencia de los adultos.

6. EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA DE MIELODISPLASIA

El diagnóstico de los SMD es de exclusión, por lo que es necesario descartar la existencia de grupo de entidades con características morfológicas similares antes de establecer el diagnóstico final, entre ellos podemos citar: anemia megaloblásticas, leucemias agudas, anemia aplásica, entre otras. Algunos investigadores han propuesto criterios mínimos para el diagnóstico.

Entre estos criterios propuestos destacan: presencia de megacariocitos multinucleados, mieloblastos agranulares o con presencia de

bastones de Auer, neutrófilos agranulares, diseritropoyesis, sideroblastos en anillo y alteraciones del cariotipo.

En el diagnóstico se debe incluir: historia clínica detallada, historia familiar de leucemia o alteraciones constitucionales congénitas. Antecedentes de terapia citotóxica o exposición a radiación. Examen físico: búsqueda de desórdenes congénitos (anemia de Fanconi, enfermedad de Shwachman, Neurofibromatosis, síndrome de Down, enfermedad de Kostmann, Noonan. Laboratorio: Hemograma, reticulocitos, volumen corpuscular, plaquetas, VHS; pruebas de coagulación, estudio de función hepática y renal, LDH, fosfatasas alcalinas leucocitarias. determinación de Inmunoglobulinas, test de HAM, hemoglobina fetal pretransfusión, serología para virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, Parvovirus, Herpes 6, Micoplasma, VIH, cultivo de linfocitos. Médula ósea: aspirado para morfología y tinción de hierro (hemosiderina), inmunofenotipo, citogenética, biopsia medular.

El índice pronóstico internacional (IPSS). Utiliza para determinar el “score”, el porcentaje de blastos en médula ósea el cariotipo y la citogenética (tabla 15-8).

Tabla 15-8. Índice de pronóstico internacional (IPSS)

	0	0.5	1	1.5	2
Blastos Médula Ósea (%)	<5	5 – 10		11 – 20	21 – 30
Cariotipo	bueno	intermedio	malo		
Citogenética	0/1	2/3			

El IPSS permite clasificar a los pacientes en grupos de riesgo (tabla 15-9).

Tabla 15-9. Clasificación de grupo de riesgo según IPSS

Grupo de riesgo	IPSS	Sobrevida a 2 años	Sobrevida a 5 años
Bajo	0	76%	55%
Intermedio 1	0.5 - 1	52%	22%
Intermedio 2	1.5 - 2	40%	10%
Alto	2.5 o +	30%	0%

IPSS, Índice pronóstico internacional

Una vez que se determina el grupo de riesgo del paciente y además se sabe su clasificación dentro de los SMD, se puede tomar una decisión para un mejor tratamiento.

7. TRATAMIENTO DE LOS SMD

Este es un grupo heterogéneo de enfermedades en que la conducta clínica varía y la aproximación terapéutica es a veces controversial. Es de mucha importancia tener bien caracterizado cada paciente para clasificarlo en la forma adecuada. El tratamiento óptimo no ha sido bien definido.

La heterogeneidad clínico biológica de los SMD y la diversidad de tratamientos disponibles con diferente intensidad y toxicidad, reflejan la ausencia de un tratamiento efectivo para la mayoría de los casos. Ello obliga a individualizar el tratamiento de estas enfermedades según la edad, estado general del paciente y la severidad del SMD. En cada caso, un diagnóstico preciso y la determinación del IPSS son esenciales para trazar un plan terapéutico.

7.1. Estrategias generales de tratamiento

Tratamiento de soporte

Muchos pacientes con SMD presentan citopenias leves y estables durante largo tiempo. Cuando las citopenias se agravan es necesario realizar transfusiones, ya sea de glóbulos rojos para la anemia y plaquetas para tratar trombocitopenias sintomáticas.

Cuando los requerimientos de transfusiones de glóbulos rojos son elevados, se requiere utilizar conjuntamente quelantes de hierro, con el fin de evitar la sobrecarga tisular.

También se debe administrar antibióticos, en caso de infecciones que son las más frecuentes en estos pacientes.

Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante de “stem cells” es la única alternativa terapéutica curativa disponible, pero esta estrategia asume un alto riesgo de mortalidad. Se recomienda trasplantar lo antes posible a todos los pacientes menores de 40 años, y a los mayores de edad cuando hay citopenias graves o exceso de blastos. Otros investigadores recomiendan que el trasplante se realice en forma precoz en los pacientes con SMD de alto riesgo, esperando que tengan una progresión a un SMD de menor riesgo.

Existen varias modalidades de trasplante de progenitores hematopoyéticos: TPH alogénico de donante relacionado, PH alogénico de donante no relacionado, TPH de sangre periférica, TPH autólogo y Mini trasplantes.

Quimioterapia

El empleo de la monoquimioterapia a bajas dosis es de dudosa eficacia, siendo probablemente el Melfalán y el Topotecan los fármacos más eficaces.

Factores de crecimiento hematopoyético

No eliminan los SMD, pero al aumentar los recuentos de las células sanguíneas pueden reducir la cantidad de transfusiones en algunos pacientes.

Hay distintos tipos de factores de crecimiento, que pueden usarse solos o en forma combinada. El potencial terapéutico de la Eritropoyetina (Epo) recombinante en el tratamiento de la anemia sintomática en los pacientes con SMD. En los últimos años se ha utilizado Epo combinándola con factores estimuladores de colonias de granulocitos (G-CSF) y granulocítica-macrofágica (GM-CSF) obteniéndose respuesta entre el 40 - 60%.

Actualmente se estudia la interleuquina 11 (IL-11), ya que parece ser útil para el mejoramiento de la trombocipenia de algunos pacientes, pero aún no se ha entregado datos certeros sobre su utilidad.

Terapia inmunosupresora

Se utilizan en pacientes jóvenes con SMD, que presentan una médula ósea hipoplásica (<15% de celularidad), que suelen presentar cariotipo normal y número de blastos normal en médula.

El tratamiento con Globulina Antitimocito (ATG) y Ciclosporina (Cy), ha demostrado una eficacia en estudios que el 34 y 47%, respectivamente, de los pacientes con SMD tratados, los cuales no requirieron más transfusiones, presentaron un decrecimiento de la progresión de la enfermedad y un aumento de la sobrevida.

Hoy en día, aunque se observan respuestas significativas, es importante tener presente los efectos secundarios que puede presentar el paciente, como fiebre, urticaria, anafilaxis que raramente se presenta pero es severa, en el caso de ATG y daños en el riñón, hipertensión arterial en el caso de la Cy. Por esta razón, en algunos pacientes se pone en duda su utilidad.

Inductores de diferenciación

En algunos casos, pueden inducir a la "stem cell" a un funcionamiento más eficiente, procediendo mayor número de células sanguíneas maduras.

La Citarabina en bajas dosis, cuyos efectos hasta hoy en día no se sabe si están ligados a inducción de diferenciación o a la toxicidad, ha sido ampliamente estudiada, con tasas de respuestas completa menores al 20%, sin beneficio clínico significativo y con efectos secundarios importante en la mitad de los pacientes.

Los derivados de la vitamina D₃, que *in vitro* tiene un claro efecto diferenciador, en la clínica no han proporcionado resultados significativos.

El Ácido transretinoico (ATRA) ha sido en utilizado en forma aislado como agente diferenciador, obteniéndose respuestas solo en un 10% de los pacientes.

El uso de ATRA asociado con otros agentes inductores de diferenciación celular podría ser beneficioso, ya que su respuesta se ve aumentada en un 20%.

Agentes desmetilizantes

Azacitidina (AZA) es un análogo de la pirimidina, que inhibe a la DNA metiltransferasa, que es la enzima responsable de la metilación del DNA dando como resultado DNA hipometilado produciendo cambios en la expansión de transcripción. El uso de AZA reduce el riesgo de transformación a leucemia, mejora la calidad de vida, pero no altera de manera significativa la sobrevida global del paciente. La Decitabina es otro agente hipometilizante con el que se ha obtenido un 50% de respuesta hematológica global.

Futuras estrategias que aún están en estudio pueden optimizar los tratamiento con estos agentes, combinándolos con G-CSF y Fluradabina; estudios preliminares muestran una respuesta hematológica del 64% en pacientes con anormalidades citogenéticas de riesgo favorable o intermedio.

Inhibidores de apoptosis

En los pacientes con SMD se ha descrito un aumento de la apoptosis, lo que origina una hematopoyesis ineficaz y citopenias periféricas. El incremento del fenómeno de apoptosis se ha relacionado con la activación intrínseca de los mecanismos de muerte celular o preferentemente inducido por ciertas citoquinas (como el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α)).

Estudios experimentales han demostrado que la Amifosfatina puede ser un inhibidor potencial de la actividad de las citoquinas. Además es un agente que tiene la capacidad de proteger tejidos finos normales, pero no protege a las células tumorales, por lo que podría utilizarse junto con quimioterapia, pero esto no se ha podido comprobar en un ciento por ciento.

Inhibidores de la angiogénesis

Recientemente se ha descrito un aumento en la angiogénesis en médula ósea como parte de los mecanismos que contribuyen a explicar la hematopoyesis ineficaz. Por este motivo se ha estudiado el uso de la Talidomida, dada su capacidad antiangiogénica *in vitro*.

Los resultados del tratamiento con la Talidomida han sido, en general, muy pobres, menores al 30%, y presentan una alta toxicidad. La mayor tasa de respuesta se obtiene en los pacientes con SMD de bajo riesgo.

7.2. Tratamiento de los SMD en pediatría

A continuación se indica una pauta de terapia para cada grupo de enfermos basada en la clasificación actual y la experiencia de grupos internacionales colaborativos.

Anemia refractaria. En este grupo de pacientes se tomará una conducta conservadora si el estudio citogenético es normal y no es dependiente de transfusiones. Se hará un tratamiento denominado multifactorial con: Vitamina C 100 mg día oral. Ácido fólico 1 mg día oral. Riboflavina 5 mg día oral (comprimido de 10 mg). Complejo vitamínico B₁, B₆, B₁₂ (Tol 12 suspensión) 10 ml día. Prednisona 5 mg día por medio oral. Si el paciente tiene un recuento plaquetario mayor de 50.000 se usará además: Vitamina B₆ (Piridoxina) 200 mg intramuscular (IM) bisemanal. Vitamina B₁₂ 100 ug IM semanal. Si el paciente es dependiente de transfusiones, presenta citogenética anormal o tiene un curso evolutivo agresivo o de progresión: Trasplante de médula ósea, alogénico, relacionado.

Anemia refractaria con sideroblastos en anillo

En pediatría esta patología es excepcional y es muy importante descartar una citopatía mitocondrial, entidad que presenta anemia sideroblástica, vacuolas en mieloblastos y eritroblastos inmaduros y estudio citogenético normal. Puede evolucionar por largos períodos con anemia como citopenia única, compromiso neurológico cortical progresivo, acidosis metabólica y compromiso multiorgánico. La citopatía mitocondrial no corresponde a un síndrome mielodisplásico. Si el paciente tiene una enfermedad estable se debe efectuar tratamiento multifactorial. En cambio, si el paciente tiene dependencia transfusional o presenta una anormalidad citogenética como una delección del brazo largo del cromosoma 5 (5q-) se debe intentar un trasplante de médula ósea.

Anemia refractaria con exceso de blastos y Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación.

Si el paciente tiene además un síndrome de Down se indica Quimioterapia de Leucemia mieloide aguda (LMA). Si el paciente tiene una cifra de blastos > 15 % en médula ósea y una alteración citogenética habitual de LMA (ej. t(8;21), t(15;17), inv(16): Efectuar quimioterapia de LMA. Si el paciente presenta una monosomía 7: trasplante de médula ósea. Intentar el

trasplante en forma precoz una vez hecho el diagnóstico por la peor evolución en estado evolutivo o en progresión.

Leucemia mielomonocítica juvenil

Si el paciente es menor de 2 años y enfermedad estable: Conducta expectante. Evaluar el uso de ácido retinoico 40 mg/m²/día oral. Uso de factor estimulante de colonias de granulocitos en neutropenia: 5 ug/kg/día. Si el paciente es > 2 años, tiene Hb fetal aumentada para la edad, alteración citogenética o monosomía 7 o dependencia transfusional debe efectuarse trasplante de médula ósea de donante familiar compatible. Si el paciente no tiene donante para el trasplante, considerar la quimioterapia de LMA.

LECTURAS SUGERIDAS

Aricó, M., Biondi, A., Pui, CH. "Juvenile myelomonocytic leukemia" *Blood*, 90:479-4884, 1997.

Bargay, J. "Trasplantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas en Síndromes Mielodisplásicos ¿Vamos avanzando?". *Hematología* (edición especial). 87(6): 394 – 398, 2003.

Cazzola, M. "Alternatives to Conventional or Myeloblastic chemotherapy in Myelodysplastic Syndrome". *International Journal of Hematology*. 72(2): 134 – 138, 2000.

Fernández, N., Hernández, C., Hernández, P. "Tratamiento de los Síndromes Mielodisplásicos con Ácido retinoico asociado con otros agentes inductores de la maduración celular". *Revista Cubana hematología inmunología hemoterapia*. 12(1): 125 – 129, 1997.

Fernández, N., Hernández, P. "Síndromes Mielodisplásicos, Biología y Clínica". *Revista Cubana hematología inmunología hemoterapia*. 16(1): 5 – 20, 2000.

Fernández, N. "Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los Síndromes Mielodisplásicos". *Hematología* (edición especial). 87(6): 18 – 20, 2002.

Fundación Internacional de A. Aplásica y SMD. Síndromes Mielodisplásicos. 2000. Disponible en www.aplastic.org/docs/SíndromeMielodisplásicos.docs. Consultado en marzo de 2004.

- Hasle, H., Niemeyer, C.M., Chessells, J., Baumann, I., Bennett, J., Kerndrup, G., Head, D. "A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases". *Leukemia*, 17:277-282, 2003.
- Hernández, A., Villaescusa, R., Santos, R. "Niveles de Inmunoglobulinas en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos". *Revista Cubana hematología inmunología hemoterapia*. 12(1): 135 –139, 1997.
- Kardos, G., Baumann, S., Passmore, J. et al. "Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7". *Blood* 2003; 102: 1997-2003.
- Kovides, P., Bennett, J. "Morphology and classification of the Myelodysplastic Syndromes and their pathologic variants". *Anal of Oncology*. 11(4): 275 – 280, 2000.
- Luna-Finemann, S., Shannon, K., Atwater, S. et al. "Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: A study of 167 patients". *Blood*; 93:459-4665, 1999.
- López, M., Baro, J; Richard, C. Alternativas terapéuticas no curativas en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos. *Hematología* (edición especial). 87(6): 398 – 403, 2003.
- Myelodysplastic Syndromes. The American Society of Hematology. Disponible en www.asheducationbook.org/cgi/content/full/2003. Consultado en marzo de 2004.
- Molldrem, J; Leifler, E., Bahceci, E. "Globina antimonocito en tratamiento de Síndromes Mielodisplásicos". *The American Society of hematology*. 137(3): 156 – 163, 2002.
- Niemeyer, C.M., Aricó, M., Baro, G. et al. "Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: A retrospective analysis of 110 cases". *Blood*, 89: 3534-35433, 1997.
- Orfao, A., Santiago, M., Martarraz, S. "Contribución del Inmunofenotipo al estudio de los Síndromes Mielodisplásicos". *Hematología* (edición especial). 87(6): 269 – 274, 2003.
- Ortega, J. "Síndromes Mielodisplásicos en niños. Clasificación y Tratamiento". *Hematología* (edición especial). 87(1): 100 – 108, 2002.
- Passmore, S.J., Hann, I.M., Stiller, C.A. et al. "Pediatric myelodysplasia: A study of 68 children and a new prognosis scoring system". *Blood*; 85: 1742-17502, 1995.
- Pinkel, D. "Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from infectious disease Letter". *Blood*, 91:365-3677, 1998.
- Sanz, G., Sanz, M. "Pronostic factors in Myelodysplastic Syndromes". *Journal of Clinical Oncology*. 19(9): 2215 – 2217, 2002.
- Sanz, G. "Valor del Índice Pronóstico Internacional (IPSS) en los Síndromes Mielodisplásicos". *Hematología* (edición especial). 87(6): 280 – 284, 2003.
- Sauntharajah, Y., Rivera, M. "Randomized controlled os Azacitidine in patients with the Myelodysplastic Síndromes. A study of the Cancer and leukemia grup B". *Journal of Clinical oncology*. 20 (10): 2415 – 2416, 2002.
- Solé, F. "Asociaciones morfológico citogenéticas en los síndromes mielodisplásicos". *Hematología* (edición especial). 87(6) 275 – 280, 2003.
- Sonneved, P., Hagemejer, A., Nooter, K. "High expression of the multidrug resistance P-glycoprotein in high risk Myelodysplastic is associated with immature phenotype". *Leukemia*. 7(1): 963-969, 1998.
- Tordecilla, J., Bravo, M., Campbell, M. et al "Síndrome mielodisplástico en pediatría: Experiencia clínica". *Rev Chil Pediatr*; 70:376-3836, 1999.
- Vallespi, T., Sanz, F., Blanco, A. "Reflexiones acerca de las diversas clasificaciones de los Síndromes Mielodisplásicos". *Hematología* (edición especial). 87(6): 266 – 269, 2003.
- Wang, E., Wu, K., Chin, A. "Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerasa template antagonist *in vitro* and *in vivo* studies in Múltiple Myeloma and Lymphoma". *Blood*. 103(1): 258 – 266, 2004.

GENERALIDADES SOBRE TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Julia Palma B. y Oscar González R.

- 1. Introducción**
- 2. Fundamento y objetivos del TPH**
- 3. Tipos de TPH**
 - 3.1. TPH alogénico
 - 3.2. TPH autólogo
- 4. Fuente de precursores hematopoyéticos**
 - 4.1. Progenitores obtenidos de la médula ósea
 - 4.2. Progenitores obtenidos de la sangre periférica
 - 4.3. Progenitores obtenidos de la sangre de cordón
- 5. Etapas del TPH**
 - 5.1. Planificación
 - 5.2. Preparación
 - 5.3. Acondicionamiento
 - 5.4. Trasplante
 - 5.5. Implante
 - 5.6. Recuperación a corto plazo
 - 5.7. Recuperación a largo plazo
- 6. Indicaciones del TPH**

RESUMEN

El aumento progresivo del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) como tratamiento de enfermedades hematológicas, oncológicas y hereditarias es la culminación de más de cuatro décadas de investigación. Estudios efectuados en modelos animales tuvieron gran importancia para entender las bases biológicas de la inmunología de los trasplantes. Así pudo definirse la genética del Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC, HLA). El concepto de proteger con injertos compatibles de médula ósea (MO) después del uso de quimiorradioterapia fue luego aplicado al tratamiento de humanos con enfermedades malignas del sistema hematopoyético. Las drogas inmunosupresoras se desarrollaron con el fin de disminuir la severidad de la reacción inmunológica entre el injerto y el huésped. En los últimos 35 años ha habido un crecimiento exponencial del TPH, realizándose inicialmente entre hermanos HLA idénticos y desarrollándose posteriormente los de donante familiar no idéntico y donantes alternativos no emparentados. La morbilidad y la mortalidad asociada han disminuido notablemente en las últimas décadas debido al uso de regímenes de acondicionamiento menos tóxicos, cambio en las pautas de inmunosupresión y mejoría en los tratamientos de soporte.

El objetivo principal del TPH es curar enfermedades que serían fatales sin este tratamiento. Después de utilizar altas dosis de quimioterapia, radiación o ambas, la mielopoyesis es insuficiente y se restaura por medio del TPH ("stem cells" o células madre), que son capaces de reproducir todas las líneas celulares hematopoyéticas. Actualmente las fuentes de obtención de progenitores hematopoyéticos son la MO, la sangre periférica y el cordón umbilical.

Existen tres tipos de TPH: autólogo, alogénico y singénico. En el trasplante autólogo, se utilizan las propias células del paciente previamente extraídas de la MO o recolectadas de su torrente circulatorio mediante separación celular por aféresis. En el trasplante alogénico las células progenitoras se pueden obtener de MO, sangre periférica o sangre de cordón umbilical del donante. Se selecciona al donante que tenga la mayor histocompatibilidad con el receptor. Si no existe donante familiar adecuado, se inicia una búsqueda a través de registros internacionales autorizados de MO y cordón umbilical.

1. INTRODUCCIÓN

La reconstitución hematopoyética parcial o total posterior a la aplicación de células progenitoras madre provenientes de la MO, movilizadas en la sangre periférica (SP) u obtenidas de la sangre del cordón umbilical (SCU) es una modalidad terapéutica conocida en la actualidad como TPH.

El aumento progresivo del TPH como tratamiento de enfermedades hematológicas, oncológicas y hereditarias es la culminación de más de cuatro décadas de investigación. Los intentos iniciales en los años 50 de trasplantar células vivas de un individuo a otro fueron observados con gran escepticismo, considerándose que la barrera inmunológica frente a tejidos ajenos no podría ser sobrepasada.

El primer TPH en un modelo animal se comunicó en 1939. Las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki en 1945 mostraron por primera vez el efecto letal de la radiación.

Posteriormente, se descubrió que la muerte podía evitarse en los roedores al ser sometidos a irradiación en dosis letales, si se protegía el bazo o si, posteriormente, se reinfundía médula ósea autóloga. Estas observaciones hicieron pensar, por primera vez, que los pacientes con leucemia podrían ser irradiados con el objetivo de destruir las células malignas de la médula ósea. Si bien la teoría era correcta, inicialmente el procedimiento se limitó a pacientes de muy alto riesgo, sin otra posibilidad de tratamiento curativo. Los primeros resultados clínicos fueron muy desilusionantes. Sólo sobrevivieron aquellos enfermos trasplantados de un gemelo idéntico. En estas primeras etapas se conocía muy poco sobre inmunología clínica y muchos investigadores se desalentaron y abandonaron los estudios.

No fue hasta la década de los 60, fecha en que se describe el Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC, HLA en humanos), cuando se da inicio a los TPH en pacientes adultos con patologías oncológicas. El primer

trasplante exitoso en un paciente pediátrico con un síndrome de inmunodeficiencia severa combinada se comunicó en 1968. En los años posteriores se introdujeron nuevos métodos de inmunoterapia, quimioterapia en altas dosis y diagnóstico de enfermedad residual. A partir de 1985, el desarrollo de esta rama de la hemato-oncología ha escalado peldaños importantes. De esta forma en la actualidad el TPH representa una modalidad terapéutica primaria y curativa para patologías que no tendrían otra opción terapéutica.

En los últimos 35 años ha habido un crecimiento exponencial del TPH, realizándose inicialmente entre hermanos HLA idénticos y desarrollándose, posteriormente, los de donante familiar no idéntico y donantes alternativos no emparentados.

2. FUNDAMENTO Y OBJETIVOS DEL TPH

Los objetivos primordiales en los pacientes sometidos a un TPH pueden ser : (a) sustituir el sistema hematopoyético del paciente en forma total o parcial por uno sano, esto debido a estar total o parcialmente defectuoso, insuficiente o con compromiso neoplásico y (b) permitir un tratamiento antineoplásico en dosis muy elevadas, las que normalmente originarían mielosupresión prolongada o definitiva, seguidas de un rescate celular con progenitores hematopoyéticos (PH) autólogos. Este tipo de trasplante se fundamenta en la necesidad de aplicar quimioterapia en dosis muy altas (mieloablativas) para lograr el control de la enfermedad oncológica de base. Solo se plantea realizar este tipo de TPH si la enfermedad de base se encuentra controlada y en remisión completa (RC) morfológica, molecular o por imágenes. Se podría resumir que los principales objetivos de los TPH son:

- Sustituir MO enferma alterada en forma parcial o total, por una sana y funcional (para patologías como la anemia aplásica severa, anemia drepanocítica o de células falciformes, las talasemias mayores, etc.).
- Sustituir la MO y restaurar su función normal después de que se hayan administrado altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia para tratar una neoplasia que no pudo erradicarse con otras modalidades terapéuticas. En este rubro se encuentran la mayoría de los trasplantes de tipo autólogo.
- Sustituir la MO por una funcional y sana genéticamente para prevenir o restaurar el daño como consecuencia de una enfermedad genética (tal como el síndrome

de Hurler y la adrenoleucodistrofia).

- Sustituir la MO que ha sido infiltrada por células neoplásicas por una sana y funcional (para las leucemias agudas y crónicas, síndromes mielodisplásicos, etc.)

3. TIPOS DE TPH

En la actualidad, existen distintos tipos de TPH, los que pueden ser realizados de diversas formas y el nombre que reciben está determinado por lo general del origen de los PH a transplantar. De esta forma el TPH puede ser **autólogo** cuando los PH se obtienen del mismo paciente, o de tipo **allogénico**, cuando los PH provienen de un donante, ya sea familiar o no emparentado.

3.1. TPH allogénico

Existen diferentes tipos de TPH allogénicos dependiendo básicamente del origen de los PH y parentesco entre el donante y el receptor, además del grado de histocompatibilidad HLA entre ambos. De esta forma los TPH allogénicos pueden a su vez dividirse en:

- **Singénicos**, cuando los PH son obtenidos de un gemelo univitelino idéntico (hermano homocigoto); en este caso comparten el mismo HLA.
- **Allogénico familiar**, cuando los PH han sido obtenidos de un donante familiar, generalmente hermano. Estos, a su vez, pueden ser de un familiar idéntico (comparten el mismo sistema HLA) o parcialmente compatible si existe una diferencia inmunológica mínima en el sistema HLA (*mismatch* menor).
- **Allogénico de donante no emparentado**, cuando los PH han sido obtenidos de un donante no familiar (banco de PH de MO o SCU). Al igual que el primer grupo, estos pueden dividirse en HLA idénticos o no HLA idénticos.
- **Haploidénticos**, cuando el donante es un familiar que comparte la mitad de los genes HLA con el receptor; generalmente uno de los padres del paciente.

3.2. TPH autólogo

En los trasplantes de tipo autólogo el paciente recibe sus propios PH previamente recolectados y criopreservados. El trasplante autólogo se ha utilizado primordialmente en el tratamiento de tumores sólidos o para aquellos pacientes con una hemopatía maligna en los que no se haya encontrado un donante compatible.

4. FUENTE DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS

Los PH pueden ser obtenidos de diferentes fuentes: MO, SP y SCU. Inicialmente los TPH fueron llamados “trasplantes de médula ósea”, debido primordialmente a que la MO era la fuente clásica donde se obtenían los PH. Con el uso de otras fuentes de PH, actualmente el término utilizado es el de TPH.

4.1. Progenitores obtenidos de la médula ósea

Los progenitores de la MO se obtienen bajo anestesia general por medio de aspiración directa del hueso por múltiples punciones en la cresta iliaca y menos frecuentemente en esternón y en tibias. Las punciones se realizan con agujas tipo Janshidi, en pequeños volúmenes que no deben sobrepasar los 4 ml para evitar la contaminación con sangre periférica. La MO es recolectada en una bolsa especial con anticoagulante para luego ser filtrada. La cantidad de MO o de PH a recolectar variará considerablemente con el peso de cada paciente. En términos generales se recomienda por lo menos $3 \text{ a } 5 \times 10^8$ células totales/kg de peso del receptor para garantizar el implante del injerto. Posteriormente, la MO puede ser infundida al receptor, o bien ser llevada al laboratorio para distintos procesamientos si es necesario, a modo de ejemplo: purga de células tumorales en caso de TPH autólogo, leucorreducción, criopreservación, etc.

4.2. Progenitores obtenidos de la sangre periférica

Obtención de PH por medio de una aféresis, previa movilización de los PH a la sangre periférica con factores estimulantes de las colonias, quimioterapia, o ambos. Los PH obtenidos por aféresis de la sangre periférica han ido substituyendo a la MO paulatinamente sobre todo para los trasplantes autólogos, trasplantes alogénicos en adultos y actualmente en número creciente en trasplantes pediátricos.

La movilización de progenitores dependerá, primordialmente, del tipo de paciente y su patología. Existen varios protocolos para movilizar, uno de los más recomendados es el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) en $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ subcutáneo cada 12 horas por tres a cinco días consecutivos dependiendo de la cifra de leucocitos en el hemograma. La leucoféresis puede hacerse en una a cinco

sesiones, dependiendo del número de células planeadas a trasplantar. La preferencia actual de utilizar PH de tipo periférico en comparación con los PH provenientes de la MO se basa, fundamentalmente en tres ventajas: (a) su rápida reconstitución hematológica, (b) la facilidad de obtención y (c) la seguridad del procedimiento. Otra ventaja que ha sido atribuida a los PH obtenidos por aféresis es que probablemente puedan estar libres de contaminación tumoral. Sin embargo, esta aseveración es muy controvertida ya que algunos otros autores han encontrado importante contaminación tumoral en las cosechas celulares posteriores a las aféresis.

4.3. Progenitores obtenidos de la sangre de cordón

La presencia de PH en la SCU se demostró por primera vez en 1974; diez años más tarde se demostró además que estos PH se diferenciaban de los que se encuentran en la MO por su estado de madurez, siendo los PH de la SCU células más primitivas. La SCU representa la porción de sangre fetal circulante que permanece en la placenta y en el cordón umbilical posterior al parto. A pesar del pequeño volumen en que estas células circulan, la concentración sanguínea de PH en la SCU es suficiente como para permitir la reconstitución hematopoyética por medio de un trasplante de PH en los humanos. La mayoría de los trasplantes se han realizado en la población pediátrica.

La técnica de recolección es fácil de realizar. Una vez que el recién nacido nace, el cordón umbilical se pinza precozmente (menos de 35 segundos) a 5 cm de la cicatriz umbilical con dos pinzas y a continuación se corta el cordón. La sangre se obtiene durante el alumbramiento o inmediatamente posterior al mismo por venopunción y drenaje por gravedad, recolectándose en una bolsa estéril con anticoagulante. Posteriormente la bolsa es enviada al banco de sangre donde se lleva a cabo los controles de calidad y la criopreservación de los progenitores. Comparado con los PH de la médula ósea, los PH obtenidos de la SCU tienen un potencial importante de diferenciación al ser éstos más inmaduros, además, la barrera de disparidad en los antígenos de HLA, importantes para la aceptación del injerto, puede tener cierto grado de disparidad entre el donante y el huésped. Una de las principales desventajas la SCU es el escaso número de PH, sobre todo cuando el peso del paciente a trasplantar sobrepasa los

20 kilos. En la actualidad existen protocolos de investigación que tratan de expandir estos PH sin que exista diferenciación celular, con el principal objetivo de utilizarlos para pacientes pediátricos de mayor peso o incluso en pacientes adultos. En la actualidad existen protocolos experimentales que no solo expanden estos progenitores de SCU, también plantean la posibilidad de combinar dos o más unidades de SCU, esto en pacientes adultos.

5. ETAPAS DEL TPH

En la preparación de un trasplante, se reconocen las siguientes etapas: Planificación, preparación, acondicionamiento, trasplante, espera del implante, recuperación después del implante (a corto plazo) y recuperación a largo plazo. A continuación se describen dichas etapas:

5.1. Planificación

Período de gran actividad en el cual se organizan todos los asuntos sociofamiliares para efectos de la estadía en la unidad de trasplante. Generalmente hay enfermos que deben viajar largas distancias hasta el lugar del centro de trasplante. En este período se realiza el estudio de HLA (tipaje HLA), se estudia los fenotipos HLA del paciente y sus familiares más cercanos (padres y hermanos) para establecer quien es el mejor donante posible (“*HLA matching*” de donante y receptor).

Hermanos HLA idénticos son los mejores candidatos para ser elegidos como donantes, pero sólo 30-35% de los pacientes en Estados Unidos y Europa tienen donantes potenciales dentro del grupo familiar próximo; en nuestra experiencia pediátrica el 40% de los pacientes tiene un donante de este tipo. En los últimos 10 años se ha podido establecer que donantes voluntarios de médula ósea tienen combinaciones fenotípicas HLA-idénticas al receptor, aunque no emparentados directamente, también son buenos candidatos para ser elegidos como donantes. Los donantes no emparentados se inscriben, voluntariamente, en bancos internacionales de médula ósea y están dispuestos a donar tejido hematopoyético cuando sea necesario. Esta labor, altamente altruista, es de gran valor para el funcionamiento de los bancos de médula.

El NMDP (Programa Americano de Donantes de Médula Ósea, “National Marrow Donor Program”) se estableció en 1986 y está actualmente unido a más de 100 instituciones

internacionales autorizadas para realizar trasplantes no relacionados de médula ósea y sangre de cordón umbilical (“International Bone Marrow Transplant Registry”, IBMTR). Actualmente se cuenta con cerca de 5.000.000 de donantes de diversas nacionalidades y grupos étnicos. El centro trasplantador al que acude el paciente solicita al NMDP/IBMTR buscar un donante idóneo para el enfermo. La búsqueda se inicia en el archivo general; al identificarse un donante potencial se contacta con el centro correspondiente para evaluar médicamente al donante y efectuar estudios de histocompatibilidad de alta resolución. Luego se extrae la médula ósea al donante y se envía al centro donde se encuentra el paciente recibiendo el acondicionamiento previo al trasplante. Al día siguiente, se infunde la médula ósea.

Cuando la fuente de progenitores es la sangre de cordón umbilical, se reserva la unidad de sangre de cordón umbilical criopreservada en un banco de donantes y se formaliza una fecha para recepcionar la unidad en el centro trasplantador previo al inicio del acondicionamiento. Cuando la unidad se encuentra en el centro que realizará el trasplante se inicia la etapa siguiente.

Los registros de donantes de gran volumen han proporcionado médulas compatibles a un número creciente de pacientes. Los avances tecnológicos en inmunohistocompatibilidad han aumentado considerablemente la sensibilidad de los métodos de estudio en humanos, llegando a requerirse centros dedicados solo a este aspecto del trasplante.

En esta etapa de planificación se incluye además una evaluación nutricional y un examen dental completo con tratamiento de las piezas comprometidas con el objetivo de obtener la mejor condición clínica del paciente al momento de efectuarse el trasplante. También es fundamental contar con el consentimiento informado de la familia, discutiéndose previamente con ellos los procedimientos a efectuar y los posibles efectos colaterales a corto y largo plazo. La duración aproximada de esta etapa de planificación es de un mes.

5.2. Preparación

Este período incluye una evaluación médica completa y orientación al paciente y su familia mediante clases teóricas y por medio de manuales. En este período es también

fundamental la educación impartida por el personal de enfermería. En el caso del paciente pediátrico es muy importante la comunicación con la familia para hacerles partícipes de los cuidados del niño. Durante la preparación del trasplante se debe instalar un catéter venoso central, preferentemente de doble o triple lumen debido a la gran cantidad de medicación por vía intravenosa que requieren estos pacientes (antibióticos, transfusiones, nutrición). La duración de esta etapa es de aproximadamente 2-3 semanas.

5.3. Acondicionamiento

Tradicionalmente, se ha descrito que esta etapa tiene tres objetivos, a saber: (a) lograr el control de la potencial enfermedad residual con dosis altas de quimio radioterapia, (b) “crear espacio” para que se alojen los progenitores infundidos y (c) lograr una adecuada inmunosupresión que impida el rechazo de las nuevas células infundidas. Este período consiste en la administración de quimioterapia y/o radioterapia en altas dosis, con el objeto de destruir la mayor cantidad posible de células tumorales, previamente no destruidas con dosis convencionales en el caso de enfermedades malignas, de crear espacio para el implante del nuevo injerto y también de inmunosuprimir al paciente para evitar el rechazo de los progenitores infundidos. La duración es variable y es generalmente de 6 a 8 días. El régimen de condicionamiento ideal es el que elimina, en su totalidad, las células malignas del huésped, tiene baja morbilidad y mortalidad, y permite suficiente inmunosupresión para evitar las alteraciones inmunológicas que se presentan debido a la inoculación de células inmunológicamente activas y por lo tanto capaces de montar una respuesta inmune en un donante que tiene un sistema inmune con igual capacidad de rechazo inmunológico y enfermedad injerto contra huésped (GVHD, “Graft versus Host Disease”). En la actualidad, no existe un solo régimen de condicionamiento perfecto, ya que las recaídas postrasplantes continúan ocurriendo y la toxicidad asociada al procedimiento sigue siendo importante a pesar de una larga experiencia de más de 30 años. La radioterapia corporal total, sobre todo en un niño en pleno crecimiento y desarrollo, puede producir un gran número de complicaciones tardías, como por ejemplo: enfermedad crónica pulmonar, leucoencefalopatías, cataratas, segunda malignidad, hormonopatías y trastornos de la fertilidad. Estas complicaciones, también se ven en el adulto trasplantado. En el

futuro, idealmente se podría eliminar la radioterapia corporal total si existieran combinaciones sinérgicas de drogas igualmente efectivas que la combinación con radioterapia. Actualmente, existen nuevos esquemas de acondicionamiento de baja intensidad para realizar los denominados “mini trasplantes”. En éstos, se usa quimioterapia de menor intensidad seguido de infusión de precursores hematopoyéticos y una potente inmunosupresión que permita el implante de las células infundidas y el control tumoral. El objetivo es poder realizar trasplantes en pacientes en los cuales los regímenes mieloablativos convencionales causarían una muy alta morbimortalidad peritrasplante. Se aplicó preferentemente en adultos, pero en la actualidad se encuentra también en uso en pediatría en pacientes de muy alto riesgo (pacientes con alto riesgo de muerte por toxicidad acumulada), constituyendo un área de gran interés de investigación clínica.

5.4. Trasplante

La médula ósea, sangre periférica movilizada o sangre de cordón umbilical se infunde después de completar el acondicionamiento. Las células son administradas por una vena a través de un catéter venoso central. Duración: desde 20 minutos (PH de SCU o haploidénticos), 1 a 2 horas (PH de SP) y hasta 6 a 8 horas (PH de MO). En el TPH con PH criopreservados es necesaria la descongelación rápida en un baño termorregulado a 37°C.

5.5. Implante

El éxito de los TPH depende de la posibilidad de colonizar la médula del receptor con PH del donante. Después de un trasplante exitoso el receptor se transforma en quimera inmunológica al producir células hematopoyéticas de otro individuo genéticamente distinto a pesar de su compatibilidad. El implante demora entre 10 a 28 días después del trasplante. Para evaluar el proceso se efectúan exámenes hematológicos diarios. La primera señal que el TPH fue exitoso es el aumento del recuento de glóbulos blancos, seguido de glóbulos rojos y plaquetas. Durante este período hay que estar atentos a las complicaciones infecciosas, principalmente por patógenos bacterianos, hongos y virus.

La morbilidad y la mortalidad asociada al proceso del TPH han disminuido notablemente en las últimas décadas debido al uso de regímenes de acondicionamiento menos

tóxicos, cambio en las pautas de inmunosupresión y mejoría en los tratamientos de soporte. Sin embargo, el riesgo de mortalidad relacionada al trasplante, que se produce en los primeros 100 días no causada por recaída de la enfermedad de base, sigue existiendo, siendo el factor de riesgo más importante la enfermedad injerto contra huésped (GVHD aguda) y en segundo lugar las infecciones.

La GVHD se define como la resultante del reconocimiento como extraños de antígenos del receptor por parte de los linfocitos T del donante. Para que ocurra dicha complicación deben cumplirse las siguientes condiciones: (a) el implante debe contener células inmunocompetentes, (b) el receptor debe tener aloantígenos que difieran de los del donante o reconocer autoantígenos en forma inadecuada y (c) el receptor debe ser incapaz de producir respuesta inmune contra el injerto. La GVHD aguda es aquella que se produce durante los primeros 100 días posterior al trasplante, iniciándose habitualmente la segunda semana, tiene una incidencia variable de un 5-80% y afecta clásicamente 3 órganos diana (blanco): piel, hígado e intestino.

Se reconocen variados factores de riesgo de infecciones en el TPH destacando: la enfermedad de base, el tipo de trasplante, el acondicionamiento utilizado, la duración de la neutropenia, la ruptura de barrera mucocutánea, la GVHD y su tratamiento como también el grado de inmunodeficiencia en los distintos períodos del trasplante. Existen además numerosos cambios ocurridos en el tiempo que inciden en el desarrollo de los distintos cuadros infecciosos, éstos son: nuevos agentes oportunistas emergentes, cambios en la susceptibilidad a los agentes infecciosos, nuevos regímenes de acondicionamiento, donantes alternativos y distintos grados de inmunodeficiencia.

Actualmente no es posible describir las infecciones asociadas al TPH sin tomar en cuenta el compromiso inmune del huésped. Es por esto que se reconocen diferentes fases en los receptores de TPH, las que se asocian a infecciones por diferentes patógenos oportunistas. Estas fases son tres: Pre implante (0 – 30 días), Post implante (30 – 100 días) y Post trasplante tardía (> 100 días).

Fase 1. El defecto del huésped en este período es fundamentalmente la neutropenia asociada

a catéter venoso central (CVC) y ruptura de barreras. Se ha descrito en las distintas series desde un 80 a 100% de fiebre asociada a neutropenia en pacientes pediátricos sometidos a TPH alogénico y autólogo. La explicación de este hecho está dada en gran parte por los regímenes de acondicionamiento mieloablativos utilizados, la aplasia medular severa secundaria, y la disrupción de barreras naturales. En los pacientes que desarrollan neutropenia y fiebre se ha observado que un 30 a 50% presenta fiebre de origen desconocido, un 25 a 50% bacteremia sin foco y un 15 a 20% infecciones localizadas asociadas o no a infecciones del CVC. Los agentes bacterianos identificados con mayor frecuencia como causantes de infecciones severas en estos pacientes son en un 70% Gram (+) y en un 25% Gram (-). Según investigaciones publicadas existiría un mayor porcentaje de bacteremia con mayor mortalidad en el TPH alogénico respecto del autólogo que se relacionaría con un mayor tiempo de neutropenia, uso de acondicionamiento más mieloablativo e inmunosupresor y la existencia de diferencias inmunológicas de histocompatibilidad entre donante y receptor.

Fase 2. En esta fase de post-implante la alteración inmune del huésped es el resultado de la nueva ontogenia, GVHD y tratamiento inmunosupresor derivado de su tratamiento y tipo de trasplante. En este periodo aumenta la prevalencia de infecciones fúngicas por *Candida* spp, *Aspergillus* spp y *P. carinii* como también virus, especialmente citomegalovirus (CMV), por lo que es fundamental realizar una vigilancia activa con detección precoz de infección a través de reacción de polimerasa en cadena o antígenemia para CMV.

Fase 3. En la última fase el huésped puede presentar inmunodeficiencia 2ª a GVHD crónico con supresión celular específica, disminución de función retículo-endotelial y déficit de subclases IgG, todo lo cual lo hace susceptible a presentar infecciones por patógenos bacterianos capsulados, *Candida* spp y Virus Varicela Zoster.

Es importante destacar que en el TPH los cuadros de diagnóstico diferencial de lesiones cutáneas, neumonitis post-TPH, hepatitis, cistitis hemorrágica y otros incluyen habitualmente variados patógenos microbianos, causas inmunológicas como también derivadas de la quimioterapia y/o radioterapia.

Frente al TPH se deben aplicar medidas pasivas

(aislamiento del paciente, lavado de manos, filtro HEPA presión positiva, uso de mascarilla y uso de flujo laminar en algunos centros), aceptándose internacionalmente que lo más importante es el lavado de manos y el uso de presión positiva. Asimismo, las medidas activas que se puede adoptar incluyen: descontaminación intestinal, profilaxis antibiótica, profilaxis antifúngica y profilaxis antiviral.

5.6. Recuperación a corto plazo

Durante este período se espera el desarrollo y maduración del sistema inmunitario y se debe tratar cualquier complicación que pueda surgir. Por otra parte, es el momento en el cual aparece la GVHD crónica pudiendo requerirse de medicación específica para su tratamiento. La duración de este período es de unos 365 días.

5.7. Recuperación a largo plazo

Es importante evaluar en este período las complicaciones tardías, las que incluyen: GVHD crónica, trastornos de crecimiento y desarrollo, cardiopatías secundarias a quimioterapia, bronquiolitis obliterante, alteraciones de la fecundidad, etc. Este período se inicia a contar de los 100 días.

La reconstitución de la hematopoyesis y de la inmunidad innata se objetiva mediante el implante periférico, lo cual ocurre habitualmente dentro del primer mes postrasplante. Sin embargo, la reconstitución del sistema inmune específico celular y humoral es más prolongado, difícil de evaluar y dependiente de numerosas variables como tipo de trasplante, presencia de GVHD y tratamiento inmunosupresor. Este proceso de inmunorreconstitución dura como mínimo 12 meses, lográndose en la mayoría de los casos a los 24 meses. Durante los primeros 6 meses del TPH se observa habitualmente un número disminuido de células CD4+, con células NK y células CD8+ normales o aumentadas y deficiente respuesta proliferativa. Estas alteraciones son más frecuentes en el TPH alogénico que en el autólogo y evidentemente más prolongadas si el TPH fue depletado de células T. Las células CD20+ suelen estar disminuidas durante 2 a 6 meses después del TPH. Las inmunoglobulinas empiezan a aumentar 3-4 semanas después del TPH, siendo la IgE la primera en ascender. La producción de IgG e IgA es habitualmente deficitaria hasta 6 a 18 meses después del TPH si el paciente ha sido

sometido a un TPH con depleción de linfocitos T o si presenta GVHD crónica.

El paciente trasplantado debe llegar, a largo plazo, llevar una vida normal, idealmente inmunorreconstituido y de un punto de vista infeccioso, vacunado contra los patógenos habituales.

6. INDICACIONES DEL TPH

Actualmente se efectúa un gran número de trasplantes en el mundo, considerándose muy importante para el resultado final realizar el trasplante de manera precoz (en el caso de un paciente con leucemia, aquel con buen estado clínico general y baja masa tumoral), lo que en términos oncológicos se denomina remisión completa (RC). El trasplante es considerado como terapia de elección en algunos tipos específicos de leucemia (leucemia mieloide crónica) o insuficiencias medulares (anemias aplásticas severas y Anemia de Fanconi, etc.). Consiste también en el único tratamiento curativo en inmunodeficiencias combinadas severas y otras inmunodeficiencias primarias como síndrome de Wiskott Aldrich y Chediak Higashi. En otras patologías, como anemia de células falciforme o talasemias, el rol es de carácter curativo sólo en las formas más severas. En las tablas 16-1 y 16-2 se resumen en forma muy general, las indicaciones de TPH en este momento, para ambos pacientes portadores de enfermedades congénitas y adquiridas, respectivamente.

En adultos y niños la principal indicación de TPH es la patología oncológica. Los criterios generales para indicar un trasplante en ambos grupos de pacientes son: (a) bajas tasas de curación con quimioterapia (QT) no mieloablativa, (b) la mortalidad esperada con el trasplante no debe ser mayor que la con QT o probabilidad de recaída y (c) los trasplantes de hermanos compatibles son la mejor opción. No obstante, es importante recalcar que las indicaciones en niños son mucho mayores que en los adultos, así como también la sobrevida esperada en los distintos tipos de TPH.

En niños, el 80% de las indicaciones de TPH son enfermedades oncológicas de muy alto riesgo y está recomendado realizarlo en los siguientes casos:

- TPH alogénico en Leucemia linfoblástica aguda (LLA) en RC1 en pacientes de muy alto riesgo con: t (9;22), BCR/ABL al

Tabla 16-1. Indicaciones generales de trasplante en enfermedades congénitas

Alogénico	Autólogo
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunodeficiencia congénita combinada • Aplasia medular de Fanconi • Talasemia mayor • Drepanocitosis • Eritroblastopenia de Blackfan-Diamond • Neutropenia de Kostmann • Síndrome de Wiskott-Aldrich • Osteopetrosis juvenil • Tesaurosismosis • Enfermedad granulomatosa crónica 	<ul style="list-style-type: none"> • Ninguna

Tabla 16-2. Indicaciones generales de trasplante en enfermedades adquiridas

Alogénico	Autólogo
<p>Neoplásicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucemias agudas • Leucemia mieloide crónica • Leucemia linfática crónica • Linfomas no-hodgkinianos ² • Enfermedad de Hodgkin ² • Mieloma múltiple • Histiocitosis ² • Amiloidosis ² • Síndromes mielodisplásicos <p>No Neoplásicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aplasia medular severa • Hemoglobinuria paroxística nocturna 	<ul style="list-style-type: none"> • Leucemias agudas • Leucemia mieloide crónica ² • Leucemia linfática crónica ² • Linfomas no-hodgkinianos • Enfermedad de Hodgkin • Mieloma múltiple • Histiocitosis ² • Amiloidosis ² • Síndromes mielodisplásicos ² • Tumores sólidos ¹ <p>Enfermedades autoinmunes ²</p>

¹ Goldman *et al*, BMT 1988

² Preferentemente dentro de protocolos de investigación clínica.

diagnóstico, falla a la inducción, mala respuesta a prednisona más t (4;11) o reordenamiento MLL en < de 1 año o inmunofenotipo T o proB o MO (M3) al día 15 o recuento de leucocito >100.000/ μ L o enfermedad mínima residual > 1/103 pre-consolidación; en RC2 recaída medular precoz o muy precoz, recaída con inmunofenotipo T y controversial en RC3.

- TPH alogénico de donante familiar como primera opción terapéutica en Leucemia mieloblástica aguda (LMA) de alto riesgo en RC1, el trasplante autólogo es una opción terapéutica en pacientes con LMA en RC2, donde la purga no está demostrada como necesaria.

- TPH alogénico de donante familiar idéntico como primera opción terapéutica en Leucemia mieloide crónica (LMC) en fase crónica.

En adultos, las principales indicaciones de TPH autólogo son Mieloma múltiple y recaída de Linfomas de mediano y alto grado. En todas las demás patologías el TPH autólogo es parte de protocolos de intensificación o rescate, pero los resultados son controversiales y la indicación es una decisión local. El TPH alogénico tiene como indicación principal las leucemias agudas en especial la (LLA) del adulto cuyos resultados con quimioterapia convencional son muy pobres. Muchos centros están dejando actualmente, de lado el TPH alogénico como

terapia de rescate en la mayor parte de las patologías salvo que el paciente sea menor de 30 años y tenga un donante "full match" relacionado. En los pacientes mayores de 50 años, en especial con diagnóstico de leucemia mieloide crónica y en menor grado leucemias agudas, el enfoque actual es, en forma creciente, el TPH no mieloablativo (mini-alotrasplante). Estos estudios se encuentran en fase II o III. Los avances en quimioterapia y terapias biológicas como anticuerpos monoclonales e inhibidores específicos como el STI 571 (Glivec®), Ácido Transretinoico y Trióxido de Arsénico están siendo preferidos por los hematólogos de adultos respecto del TPH en espera de los resultados que estas nuevas terapias pueden brindar.

El TPH es el tratamiento de elección de algunas patologías oncológicas de alto riesgo y definitivo de una serie de patologías no malignas, tanto en niños como adultos.

En general, hay consenso internacional que deben cumplirse ciertos requisitos mínimos para el adecuado funcionamiento de una unidad de trasplante. Como guía existen las recomendaciones de la Escuela Europea de Hematología (EEH) y del Comité Europeo de Trasplante de Médula Ósea. Estas recomendaciones son las siguientes: el trasplante debe efectuarse en unidades que cuenten con personal médico y de enfermería debidamente entrenado para resolver los problemas que se puedan presentar.

Según recomendaciones de la EEH, es exigible un mínimo de 20 trasplantes anuales para acreditar un centro de trasplante tanto pediátrico como de adultos.

Crear un buen programa de trasplantes de médula ósea exige un trabajo en equipo y su adecuado desarrollo supone un enorme desafío para cualquier sistema de salud, ya sea público o privado.

LECTURAS SUGERIDAS

A European reference protocol for quality assessment and clinical validation of autologous haematopoietic blood progenitor and stem cell grafts. Serke S, Johnsen HE. *Bone Marrow Transplant.* 27(5):463-70, 2001.

Bacigalupo, A., Brand, R., Oneto, R., et al. "Treatment of acquired severe aplastic anemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy—The European Group for Blood and Marrow Transplantation experience". *Semin Hematol.* 37(1):69-80, 2000.

Bosi, A., Laszlo, D., Labopin, M., Gluckman, E., Alessandrino, P.E., Locatelli, F., Sierra J., Frassoni, F. "Second Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Acute Leukemia: Results of a Survey by the European Cooperative Group for Blood and Marrow transplantation (EBMT) of 170 cases". *Journal of Clinical Oncology*, 2001.

Comans-Bitter, W.M., de Groot, R., van den Beemd, R., Neijens, H.J., Hop, W.C., Groeneveld, K., Hooijkaas, H., van Dongen, J.J. "Immunophenotyping of blood lymphocytes in Childhood. Reference values for lymphocyteSuppopulations". *J Pediatr*; 130 (3): 388-93), 1997.

Cubells, J., Diaz, M.A. "Spanish Working Party for BMT in Children (GETMON)". *Bone Marrow Transplant.* 30(1):9-13, 2002.

Dini, G., Cornish, J.M., Gadner, H., Souillet, G., Vossen, J.M., Paolucci, P., Manfredini, L., Miano, M., Niethammer, D.G. "Bone marrow transplant indications for childhood leukemias: achieving a consensus. The EBMT Pediatric Diseases Working Party". Gaslini Institute, Genova, Italy. *Bone Marrow Transplant.* 18 Suppl 2:4-7, 1996.

Frassoni, F., Labopin, M., Gluckman, E., Prentice H.G., Gahrton, G., Mandelli, F., Carella, M., Herve, P., Gratwohl, A., Goldman, J., Gorin, N.C. "On behalf of the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT): Are patients with acute leukaemia, alive and well 2 years post-bone marrow transplantaiton cured ? A european survey". *Leukemia*, 8, 6, 924-28, 1994.

Frassoni F., Labopin, M., Gluckman, E., Prentice, H.G., Vernant, J.P., Zwaan F., Granena, A., Gahrton, G., De Witte, T., Gratwohl, A., Reiffers, J., Gorin N.C. "Results of allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia have improved in Europe with time: a report of the acute leukemia working party of the european group for blood and marrow transplantation (EBMT)", *Bone Marrow Transplantation*, 17, 13-18, 1996.

Goldman, J., Schmitz, N., Niethammer, D., Gratwohl, A. "Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: current practice in Europe in 1998". *Bone Marrow Transplant*; 21: 1-7, 1998.

Guidelines for Preventing Opportunistic Infections Among Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. Recommendations of CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. 20, 2000 / 49(RR10);1-128

Matthay K.K, Villablanca, J.G., Seeger, R.C., Stram, D.O., Harris, R.E., Ramsay, N.K., Swift, P., Shimada, H., Black, C.T., Brodeur, G.M., Gerbing, R.B., Reynolds, C.P. "Treatment of high risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation and cis retinoic acid". *N Engl J Med*; 341(16):1165-73, 1999.

Mishra, V., Vaaler, S. *et al* "A prospective cost evaluation related to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation including pretransplant procedures, transplantation and 1 year follow up procedures". *Bone Marrow Transplantation*; 18: 1111 – 1116, 2001.

Mullen, C.A., Nair, J. *et al* "Fever and neutropenia in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients". *Bone Marrow Transplantation*; 25: 59 – 65, 2000.

Shaw, P.J., Pinkerton, C.R., Yaniv, I. "Melphalan combined with a carboplatin dose based on glomerular filtration rate followed by autologous stem cell rescue for children with solid tumours". *Bone Marrow Transplantation*; 18(6):1043-47,1996.

TRASPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE DONANTES NO RELACIONADOS: TECNOLOGÍA Y RESULTADOS CLÍNICOS

Pablo Rubinstein

- 1. Introducción**
- 2. Ventajas hipotéticas del trasplante de sangre de cordón de donantes no relacionados con el receptor**
- 3. Métodos**
 - 3.1. Recolección de sangre de cordón
 - 3.2. Consentimiento informado de la madre
 - 3.3. Identificación de unidades y especímenes
 - 3.4. Reducción de volumen
 - 3.5. Exámenes
 - 3.6. Congelamiento y descongelamiento de la sangre de cordón
- 4. Estudios clínicos**
 - 4.1. Datos sobre los pacientes y selección de trasplantes
 - 4.2. Análisis estadísticos
 - 4.3. Prendimiento de los trasplantes de sangre de cordón
 - 4.4. Histocompatibilidad
 - 4.5. Enfermedad Trasplante contra Huésped
 - 4.6. Eventos Relacionados al Trasplante
 - 4.7. Recidiva leucémica
 - 4.8. Sobrevida sin eventos negativos
 - 4.9. Avances recientes para mejorar el pronóstico, especialmente en adultos
- 5. Conclusiones**

RESUMEN

El descubrimiento de la presencia de células troncales hematopoyéticas, en la sangre de cordón umbilical, abrió la posibilidad de obtener tejido para el reemplazo de la médula, a partir de un componente tradicionalmente desechado. La creación de bancos que almacenan sangre de cordón para su uso en enfermos no relacionados ha iniciado una revolución en las posibilidades del tratamiento de pacientes que, anteriormente, no tenían ninguna posibilidad de obtener un donante histocompatible. Debido a sus propiedades biológicas, las células inmunes de la sangre de neonatos son menos capaces de inducir reacciones de injerto contra huésped y esta fuente es, por tanto, menos problemática como trasplante alogénico. En este capítulo se revisan los aspectos más salientes de la donación y adquisición de sangre de cordón para trasplantes, las técnicas para su procesamiento y congelación, las precauciones necesarias para su envío desde los Bancos hacia los Centros de Trasplante y, finalmente, se analizan los datos clínicos más recientes, usando la información del National Cord Blood Program de Nueva York. Los resultados indican que esta fuente de células troncales puede servir a pacientes de diversas edades, no sólo niños pequeños, y que puede alcanzar sobriedades comparables a la médula ósea y a la de las células movilizadas con factores de crecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

La sangre fetal/neonatal atrapada en la circulación placentaria y en el segmento inicial de la vena umbilical después del ligamiento del cordón (denominada Sangre de Cordón o SDC) fue utilizada con éxito como sustituto de la sangre donada por voluntarios para la transfusión clínica desde antes de la Segunda Guerra Mundial. La utilidad de la SDC se extendió bastante: en los EEUU todavía se administraba como "Placental/Umbilical Cord Blood" en las transfusiones de sangre en algunos Hospitales en New York y en otras ciudades durante la década de los sesenta y todavía se practica en otras partes del mundo (Halbrecht, 1939). La transfusión de un paciente de 16 años con leucemia aguda con sangre de cordón de 8 donantes no relacionados, en 1970, fue seguida de "prendimiento" ("engraftment") temporal de células progenitoras de, por lo menos, la serie eritroide (Ende, M. y Ende, N., 1972). En esa publicación, ellos atribuyeron el "prendimiento" observado a la presencia de células troncales hematopoyéticas (CTH) en la sangre de cordón utilizada en la transfusión. En comparación con el tejido hematopoyético de donantes adultos, los autores expresaron que "se cree que el tejido hematopoyético fetal es más tolerante hacia el huésped que los trasplantes obtenidos de la médula ósea de adultos". A pesar de que este estudio fue ignorado por muchos años, la sangre de cordón contiene efectivamente abundante cantidad de

CTH y células progenitoras, que se demuestran por el desarrollo de colonias celulares hematopoyéticas en cultivos con factores de crecimiento, (Knudtzon, 1974). Knudtzon indicó en la discusión de sus observaciones, que siendo la concentración de estas células tan alta en la sangre de cordón como en la médula ósea, la sangre de cordón podría ser usada como fuente de CTH para la recuperación de la función medular en seres humanos cuya médula ha sido destruida. La caracterización y cuantificación de CTH mejoró notablemente durante la década de los ochenta. En 1982 Nakahata y Ogawa demostraron que las colonias de tipo GEMM (en que, a partir de una sola célula, granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos) contienen células generadoras de colonias no diferenciadas y que al ser traspasadas a otras placas de cultivo producen colonias GEMM. Aún más, Koike y colaboradores observaron que las células productoras de estas colonias podían ser congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas tiempo después sin perder su capacidad de multiplicarse y formar colonias en cultivo, y sugirieron que estas células podrían ser almacenadas para ser usadas en trasplantes, especialmente en casos de enfermedades genéticas. Besalduch, en su tesis doctoral de la Universidad de Valencia, hizo la misma sugerencia y también postuló que la tolerancia inmunológica característica de los neonatos podría ser suficiente para permitir hacer estos trasplantes, a pesar de incompatibilidades en el sistema HLA. Más adelante, Boyse,

Broxmeyer y Douglas propusieron que la cantidad de CTH en recolecciones de sangre de cordón, congeladas adecuadamente, podrían ser suficientes para conseguir la restauración de la médula destruida y participaron en un trasplante exitoso de sangre de cordón a un niño con anemia de Fanconi. Una veintena de trasplantes de sangre de cordón de hermanos, tanto HLA-idénticos como parcialmente incompatibles fueron efectuados entre 1989 y 1993 (Revisión por Wagner, J. y colaboradores, 1995). Los primeros dos trasplantes de sangre de cordón de donantes no relacionados (1993), fueron recolectados, preparados y congelados por el primer Banco de Sangre Placentaria (hoy llamado Programa Nacional de Sangre de cordón), establecido en el New York Blood Center. Hasta febrero de 2005, este Programa ha proporcionado trasplantes hematopoyéticos a más de 1700 pacientes en América, Europa, Asia y Australia-Nueva Zelandia. Numerosos bancos de SDC para uso público se han establecido posteriormente en Europa, EEUU, el lejano Oriente, Australia y otros países. Algunos de estos bancos han organizado el NETCORD, una red de bancos de sangre de cordón muy preocupada por los aspectos de calidad técnica, que propuso el establecimiento de Estándares Internacionales, hoy integrados en el NETCOD-FACT Standard for Accreditation, recomendado por la mayoría de las organizaciones de trasplante de células troncales hematopoyéticas.

En este capítulo, examinaremos aspectos de la tecnología actual del Banco de Sangre de cordón y haremos una síntesis breve de los resultados obtenidos hasta ahora con los trasplantes de sangre de cordón a receptores no relacionados.

2. VENTAJAS HIPOTÉTICAS DEL TRASPLANTE DE CTH CON SANGRE DE CORDÓN DE DONANTES NO RELACIONADOS CON EL RECEPTOR

Desde la partida, se esperaban ventajas importantes de los trasplantes de sangre de cordón con respecto a los de médula ósea donada también por individuos no relacionados. La base de esa expectativa era la relativa “inmadurez” del sistema inmunológico y su consecuencia, bien conocida, la posibilidad de inducir tolerancia inmunológica frente a aloantígenos codificados por el sistema mayor de histocompatibilidad HLA (“Human Leucocyte Antigen”). Se esperaba que esta inmadurez resultara en una mayor facilidad para

controlar la incidencia de la enfermedad de injerto contra huésped (“Graft-versus-Host Disease”, GvHD) y su severidad clínica cuando existen incompatibilidades (“mismatches”), es decir, distintos determinantes antigénicos heredados como alelos del sistema HLA. De esta manera, se podría efectuar trasplantes parcialmente histoincompatibles en pacientes cuyos antígenos HLA son poco frecuentes, por lo que no se encuentran donantes completamente HLA-compatibles (“matched”). Por razones obvias, este es un problema mayor para los enfermos de grupos étnicos minoritarios. Aunque los mecanismos celulares de la GvHD y su relación con los que median el efecto GvL (“Graft vs Leucemia”) son todavía sólo parcialmente conocidos; existe una clara asociación estadística entre GvHD y GvL. Esta asociación sugirió que el efecto GvL pudiera ser menos efectivo cuando se usa sangre de cordón y que la reducción de GvL pudiera causar un aumento de la frecuencia de las recidivas. Como se verá más adelante, esta contingencia no se ha materializado. La posibilidad de efectuar trasplantes de células troncales, clínicamente útiles aunque histo-incompatibles, es particularmente importante para personas de grupos étnicos minoritarios, para los que existen menos donantes voluntarios. También se anticipó correctamente que, por hallarse las unidades de sangre de cordón congeladas y listas para el trasplante, se podría ahorrar tiempo en el proceso de búsqueda y después de hallado el trasplante, proceder con preparación del paciente con la certidumbre de contar con el injerto, en lugar de sólo tener la esperanza de que un voluntario inscrito en el Registro de donantes llegue a la donación en la práctica (Van Rood JJ, Oudshorn, M. 1988). La larga vida media, hasta ahora no determinada, pero ciertamente mayor de diez años, hacen a la sangre de cordón muy atractiva en casos de leucemia aguda en que la velocidad con que se trasplanta es fundamental para el éxito del trasplante.

La obvia utilidad de esta fuente de células troncales ha motivado amplio interés y se han creado numerosos Bancos de sangre de cordón alrededor del mundo, en Norteamérica así como Europa, Extremo y Mediano Oriente, Australia, y se ha comenzado a estudiar su implementación en Sudamérica.

Además, se han organizado muchos Bancos de sangre de cordón privados, “para familias”, con fines de lucro. Estos bancos no consideran los problemas potenciales de los trasplantes

autólogos en leucemias infantiles, motivando sería inquietud por parte de organismos profesionales y de las agencias reguladoras de salud pública y de organismos preocupados por factores éticos (American Academy of Pediatrics, 1999).

Varias publicaciones se refieren a la organización y las técnicas utilizadas en nuestro Programa y a los resultados clínicos de los trasplantes que demuestran la utilidad de esta fuente de células troncales.

3. MÉTODOS

3.1. Recolección de sangre de cordón

Hay dos métodos en uso para efectuar la recolección usando la vena umbilical del segmento del cordón proximal a la placenta; el más antiguo, durante la tercera fase del parto (con la placenta todavía en el útero) y el otro, dentro de los 15 minutos siguientes a la expulsión placentaria. El primer método, que hemos utilizado desde el año 1993, requiere un soporte para suspender la placenta con la cara fetal hacia abajo y el cordón suspendido. La sangre de los vasos placentarios baja a la vena umbilical del cordón y la distiende, permitiendo su extracción por punción y almacenamiento en una bolsa plástica para Transfusión con anticoagulante CPD-A. Este método está completamente libre de riesgos para el donante y su madre, ya que no afecta el manejo del parto en manera alguna, en tanto que el segundo método exige una pequeña desviación durante la tercera fase. Este último, a diferencia del anterior, requiere por lo tanto, el consentimiento informado materno previo a la extracción.

3.2. Consentimiento informado de la madre

Existe acuerdo en cuanto al momento en que debe obtenerse, dependiendo de la técnica utilizada. Como en otros tipos de consentimiento, la madre debe ser informada de su derecho de rehusar su participación y no donar para trasplante, o de restringir su donación, por ejemplo, al uso de la sangre para investigación y no para trasplante clínico. La madre deber dar su consentimiento para varias cosas, permitiendo específicamente:

- El uso de la sangre de cordón para trasplante.
- Ser entrevistada para proporcionar información sobre la etnicidad y antecedentes patológicos de la familia, y

posibles antecedentes de enfermedades infecciosas o genéticas.

- La revisión de las historias clínicas, suya y del recién nacido, para buscar información sobre posibles riesgos de enfermedades transmisibles.
- La obtención de dos muestras de sangre materna (volumen total <15ml) para la determinación del tipo HLA, pesquisa de enfermedades infecciosas, para referencia futura, etc.
- La obtención de una pequeña muestra de saliva del recién nacido para cultivo de CMV.
- Que el Programa comunique los resultados de las pruebas a efectuarse sobre las sangres del infante y de la madre al médico designado por la madre.

3.3. Identificación de unidades y especímenes

Para evitar la posibilidad de confusiones y errores, todas las muestras y documentos pertenecientes o referentes al donante y a su madre deben llevar la misma identificación, un número ID único con sufijo "P" (placentaria) o "M" (materna). El número es correlativo para las muestras obtenidas en el mismo Hospital y se asigna en código de barras y en caracteres legibles visualmente. Es de importancia fundamental que los reportes y, en general, toda la comunicación respecto a un donante, se haga con referencia a este número ID y que toda transferencia al computador o a la impresora se efectúe "leyendo" el código de barras con un instrumento adecuado (escáner o, como mínimo, un "light-pen").

3.4. Reducción de volumen

Con el aumento del número de las unidades mantenidas en el Banco, el espacio destinado al inventario (número y capacidad de los tanques de nitrógeno líquido) constituye un factor limitante. Esta limitación hace necesario el desarrollo y validación de una técnica para reducir el volumen de las unidades de sangre de cordón, para aumentar la capacidad de los espacios que mantienen temperaturas criogénicas. Varios métodos han sido explorados y considerados como útiles. El primero y más usado en la actualidad se basa en la facilitación de la sedimentación de los eritrocitos en la sangre de cordón, permitiendo la eliminación de más o menos la mitad del volumen de la unidad. El método consigue la reducción del potencial- ζ (zeta) usando almidón hidroxietílico (Rubinstein y colaboradores,

1995) permitiendo la separación de los glóbulos rojos con una centrifugación liviana (50 x G por 6 minutos). El plasma sobrenadante incluye más del 90% de las células nucleadas (principalmente leucocitos). La concentración de estas células se hace por centrifugación (400 x G por 15 minutos), permitiendo obtener unidades de volumen constante (20 ml), a las que agregamos 5 ml de solución de criopreservación (di-metil sulfoxido al 50%). La recuperación de células nucleadas en promedio, es de 92% y el de células progenitoras (formadoras de colonias hematopoyéticas o CD34+) es casi del 100%. El uso de unidades de volumen constante facilita substancialmente el congelamiento gradual y su automatización. Dos procedimientos para automatizar el procesamiento han sido ofrecidos comercialmente: el sistema BioSafe (Sepax) y el BioArchive ("Thermogenesis") que automatizan el procesamiento y el congelamiento, respectivamente. Otros sistemas de procesamiento automatizado han sido anunciados por empresas, que los pondrán en el mercado próximamente.

3.5. Exámenes

En nuestro Banco, tratamos de minimizar la cantidad de sangre usada en exámenes de laboratorio. Como la sangre de cordón normalmente posee un recuento de glóbulos blancos de 10-15 x 10⁶/ml, y la dosis de células adecuada para el trasplante es de 2,5 x 10⁷ por Kg de peso del receptor eventual, cada ml de sangre provee células suficientes para Kg y no debe "perdersse" innecesariamente por exceso de volumen de muestra en estas pruebas. Es necesario convencer a los laboratorios encargados de requerir la menor cantidad de sangre posible.

La masa eritrocitaria sedimentada puede ser usada para investigar fenotipos de hemoglobinas anormales y también para extraer DNA genómico de los leucocitos (principalmente granulocitos) y células eritroides inmaduras, útil en la tipificación de HLA. El plasma separado permite ahorrar sangre en los estudios bacteriológicos y de marcadores de enfermedades infecciosas, incluyendo HIV, HTLV, HBV, HCV, sífilis y recientemente, en los EEUU, el West Nile virus. Recuentos celulares en la sangre y en la suspensión celular final deben hacerse para asegurar la calidad del procesamiento así como la cantidad de células presentes en el trasplante. Es interesante que la presencia de eritrocitos nucleados en el

recuento no falsea los resultados: estos recuentos no estiman directamente el número de células troncales, sino solamente de células ya diferenciadas que anticipan la velocidad del proceso de prendimiento del trasplante. Los recuentos de estas últimas son sólo sustitutos, y los eritrocitos nucleados predicen muy bien la velocidad del prendimiento después del trasplante (Stevens CE y colaboradores, 2002). La tipificación ABO y Rh es también necesaria y contribuye a una mejor caracterización del producto.

3.6. Congelamiento y descongelamiento de la sangre de cordón

Como ya se ha dicho, es importante reducir el volumen de la sangre a congelar por varias razones, incluyendo el ahorro de espacio y la automatización del proceso de congelación. Otra ventaja es la menor cantidad de solución crioprotectora de di-metil sulfoxido (DMSO) que podría ser infundida al paciente (el DMSO es un fármaco de cierto peligro, ya que produce bradicardia, a veces marcada y, raramente, letal). El DMSO se introduce a la suspensión celular final lentamente, con agitación orbital y manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. La recuperación de células viables depende también del método de descongelación. Se recomienda la descongelación rápida sumergiendo la unidad (previamente mantenida a -196°C) en un recipiente con agua tibia a 37°C con agitación constante. Inmediatamente de la vuelta al estado líquido, se diluye la suspensión celular en un volumen igual (25 ml) de salino fisiológico estéril conteniendo, en lo posible, 1% de dextrano 40 y 1% de albúmina humana. La viabilidad de la suspensión así diluida es estable por lo menos por una hora. Si además se extrae el sobrenadante después de centrifugar y se reemplaza por 50 ml de diluyente, la viabilidad se mantiene por varias horas y la infusión retiene mucho menos DMSO.

4. ESTUDIOS CLÍNICOS

En el curso de los 12 años de este Programa, más de 1700 enfermos han recibido trasplantes de sangre de cordón umbilical preparados por el New York Blood Center. Los primeros 562 enfermos así transplantados fueron reportados en 1998. A continuación describiremos, brevemente, los hallazgos clínicos más importantes, incluyendo los resultados de trasplantes posteriores a 1998.

4.1. Datos sobre los pacientes y selección de trasplantes

enfermos transplantados se resumen en la tabla 17-1.

Las características clínicas y demográficas de

Tabla 17-1. Características clínicas y demográficas de 1300 participantes (excluyendo los que previamente recibieron otros trasplantes y los receptores de trasplantes múltiples)

Característica	Número (%)
Sexo	
Masculino	741 (57%)
Femenino	559 (43%)
Edad (años)	
0-1	286 (22%)
2-5	287 (22%)
6-11	303 (23%)
12-17	166 (13%)
> 18	258 (20%)
(media = 7.2 años, promedio = 11.9 años)	
Grupo étnico (Desconocido = 15)	
Asiático	49 (4%)
Africano	210 (16%)
"Hispánico"	261 (20%)
Aborígen americano	9 (1%)
Caucásico europeo	717 (56%)
Oriente Medio	37 (3%)
Otro	2 (0.2%)
Centro de Trasplante (nacionalidad)	
EE.UU.	1,005 (77%)
No-EE.UU.	295 (23%)
Diagnóstico	
Leucemia	829 (64%)
LLA	393 (30%)
LMA	291 (22%)
LMC	113 (9%)
Otra	32 (2%)
Mielodisplasia	59 (5%)
Linfoma	27 (2%)
Enfermedad genética	329 (25%)
Anemia Aplástica Severa	39 (3%)
Otros	16 (1%)
Grado de Avance de la leucemia (LLA, LMA, LMC) (grado no diagnosticado = 16)	
Temprano	198 (25%)
Intermedio	330 (42%)
Avanzado	253 (32%)

Para encontrar unidades de sangre de cordón, los centros de trasplantes hematopoyéticos envían una solicitud ("Search Request). Esta solicitud incluye información sobre el enfermo, su edad, peso, diagnóstico y grado del desarrollo de la enfermedad, y los grupos sanguíneos (ABO/Rh) y tisulares (HLA). En lo posible, también incluyen los fenotipos HLA de

los padres y hermanos.

Estos datos se usan para interrogar la base de datos en busca de unidades compatibles con el receptor. La determinación de compatibilidad ("matching") para cada uno de los alelos de los loci HLA se establece dividiendo el número de especificidades HLA compartidas por el dador

y el paciente por el número total de especificidades consideradas, generalmente 6, dos por cada uno de los tres loci utilizados en esta determinación. La tipificación de HLA ha progresado notablemente en los últimos diez años, habiéndose descubierto un polimorfismo mucho mayor que el conocido anteriormente y que se resuelve a nivel de la secuencia de los genes respectivos. Las técnicas, llamadas de “alta resolución” (designado como “nivel alélico” [“allele level”]). permiten precisar la secuencia de los nucleótidos en las regiones codificantes de estos polimorfismos. En el caso de la sangre de cordón se ha hecho general la determinación de los alelos de los genes HLA-A, -B y -DRB1; HLA-A y -B con resolución serológica y -DRB1 con alta resolución. Un efecto negativo de los trasplantes con incompatibilidades de HLA-A, -B y -DRB1 sólo discernibles con alta resolución ha sido demostrado en trasplantes de médula de donantes adultos, incluyendo muy recientemente a HLA-C. En el caso de la sangre de cordón, la evidencia del efecto deletéreo de incompatibilidades discernibles solamente con alta resolución se restringe a HLA-DRB1. Recientemente, hemos podido confirmar que si un donante de sangre de cordón es homocigoto para uno de los tres loci HLA, y el receptor es heterocigoto para el mismo alelo, en ausencia de otras incompatibilidades, el trasplante tiene el mismo pronóstico que si fuera un “match” perfecto. La homocigocidad en los donantes aumenta significativamente la oportunidad de encontrar donantes óptimos de sangre de cordón. Los tipos HLA de donante y receptor se confirman en ambos, el Banco de sangre de cordón y el Centro de Trasplantes, incluyendo la alta resolución de HLA-DRB1, para disminuir la probabilidad de errores. Las dos variables más importantes para la selección de unidades, histocompatibilidad y dosis de células nucleadas, son estadísticamente independientes. Es posible, por lo tanto, escoger el trasplante de acuerdo a diferentes esquemas de valores relativos para estas dos variables, por sí, o en combinación con otras.

Periódicamente (a los tres, seis y doce meses, y luego anualmente) los Centros de Trasplante envían información a nuestro Banco, sobre la marcha clínica de los pacientes. Estos datos permiten constatar el efecto clínico a corto y largo plazos y constituyen el Control de Calidad definitivo para el Banco de Sangre de cordón.

4.2. Análisis estadísticos

En la presentación de los resultados aquí

incluidos, hemos utilizado las técnicas habituales en los estudios sobre los resultados de trasplantes de médula, para calcular la significación estadística de las diferencias entre grupos. La probabilidad de “engraftment” del trasplante, así como la incidencia de eventos de riesgo relacionados con el trasplante, las recidivas y la sobrevida, son tradicionalmente estudiados con el método de Kaplan-Meyer, que permite analizar muestras cuyos participantes tienen seguimientos variables e incompletos. En esta técnica, el denominador (número total de participantes) disminuye cuando se materializa un riesgo que impide al paciente obtener subsecuentemente el prendimiento. Los pacientes que caen en esta categoría son “censurados” (“censored”) y el denominador se ajusta, disminuyendo con cada caso censurado. Recientemente se ha hecho popular el uso de la estadística llamada “cumulative engraftment with competing risks” en que el denominador se mantiene constante y el “riesgo” de obtener el prendimiento del trasplante se computa separadamente del riesgo de otros puntos finales (“endpoints”): falla del trasplante, recidiva de la enfermedad, muerte del paciente por cualquier causa, etc.

La influencia de distintos factores sobre estos aspectos del trasplante se evalúa con análisis univariados usando las estadísticas del “log-rank” y de Wilcoxon generalizado. Este último, también llamado test de Breslow, aplica una corrección a las comparaciones de acuerdo con el número de pacientes que permanecieron activos en cada momento de su seguimiento (este número es máximo en el período inmediato al trasplante). La comparación de datos asignados a categorías predefinidas (ejemplo: infantes vs. niños vs. adultos) se hace con tablas de co-tabulación, usando las técnicas llamadas “Fisher’s exact test”, el χ^2 de Pearson o el test de Mantel-Haenzel (“linear-by-linear”). Para los análisis multivariados de distribuciones como en el prendimiento del trasplante y la sobrevida, se usa la regresión logística de Cox, comprobando que los riesgos de las categorías sean proporcionales o introduciendo correcciones apropiadas para lograr la proporcionalidad.

4.3. Prendimiento de los trasplantes de sangre de cordón

Se ha definido el momento del prendimiento como la recuperación de un recuento absoluto de 500 neutrófilos/ μ l, mantenido por lo menos durante tres días consecutivos (se considera

alcanzado en el primer día). En general se considera como límite máximo del tiempo al día 42 (trasplante = día 0) y así lo hemos hecho en algunos análisis, pero en los análisis

multivariados se incluyen también los trasplantes que prenden después del día 42 (tabla 17-2).

Tabla 17-2. Análisis multivariado del prendimiento del trasplante al día +77.

Variab l es	Número	RR* (95% C.I.)	p
Dosis de células nucleadas/Kg	1211	1.5 (1.4-1.6)	< 0.001
Histocompatibilidad (Nivel de Match)			
6/6	59	1.6 (1.2-2.2)	0.001
5/6	430	1.0 (0.9-1.2)	1.0
4/6	655	Referencia	
3/6	84	0.8 (0.6-1.04)	0.10
Centro de trasplante no en USA	272	0.7 (0.6-0.8)	< 0.001
Profilaxis de GvHD con Methotrexate			
No	791	Referencia	
Sí	182	0.7 (0.6-0.9)	< 0.001
Sin respuesta	255	0.6 (0.5-0.7)	< 0.001
Diagnóstico de Anemia de Fanconi, Anemia Aplástica Severa o LMC	182	0.8 (0.6-0.9)	0.009

De acuerdo al test de Kaplan-Meyer, el 92.7% de los trasplantes prendieron, aunque el 12.7% lo hizo después del día 42. Una serie de variables son reconocidas como influyentes sobre la velocidad del prendimiento de las series mieloide y megacariocítica (alcanzando recuentos de 500 neutrófilos y de 50.000 plaquetas/ μ l, respectivamente) (19,38,46). La más dramática es la **dosis de células** (el número de células nucleadas viables por Kg de peso del receptor) (tabla 17-2; figura 17-1). La **edad del paciente** no alcanza significación estadística independiente en los tests multivariados aunque sí la alcanza en los univariados, probablemente debido a la conjunción entre la edad y el peso del paciente (el peso, obviamente, hace variar la dosis celular). En estudios recientes, hemos constatado que si se agrega la variable **dosis de células progenitoras** (formadoras de colonias) **por Kg de peso** (del paciente) al análisis multivariado, esta variable desplaza a la dosis celular total por Kg de peso del paciente - como influencia independientemente significativa sobre la velocidad del prendimiento medular.

Observaciones similares hechas aún más

recientemente usando como índice la dosis de células que expresan el marcador CD34+, confirman la semejanza numérica de las células que expresan CD34 con las células formadoras de colonias. La influencia de los eritrocitos nucleados en este aspecto es muy interesante. Tradicionalmente se ha presumido que los eritroblastos (hemoglobinizados pero aún con núcleo), por tratarse de células ya comprometidas con un linaje hematopoyético, no se correlacionan con la probabilidad del prendimiento y su velocidad. De aquí se llegó a la suposición de que en unidades de sangre de cordón con un elevado recuento de eritroblastos, estas células deberían restarse del recuento total de células nucleadas. En un nuevo estudio, sin embargo, hemos encontrado que la dosis de eritroblastos también predice por sí misma la velocidad del prendimiento y que, por lo tanto, estas células deben considerarse en la dosis celular total. Esta observación facilita la estimación de la dosis total, ya que la mayoría de los instrumentos que recuentan células sanguíneas automáticamente no pueden diferenciar los eritroblastos de los linfocitos.

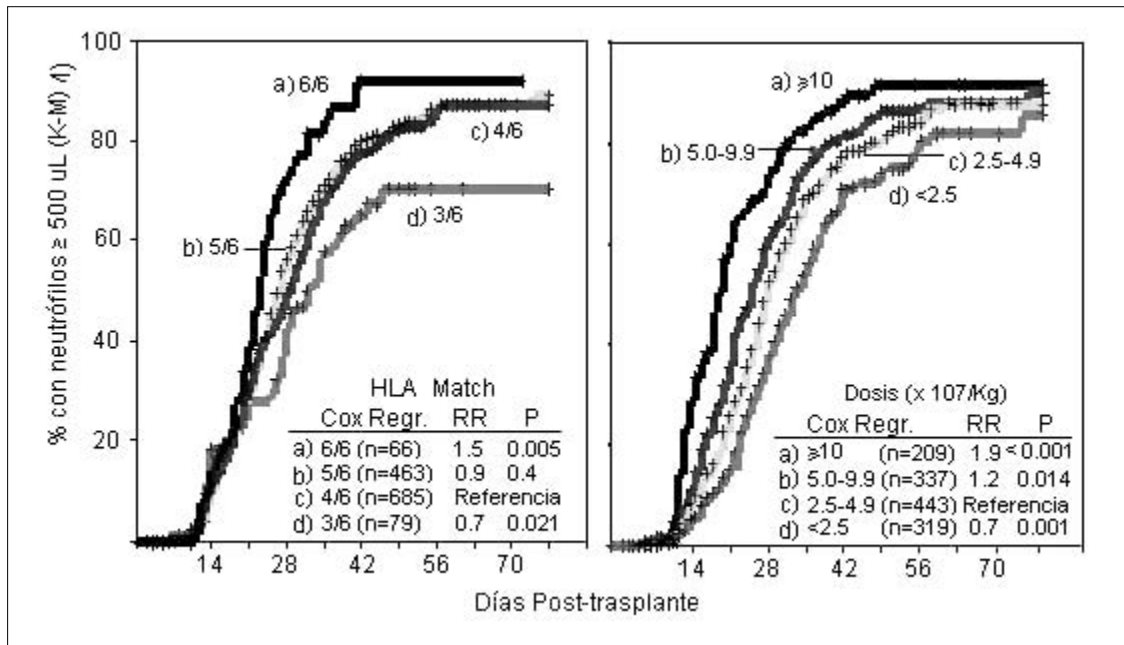


Figura 17-1. Prendimiento post-trasplante de la serie mieloide: influencia de HLA y de la dosis de células por kg.

4.4. Histocompatibilidad

La influencia de la histocompatibilidad entre donante y receptor ha sido más difícil de demostrar, aunque tanto nuestros datos de 1998 como los de Eurocord en receptores de trasplantes de sangre de cordón de donantes no relacionados demostraron la mayor velocidad en alcanzar el prendimiento que se obtiene con una mejor compatibilidad para los antígenos HLA. Otras series de pacientes no consiguieron demostrar esta asociación. Pensamos que la diferencia residió en la falta de poder estadístico de esas series, con menor número de pacientes. Nuestros datos actuales en los EEUU, en un total de 1293 trasplantes no relacionados, confirma la asociación estadística como significativa. La mediana del tiempo necesario para obtener 500 neutrófilos/ μ l fue de 23 días para receptores de trasplantes compatibles (designados 6/6) y de 28 días para los incompatibles (principalmente 5/6 y 4/6) (figura 17-1). Algo similar ocurre con la velocidad del prendimiento de las plaquetas: 67 días para alcanzar 50,000 plaquetas/ μ l con los trasplantes 6/6 y 88 días para los 5/6 ($P = 0.013$). Sin embargo, comparando los dos grupos más numerosos, la velocidad del prendimiento mieloide de los trasplantes con una incompatibilidad solamente (5/6), es idéntica a la de los con dos (4/6).

4.5. Enfermedad Trasplante contra Huésped

Existe acuerdo general sobre la menor frecuencia y severidad de la GvHD con los trasplantes de sangre de cordón. Los aspectos clínicos del síndrome agudo son muy parecidos a los que siguen al trasplante de médula ósea, aunque la intensidad del tratamiento requerido es menor. Algunos especialistas han llegado a sugerir que se trata de una enfermedad diferente, por esa razón. Los factores que influyen el GvHD post-trasplante de médula también se manifiestan en el caso de los de sangre de cordón, incluyendo la edad del paciente. El efecto de la incompatibilidad HLA se ve claramente en nuestra serie, en que la frecuencia de GvHD severa, es decir de Grados III y IV, fue del 8.3% en los receptores de trasplantes completamente compatibles (6/6) en comparación con 24% para los demás trasplantes ($P = 0.03$).

En el número total de pacientes transplantados con nuestras unidades de sangre de cordón hasta agosto de 2004, la incidencia de esta complicación fue baja, significativamente menor que la de los receptores de trasplantes de médula ósea. La correlación con la compatibilidad HLA, entre el número de antígenos incompatibles (0, 1, 2, o más) y la severidad del GvHD agudo (grados 0-I, II o III-

IV), es fuerte, especialmente utilizando la estadística de Mantel-Haenzel en que las dos variables se relacionan linealmente: χ^2 con 1df = 12.3, $P < 0.001$. La figura 17-2 muestra que el riesgo relativo de hacer GvHD de grado 2 es

más bajo para los trasplantes más compatibles. Esta asociación se demostró como independiente en tests multivariados que incluían la edad, el diagnóstico, la ubicación del centro de trasplantes, etc.

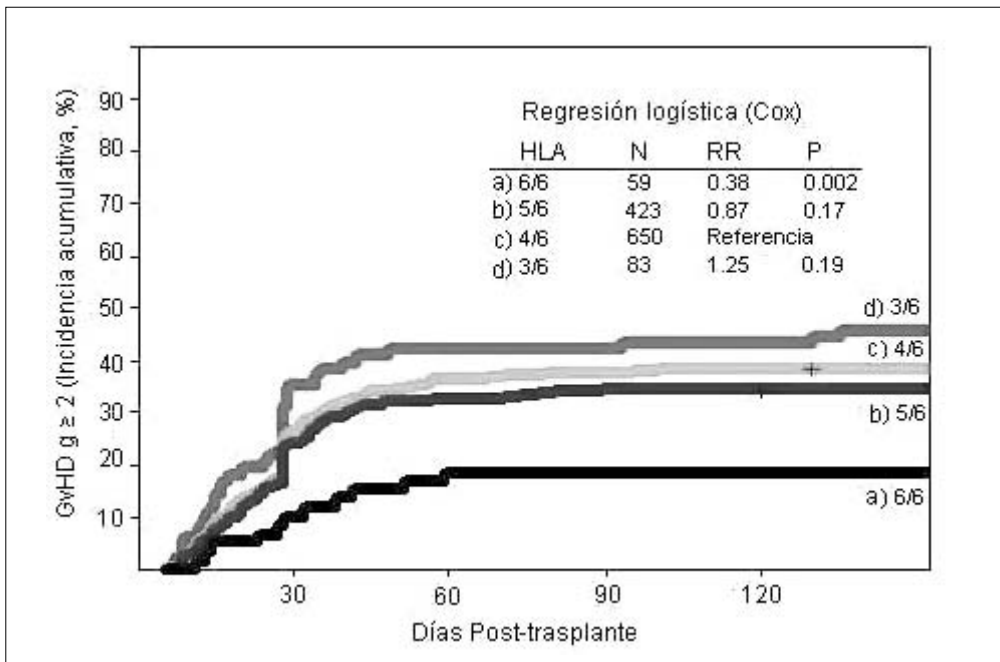


Figura 17-2. Enfermedad injerto contra huésped (GvHD) y Match HLA.

Otras series de pacientes, sin embargo, no han demostrado la asociación con HLA, probablemente a consecuencia del pequeño tamaño de la muestra respectiva. La GvHD crónica, que se diagnostica después de los 100 días del trasplante, se presentó en casi un tercio de los enfermos trasplantados, principalmente con carácter limitado y se asoció fuertemente con la previa existencia de GvHD aguda ($P < 0.001$) pero, sorprendentemente, no con HLA. Posiblemente se explique por el tamaño de la muestra.

4.6. Eventos relacionados al trasplante

Los “eventos relacionados al trasplante” (“Transplant-related events”, TRE) incluyen la falla del trasplante, la reconstitución autóloga, el recibir un nuevo trasplante de células troncales y la muerte por cualquier causa. Su incidencia está fuertemente asociada con el

diagnóstico y grado de avance (especialmente en malignidades), la compatibilidad HLA y la dosis celular (tabla 17-3) y, más débilmente, con la edad y la seropositividad del paciente para anti-CMV. Los riesgos relativos más altos de sufrir TRE afectan a los pacientes receptores de trasplantes con ≥ 2 antígenos HLA incompatibles y a los receptores de las dosis celulares más bajas. La asociación se confirma como independiente, en los tests multivariados. Analizando la influencia de estas mismas variables en la probabilidad de sufrir TRE después del prendimiento del trasplante (tabla 17-4), las diferencias más interesantes son la disminución de la influencia de la *dosis celular* en los tests multivariados y el fortalecimiento de la asociación con la *edad del enfermo*. El efecto de incompatibilidades HLA se manifestó, sin cambios, después del prendimiento del trasplante.

Tabla 17-3. Variables que influyen la probabilidad de sufrir TRE (Regresión de Cox)

Variable	N	RR (95% IC)	p
Dosis de células nucleadas (log. nat.)	1267	0.66 (0.59-0.75)	< 0.001
Match para HLA			
6/6	61	0.5 (0.3-0.8)	0.002
5/6	445	0.8 (0.6-0.9)	0.005
4/6	675	Referencia	
3/6	86	0.9 (0.7-1.3)	0.7
Centro fuera de EE.UU	280	1.4 (1.2-1.4)	< 0.001
LLA, LMA, LMC de alto riesgo	251	1.3 (1.1-1.6)	0.007
Paciente no Caucásico	560	1.2 (1.0-1.4)	0.038
Serología anti- CMV pre-trasplante			
Negativa	605	Referencia	
Positiva	536	1.4 (1.1-1.9)	0.005
No determinada	126	1.3 (1.1-1.5)	0.008

TRE = Eventos relacionados con el trasplante ("transplant-related events")

RR = riesgo relativo

95% IC = intervalo de confianza de 95%

P = probabilidad asociada con el RR.

4.7. Recidiva leucémica

Esta complicación se presenta con diferente frecuencia en pacientes con distintos tipos de leucemias o linfomas y, tal como en el caso de los trasplantes de médula ósea, se asocia fuertemente con el diagnóstico (la frecuencia en las leucemias mieloides agudas es 45%, en las leucemias linfoides agudas es 28% y en las leucemias mieloides crónicas es 17 %, y, especialmente, con el grado de avance de la enfermedad al momento del trasplante. La mayor parte de las recidivas ocurre en los primeros seis meses post-trasplante, pero algunos casos han sido reportados hasta dos años después. Esta tendencia a la recidiva temprana y a la falta de los casos tardíos que se ven después de trasplantes de médula, ocurren también en el caso de los linfomas.

Curiosamente, la frecuencia de la recidiva es semejante a lo que ocurre con la médula ósea, aunque se podría haber esperado un incremento importante debido a la posibilidad de una disminución de la respuesta trasplante anti-leucemia (graft-vs.-leukemia, or GvL) tal como la que se ve en el caso de la respuesta trasplante anti-huésped (GvHD). La probabilidad de recidiva es menor en pacientes que han sufrido GvHD aguda severa (grado III y IV) quienes recidivaron en un 9%, comparado con el 29% de los que no tuvieron esta complicación ($p < 0.02$). Lo mismo ocurre con los pacientes que desarrollaron GvHD crónica, posiblemente debido a la relación con la GvHD aguda.

La recidiva, por lo tanto, no es más frecuente en los trasplantes con sangre de cordón que en los de otras fuentes de células troncales.

Tabla 17-4. Recidiva en pacientes trasplantados por leucemia o linfoma, a los cinco años del trasplante (Regresión de Cox)

Variabes:	N	RR (CI =95%)	p
Dosis total de células nucleadas (log. nat.)	802	1.2 (0.8-1.6)	0.4
Número de “mismatches”			
0	31	0.5 (0.2-1.3)	0.15
1	315	1.1 (0.8-1.6)	0.5
2	412	Referencia	
3	44	0.9 (0.4-1.9)	0.8
Riesgo (Categorías de IBMTR para LLA, LMA, LMC)			
Bajo	187	Referencia	
Intermedio	313	1.5 (0.9-2.4)	0.14
Alto	247	2.8 (1.7-4.6)	< 0.001
Otra leucemia o linfoma	55	3.7 (2.0-6.7)	< 0.001
Edad < 6 años (al hacer el trasplante)	258	1.3 (0.8-2.0)	0.3

4.8. Mortalidad

Los aspectos generales de la mortalidad de los pacientes trasplantados con sangre de cordón se resumen en la tabla 17-5 A, y los de la “mortalidad relacionada con el trasplante” en la B.

Se acostumbra a considerar más especialmente la sobrevida, es decir, la fracción de los pacientes trasplantados que permanecen vivos al cumplirse un determinado período después del trasplante. Se usan como índices, características de la sobrevida (por ejemplo, la sobrevida \geq tres años con un trasplante completamente funcional y sin recidiva de la enfermedad se llama “sobrevida sin eventos negativos,” (“Event-free survival” o EFS). La EFS es más alta para los pacientes con enfermedades genéticas

que para los que se transplantan por leucemias. Las probabilidades de EFS y los intervalos de confianza de 95% son, respectivamente, 48% (40%-55%) y 27% (23%-31%) tres años post-trasplante, la última muy similar a la de los pacientes con mielodisplasia y anemia aplásica severa: 29% (23%-35%), también a los tres años. El grado de avance de la enfermedad al momento del trasplante, la dosis celular trasplantada y la compatibilidad HLA son, nuevamente, los factores que mejor se asocian con la probabilidad de EFS en análisis multifactoriales. En las enfermedades genéticas, el factor más importante ha sido el país donde se encuentra el centro de trasplantes, especialmente al comienzo de la experiencia de los centros. La edad de los pacientes (o la dosis celular trasplantada) también se manifestó como independientemente significativa.

Tabla 17-5. Mortalidad asociada al trasplante

Mortalidad total a los cinco años del trasplante			
	<u>N</u>	<u>RR (95%IC)</u>	<u>P</u>
Dosis celular/Kg (natural log)	1205	0.68 (0.61-0.75)	< 0.001
HLA "mismatches" (en el sentido de rechazo)			
0	54	0.5 (0.3-0.8)	0.002
1	497	0.9 (0.7-1.02)	0.096
2	594	Referencia	
3	61	1.07 (0.8-1.5)	0.7
Centro fuera de EEUU	263	1.3 (1.1-1.6)	0.001
LLA, LMA o LMC de alto riesgo	247	1.6 (1.3-1.8)	< 0.001
Enfermo no-Caucásico	542	1.2 (0.99-1.3)	0.060
Serología anti-CMV pre-trasplante			
Negativa	577	Referencia	
Positiva	511	1.2 (0.90-1.5)	0.2
No determinada	118	1.3 (1.1-1.5)	0.004
Mortalidad relacionada con el trasplante (al final del primer año)			
Dosis celular/Kg (log nat)	1205	0.62 (0.55-0.71)	< 0.001
Número de "mismatches" (en el sentido de rechazo)			
0	53	0.5 (0.3-0.8)	0.007
1	497	0.9 (0.7-1.02)	0.073
2	594	Referencia	
3	61	1.1 (0.8-1.6)	0.6
Centro fuera de EEUU	263	1.5 (1.2-1.8)	< 0.001
LLA, LMA o LMC de alto riesgo	247	1.3 (1.04-1.6)	0.017
Enfermo no-Caucásico	542	1.2 (1.0-1.4)	0.032
Serología anti-CMV pre-trasplante			
Negativa	577	Referencia	
Positiva	511	1.4 (1.1-1.9)	0.013
No determinada	118	1.3 (1.1-1.5)	0.008

4.9. Avances recientes que mejoran el pronóstico, especialmente en adultos

A pesar de la mejora de la supervivencia de los pacientes trasplantados con sangre de cordón en los últimos años, es innegable que la probabilidad de supervivencia a largo plazo continúa siendo baja, al igual que en el caso de los trasplantes de médula ósea entre no-relacionados. Si se considera, además de la naturaleza maligna de las enfermedades que motivan estos trasplantes, la toxicidad de los regímenes condicionantes y las devastadoras consecuencias inmediatas y alejadas de la GvHD, es obvio que los riesgos que acompañan al trasplante son muy graves. En el caso de la sangre de cordón, el éxito de esta terapéutica reside en la disminución de la GvHD, pero está limitado por la pequeña magnitud de los inventarios de sangre de cordón (la mayor parte de los trasplantes serán incompatibles) y por la escasa celularidad de la mayoría de las unidades existentes (menor velocidad del prendimiento

y mayor probabilidad de que infecciones graves ocurran durante e inmediatamente después del prolongado período de aplasia).

La atención de los especialistas ha enfocado especialmente el segundo de los problemas, la dosis de células trasplantadas. Para aumentar el número de estas células, se ha ensayado sin éxito hasta ahora, la expansión de células progenitoras, con diversas estrategias de cultivo en presencia de factores de crecimiento hematopoyéticos. Los ensayos que se han reportado expanden, a veces marcadamente, los números de células CD34+ pero no mejoran su capacidad de acelerar el prendimiento. Recientemente se han aumentado las dosis celulares haciendo trasplantes de dos o más unidades simultáneamente, los que han sido muy exitosos. Otro método acompaña al trasplante de sangre de cordón con la infusión simultánea de células CD34+, purificadas de la médula ósea de un pariente parcialmente histocompatible con el enfermo o, incluso, de

donantes totalmente no compatibles. Además, la introducción de regímenes condicionantes no completamente ablativos, que disminuyen el período de aplasia y la probabilidad de infecciones letales post-trasplante, ha demostrado una promesa importante. Aunque es muy temprano para una evaluación definitiva de estos métodos, es indudable que el problema de las dosis celulares podrá ser superado en el futuro muy próximo, con lo que la incompatibilidad inmunológica para HLA permanecería como la mayor barrera para la sangre de cordón. En este caso, la solución será terminar con la insuficiencia de unidades de sangre de cordón de los diferentes grupos étnicos para suplir las necesidades de la mayoría de los pacientes.

5. CONCLUSIONES

El progreso en la utilización de la sangre de cordón umbilical como fuente de células troncales, para la reconstitución de la médula ósea ha sido comparativamente muy rápido: en once años se ha demostrado la utilidad de esta fuente celular y se ha desarrollado una red de bancos alrededor del mundo para la recolección de este recurso y su almacenamiento. Esta red ya provee una parte importante de los trasplantes en la actualidad: más de la mitad del total de los trasplantes hematopoyéticos en Japón y aproximadamente la mitad de los trasplantes pediátricos en EEUU usan sangre del cordón. Los resultados clínicos han sido demostrados como equivalentes a los obtenibles con la médula ósea donada por individuos no relacionados con el receptor y en algunos casos como superior a ellos. Las ventajas logísticas sugieren que en pocos años será posible evitar la donación de médula ósea o de células troncales movilizadas por voluntarios y los riesgos involucrados, a la vez que se agiliza el proceso de encontrar un donante adecuado para cada enfermo que lo requiere. Es interesante que el costo de un programa nacional es menor con sangre de cordón que con donantes voluntarios. El uso de donantes voluntarios implica la necesidad de reemplazar los voluntarios que abandonan el sistema después de un período. En contraste con la sangre de cordón, que permanece viable por muchos años hasta que se necesita, los voluntarios viajan, se enferman, envejecen, cambian de opinión y dejan de ser voluntarios, etc.

Además del gran número de unidades de sangre de cordón requeridas para mejorar la

compatibilidad HLA y el pronóstico de los enfermos trasplantados, la tecnología, que avanza decididamente hacia la automatización, todavía debe superar otros desafíos importantes. En primer lugar, la estandarización de procedimientos en la preparación de unidades y su caracterización, para que los clínicos puedan elegir una unidad de cualquier procedencia solamente en base a factores técnicos y científicos. Ha habido progreso importante a nivel internacional en la promulgación de estándares de calidad y mecanismos para la acreditación de bancos de sangre de cordón (NETCORD-FACT) pero queda mucho por hacer en esta esfera.

En el ámbito de la investigación, hay un campo enorme que se desenvuelve en gran parte como consecuencia de los bancos de sangre de cordón: la provisión de células troncales para estirpes celulares no hematopoyéticas. La demostración de células hepáticas, miocárdicas, nerviosas y mesenquimáticas, con el genotipo del donante, a partir de sangre de cordón ha abierto posibilidades insospechadas sobre la base del fenómeno de troncalidad ("stemness"). Para mayor información sobre células mesenquimáticas ver el capítulo 2 de este libro.

Finalmente, el hallazgo de células de estas y otras estirpes, en receptores de trasplantes de sangre de cordón humana ha revolucionado las expectativas de desarrollar, a corto o mediano plazo, tratamientos basados en terapéutica celular y regeneración tisular sin tener que utilizar elementos celulares embrionarios.

LECTURAS SUGERIDAS

American Academy of Pediatrics Work Group on Cord Blood Banking. Cord blood banking for potential future transplantation: subject review. *Pediatrics* 1999;104:116-118.

Beatty, P.G., Mori, M., Milford, E. "Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor". *Transplantation* 1995; 60:778-783.

Besalduch, J. "Naturaleza y características de los precursores Granulocítico-macrofágicos en Sangre de Cordón" (tesis doctoral) 1985, Universitat de València, Valencia, Spain.

Boyse, E.A., Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W. "Preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood". U.S. Patent 5,004,681 4/02/1991.

- Brent, L., Brooks, C.G., Medawar, P.B., Simpson, E. "Transplantation tolerance". *Br Med Bull* 1976;32:101-105.
- Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Army, M., Thomas, L., Boyse, EA. "Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828-3832.
- Broxmeyer, H.E., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R.C., Graves, V., Yoder, M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., Rubinstein, P., Braun, E.R. "Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults". *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4109, 4114
- Cox, D.R. "Regression models and life tables (with discussion)". *J R Stat Soc (B)*1972;34:187-81.
- Ende, M. and Ende, N. "Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood: anew method". *Virginia Medical Monthly* 1972; 99:276-280
- Gale, K.B., Ford, A.M., Repp, R., Borkhardt, A., Keller, C., Eden, O.B., Greaves, M.F. "Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots". *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13950-54.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Auerbach, A.D., Friedman, H., Douglas, G.W., DeVergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., Boyse, E.A. "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling". *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178
- Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souliet, G., Ferreira, E., Laporte, J.P., Fernandez, M., Chastang, C. "Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors". *N Engl J Med* 1997;337:373-81.
- Halbrecht, J, "Fresh and stored placental blood". *Lancet*, 1939 ii; 1263-1671.
- Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., et al. "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation". *Blood* 1990;75:555-62.
- Issaragrisil, S. "Cord blood transplantation in thalassemia". *Blood Cells* 1994, 20;259-262.
- Kaplan, E.L., Meier, P. "Nonparametric estimation from incomplete observations". *J Amer Stat Assoc* 1958;53:457-81.
- Kernan, N.A., Schroeder, M.L., Ciavarella, D. et al.: "Umbilical cord blood infusion in a patient for correction of Wiskott-Aldrich syndrome". *Blood Cells* 1994; 20:245-249.
- Knudtzon, S. "In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood". *Blood* 1974;43:357-361
- Kurtzberg, J., Graham, M., Casey, J., Olson, J., Stevens, C.E., Rubinstein, P. "The use of umbilical cord blood in mismatched related and unrelated hemopoietic stem cell transplantation". *Blood Cells* 1994;20: 275-283.
- Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M.L., et al. "Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients". *N Engl J Med* 1996;335:157-166.
- Linch, D.C., Brent, L. "Can cord blood be used?" *Nature* 1989;340:676
- Locatelli, F., Rocha, V., Chastang, C., Arcese, W., Michel, G., Abecasis, M., Messina, C., Ortega, J., Badell-serra, I., Plouvier, E., Souiller, G., Jouet, J.P., Pasquini, R., Ferreira, E., Garnier, F., Gluckman, E. "Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia". *Blood*, 1999;53;3662-3671
- Mahmoud, H.H., Ridge, S.A., Behm, F.G., Pui, C-H., Fard, A.M., Raimondi, S.C., Greaves, M. "Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins". *Med Pediatr Oncol* 1995;24:77-81.
- Rowley, J.D. "Backtracking leukemia to birth". *Nature Med* 1998; 4:150-151.
- Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., et al. "Outcomes among 562 recipients of placental blood transplants from unrelated donors". *N Engl J Med*, 1998; 339:1565-1577.
- Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R.E, et al. "Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution". *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10119-10122.

- Rubinstein, P., Rosenfield, R.E., Adamson, J.W., Stevens, C.E. "Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution". *Blood* 1993;81:1679-1690.
- Rubinstein, P., Taylor, P.E., Scaradavou, A., et al. "Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program". *Blood Cells* 1994; 20:587-600.
- Rubinstein, P. "Placental blood-derived hematopoietic stem cells for unrelated bone marrow reconstitution". *J. Hematotherapy* 1993;2:207-210.
- Sonnenberg, F.A., Eckman, M.H., Pauker, S.G. "Bone marrow donor registries: the relation between registry size and probability of finding complete and partial matches". *Blood* 1989;74:2569-2575
- SPSS Advanced Statistical Software. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Stevens, C.E., Gladstone, J., Taylor, P.E., Scaradavou, A., Migliaccio, A.R., Visser, J., Dobrila, N.L., Carrier, C., Cabbad, M., Wernet, P., Kurtzberg, J, Rubinstein, P. "Placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution: relevance of nucleated red blood cells". *Blood*, 100:2662-2664, 2002.
- Sullivan, K.M., Weiden, P., Storb, R., et al. "Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for acute and chronic leukemia". *Blood* 1989; 73:1720-28.
- Szidlo, R., Goldman, J.M., Klein, J.P., et al. "Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings". *J Clin Oncol* 1997;15:1767-77.
- Van Rood, J.J., Oudshorn, M. "An HLA matched donor? An HLA matched donor? What do you mean by an HLA matched donor?". *Bone Marrow Transpl* 1998;22(Suppl 1):583.
- Vilmer, E., Sterkers, G., Rahimy, C., Denamur, E., Elion, J., Broyart, A., Lescoeur, B., Tiercy, J.M., Gerota, J., Blot, P. "HLA-mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia". *Transplantation* 1992;53:1155-1159.
- Wagner, J., Kurtzberg, J. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation at Duke University and at the University of Minnesota: results in 143 patients (Abstract from the 3rd Eurocord Transplant Concerted Action Workshop, 1988).
- Wagner, J.E., Broxmeyer, H.E., Byrd, R.L., Zehnauer, B., Schmeckpeper, B., Shah, N., Griffin, C., Emanuel, P.D., Zuckerman, K.S., Cooper, S., Carow, C., Bias, W., Santos, G.W. "Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: Analysis of engraftment". *Blood* 1992;79:1874.
- Wagner, J.E., Kernan, N.A., Steinbuch, M., Broxmeyer, HE., Gluckman, E. "Allogeneic sibling umbilical-cord blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease". *Lancet* 1995; 346:214-219.
- Wernet, P., Kogler, G., Hakenberg, P., et al. "Standards and efficiency of cord blood banking by the international Netcord organisation". *Blood* 1999;94 (Suppl.1) 4763A.

ENFERMEDADES LISOSOMALES E HISTIOCITOSIS

Erna Raimann B., J. Francisco Cabello A.,
Claudio Cruzat C., Carlos Rodríguez-Galindo e Iván Palomo G.

ENFERMEDADES LISOSOMALES

1. **Introducción**
2. **Enfermedades lisosomales**
 - 2.1. Esfingolipidosis
 - 2.1.1. Antecedentes generales
 - 2.1.2. Enfermedad de Gaucher
 - 2.1.3. Enfermedad de Niemann Pick
 - 2.2. Otras Enfermedades lisosomales

HISTIOCITOSIS

1. **Introducción**
2. **Etiología y epidemiología de la histiocitosis**
3. **Ontogenia y fisiopatología de las células histiocíticas y dendríticas**
4. **Morfología, localización e inmunofenotipo de células dendríticas e histiocíticas**
5. **Clasificación de la histiocitosis**
6. **Afecciones relacionadas con las células dendríticas**
 - 6.1. Histiocitosis de células de Langerhans
 - 6.2. Proceso de células dendríticas secundario
 - 6.3. Xantogranuloma juvenil y afecciones asociadas
 - 6.4. Histiocitomas solitarios de células dendríticas con fenotipos variables, dendrocitomas.
7. **Afecciones relacionadas con los macrófagos**
 - 7.1. Síndromes hemofagocíticos
 - 7.2. Reticulohistiocitoma y reticulohistiocitosis multicéntrica
 - 7.3. Enfermedad de Rosai-Dorfman

RESUMEN

Las lipoidosis se refiere a un grupo heterogéneo de alteraciones en el metabolismo de los lípidos. En este capítulo nos referiremos a ciertos errores innatos del metabolismo que, agrupados en el contexto de las Enfermedades Lisosomales, comparten la característica que pueden presentarse con síntomas o signos clínicos o de laboratorio que pueden ser de importancia para el hematólogo.

La Enfermedad de Gaucher ocupa un lugar principal por ser la más frecuente de las enfermedades lisosomales y porque las manifestaciones clínicas comprenden el compromiso hematológico, visceral y óseo. La presencia de las células de Gaucher en la médula ósea permite muchas veces al hematólogo sospechar el diagnóstico de esta enfermedad en un paciente que pudo haber sido derivado para estudio por una pancitopenia, hepatoesplenomegalia o hiperesplenismo.

La Enfermedad de Niemann Pick es otra esfingolipidosis que puede presentar células anormales a la visión experta del hematólogo. Las mucopolisacaridosis, las oligosacaridosis, las mucolipidosis y la Enfermedad de Pompe suelen no tener manifestaciones de la esfera hematológica, pero pueden presentar alteraciones que catalogadas como hallazgos en el análisis de sangre periférica o en la médula ósea, pueden orientar al clínico experimentado.

La Histiocitosis representa un grupo de enfermedades en que proliferan células dendríticas y/o macrófagos, tanto neoplásicas como no-neoplásicas.

Las histiocitosis se clasifican según la célula de origen; células dendríticas o macrófagos. En el primer grupo se encuentra la Histiocitosis de células de Langerhaus.

Aquí se describirán las principales características de las Histiocitosis clínicamente más importantes.

ENFERMEDADES LISOSOMALES

Erna Raimann B. y J. Francisco Cabello A.

1. INTRODUCCIÓN

El término lipoidosis se refiere convencionalmente a las alteraciones en el metabolismo de los lípidos. Se suele entender que secundaria a esta alteración ocurre un depósito de lípidos que puede identificarse por métodos diagnósticos convencionales. El carácter inespecífico de esta definición ha obligado a reconocer diferentes entidades dentro de enfermedades antiguamente agrupadas dentro del capítulo de las lipoidosis y que no necesariamente corresponden a defectos primarios del metabolismo de un lípido. Hoy en día, es posible encontrar algunas de estas condiciones en los capítulos referidos a enfermedades de depósito, o bien, clasificadas según el organelo donde ocurre el defecto enzimático o el depósito del lípido. Otras condiciones como las dislipidemias, los desórdenes del metabolismo del colesterol o de la síntesis de ácidos biliares, si bien corresponden a alteraciones del metabolismo

de los lípidos, suelen considerarse en capítulos diferentes.

En virtud de la orientación de este libro, se han seleccionado las condiciones relacionadas a alteraciones del metabolismo de los lípidos que al parecer tienen mayor implicancia en la práctica clínica y de laboratorio del hematólogo. Es así que se revisará en mayor extensión la Enfermedad de Gaucher y la de Niemann Pick, dos esfingolipidosis que por su frecuencia y por la forma de presentación pueden corresponder a un diagnóstico diferencial importante. De manera más somera, se describirán otras enfermedades lisosomales que no se presentan frecuentemente en la consulta hematológica.

2. ENFERMEDADES LISOSOMALES

Comprenden las entidades clínicas que se producen por el defecto de cualquiera de las enzimas lisosomales. Actualmente se reconocen cerca de 40 alteraciones distintas con características clínicas diversas. Las enfermedades lisosomales se pueden clasificar en grupos distintos, entre los cuales vale la pena destacar las esfingolipidosis, las

mucopolisacaridosis, las oligosacaridosis, las mucopolipidosis y la glicogenosis tipo II (enfermedad de Pompe).

2.1. Esfingolipidosis

2.1.1. Antecedentes generales

Los esfingolípidos son lípidos de membrana complejos derivados de la ceramida en cuyo catabolismo requieren de hidrolasas lisosomales. La deficiencia de estas enzimas, producen un depósito progresivo de estos compuestos en los órganos afectados y variadas consecuencias funcionales. De esta manera, las esfingolipidosis son un subgrupo de enfermedades por depósito lisosomal que pueden manifestarse de diversas formas, predominantemente con síntomas como hepatoesplenomegalia (Gaucher y Niemann Pick A y B), dis y desmielinización central y periférica (leucodistrofia metacromática y enfermedad de Krabbe), y desórdenes con depósito neuronal predominante (gangliosidosis). la enfermedad de Farber y la enfermedad de Fabry tienen presentaciones únicas y no asimilables a estos grupos.

Avances importantes han acontecido en este grupo de condiciones en su enfrentamiento terapéutico en los últimos años. La terapia de reemplazo enzimático, largamente anhelada para otros errores innatos del metabolismo, vio en la Enfermedad de Gaucher la primera condición donde se lograba, a través de esta aproximación terapéutica, detener la progresión del depósito de esfingolípidos, abriendo el camino para la Enfermedad de Fabry, Niemann

Pick B y recientemente para otras Enfermedades Lisosomales, como las Mucopolisacaridosis tipo I, II y VI, y la Enfermedad de Pompe.

2.1.2. Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher es considerada la más frecuente de las enfermedades por depósito lisosomal.

Se produce por el déficit de la enzima lisosomal glucocerebrosidasa (figura 18-EL-1) y se transmite de manera autosómico recesiva.

Fisiopatología

Se presenta con una frecuencia aproximada de 1:60.000 recién nacidos en todo el mundo, pero es más frecuente en población judía ashkenazi, donde su prevalencia llega a ser de 1:855.

Presentación clínica

Se reconocen tres tipos clásicos de presentación asociados al déficit de glucocerebrosidasa, sin embargo, algunos prefieren describir un continuo de presentaciones desde una forma neonatal letal hasta el paciente asintomático.

Enfermedad de Gaucher tipo I. La enfermedad de Gaucher tipo I, o forma no neuronopática, se caracteriza por el compromiso visceral, hematológico y óseo, así como por la ausencia de compromiso neurológico primario. Los pacientes inician las manifestaciones clínicas en la edad pediátrica, con epistaxis frecuentes, hematomas o equimosis ante traumas mínimos, y otras alteraciones asociadas a la trombocitopenia. En el estudio se constata, frecuentemente, trombocitopenia como hallazgo más llamativo en sangre periférica, pero es posible reportar desde el momento de la aparición de los síntomas una bi o pancitopenia, en concomitancia con una visceromegalia, donde el predominio de la esplenomegalia es característico y llega a producir un abdomen prominente en los pacientes afectados. La trombocitopenia suele explicarse en los primeros años de evolución por un secuestro esplénico de plaquetas y por lo mismo mejora significativamente con la esplenectomía, hoy contraindicada por asociarse a un empeoramiento del compromiso óseo y ante la existencia de terapias específicas. El bazo puede llegar a volúmenes de 1500-3000 cc en contraste con los 50-200 cc de volumen promedio en el adulto. Habitualmente dentro de la primera década de la vida se presentan

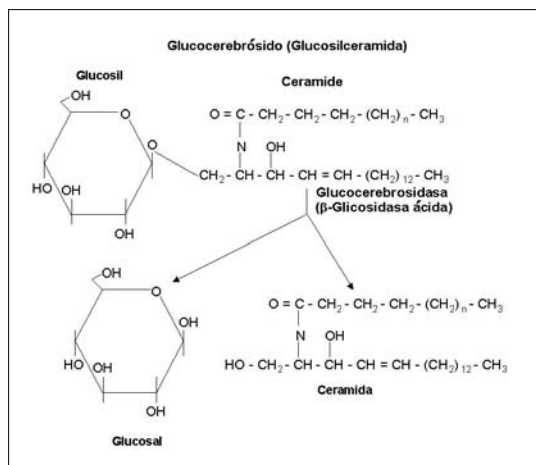


Figura 18-EL-1. Esquema en que se muestra la alteración metabólica de la Enfermedad de Gaucher.

las primeras crisis óseas, que son episodios intensos de dolor, de ubicación en caderas, rodillas o superficie de huesos largos como el fémur, y que obedecen a procesos de necrosis avascular, lesiones líticas o pequeños infartos óseos. Con el avance de los años, la visceromegalia suele estabilizarse, pero los

síntomas óseos progresan, llevando a osteoporosis, fracturas patológicas, deformación ósea y frecuentemente los pacientes tienen indicación de reemplazos articulares en edades tempranas (figura 18-EL-2). El compromiso pulmonar es inhabitual, pero constituye una causa importante de mortalidad cuando se



Figura 18-EL-2. Paciente con enfermedad de Gaucher. Paciente de 28 años, esplenectomizado, con severa enfermedad ósea, sin acceso a reemplazo enzimático. Se observa: (A) la severa alteración de la morfología de la cabeza femoral producto de una secuela de necrosis avascular, (B) la osteoporosis y deformación en frasco de Erlenmeyer en la Rx de fémur distal y (C) la infiltración medular en la Resonancia Nuclear Magnética de fémur.

presenta y debe ser monitorizada. Puede presentarse como compromiso intersticial, como consolidaciones alveolares/lobares o como hipertensión pulmonar. El compromiso neurológico puede presentarse secundario a la patología ósea (colapso vertebral, compromiso de plexos o nervios periféricos por compresión ósea) o hematológica (hematomas subdurales u otros fenómenos hemorrágicos en el sistema nervioso central).

Enfermedad Gaucher tipo II. La enfermedad de Gaucher tipo II, o forma neuronopática aguda, se manifiesta antes de los dos años de vida, con un curso rápido y progresivo, donde la presencia de signos piramidales (opistótonos, espasticidad, trismus), compromiso bulbar (estridor, trastornos de la deglución), epilepsia mioclónica y alteración de la oculomotricidad (apraxia, fallas en el inicio de la mirada sacádica, nistagmo optokinético) son característicos. Estos niños mueren habitualmente en los primeros años de vida.

Enfermedad Gaucher tipo III. La enfermedad de Gaucher tipo III, o forma neuronopática crónica, se manifiesta con signos neurológicos progresivos que pueden iniciarse antes de los dos años de vida, pero que evolucionan sin un patrón característico, donde ocasionalmente la alteración de la oculomotricidad puede ser el único síntoma detectable, constituyendo un síntoma importante a evaluar en pacientes considerados con la forma I.

Se reconocen dos formas adicionales de presentación. Una forma perinatal letal, con piel ictiosiforme (niño colodion) o como un hidrops no inmune. La forma denominada cardiovascular se presenta con calcificación de la válvula mitral y aórtica, asociada ocasionalmente a esplenomegalia leve, opacidades corneales y oftalmoplegia supranuclear.

Diagnóstico

El diagnóstico de todas las formas descritas se basa en la determinación de una actividad deficiente de la enzima glucosilceramidasa en leucocitos u otras células nucleadas. El análisis de mutaciones del gen GBA (cr 1q21) está disponible habitualmente para las mutaciones más frecuentes. Existen cuatro mutaciones de presentación más habitual (N370S, L444P, 84GG, IVS2+1) que dan cuenta del 90% de los alelos en población judío ashkenazi y de cerca de un 50-60% en población no judía, donde

usualmente se encuentra una mutación conocida y una de presentación inhabitual. El aspirado de médula ósea no se indica cuando se sospecha la enfermedad si se dispone de la actividad enzimática, sin embargo, los pacientes con Gaucher suelen ser sometidos a este procedimiento diagnóstico como parte del estudio de su pancitopenia o hepatoesplenomegalia. En este aspirado pueden reconocerse macrófagos llenos de lípidos, con un citoplasma con aspecto de seda arrugada que capta la tinción de PAS y un núcleo excéntrico, conocida como célula de Gaucher, que en ojos de un patólogo experimentado constituye un medio diagnóstico importante. Se ha descrito la presencia de pseudo-células de Gaucher en una variedad de condiciones tales como: leucemia granulocítica crónica, talasemias, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfomas plasmacitoides y SIDA (pacientes infectados por *Mycobacterium avium*).

Tratamiento

El tratamiento comprende tres aspectos importantes que deben ser llevados a cabo por un equipo multidisciplinario. Estos son la evaluación periódica, el manejo de los síntomas y la reducción de la acumulación de glicosilceramida.

Si bien la existencia de reemplazo enzimático ha evitado la aparición de muchos síntomas y por tanto ha disminuido el número de acciones orientadas al manejo de los síntomas a lo largo del mundo, existen muchos países en que los pacientes no pueden acceder al tratamiento por su alto costo. Estos pacientes sólo recibirán tratamiento sintomático, que comprende la transfusión de concentrados de plaquetas u otros hemoderivados; analgésicos para las crisis óseas; cirugías de reemplazo articular; aporte de suplementos como los bifosfonatos en pacientes con baja densidad ósea. La esplenectomía debe ser evitada ya que produce empeoramiento de los síntomas óseos, aunque sin acceso a la Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE), a veces constituye la única alternativa para manejar los síntomas secundarios al aumento de volumen del bazo o al hiperesplenismo.

El trasplante de médula ósea ha visto limitado su uso en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo I por la alta morbilidad y mortalidad del procedimiento. Sin embargo, en pacientes con la forma neuronopática crónica, pueden verse beneficiados corrigiendo el defecto metabólico

y mejorando el compromiso hematológico y visceral. En algunos pacientes se ha reportado la estabilización de la enfermedad ósea y de los síntomas neurológicos.

La enfermedad de Gaucher fue la primera enfermedad lisosomal que hace ya 12 años cuenta con TRE y ya cerca de 3.000 pacientes la han recibido a lo largo de todo el mundo. Esta aproximación terapéutica se basa en la administración de enzima recombinante, sintetizada en cultivos celulares en base a la secuencia de la enzima humana, de manera de superar el bloqueo en la vía catabólica y producir una remoción efectiva del sustrato acumulado previamente. Infusiones regulares de imiglucerasa (Cerezyme®), producen mejoría en los síntomas hematológicos y viscerales en los

primeros 6-12 meses de tratamiento (figura 18-EL-3). Esto repercute positivamente en la calidad de vida de estos pacientes, logrando disminuir el ausentismo escolar o laboral, permitiéndoles llevar una vida prácticamente normal. El compromiso óseo revierte de manera menos predecible, lo que posiblemente esté en relación con el estado óseo previo del paciente, logrando mejores efectos cuando el tratamiento se inicia precozmente. El compromiso neurológico de las formas neuronopáticas de la enfermedad de Gaucher no responden a la TRE debido a la acción de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, puede indicarse la TRE para el manejo de los síntomas no neurológicos de manera de mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

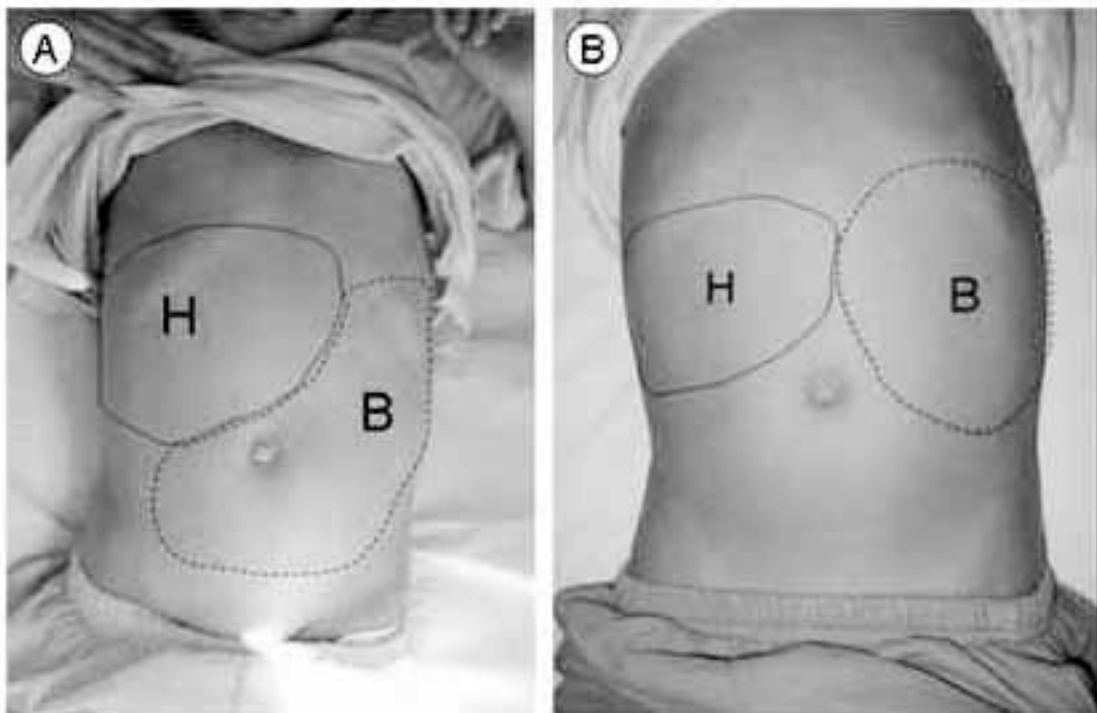


Figura 18-EL-3. Respuesta a terapia de reemplazo enzimático en la Enfermedad de Gaucher. Hepatoesplenomegalia masiva en paciente de 9 años con Enfermedad de Gaucher y la respuesta a la TRE. (A) antes y (B) después de 6 meses de tratamiento.

La terapia de inhibición de sustrato busca restaurar la homeostasis metabólica limitando la cantidad de sustrato precursor sintetizado. Durante los ensayos clínicos se han evidenciado frecuentes efectos adversos que han limitado su uso, por lo que está restringido a los casos muy ocasionales de reacciones severas de hipersensibilidad a la TRE.

La terapia génica está aún bajo investigación.

Interesantes aproximaciones han sido publicadas, pero todavía no se logra una respuesta sostenida en el tiempo para los efectos terapéuticos por parte de los modelos utilizados hasta ahora.

2.1.3. Enfermedad de Niemann Pick

La enfermedad de Niemann Pick actualmente es considerada un grupo heterogéneo de

enfermedades de herencia autosómico recesiva que, originalmente, se clasificaban clínicamente en los tipos A, B, C y D.

Fisiopatología

Hoy se reconoce que los tipos A y B de la enfermedad de Niemann Pick corresponden a desórdenes por depósito de esfingomielina por déficit de esfingomielinasa y que los tipos C y D son producidos por un defecto de la esterificación del colesterol.

Presentación clínica

La enfermedad de Niemann Pick tipo A se presenta con un inicio insidioso en los primeros meses de vida con dificultades en la alimentación e infecciones respiratorias frecuentes. La hepatomegalia es un hallazgo importante y predomina sobre la esplenomegalia, como un elemento distintivo con la enfermedad de Gaucher. El compromiso neurológico aparece característicamente luego de un período de 6 meses, con pérdida del contacto visual e hipotonía que se sucede con una paresia espástica progresiva y la aparición de síntomas extrapiramidales. En el examen oftalmológico, es posible encontrar una mancha roja cereza similar a la de las gangliosidosis hasta en un 50% de los casos y en el aspirado de médula ósea se pueden encontrar macrófagos con citoplasmas llenos de lípidos, similares a las células de Gaucher. La radiografía de tórax puede mostrar un patrón reticular, que hace confundir el diagnóstico con el de una tuberculosis miliar, pero que obedece al depósito intersticial pulmonar de esfingolípidos. Las imágenes del sistema nervioso central muestran atrofia, característicamente de predominio en cerebelo. El deterioro es progresivo y los paciente fallecen los primeros dos o tres años de vida.

La enfermedad de Niemann Pick tipo B es una enfermedad de inicio más tardío y se presenta con hepatoesplenomegalia en niños entre los 2-5 años que habitualmente no presentan compromiso neurológico. Ocasionalmente se reportan casos con ataxia y déficit cognitivo. El compromiso hematológico secundario a la pancitopenia es causa habitual de manifestaciones tales como epistaxis o equimosis ante traumas mínimos asociados a trombocitopenia. Estos pacientes presentan también compromiso pulmonar, manifestado como infecciones frecuentes u ocasionalmente

como un hallazgo en una radiografía de tórax. Con el tiempo, el compromiso pulmonar puede llevar a insuficiencia respiratoria crónica y a una *cor pulmonale*. El compromiso hepático puede avanzar hacia la cirrosis. El crecimiento de estos pacientes puede estar disminuido. Las manifestaciones de esta enfermedad pueden ser tan leves que se manifiestan en pacientes adultos, y si bien la sobrevida estará en relación a la intensidad de los síntomas, usualmente es cercana a lo normal.

Diagnóstico

Ya desde la descripción por parte de Ludwick Pick en 1927, se reconoció que las células depositadas en esta enfermedad eran diferentes a las descritas en la Enfermedad de Gaucher, por lo que se llamó a esta entidad “esplenomegalia de células lipoides”. Estas células han sido descritas en pacientes con Enfermedad de Wolman, enfermedad de depósito de esteres de colesterol, deficiencia de lipoprotein-lipasa y algunos pacientes con gangliosidosis GM1. Esta célula es más pequeña que la célula de Gaucher, mide aproximadamente 25-75 µm, usualmente tiene un núcleo, y su citoplasma está lleno de partículas o gotas de lípidos, que al ser de tamaños uniformes, dan a la célula esta característica espumosa («foamy cells»), también descrita como “en panal de abeja”. Bajo luz polarizada, estas partículas son birrefringentes, y bajo la luz UV, aparecen amarillo-verdosas o con un tono café. En secciones congeladas, estas partículas tiñen positivas para la tinción Sudan Black B. La reacción de Schultz para colesterol es positiva en la mayor parte de los casos, siendo negativa para las células de Gaucher. Otra diferencia es la pobre tinción con PAS. La característica del material intracelular azuloso en la médula ósea le da el nombre del “histiocito azul mar” («sea-blue histiocyte»). Ultra estructuralmente, la célula Niemann Pick contiene numerosas inclusiones granulares en el citoplasma. Estas inclusiones pueden aparecer como lamelares, teniendo una periodicidad de unos 50 Å y son más frecuentes a medida que avanza la edad del paciente. En contraste con las células de Gaucher, estos cuerpos de inclusión reaccionan débilmente a la fosfatasa ácida. Estas células se originan de células progenitoras de la médula ósea, por lo que es raro no encontrar al menos algunas de estas células en todos los tejidos.

El diagnóstico se basa en la determinación de

una actividad deficiente de esfingomielinasa. El estudio de mutaciones del gen ubicado en el cromosoma 11 (11p15.4-p15.1) está disponible y tiene utilidad pronóstica limitada.

Tratamiento

El manejo de la enfermedad de Niemann Pick se basa en la monitorización de los síntomas y de su progresión. Está abierta la posibilidad para el uso de la terapia de reemplazo enzimático en las formas con ausencia de compromiso neurológico, para las cuales existen estudios clínicos ya en marcha.

2.2. Otras Enfermedades Lisosomales

Existen otras enfermedades lisosomales donde el hematólogo puede jugar un rol en la pesquisa de nuevos casos o en el manejo de los mismos, que debe ser multidisciplinario. No es raro que el hematólogo sea el primero en sospechar una de estas enfermedades al examinar a un paciente referido por una pancitopenia, esplenomegalia o en el diagnóstico diferencial de leucemias o linfomas.

Tal como se mencionaba en la sección referida a Enfermedad de Gaucher, el análisis del aspirado de médula ósea suele ser de gran trascendencia para sospechar el diagnóstico, a pesar que hoy existen análisis más simples y menos invasivos para lograr la confirmación diagnóstica de estas enfermedades.

Mucopolisacaridosis

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de enfermedades que comparten la característica de una acumulación crónica y progresiva de diferentes glicosaminoglicanos que son degradados defectuosamente en los lisosomas. Según el/los glicosaminoglicanos acumulados, se determinarán los síntomas que comprenden un espectro de presentaciones, entre las cuales destacan las dismorfias faciales, las displasias óseas, las opacidades corneales, hepatoesplenomegalia, alteraciones cardíacas, anomalías neurológicas y la reducida supervivencia.

La **mucopolisacaridosis tipo I** (MPS I) presenta un espectro de presentación clínica, siendo la enfermedad de Hurler la más severa y la enfermedad de Scheie la forma más leve. La

primera representa el prototipo de todas las mucopolisacaridosis, con retraso en el desarrollo psicomotor en el primer año de vida y frecuentes infecciones respiratorias, que se suceden más adelante con el establecimiento macrocefalia, piel gruesa, opacidades corneales, hepatoesplenomegalia, displasia ósea y una serie de dismorfias faciales que dan un aspecto “en gárgola” a la cara de estos pacientes. Las alteraciones óseas llevan a retraso del crecimiento y severas deformidades de tronco y extremidades. Los pacientes con la forma severa de la enfermedad fallecen en los primeros años de vida. Los pacientes con la enfermedad de Scheie presentan síntomas leves, a veces casi imperceptibles de la misma enfermedad a pesar de compartir el mismo defecto bioquímico con los pacientes con el fenotipo severo.

La **mucopolisacaridosis tipo II** (MPS II) o enfermedad de Hunter difiere de los otros tipos por ser la única con herencia ligada al X. Se asemeja a la MPS I con la diferencia que no tiene opacidades corneales. También puede encontrarse un espectro de presentaciones desde formas severas hasta formas leves.

En la **mucopolisacaridosis tipo III** (MPS III) o enfermedad de Sanfilippo predomina el compromiso del sistema nervioso central y los síntomas somáticos suelen ser moderados. Los síntomas principales aparecen después de los 3 años de vida como pérdida de habilidades adquiridas, alteraciones de conducta y epilepsia. La hepatomegalia y las alteraciones óseas son más leves que en los otros tipos. Se reconocen cuatro variantes bioquímicas distintas, con diferencias imperceptibles clínicamente, con excepción de la tipo A que suele ser la más severa.

La **mucopolisacaridosis tipo IV** (MPS IV) o enfermedad de Morquio se caracterizan por el compromiso óseo severo que da lugar a una displasia espondiloepifisiaria, talla baja, deformidad torácica y genu valgo. Las opacidades corneales son leves y no hay dismorfias.

La **mucopolisacaridosis tipo VI** (MPS VI) o enfermedad de Maroteaux Lamy se presenta con un fenotipo similar al Hurler, pero sin compromiso neurológico (figura 18-EL-4).

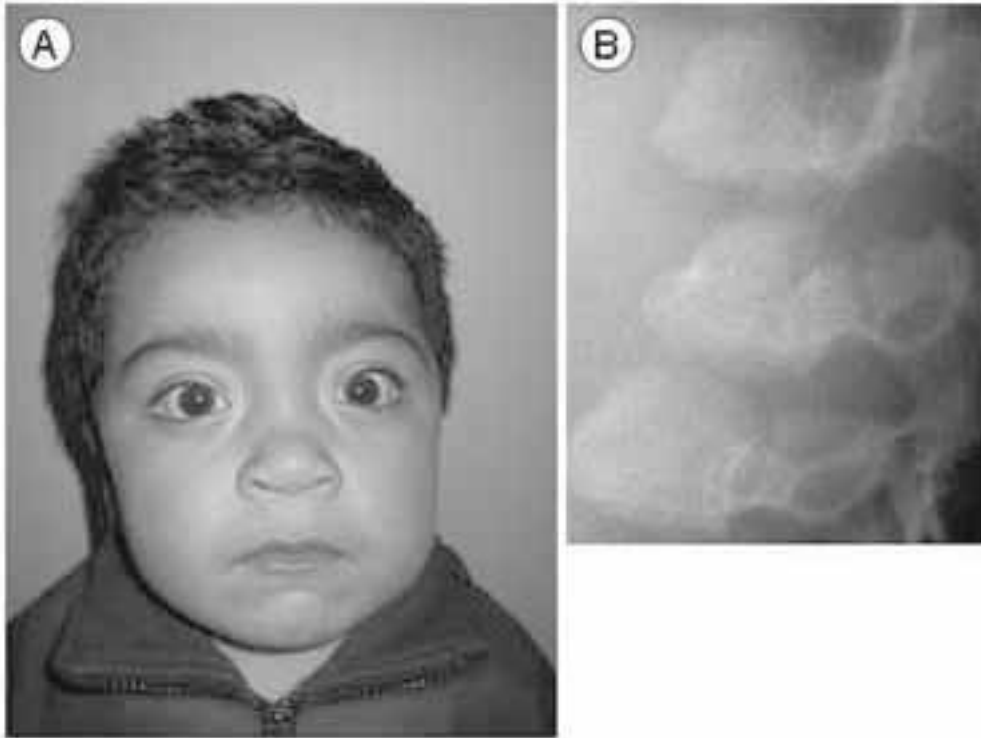


Figura 18-EL-4. Paciente con mucopolisacaridosis VI (Enfermedad de Maroteaux Lamy). (A), Paciente de 4 años con historia de infecciones respiratorias frecuentes, aparición progresiva de dismorfias faciales observadas, opacidades corneales, hipoacusia, apnea obstructiva, limitación progresiva de la marcha y disostosis múltiple. (B), En la radiografía lateral de columna dorsal, se observa la alteración en la morfología de los cuerpos vertebrales, con vértebras “en cabeza de pescado”. (Fotografía autorizada por la madre del paciente).

La **mucopolisacaridosis tipo VII** (MPS VII) o enfermedad de Sly presenta quizás el espectro más amplio de presentaciones desde el hidrops fetal a individuos prácticamente normales.

La **mucopolisacaridosis tipo IX** (MPS IX) o déficit de hialuronidasa es la forma más recientemente descrita en 1996 en una paciente aislada.

En la médula ósea de pacientes con MPS, es posible observar histiocitos que contienen gránulos metacromáticos conocidos como cuerpos de Reilly o de Alder-Reilly. Si bien esto no constituye un elemento diagnóstico importante, su hallazgo casual unido a las características descritas deben hacer plantear el diagnóstico de estas condiciones.

Dentro de las mucopolisacaridosis, la enfermedad de las células I (I-cell disease, mucopolisacaridosis II), se caracteriza por presentar características clínicas similares a la mucopolisacaridosis tipo I (enfermedad de Hurler), pero análisis normal

de mucopolisacáridos en orina. Presentan dismorfias, retardo del desarrollo psicomotor, cardiopatía (compromiso mitral y/o aórtico y miocardiopatía), disostosis múltiples, infecciones respiratorias frecuentes y muerte habitualmente en la primera década de la vida. Originalmente fue descrita en 1967 como una condición que semejaba la enfermedad de Hurler, pero en la que destacaba la presencia de numerosas inclusiones de fase densa en el citoplasma de fibroblastos provenientes de individuos afectados. Estas células fueron llamadas células de inclusión (“inclusion cells”, abreviadas como I-cells). Más tarde fueron descritas las alteraciones bioquímicas propias de esta condición. El término mucopolisacaridosis fue acuñado posteriormente para denominar un grupo de condiciones que reunían características comunes con las mucopolisacaridosis y las esfingolipidosis.

Enfermedad de Pompe

En la enfermedad de Pompe, es posible observar vacuolas de glicógeno en fibroblastos, músculo

y médula ósea, aunque prácticamente en todos los tejidos examinados en especímenes de autopsia. Estos pacientes se presentan en una forma infantil, juvenil o adulta. La forma infantil es la más característica y severa, con una hipotonía severa de inicio en el recién nacido, una lengua prominente, y un corazón con una hipertrofia concéntrica severa. Las formas tardías suelen manifestarse con alteraciones motoras en un patrón miopático y el compromiso cardíaco es mínimo o ausente.

Es posible encontrar linfocitos vacuolados en ciertas oligosacaridosis como la sialidosis, mannosidosis, fucosidosis, y en la enfermedad de Salla. Su frecuencia es baja y los fenotipos clínicos semejan a las mucopolisacaridosis.

LECTURAS SUGERIDAS

Barth, P.G. "Disorders of sphingolipid metabolism", In **Diagnosis and treatment**. Fernández, J., Saudubray, J.M., Van den Berghe, G., Inborn Metabolic Diseases, Third edition. chap. 35, Editorial Springer, Verlag, Berlin Heidelberg, 2000, pp. 401-412.

Cabello, J.F., Colombo, M. "Esfingolipidosis" En **Errores Innatos en el Metabolismo del Niño** Colombo, M., Cornejo, V. y Raimann, E.. Segunda Edición, parte 2, cap. 8, Editorial Universitaria, Chile. 2003, pp. 257-275.

Cabrera-Salazar, M.A., Novelli, E., Barranger, J.A. "Gene therapy for the lysosomal storage disorders", *Curr Opin Mol Ther*, 2002, 4:349-58

Charrow, J., Esplin, J.A., Gribble, T.J., Kaplan, P., Kolodny, E.H., Pastores, G.M., Scott, C.R., Wappner, R.S., Weinreb, N.J., Wisch, J.S. "Gaucher disease: recommendations on diagnosis, evaluation, and monitoring", *Arch Intern Med*, 1998, 158:1754-60

Mabe, P., Leistner, S., Schwartz, I., Matte, U., Giugliani, R. "Mucopolisacaridosis" En **Errores Innatos en el Metabolismo del Niño** Colombo, M., Cornejo, V. y Raimann, E. parte 1, cap. 8, Segunda Edición. Editorial Universitaria, Chile. 2003, pp. 257-275.

Orvisky, E., Park, J.K., LaMarca, M.E., Ginns, E.I., Martin, B.M., Tayebi, N., Sidransky, E. "Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype". *Mol Genet Metab*, 2002, 76:262-70

Pastores, G.M. "Gaucher disease" en GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2003. Disponible en <http://www.genetests.org>.

Patterson, M., "Niemann-Pick Disease, type C" en GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2003. Disponible en <http://www.genetests.org>.

Swaimann, K.F., "Lisosomal Diseases" In **Pediatric Neurology, Principles and Practice** Swaiman, K.F., Ashwal, S., cap 25, Third edition, Editorial Mosby. 1999, pp. 438-482.

Weinreb, N.J., Charrow, J., Andersson, H.C., Kaplan, P., Kolodny, E.H., Mistry, P., Pastores, G., Rosenbloom, B.E., Scott, C.R., Wappner, R.S., Zimran, A. "Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry". *Am J Med*, 2002, 113:112-9.

HISTIOCITOSIS

Claudio Cruzat C., Carlos Rodríguez-Galindo e Iván Palomo G.

1. INTRODUCCIÓN

El término histiocitosis se refiere a un grupo de alteraciones proliferativas de células dendríticas y/o macrófagos (neoplásicas y no-neoplásicas; malignas y de comportamiento biológico variable). El histiocito identifica un grupo de células del sistema inmune formado por la línea monocito/macrófago y las células dendríticas o accesorias. Todas ellas tienen participación en la identificación y procesamiento de antígenos. Sin embargo, mientras que la función principal de las células de la línea monocítica es la fagocitosis, el papel de las células dendríticas es exclusivamente el procesamiento y presentación de antígenos a las células efectoras, con mínima o nula capacidad fagocitaria. Estas diferencias en función son importantes para entender las desigualdades en la presentación clínica entre los distintos síndromes. Las células dendríticas incluyen, a su vez, a las células indeterminadas, los dendrocitos dérmicos, las células dendríticas interdigitantes, las células dendríticas foliculares (células reticulares dendríticas), las células reticulares fibroblásticas y a las células de Langerhans (CLs).

2. ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS HISTIOCITOSIS

Las proliferaciones de células histiocíticas y dendríticas se encuentran entre las enfermedades más infrecuentes que afectan los tejidos linfoides y hematopoyético. Ellas representan menos del 1% de los tumores que comprometen nódulos linfáticos.

Junto a los escasos datos epidemiológicos disponibles, la incidencia real de estas enfermedades se ve afectada por la similitud morfológica e inmunofenotípica entre células reticulohistiocíticas y linfoides, con pocos marcadores específicos para el linaje celular macrófagico y dendrítico, a la hora de definir el diagnóstico, y por la histórica dificultad para distinguir proliferaciones reactivas de procesos neoplásicos de estas células.

No existen diferencias sustantivas en su distribución geográfica, racial y etaria, aunque según el caso suelen ser más comunes en la

infancia.

Su etiología exacta no es conocida y, debido a su baja frecuencia, no ha habido avances significativos en este sentido, aunque se involucran aspectos genéticos e infecciones virales.

3. ONTOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LAS CÉLULAS HISTIOCÍTICAS Y DENDRÍTICAS

La mayoría de estas células se origina de células madre hematopoyéticas; durante el proceso de diferenciación migran a los tejidos periféricos. Sin embargo, fagocitos y células accesorias, se considera que representan dos líneas paralelas e independientes de diferenciación.

Los fagocitos, cuyo rol mayor es la remoción y procesamiento de partículas antigénicas, derivan de monocitos circulantes que cruzan las paredes vasculares para entrar, principalmente, a los órganos linfoides y del sistema retículoendotelial; por lo tanto, no es sorprendente que la distinción entre leucemia monocítica y sarcoma histiocítico sea difícil o ambigua. Sin embargo, los macrófagos no son células re-circulantes, por lo que la mayoría de los sarcomas histiocíticos se presenta como una masa tumoral localizada sin una fase leucémica. Los macrófagos de nódulos linfáticos tienen acentuada actividad para enzimas lisosomales, incluyendo fosfatasa ácida y esterases no específicas. Bajo ciertas condiciones, estas células pueden desarrollar actividad fagocítica; sin embargo, ésta no es una característica prominente en malignidades histiocíticas, siendo más común en proliferaciones no-neoplásicas de histiocitos, tales como el síndrome hemofagocítico. La actividad para lisozima y alfa-1-antitripsina es una cualidad de la mayoría de los macrófagos, pero disminuye con la fagocitosis y es más prominente en histiocitos epitelioides que forman granulomas.

Las células dendríticas se encuentran en cantidades traza por todo el organismo, siendo su rol principal la presentación de antígenos a los linfocitos. Muchas de ellas, con diferencias sutiles en su fenotipo, han sido descritas en sangre, piel y órganos linfoides. Derivan de un precursor hematopoyético CD34+. En cultivos celulares *in vitro*, bajo la acción de GM-CSF y TNF α , hacia el 3 – 5 día, una célula CD34+ forma dos poblaciones celulares, una CD1a+/CD14- y otra CD14+/CD1a-, siendo la segunda la más predominante. Hacia el día 7, el 3 al 8% del total de las células se hace doblemente positiva

(CD1a+/CD14+), alcanzando esta condición el 20 – 38% de las células entre el día 8 y 10. La aparición de esta subpoblación doblemente positiva, se correlaciona con la desaparición progresiva de la línea celular CD14+/CD1a-, sugiriendo que esta población ha ido adquiriendo el marcador CD1a. Hacia el día 10 – 12, la población doblemente positiva comienza a desaparecer, y el día 14 la mayoría de las células expresan poca cantidad de CD14, manteniendo la expresión de CD1a. Ambas poblaciones celulares CD1a y CD14+, expresan niveles distintos de una serie de marcadores CD y HLA-II. Así CD1b y CD1c se expresan en más altos niveles en las células CD1a+ que en las células CD14+. Inversamente, CD11b, CD32 y CD36 son más intensamente expresados en las células CD14+ que en las células CD1a+. La molécula CD72 únicamente se expresa en las células CD1a+, mientras que CD2, CD9 y el receptor para M-CSF lo hace en las células CD14+. Hacia el día 14 las características fenotípicas de estas poblaciones celulares, cambia. Las células CD1a+ expresan bajos niveles de CD72 y altos niveles de E-caderina, una molécula expresada en las CLs, comprometida en la interacción entre éstas y los queratinocitos. También expresan el antígeno Lag (gránulo asociado a Langerhans). Por el contrario, las células CD14+ presentan bajísimos niveles de CD72, Lag, y E-caderina, expresando en forma exclusiva CD9, CD2, CD68, factor XIIIa. Hacia el día 13 – 14 las células CD1a+, presentan los gránulos de Birbeck. Finalmente, los precursores CD1a+ producen las típicas CLs en la epidermis, caracterizadas por la expresión de CD1a+, gránulos de Birbeck, antígeno Lag, y E-caderina, mientras que los precursores CD14+ producen células dendríticas halladas en sangre y epidermis, expresando el factor XIIIa, CD68, CD9 y CD2. Por otro lado, las células CD14+/CD1a-, que expresan el receptor para M-CSF, en presencia de este factor estimulador disminuyen la expresión de CD2, CD40, CD80 y CD83, y más aún de los CD86, HLA-DR y HLA-DQ, expresando a su vez altos niveles de CD9 y CD11b. Este cambio fenotípico también lleva a un cambio morfológico de estas células, las cuales adquieren la morfología de macrófago.

Las células dendríticas derivadas de las poblaciones celulares CD1a+/CD14- y CD14+/CD1a-, poseen la capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T CD45RA+.

Las células dendríticas interdigitantes (CDI) y las células de Langerhans (CL) “presentan”

antígenos a los linfocitos T.

Las células dendríticas foliculares (CDF), cuyo origen parece ser no-hematopoyético (célula madre pluripotencial mesenquimática), presentan antígenos a linfocitos B. Ellas atrapan y almacenan complejos antígeno-anticuerpo en organelos denominados icosomas, pudiendo permanecer almacenados en esta condición por muchos años. Debido a la retención antigénica en la superficie celular, se produce un estado prolongado de reacción al antígeno, que es relevante en la memoria inmunológica.

Las células reticulares fibroblásticas (CRF) son de origen más bien mesenquimático que hematopoyético, expresan actina músculo liso, y están involucradas en el transporte de citoquinas y otros mediadores. Debido a su origen mesenquimal, las neoplasias de FRCs no son incluidas en la clasificación OMS sobre tumores linfoides y hematopoyéticos. Sin embargo, deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial de neoplasias de origen en IDCs y FDCs.

4. MORFOLOGÍA, LOCALIZACIÓN E INMUNOFENOTIPO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E HISTIOCÍTICAS

Las células dendríticas e histiocíticas se encuentran presentes, en pequeñas cantidades, en todo el organismo, principalmente en órganos del sistema reticuloendotelial sangre y piel. Morfológicamente, muchas de ellas muestran similitud con elementos celulares mieloides y linfoides, con algunos marcadores inmunofenotípicos comunes a linfocitos, aunque en general no expresan receptores de células T ni reordenamiento génico de inmunoglobulinas, siendo así problemática la detección de clonalidad en el diagnóstico de rutina.

Los **macrófagos**, en nódulos linfáticos, se ubican a nivel sinusal, paracortical y en centros germinales. Son células grandes con bordes mal definidos; el citoplasma fuertemente basófilico no pironinófilico ayuda a distinguir histiocitos de células linfoides grandes.

Su forma irregular es producto de procesos pseudopódicos y semejan células reticulares. Los fagocitos tienen abundantes lisosomas primarios y secundarios junto a un gran complejo de Golgi. Dependiendo de su estado reactivo, pueden incluir numerosos fagosomas y cuerpos extraños. El núcleo es oval o hendido, de cromatina fina y nucléolo inconspicuo. Su

inmunofenotipo es: Fc y R(+), CD21(+), CD4(+), CD68(+), Lisozima(+), Fagocitosis(+), esterasas no-específicas (+), CD3(-), y CD20(-).

Las **células dendríticas interdigitantes** están presentes fundamentalmente en el paracortex de los ganglios linfáticos. Son células grandes con núcleos profundamente indentados y nucléolo inconspicuo; el citoplasma es abundante, pálido y mal definido. Cuando se encuentran en gran cantidad, producen un aspecto moteado en el área paracortical. Al igual que las células de Langerhans, de las cuales parecen originarse, contienen gránulos intracitoplasmáticos de Birbeck que son visibles bajo el microscopio electrónico. Su inmunofenotipo es: HLA-DR(+), prot S-100(+), CD21(-), CD4(-), CD3(-), y CD20(-).

Las **células dendríticas** foliculares se encuentran en centros germinales de folículos linfoides y constituyen una red caracterizada por complejas prolongaciones celulares unidas por desmosomas. El citoplasma de estas células no es discernible por microscopía de rutina y su núcleo es grande e irregular con inconspicuo nucléolo. Su inmunofenotipo es: HLA-DR(+), prot S-100(-), CD21(++), CD4(-), CD3(-), y CD20(-).

Las **células de Langerhans** son células dendríticas que residen principalmente en la piel, dentro del estrato suprabasal del epitelio escamoso, y constituyen cerca del 4% de las células epidérmicas. Las CLs también pueden ser encontradas en otros sitios, incluyendo: boca, esófago, pulmón, cerviz, dermis, timo y ganglios linfáticos. Estas células miden entre 10-20 mm, y son reconocidas histológicamente por su núcleo hendido o lobulado de cromatina fina e inconspicuo nucléolo, y citoplasma amplio suavemente acidófilo. Su inmunofenotipo es: CD1a(+), prot S-100(+), CD4(+), CD21(-), CD3(-), y CD20(-).

5. CLASIFICACIÓN DE LA HISTIOCITOSIS

Las histiocitosis fueron descritas por primera vez en 1865, con la caracterización de los primeros casos de histiocitosis de células de Langerhans. Desde entonces, una mejor comprensión de la patogénesis y una mejor caracterización de los diversos síndromes, ha dado lugar a la identificación de las histiocitosis como un grupo de enfermedades con un amplio espectro de presentación clínica y severidad. La Sociedad de Histiocitosis, en conjunto con el Comité de Proliferaciones de Células Reticulares/

Histiocíticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), reclasificó este grupo de enfermedades en 1997.

Debido a que el origen de las Histiocitosis, neoplásico o reactivo, no está claro, se les separa en dos grupos: las de comportamiento biológico variable y las verdaderamente malignas. Luego cada una de las dos categorías se subdivide en afiliación con células dendríticas, macrófagos, y monocitos, esta última en la categoría maligna (tabla 18-H-1). Sólo se tratarán los desórdenes no malignos que vinculan a las células dendríticas y macrófagos, por considerar al resto como tema relacionado con Leucemias y Linfomas.

6. AFECCIONES RELACIONADAS CON LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

6.1. Histiocitosis de Células de Langerhans

Desde su descripción original en el siglo XIX hasta 1983, en que se le denomina «Histiocitosis de células de Langerhans», esta histiocitosis ha recibido varias denominaciones: enfermedad de Hand-Schuller-Christian, enfermedad de Letterer-Siwe, granuloma eosinófilico óseo, e histiocitosis X.

La Histiocitosis de Células de Langerhans (HCL), es una enfermedad actualmente definida como una acumulación o proliferación de una población clonal de células con fenotipo similar al de las CL, que ha sido arrestada en un estado temprano de activación y que es funcionalmente deficiente. Esta enfermedad puede manifestarse como una lesión solitaria de hueso, con remisión espontánea, o con compromiso multisistémico que amenaza la vida del paciente. Afecta a hombres y mujeres por igual, a cualquier edad, pero es más frecuentemente diagnosticada en niños (50% de los casos).

Aunque existe cierta confusión relativa a una nomenclatura universalmente aceptada, la HCL es un término que abarca las denominaciones clásicas de Granuloma Eosinófilo, la enfermedad de Hand-Schuller-Christian y la enfermedad de Letterer-Siwe. Sin embargo, el espectro clínico de las HCL no se limita a los síndromes clásicos; estas afecciones representan variaciones en la localización y extensión del compromiso por un mismo proceso patológico.

Las lesiones solitarias de hueso, son halladas frecuentemente en niños de entre 5 y 15 años de edad, y la HCL multisistémica en niños menores de 2 años.

Tabla 18-H-1. Clasificación actual de las alteraciones histiocíticas

Alteraciones con comportamiento biológico variable

Relacionadas con célula dendríticas

- Histiocitosis de células de Langerhans
- Procesos secundarios de células dendríticas
- Xantogranuloma juvenil y alteraciones asociadas
- Histiocitomas solitarios de células dendríticas con fenotipos variables
- Tumor de células Dendríticas, de fenotipo específico: interdigitantes, foliculares

Relacionadas con macrófagos

- Síndromes hemofagocíticos
- Linfohistiocitosis hemofagocítica primaria (familiar y esporádica producida por infecciones virales)
- Síndromes hemofagocíticos secundarios
 - Asociados a infección.
 - Asociados a procesos malignos
 - Otros
- Enfermedad de Rosai-Dorfman (histiocitosis sinusal con adenopatías masivas)
- Histiocitoma solitario con fenotipo de macrófago

Alteraciones malignas

Relacionadas con monocitos

- Leucemias (clasificación FAB)
- Leucemia monocítica M5 a y b
- Leucemia mielomonocítica M4
- Leucemia mielomonocítica crónica
- Tumor o sarcoma monocítico extramedular

Relacionadas con células dendríticas

- Sarcoma histiocítico relacionado con la célula dendrítica (localizado o diseminado) de fenotipo específico: célula dendrítica folicular, célula dendrítica interdigitante, etc.
- Sarcoma de células dendríticas, sin otra especificación (NOS)

Relacionadas con el macrófago

- Sarcoma histiocítico relacionado con el macrófago (localizado o diseminado)

La prevalencia es de 2 a 5 por 1.000.000 de niños.

En contraste con las CLs normales, las células de la HCL se encuentran en continua proliferación, expresando ciertos marcadores antigénicos. En las lesiones se encuentra una población monoclonal de histiocitos CD1a+, con fenotipo similar al de CL. Otras células presentes en la lesión son linfocitos T, macrófagos y eosinófilos.

Estudios de clonalidad de estas células CD1a+, podrían indicar que la HCL es un desorden neoplásico con comportamiento biológico variado y no necesariamente refleja un proceso maligno.

Tanto la morfología de las lesiones, como los

signos y síntomas clínicos sugieren que las citoquinas pueden jugar un rol importante en la patogénesis de la enfermedad. Recientes estudios han demostrado una alta expresión de variadas citoquinas en las lesiones de la HCL, la mayoría son producidas por células T, sugiriendo un importante rol de estas células en la enfermedad. Varias de estas citoquinas contribuyen de manera directa a las secuelas patológicas de la HCL, ya que contribuyen a la fibrosis, resorción ósea y necrosis.

La principal manifestación de la HCL es la acumulación de CLs, parcialmente activadas, en tejidos tales como la piel o hueso, lo que hace sospechar de un problema a nivel de tráfico celular. Un modelo que intentaría explicar la migración normal de estas células hacia los órganos linfoides, indica que las CLs en forma

fisiológica expresan el receptor CCR6, cuyo ligando es la proteína MIP-3 α /CCL20, la cual es secretada por los queratinocitos cutáneos en casos de inflamación. Cuando las CLs son atraídas por el aumento de la expresión de MIP-3 α /CCL20, son activadas por mediadores inflamatorios locales, que hacen disminuir la expresión del receptor CCR6 y estimulan la expresión de un nuevo receptor denominado CCR7, cuyos ligandos (ELC)/CCL19 y (SLC)/CCL21 son expresados por órganos linfoides. Recientemente se demostró que las CLs de la HCL coexpresaban ambos receptores, CCR6 y CCR7. Por lo tanto la expresión de MIP-3 α /CCL20 por los queratinocitos, comprometería a la piel, y por macrófagos y osteoblastos, comprometería a los huesos. Mientras que la expresión de (ELC)/CCL19 y (SLC)/CCL21 por los órganos linfoides, comprometería a los mismos en la enfermedad. En otras enfermedades histiocíticas también se ha observado una coexpresión de ambos receptores, lo que sugeriría que esto es una característica general de las histiocitosis.

El número de CLs aumenta en los ganglios linfáticos de los pacientes con enfermedades virales, lo que sugeriría que la HCL representaría una reacción contra algún virus.

Manifestaciones clínicas

La HCL puede afectar a varios órganos diferentes, incluyendo la piel, el sistema óseo, nódulos linfáticos, glándula pituitaria, sistema nervioso central (SNC), hígado, bazo, tracto gastrointestinal, pulmón y médula ósea.

El compromiso de la piel se ha observado en más del 50% de los niños con HCL, y en cerca del 10% los casos se reporta como el único sitio afectado. A menudo constituye la primera manifestación de la enfermedad. Cualquier parte de la piel puede ser afectada. Las lesiones son escamosas y eritematosas parecidas a la dermatitis seborreica, a veces dolorosas al tacto.

El sistema esquelético es el más frecuentemente afectado; aproximadamente el 90% de los pacientes desarrollan lesiones óseas durante el curso de la enfermedad. El signo más común de compromiso óseo es la inflamación con dolor, siendo los huesos del cráneo los más frecuentemente afectados, seguidos por los huesos largos de la extremidad superior, y otros huesos planos como las costillas, pelvis y vértebras.

El compromiso óseo en algunos casos puede ser encontrado en forma fortuita en radiografías óseas, con lesiones de tipo osteolítico.

El compromiso de ganglios linfáticos puede deberse a reacciones de lesiones óseas o de la piel, sin embargo puede estar circunscrita a uno o más nódulos linfáticos. Los sitios comúnmente afectados son las áreas cervicales y la ingle, pero pueden estar afectadas otras áreas.

Una de las manifestaciones tardías más reconocidas es la diabetes insípida, que ocurre en alrededor del 25% de los pacientes, generalmente de modo tardío, muchas veces sin relación con la presencia de enfermedad activa. En años recientes, sin embargo, ha quedado claro que la diabetes insípida es solamente una manifestación más de un complejo compromiso del sistema nervioso central. Las lesiones de la HCL tienen predilección por el eje hipotalámico/hipofisario, lo que provoca alteraciones de comportamiento, apetito, regulación de la temperatura, diabetes insípida, retardo en el crecimiento, deficiencia en la producción de hormona tiroidea, pubertad precoz o retardada, amenorrea, etc. En estos casos, los estudios de resonancia magnética muestran una típica imagen de infiltración del tracto hipotálamo-hipofisario, así como ausencia del típico punto brillante en la neurohipófisis. Una minoría de pacientes desarrolla un complejo síndrome degenerativo caracterizado por ataxia y, en algunos casos, regresión intelectual. Este síndrome degenerativo suele ocurrir tardíamente, típicamente varios años después de terminar el tratamiento, y no parece asociarse a enfermedad activa. Las biopsias del cerebelo en estos pacientes no muestran infiltración de CLs, pero revelan una gliosis progresiva, que conduce a una atrofia cerebelar. La afectación del sistema nervioso central suele estar en relación con enfermedad sistémica o múltiples recurrencias de enfermedad polioestótica.

La hepatomegalia puede ser primaria o secundaria al aumento de tamaño de los ganglios linfáticos en la vena porta. La ascitis causada por la hipoalbuminemia es un signo clínico de disfunción hepática, la cual también puede manifestarse por ictericia y prolongación del tiempo de protrombina. En casos de afectación hepática severa, se produce fibrosis de las vías biliares que da lugar a colangitis esclerosante. En esos casos, la hepatopatía progresa independientemente de la actividad

de la HCL; y en muchos casos es irreversible y requiere un trasplante hepático. La esplenomegalia suele ocurrir casi exclusivamente en pacientes con afectación sistémica, y puede estar asociada a una o más citopenias.

Con respecto al tracto gastrointestinal, los síntomas y signos más comunes, son los vómitos, diarrea (con o sin sangre), mala absorción, etc.

El compromiso pulmonar puede darse en forma aislada o como parte de una HCL multisistémica en pacientes de menos de 2 años. La forma aislada es casi exclusiva de los adultos, y está relacionada con el consumo de tabaco. Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar la asociación entre la HCL pulmonar y el tabaquismo. El humo del cigarro induce la secreción de péptidos de células neuroendocrinas pulmonares (péptidos “semejantes a bombesina”) y de glucoproteínas. Estos pueden promover la secreción de citoquinas, estimulando histiocitos y fibroblastos, lo que parece preceder a la fibrosis pulmonar. En estos casos, la enfermedad suele regresar al suspender el consumo de tabaco.

Se manifiesta por una taquipnea con hundimiento de las costillas y tos no productiva. Los estudios radiológicos muestran infiltrados difusos en etapas tempranas de la enfermedad y un patrón en “panal de abejas” con grandes bulas, e incluso neumotórax en etapas más avanzadas; en etapas tardías hay cambios de enfisema y fibrosis intersticial. De manera similar a los cambios a largo plazo que ocurren en el hígado (y en cierta manera en el eje hipotalámico/hipofisario), la progresión de la fibrosis puede ser independiente de la presencia de enfermedad activa. Es importante reconocer que la HCL pulmonar aislada de los adultos no es una enfermedad clonal como el resto de síndromes; es claramente reactiva y en la próxima clasificación de la Sociedad del Histiocito, esta forma clínica va a ser excluida del grupo de las histiocitosis.

Las CLs no parecen ser un constituyente normal de la médula ósea, aunque otras células dendríticas pueden hallarse. La pancitopenia tiene un origen multifactorial. Por un lado, si bien puede no haber una infiltración franca de la médula ósea por CL, existe disfunción hematopoyética, seguramente como consecuencia de la disregulación inmunológica. Por otra parte, las alteraciones hematológicas

están asociadas con la hepatoesplenomegalia. La afectación del sistema hematopoyético tiene un claro valor pronóstico adverso.

Los pacientes con enfermedad localizada (piel, hueso, nódulo linfático) tienen buen pronóstico, y la mayoría de las veces no requieren ningún tratamiento. Por otro lado los que presentan compromiso multisistémico, generalmente niños de menos de 2 años, tienen peor pronóstico. Debido a la variedad de presentaciones clínicas y de comportamiento biológico, la Sociedad del Histiocito ha propuesto un sistema de estadiaje en el que se incluyen el número de órganos (enfermedad unisistémica o multisistémica) y el compromiso de los llamados órganos de riesgo (sistema hematopoyético, hígado, bazo, y pulmón). Pacientes con afectación de uno de estos cuatro sistemas son considerados de alto riesgo y requieren tratamiento más intensivo. Si bien clásicamente la edad (menos de 2 años) ha sido considerada un factor de pronóstico adverso, los resultados del estudio LCH-II demuestran que no lo es como factor independiente.

Diagnóstico

Todo paciente con sospecha de una HCL, debe ser sometido a una gran variedad de exámenes de laboratorio y de imagenología. Inicialmente se debe hacer una evaluación clínica del paciente (temperatura, peso, talla, presencia de linfadenopatías, lesiones de encías, tamaño del hígado y bazo, fiebre, anorexia, diarrea, rash cutáneo, falta de crecimiento, etc.). Las pruebas de laboratorio mínimas que se requieren son: Hemograma/VHS, niveles de: hierro sérico, transferrina, ferritina sérica, perfil hepático y renal, pruebas de coagulación, radiografías de tórax y de esqueleto, y osmolaridad urinaria. Si hay evidencia de una HCL multisistémica se requiere de aspiración de médula ósea con tinción para CD1a y tipificación HLA.

De acuerdo a los resultados de laboratorio y antecedentes clínicos se prosigue con otros exámenes más específicos: Tomografía computacional (TC) de alta resolución, pruebas de función respiratoria, biopsia pulmonar y un lavado bronco alveolar, biopsia intestinal, biopsia hepática, imágenes de resonancia magnética (IRM)), evaluación neurológica y test psicológicos, pruebas para evaluación endocrina, radiografías dentales, audiograma.

El diagnóstico definitivo de HCL se basa en pruebas inmunohistoquímicas de biopsias que

revelan la positividad para CD1a o microscopia electrónica que muestra la presencia de gránulos de Birbeck. Una histología compatible, con positividad para CD1a es diagnóstica de HCL; no es necesario realizar microscopia electrónica en esos casos.

Para realizar un buen diagnóstico es importante tomar una biopsia adecuada, fijando el tejido

en medio propicio. La mayoría de los anticuerpos anti-CD1a necesitan de tejidos frescos y congelados. Para evitar realizar nuevas biopsias, el tejido obtenido debe ser repartido en bloques para congelar unos, conservar otros y estudiar por microscopia electrónica los restantes. Otros marcadores de CLs, incluyendo los ya nombrados se indican en la (tabla 18-H-2).

Tabla 18-H-2. Fenotipo de Células de Langerhans y Células de la HCL

Marcador	Normal	Células de Langerhans	
		Activada	Células HCL
HLA DR	+	+	+
CD1a	+	+	+
Gránulos de Birbeck	+	+	+
CD4	-	+	+
B7	-	+	+
Receptor IL-2	-	+	+
S100	+	+	+

HCL, Histiocitosis de Células de Langerhans

Tratamiento

El tratamiento que reciben los pacientes depende del tipo de compromiso orgánico que presentan, basándose en pruebas de laboratorio y número de órganos comprometidos. Así los enfermos se pueden clasificar en tres grupos: (a) pacientes con riesgo multisistémico (afectación de órganos de riesgo), (b) pacientes con bajo riesgo multisistémico (sin afectación de órganos de riesgo), y (c) pacientes con compromiso de un solo sistema "Enfermedad multifocal ósea" y con compromiso localizado "sitio especial". La definición de sitio especial incluye la afectación de cuerpo vertebral con compromiso radicular, y pacientes con enfermedad de cráneo, en un grupo de huesos del macizo facial que han sido considerados de mayor riesgo de desarrollar enfermedad en el sistema nervioso central.

Según el compromiso orgánico se utilizan protocolos quimioterapéuticos. Para pacientes con enfermedad ósea solitaria, el curetaje de la lesión es suficiente. Pacientes con enfermedad ósea multifocal requieren tratamiento sistémico. Generalmente, un tratamiento con prednisona y vinblastina por 6 meses es efectivo. El protocolo actual de la Sociedad del Histiocito (LCH-III) recomienda tratamiento con una

inducción de 6 semanas con prednisona diaria y vinblastina semanal, seguida de un tratamiento de mantenimiento con pulsos de vinblastina y prednisona cada tres semanas hasta completar 6 meses. Pacientes con enfermedad multisistémica de bajo riesgo (sin afectación de los órganos de riesgo anteriormente nombrados) son curables con el mismo tratamiento de prednisona y vinblastina. El problema en estos pacientes es la alta incidencia de recaídas (entre un 30 y un 40% de casos), por lo que pueden ser indicados tratamientos más prolongados. El protocolo LCH-III está randomizando a los pacientes a recibir tratamiento por 6 ó 12 meses. Para los pacientes con enfermedad multisistémica de alto riesgo es necesario un tratamiento más agresivo, dado que la mortalidad es cercana al 40%. En el protocolo LCH-II se evaluó de manera randomizada la incorporación de etopósido a un tratamiento basado en prednisona, vinblastina, y 6-mercaptopurina. Los resultados de dicho protocolo no demostraron ninguna ventaja de la adición de etopósido. En el protocolo actual LCH-III, estos pacientes van a ser randomizados a recibir metotrexate, a dosis intermedias durante la inducción, y a dosis bajas durante el mantenimiento, junto a un esquema clásico de prednisona, vinblastina, y 6-mercaptopurina.

El tratamiento de los pacientes en recaída depende del grado de afectación. Para pacientes con recaídas óseas, un tratamiento similar al recibido inicialmente todavía puede ser efectivo. Otra alternativa es la administración de dosis bajas semanales de metotrexate con 6-MP diaria. Debido a que las lesiones líticas óseas son debidas en parte a la activación de los osteoclastos por la liberación de citoquinas, el uso de indometacina o bifosfonatos ha demostrado ser eficaz. Para pacientes con múltiples recaídas, o pacientes con enfermedad multisistémica, la 2-clorodeoxiadenosina, sola o combinada con ara-C, puede inducir remisiones. Finalmente, debido al origen hematopoyético de las células de Langerhans, el trasplante de alogénico de células madre debe ser considerado en aquellos casos refractarios.

6.2. Proceso secundario de células dendríticas

No todas las proliferaciones de las células dendríticas, particularmente de las CLs, son HCL. CLs reactivas han sido descritas en nódulos linfáticos afectados con linfomas malignos, en timo con miastenia gravis, y en asociación con otros tumores. Esta observación no tiene relevancia clínica ya que no existe una propagación de CDs en otros órganos.

6.3. Xantogranuloma juvenil y afecciones asociadas

El xantogranuloma juvenil (JXG), es una afección familiar auto-curativa, de muy baja frecuencia, que se presenta en la infancia. Se manifiesta por compromiso cutáneo semejante a la HCL y puede presentar múltiples nódulos subcutáneos, no asociados a problemas de colesterol. La histopatología está caracterizada por un componente formado, en proporciones variables, de histiocitos (algunos de los cuales son xantomatosos) y por células gigantes tipo Touton. Estas lesiones han sido asociadas con otras patologías tales como Neurofibromatosis, Leucemia Mieloide Crónica, HCL y rara vez en la Enfermedad de Rosai-Dorfman. El fenotipo de las células encontradas en estas lesiones generalmente es S100-, Fascina +, Factor XIIIa +, CD68 +, Ki-M1P + y CD1a -.

Algunos reportes han informado que el JXG puede afectar a tejidos profundos, y al igual que otras dolencias sistémicas compromete múltiples sitios incluyendo vísceras. El JXG puede ser diagnosticado por los hallazgos histopatológicos, y confirmados por la característica fenotípica anteriormente descrita.

6.4. Histiocitomas solitarios de células dendríticas con fenotipos variables, dendrocitomas

Son lesiones de la piel, formadas por células de fenotipo indeterminado, generalmente descritos en adultos. Se han reportado dos formas clínicas. La primera es una lesión localizada en el tejido subcutáneo que es curada por escisión. La segunda es una lesión menos circunscrita, o manifestada por múltiples nódulos que progresan con serias consecuencias. Esta última forma ha sido encontrada principalmente alrededor de la cabeza, cuello e intracranalmente.

Las lesiones a primera vista se parecen mucho a las lesiones de la HCL, pero el fenotipo es diferente. Las células son CD1a+, con escaso o ningún gránulo de Birbeck, y variablemente son S100+, CD68+ y Factor XIIIa+, expresando fuertemente fascina.

7. AFECCIONES RELACIONADAS CON LOS MACRÓFAGOS

7.1. Síndromes hemofagocíticos

Son síndromes caracterizados por la proliferación de células mononucleares fagocíticas no malignas: monocitos y macrófagos que se mezclan con linfocitos en todo el sistema fagocítico mononuclear (SFM) (médula ósea, bazo, hígado y ganglios linfáticos).

Su presentación clínica más característica es: fiebre prolongada, hepatoesplenomegalia y citopenias. Pueden aparecer síntomas neurológicos.

La principal forma de este síndrome es la **Linfohistiocitosis Hemofagocítica Familiar** (LHF), que se presenta comúnmente durante los primeros meses de vida y que tiene una supervivencia promedio, sin tratamiento, de 2 meses desde el comienzo de la enfermedad. Es de herencia autosómica recesiva, y se caracteriza por un síndrome hiperinflamatorio severo con activación de macrófagos y linfocitos T. En el origen del síndrome se encuentra una deficiencia severa de la actividad de las células "natural killer" y los linfocitos citotóxicos. Se distinguen tres tipos de LHF (tipos 1 – 3). En un 30-40% de los pacientes, esta deficiencia es debida a una mutación del gen de la perforina (LHF tipo 2). La perforina se colocaliza con la granzima B en los gránulos de las células citotóxicas, y es secretada en el momento de la interacción entre la célula diana y la célula

efectora. La perforina es una proteína similar a las proteínas del complejo del complemento, que da lugar a la formación de poros en la célula diana, ocasionando muerte celular por osmosis y la entrada de la enzima proteolítica granzima B. Su patrón de transmisión es de tipo autosómico recesivo, los portadores suelen tener niveles inferiores de perforina, pero ello no resulta en disfunción inmunológica. En un 30-35% de los casos, existe una mutación del gen *hMunc 13-4* (LHF tipo 2). *Hmunc 13-4* es esencial en el proceso de formación de los gránulos citotóxicos que precede a la fusión de la vesícula con la membrana, y su deficiencia da lugar a una exocitosis granular deficiente. En el 30-40% restante de casos, la base molecular de la enfermedad no se conoce (LHF tipo 1). Como resultado de estos déficit, los pacientes suelen desarrollar una reacción hiperinflamatoria compensatoria (y por falta de retroalimentación negativa), generalmente en respuesta a una infección durante los primeros meses de vida, lo cual da lugar a una hiperactivación de los macrófagos. Dicha activación macrofágica resulta en una infiltración de órganos y hemofagocitosis. Por otra parte, la liberación descontrolada de citoquinas, como IL-2 e interferones causa elevada fiebre, fallo capilar (edema, derrames pleurales, ascitis) y fallo hepático.

Una segunda forma es el llamado **Síndrome Hemofagocítico asociado a virus (SHAV)**, que puede afectar a todas las edades y que al igual que la LHF, está asociado a una alta mortalidad. Se caracteriza por tener como antecedente una infección generalmente viral (Epstein Barr, Citomegalovirus, Adenovirus). En este caso, la infección viral no controlada da lugar a una activación mantenida del sistema macrofágico.

De manera similar al SHAV, existen otros síndromes hemofagocíticos secundarios a otras enfermedades, principalmente enfermedades neoplásicas.

Epidemiología. Alrededor del 70% de los pacientes con LHF la desarrolla antes del año de edad. La incidencia ha sido estimada en 1.2 por 1.000.000 de niños nacidos vivos, por año, afectando a hombres y mujeres por igual. El SHAV y los síndromes secundarios suelen aparecer más tardíamente.

Signos y síntomas comunes. Los hallazgos más comunes de los Síndromes Hemofagocíticos son la fiebre alta y la hepatoesplenomegalia. También se describen adenopatías, rash cutáneo, ictericia y edema. Una proporción

importante de niños con LHF desarrollan afectación del sistema nervioso central, caracterizada por estupor progresivo, y en algunos casos meningismo. La incidencia de afectación del sistema nervioso central es mayor en aquellos pacientes en los que el diagnóstico no se realiza a tiempo.

Laboratorio. Al comienzo la enfermedad se caracteriza por las citopenias (trombocitopenia, anemia y en menor grado neutropenia).

El aumento de la actividad de las transaminasas hepáticas indica la infiltración hepática de la enfermedad así como la toxicidad de la hipercitoquinemia sobre el parénquima hepático. Es muy típica la elevación de la dehidrogenasa láctica, cuya monitorización es muy importante para evaluar la respuesta al tratamiento y anticipar recaídas. Es muy típico de los síndromes hemofagocíticos la presencia de hipertrigliceridemia, que es secundaria a la inhibición de la lipoprotein lipasa por los elevados niveles de interferón. Otros hallazgos séricos incluyen aumento de ferritina, hiponatremia y disminución de proteínas como la albúmina. Una proporción importante de pacientes presentan pleocitosis. Con el transcurso de la enfermedad aparecen los problemas de coagulación, producto, principalmente, de la hipofibrinogenemia. El hallazgo de ausencia de función de células NK es diagnóstico de la enfermedad.

Histopatología y Citología. El principal hallazgo es una acumulación linfocítica, no maligna, en el SFM. Los histiocitos aparecen activados y la hemofagocitosis es un hallazgo esencial, pero no específico. La hemofagocitosis más comúnmente afecta a los eritrocitos pero también ocasionalmente a las plaquetas y a los leucocitos. Los órganos más frecuentemente comprometidos son el hígado, bazo, nódulos linfáticos, médula ósea y SNC. No hay hallazgos histológicos y/o citológicos que sean específicos de un Síndrome Hemofagocítico. El diagnóstico se basa en investigaciones clínicas y de laboratorio, incluyendo estudios de la actividad de células NK, y estudios genéticos. Si en una primera observación de médula ósea no hay evidencia de hemofagocitosis, no se debe excluir la posibilidad de un Síndrome Hemofagocítico.

Diagnóstico diferencial. Generalmente se plantea diagnóstico diferencial para leucemias, linfomas, anemia aplásica, y síndromes mielodisplásicos. Por otro lado, existen enfermedades que pueden desarrollar un síndrome macrofágico activo debido

a fallos en el sistema de inmunidad celular, tales como el Síndrome Linfoproliferativo ligado a X, el Síndrome de Chédiak-Higashi y el Síndrome de Griscelli.

El diagnóstico se basa en los hallazgos clínicos, de laboratorio e histopatológicos. Es importante destacar que el diagnóstico en los síndromes hemofagocíticos es ante todo de sospecha. Es común que la primera examinación de la médula ósea no revele hemofagocitosis. De hecho, es más efectiva la biopsia hepática que el aspirado de médula ósea. Desafortunadamente, la

situación clínica de estos pacientes es tal que no está indicada la biopsia hepática. Por lo tanto, la decisión de iniciar tratamiento debe ser tomada sin documentación histológica en muchas ocasiones; la severidad del cuadro clínico es tal que la impresión clínica debe dictar el comportamiento a seguir, de lo contrario solamente cabe esperar un empeoramiento progresivo e irreversible. El diagnóstico de LHF se puede establecer si por lo menos uno de los dos criterios está presente: Diagnóstico molecular consistente con LHF o por lo menos 5 de los 8 criterios indicados en la tabla 18-H-3.

Tabla 18-H-3. Criterios diagnósticos para LHF
(según la Sociedad del Histiocito)

<p>Criterios clínicos</p> <ul style="list-style-type: none">• Fiebre• Esplenomegalia <p>Criterios de laboratorio</p> <ul style="list-style-type: none">• Citopenias (afectando ≥ 2 de 3 líneas en sangre periférica): Hemoglobina (< 9 g/dL), plaquetas ($< 100 \times 10^9/L$), neutrófilos ($< 1.0 \times 10^9/L$) (En recién nacidos < 4 semanas, Hemoglobina < 10 g/dL).• Hipertrigliceridemia y/o hipofibrinogenemia (Triglicéridos ≥ 265 mg/dL), fibrinógeno (≤ 1.5 g/L)• Histopatología Hemofagocitosis en médula ósea, bazo o ganglios linfáticos, sin evidencia de malignidad. <p>Nuevos criterios:</p> <ul style="list-style-type: none">• Actividad de células NK baja o ausente• Ferritina sérica ≥ 500 $\mu\text{g/L}$• Niveles de CD25 soluble (receptor de IL-2) ≥ 2400 U/mL

Tratamiento. El tratamiento de los síndromes hemofagocíticos debe contemplar tres componentes: a) Corrección de la hiperactivación macrófaga y la tormenta de citoquinas causante de la severidad del cuadro; para ello los pacientes deben recibir una inducción con dosis altas de dexametasona, durante 6 a 8 semanas, a la vez que se inicia ciclosporina, que se mantendrá por varios meses; b) Citorreducción de macrófagos, mediante el uso de quimioterapia, generalmente etopósido, una droga de gran actividad frente a células del sistema monocítico y macrófago; se recomienda una citorreducción agresiva durante las semanas de inducción, con pulsos cada tres semanas en la

fase de mantenimiento; y c) Corrección del defecto inmune; que suele ser autolimitado en los casos de SHAV, pero que requiere trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en los casos de LHF. Hay que tener en cuenta que hay que monitorizar la afectación del sistema nervioso central. En aquellos pacientes con pleocitosis al diagnóstico, está indicada la quimioterapia intratecal hasta la normalización.

7.2. Reticulohistiocitoma y Reticulohistiocitosis multicéntrica

Los Reticulohistiocitomas Dérmicos solitarios o múltiples, son lesiones inusuales que han sido descritas en recién nacidos, pero más

comúnmente en hombres adultos jóvenes, en cualquier sitio del cuerpo. La Reticulohistiocitosis Multicéntrica es una enfermedad del adulto y que compromete a la piel, huesos, articulaciones y muy raramente a los ganglios linfáticos. Estas lesiones están formadas por células grandes, ricas en citoplasma homogéneo y cristalino, que se tiñe levemente con PAS. Estudios inmunohistoquímicos confirman la naturaleza macrófago de las células.

7.3. Enfermedad de Rosai-Dorfman

La Histiocitosis Sinusal con Linfadenopatía Masiva (Enfermedad de Rosai-Dorfman) se describe como una proliferación histiocítica poco frecuente, definida habitualmente por los hallazgos histológicos como una histiocitosis idiopática según los datos recogidos en la literatura. Se presenta más frecuentemente en las primeras décadas de la vida. La afección se caracteriza por la presencia de linfadenopatías indoloras, sobre todo en la región cervical. Aproximadamente un 50% de los pacientes tienen afectación extranodal, que es exclusiva (sin afectación ganglionar) en muchos de ellos, lo cual hace el diagnóstico de esta enfermedad más difícil. La afectación extraganglionar parece limitarse a las estructuras de la cabeza y cuello. Típicas son la infiltración de órbitas, afectación intracraneal (similar a meningiomas), y la afectación de estructuras del sistema digestivo y respiratorio alto. Histológicamente, la arquitectura linfoganglionar está alterada por marcada dilatación sinusal con borramiento de folículos y centros germinales; los senos distendidos y ectásicos se encuentran ocupados por una población celular polimorfa donde destacan histiocitos grandes con acentuada fagocitosis de linfocitos, eritrocitos o neutrófilos. A diferencia de los síndromes hemofagocíticos, no existe digestión de las células fagocitadas, que se encuentran íntegras en el citoplasma del histiocito, un fenómeno conocido como emperipolesis. Citológicamente, los frotis por

aspiración con aguja fina son densamente celulares, con muchos histiocitos, linfocitos fagocitados y un "background" de leucocitos reactivos. Se ha demostrado que el proceso no es clonal. Aunque se le clasifica como una afección que afecta a los macrófagos, estas células son aún más complejas, tienen ciertas enzimas y marcadores de macrófagos; esterasas y fosfatasa en gran cantidad, CD68 y alfa-1-antitripsina, respectivamente. Sin embargo comparten marcadores típicos de las células dendríticas: S100, E catepsina, Fascina, y en ocasiones también expresan CD1a. De acuerdo a estas características, estas células se asemejan más a las CDs sinusales. La mayor parte de casos de Rosai-Dorfman se resuelven espontáneamente. En aquellos casos sintomáticos puede ser necesario el tratamiento sistémico. Los corticoides son la primera línea de tratamiento, aunque las respuestas no suelen ser muy notables. Diversas combinaciones de quimioterapia han sido evaluadas, aunque las respuestas son anecdóticas. Finalmente, en casos con compresión de estructuras vitales está indicada la cirugía.

A modo de resumen el diagnóstico de la Histiocitosis continúa siendo fundamentalmente de tipo histopatológico o citológico. Las células que se presentan en uno u otro desorden, son la base para definir la enfermedad, por ej. las células dendríticas tipo Langerhans, son el *sine qua non* de la HCL; células dendríticas dérmicas e intersticiales son las responsables del JXG e Xantoma disseminatum; los macrófagos son las células predominantes de los síndromes hemofagocíticos, etc.

La inmunohistoquímica es un importante aporte al diagnóstico. Usando un amplio panel de anticuerpos que reconocen distintos marcadores de células dendríticas, se obtiene el tipo celular predominante en una lesión, y por ende define a la enfermedad involucrada (tabla 18-H-4).

Tabla 18H-4. Células involucradas en las Histiocitosis

Histiocito	Fenotipo	Desorden
Célula de Langerhans	CD1a, Langerina, S100, Gránulos de Birbeck	Histiocitosis de células de Langerhans.
Células indeterminadas	CD1a, Langerina, S100	Histiocitoma de células dendríticas / tipo célula indeterminada.
Células dendríticas activadas	HLA-II, Fascina, CD68, S100	Histiocitoma de células dendríticas / tipo célula activada.
Células dendríticas interdigitantes	Fascina, S100, CD83, DC-Lamp	Hiperplasia de células dendríticas e histiocitoma de células dendríticas, tipo célula interdigitante.
Dendrocitos dermales e intersticiales	Factor XIIIa, Fascina; CD68	Xantogranuloma familiar, xantoma diseminatum.
Células dendríticas foliculares	CD21, Ki-M4, DC35, S100+/-, Fascina	Histiocitoma de células dendríticas/tipo célula dendrítica folicular.
Células dendríticas sinusales	Ki-M9, Fascina, CD68, S100	Posible enfermedad de Rosai-Dorfman.
Macrófago	CD68, LN5	Desórdenes hemofagocíticos

LECTURAS SUGERIDAS

Arceci, R.J. "The histiocytoses: the fall of the Tower of Babel". *Eur J Cancer*. 1999 May;35(5):747-67.

Coppes-Zantinga, A., Maarten, R. "The Langerhans Cell Histiocytosis X files revealed." *British Journal of Hematology*, 116 (1):3-9, 2002.

Chu, T. "Langerhans cell histiocytosis." *Australasian Journal of Dermatology* 42:237-242, 2001.

Egeler, M. "LCH: The symptoms, Diagnosis and Treatment." Disponible en <http://www.histio.org/society/LCH/egeler2.shtml>. Consultado, Enero 2004.

Egeler, R.M., D'Angio, G.J. "Langerhans Cell Histiocytosis". *Hematology-Oncology Clinics of North America*. April 1998.

Fleming, M., Pinkus, J., Alexander, S., Tam, C., Loda, M., Sallan, S. "Coincident expression of the chemokine receptors CCR6 and CCR7 by pathologic Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis". *Blood* 101(7):2473-2475, 2003.

Glantzbecker, M., Carpentieri, D., Dormans, J. "Langerhans Cell Histiocytosis: Clinical Presentation, Pathogenesis, and Treatment from the LCH Etiology Research Group at The Children's Hospital of Philadelphia". *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal*. 15:67-73, 2002.

Henter, J. "Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH). Symptoms, Signs and Diagnosis of a Rapidly Fatal Childhood Disease." Disponible en <http://www.histio.org/society/HLH/henter1.shtml>. Consultado, Enero 2004.

Henter, J.I., Samuelsson-Horne, A., Arico, M., Egeler, R.M., Elinder, G., Filipovich, A.H., Gardner, H., Imashuku, S., Komp, D., Ladisch, S., Webb, D., Janka, G. "Histocyte Society. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation". *Blood* 2002 Oct 1;100(7):2367-73.

Janka, G.E., Schneider, E.M. "Modern management of children with haemophagocytic lymphohistiocytosis". *Br J Haematol.* 2004 Jan;124(1):4-14.

Svarch, E., Arteaga, R., Pavón, V., González, A. "Las Histiocitosis." *Revista Cubana de Hematología e Inmunología y Hemoterapia* 17(3):151-163, 2001.

Van Der Walk, M. "Reactive lymph nodes" In **Histology for Pathologists**, Sternberg S.S. (ed.). pp. 651 – 673, 1997.

HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico
Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.
Editorial Universidad de Talca, 2005

The background of the cover features three distinct microscopic images. In the upper left, a cross-section of a blood vessel is visible, showing a bright, curved structure within a darker, textured wall. In the lower left, a single platelet is shown in detail, highlighting its characteristic shape and several long, thin filaments extending from its surface. On the right side, a large, spherical thrombus is depicted, composed of numerous small, rounded components densely packed together.

SECCIÓN IV

HEMOSTASIA Y TROMBOSIS

HEMOSTASIA PRIMARIA

María Teresa Santos D., Eduardo Aranda L., Juana Vallés G. e Iván Palomo G.

1. Introducción

2. Aspectos generales de la Trombopoyesis

3. Estructura de las plaquetas

- 3.1. Membrana de las plaquetas
 - 3.1.1. Glicoproteínas
 - 3.1.2. Receptores no glicoprotéicos
- 3.2. Gránulos plaquetarios
 - 3.2.1. Gránulos alfa
 - 3.2.2. Gránulos densos
- 3.3. Citoesqueleto plaquetario
- 3.4. Sistema de membrana interno
 - 3.4.1. Sistema canicular abierto
 - 3.4.2. Sistema tubular denso

4. Envejecimiento y remoción plaquetaria

- 4.1. Fenómenos asociados con el envejecimiento de las plaquetas en la circulación
 - 4.1.1. Densidad
 - 4.1.2. Contenido granular
 - 4.1.3. Membrana plaquetaria
- 4.2. Remoción fisiológica de plaquetas
 - 4.2.1. Mecanismo inmune de remoción plaquetaria
 - 4.2.2. Mecanismos no inmunes de remoción plaquetaria

5. Formación del trombo plaquetario

- 5.1. Adhesión y extensión de las plaquetas
- 5.2. Agregación plaquetaria
- 5.3. Secreción y reclutamiento
- 5.4. Consolidación del trombo

6. Secuencia bioquímica de activación plaquetaria

- 6.1. Receptores plaquetarios que participan en la transducción de señales
- 6.2. Proteínas G
- 6.3. Fosfolipasa C
- 6.4. Calcio
- 6.5. Fosfolipasa A₂
- 6.6. Fosforilación de proteínas en las plaquetas
 - 6.6.1. Proteína quinasa C
 - 6.6.2. MAP kinasas
 - 6.6.3. Tirosina kinasas
 - 6.6.4. Fosforilación en tirosina y función plaquetaria
 - 6.6.5. Señalización a través de GPIIb/IIIa
- 6.7. Kinasas lipídicas
- 6.8. Fosforilación de proteínas e inhibición plaquetaria
- 6.9. Reorganización del citoesqueleto.

Resumen

La hemostasia primaria, es parte de un proceso más amplio como es la hemostasia que impide el sangramiento anormal. La hemostasia primaria incluye la fase de vasoconstricción y la fase endotelial-trombocitaria. En este capítulo se abordará, principalmente, la segunda fase que tiene como resultado la formación de un tapón plaquetario.

En el capítulo se aborda básicamente los siguientes aspectos: la trombopoyesis (brevemente pues es tratado en el capítulo 1), la estructura plaquetaria, el envejecimiento y los mecanismos que condicionan la remoción de las plaquetas desde la circulación por parte del sistema fagocítico mononuclear, los fenómenos de adhesión, extensión, secreción y agregación plaquetaria, y finalmente se abordan las moléculas y procesos bioquímicos que ocurren durante la activación plaquetaria.

1. INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un proceso complejo que permite prevenir, de forma continua, la pérdida espontánea de sangre y detener la hemorragia causada por daños al sistema vascular; implica la **hemostasia primaria**, la **hemostasia secundaria** (coagulación) y la **fibrinólisis**.

La hemostasia primaria incluye la fase de vasoconstricción y la fase endotelial-trombocitaria. La fase de vasoconstricción puede aclararse más al indicar que cuando se produce una herida o incisión en la piel, la pérdida de sangre es mínima al comienzo, aumentado después, progresivamente. Esto obedece a que se produce una vasoconstricción local rápida, por estimulación directa de los nervios simpáticos existentes en la pared de los vasos. La fase endotelial-trombocitaria que tiene como resultado la formación de un tapón inestable de plaquetas (3-5 minutos); en esta etapa además tiene lugar una vasoconstricción por estímulo químico, provocada por sustancias vasoconstrictoras liberadas desde los gránulos plaquetarios, como la serotonina, o sintetizadas por las plaquetas activadas como el tromboxano A_2 .

Por su parte la coagulación (ver capítulo 20) corresponde a una cascada de activación proteolítica de factores plasmáticos que conducen a la formación de trombina la cual actuando sobre el fibrinógeno permite la formación de fibrina; la estabilización y fijación del coágulo ocurre en 5-10 minutos.

El restablecimiento de la situación hemostática normal ocurre en 48-72 horas; este proceso incluye la fibrinólisis (ver capítulo 20) que corresponde a la destrucción enzimática de la red de fibrina.

A modo de información preliminar, las plaquetas son elementos celulares anucleados que se originan por fragmentación del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea, desde donde pasan a la circulación, permaneciendo allí alrededor de 8 días antes de ser removidas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM).

Las plaquetas son participantes esenciales en el proceso de hemostasia primaria. Estas células circulan normalmente como elementos de forma discoide, y en respuesta a un daño vascular sufren cambios de forma, emiten pseudopodios, secretan el contenido de sus gránulos y remodelan su membrana. La principal función de las plaquetas es evitar la pérdida de sangre por adhesión a la pared del vaso dañado e interacción con otras plaquetas, formando la base del tapón hemostático. Este proceso involucra fenómenos de adhesión, secreción y agregación plaquetaria, estrechamente relacionados entre sí. Además, para producir una hemostasia completa, es necesaria la activación del sistema de la coagulación, que da lugar a la generación de trombina y a la transformación de fibrinógeno en fibrina, que estabiliza el tapón hemostático. Las plaquetas activadas también contribuyen a la generación de trombina proporcionando una superficie catalítica donde se ensamblan factores de la

coagulación plasmáticos y/o liberados por las propias plaquetas activadas.

2. ASPECTOS GENERALES DE LA TROMBOPOYESIS

Todas las células hematopoyéticas derivan de las células pluripotentes ("stem cells") con capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en cualquier célula sanguínea (ver capítulos 1 y 2).

Las plaquetas se originan por fragmentación del citoplasma de los megacariocitos que residen en la médula ósea, en un proceso biológico único que resulta en células anucleadas, las que pasan a la circulación sanguínea.

2.1. Estadios madurativos

Los precursores megacariocíticos no pueden ser distinguidos morfológicamente de otras células precursoras de la médula ósea. El estadio **BFU-MK** requiere 21 días para dar origen a **CFU-MK** (unidad formadora de colonias megacariocíticas) un estadio que en alrededor de 11 días da origen al progenitor más maduro, **LD-CFU-MK** (LD, baja densidad) da origen a algunas colonias de **megacarioblastos** con baja celularidad y alto contenido de DNA; esto último ocurre porque disminuye la multiplicación celular y aumenta la endocitosis. Las células de los estadios BFU-MK y CFU-MK son CD34+, no así LD-CFU-MK.

Los **megacarioblastos** son las células de transición entre precursores y las células reconocibles morfológicamente. Es una célula pequeña de 18 μm de diámetro, mononuclear, expresa marcadores específicos, pero aún no es reconocible morfológicamente. Los **promegacariocitos** son de mayor tamaño (20 μm). Se observa el sistema de demarcación de membrana (SDM) poco desarrollado, presenta abundantes ribosomas y el núcleo comienza a lobularse. El núcleo en algunos casos se observa en forma de herradura, el citoplasma es basófilo y abundante. Los **megacariocitos granulares** continúan aumentando de tamaño (35 μm) y representan alrededor del 55% de la población megacariocítica en médula ósea. Finalmente los **megacariocitos maduros**, las células más grandes de la médula ósea (50-80 μm), se caracterizan por presentar núcleo multilobulado y poliploide, citoplasma acidófilo, con pocas mitocondrias, SDM desarrollado y gránulos citoplasmáticos.

El proceso de maduración megacariocítica

demora 10 días. Los megacariocitos maduros representan el 0.02-0.05% de la población celular total en la médula ósea. El número normal de megacariocitos maduros es de $6.1 \times 10^6/\text{Kg}$ y presenta una ploidía de 16N.

En el feto, se han encontrado en hígado, bazo y médula ósea. En adulto los megacariocitos se pueden detectar en todos los órganos mayores pero preferentemente en la médula ósea.

El desarrollo de la ploidía durante la maduración está dada por divisiones nucleares sucesivas sin división celular (endomitosis); el núcleo se divide a razón de múltiplos de 2 (2N, 4N, 6N, etc.). El modelo clásico de ploidía es 16N, con tres ciclos endomitóticos. Desde el segundo estadio madurativo (promegacariocitos) con un contenido de 8N, los megacariocitos son capaces de dar origen a plaquetas; dependiendo de la ploidía dan origen a plaquetas con distinta forma y densidad.

Un megacariocito es capaz de producir entre 1000 y 5000 plaquetas (producción proporcional a ploidía); el núcleo y citoplasma restante son fagocitados por macrófagos cercanos.

La liberación de plaquetas a la circulación se explica por dos modelos: (a) en el modelo proplaquetas el SDM organizaría el citoplasma de tal forma que formaría un pseudopodio, que a través de los sinusoides se extiende a circulación y por efecto de la misma se fragmentaría y liberaría plaquetas a circulación y (b) en el segundo modelo el SDM no organiza el citoplasma pero es igualmente importante, ya que se fragmenta la membrana redundante y se liberan plaquetas.

2.2. Regulación

La regulación del proceso megacariocítico se realiza por un mecanismo humoral en el que se responde al número de plaquetas en circulación. En este proceso participa una serie de citoquinas, siendo la más importante la **trombopoyetina** (TPO).

La TPO es una glicoproteína de 15-48 kDa que se produce en el hígado y riñones, siendo el primero el lugar de mayor producción. La TPO es sintetizada en forma constitutiva y liberada a la circulación según la unión a su receptor (c-MPL). La TPO (c-MPL ligand) presenta un 75% de homología en la secuencia aminoacídica, con la eritropoyetina.

La TPO se une al receptor c-MPL ubicado en los megacariocitos, estimulando así la maduración megacariocítica con el consiguiente aumento de ploidía y maduración citoplasmática. El c-MPL estimula segundos mensajeros que activan la tirosina kinasa JACK2 y la fosforilación de proteínas que activan la transcripción STAT. Las JACKs tirosinas kinasas de la familia de las JANUS kinasa no tienen actividad tirosina kinasa intrínseca por lo que deben unirse a otras proteínas kinasas (PTK). La activación de JACK lleva a la fosforilación de proteínas estimuladoras y activadoras de la transcripción, las llamadas STAT; éstas una vez fosforiladas pueden trasladarse al núcleo de la célula y activar la transcripción.

3. ESTRUCTURA DE LAS PLAQUETAS

Las plaquetas (trombocitos) son elementos celulares anucleados de 1.5-3 µm de diámetro y en reposo presentan una forma discoide. Como antes se indicó se originan por fragmentación del citoplasma de los megacariocitos.

Los principales componentes de las plaquetas son la membrana plasmática, los gránulos, el citoesqueleto y el sistema de membrana interno (los sistemas canicular abierto y el sistema tubular denso), existen también otras estructuras tales como lisosomas, gránulos de glicógeno y mitocondrias, y ocasionalmente inclusiones de lípidos (figura 19-1).

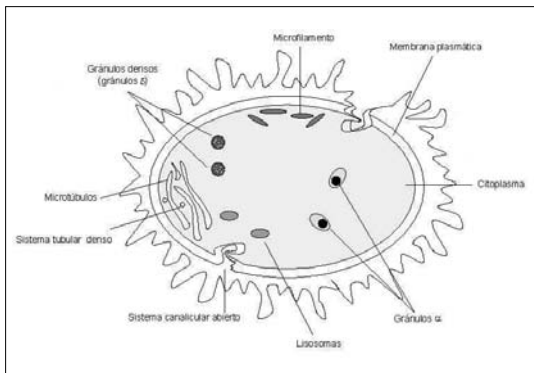


Figura 19-1. Principales componentes estructurales de las plaquetas.

Entre los principales componentes de las plaquetas humanas, expresado como peso húmedo se incluyen: agua 77%, proteínas 14.8%, lípidos 4.98%, carbohidratos 1.94%, RNA 0.20%, aminoácidos 0.59%, nucleótidos de adenina 0.20% y glutatión reducido 0.23%.

3.1. Membrana plaquetaria

La membrana plasmática de las plaquetas es considerada de importancia crítica en la fisiología de la hemostasia. Posee una serie de receptores funcionales específicos y además durante la agregación y transformación plaquetaria provee de una superficie esencial para la aceleración de la coagulación sanguínea (fosfolípidos de membrana). Media en las interacciones con el medio externo y contiene las estructuras que permiten la transmisión de señales bioquímicas (activantes o inhibitoras) al interior de la célula. Durante el proceso de secreción, se produce la fusión de las membranas de los gránulos intraplaquetarios con la membrana plasmática a través del sistema canalicular abierto, lo que permite la exposición de antígenos internos en la superficie de la plaqueta. Por ejemplo la P-selectina de los gránulos alfa o la GP53 de la membrana de los lisosomas, haciendo que la membrana de la plaqueta dependa del grado de activación de la célula. Este aspecto se pone también de manifiesto en lo que se refiere a la composición de los fosfolípidos. En las plaquetas, al igual que las membranas plasmáticas de otras células, la membrana plaquetaria está formada por una doble capa fosfolipídica con una distribución asimétrica que se transforma por la activación celular.

3.1.1. Lípidos

Alrededor del 23% del peso seco de las plaquetas humanas corresponde a lípidos, porcentaje del cual un 75-80% son fosfolípidos (FL) y el resto son lípidos neutros (triglicéridos, colesterol libre y esterificado y ácidos grasos libres), presentes en distintas proporciones.

Los FL están constituidos por fosfatidilcolina (PC) (38,98% de los FL totales), fosfatidiletanolamina (PE) (28,90%) esfingomielina (SP) (14,98%), fosfatidilserina (PS) (19,97%) y fosfatidilinositol (PI) (5,99%). También se detectan, en menores cantidades cardiolipina, lisolecitina y otros fosfoinosítidos.

Como se ha indicado, los fosfolípidos se encuentran formando una bicapa, con los grupos polares orientados hacia el citoplasma o hacia la superficie externa de la célula y las zonas no polares en el centro de la bicapa. Los fosfolípidos presentan una distribución asimétrica en la membrana: la SP se encuentra, predominantemente, en la capa externa, la mayor parte de PS y PI se encuentran solo en la

parte interna en las plaquetas en reposo, mientras que la PC y PE se encuentran en las dos caras de la bicapa.

La disposición de los fosfolípidos en la membrana tiene una importancia funcional. La localización de los fosfoinosítidos en la capa interna facilita su hidrólisis por la fosfolipasa C para formar diacil glicerol e inositol trifosfato, importantes mediadores de la activación plaquetaria. Por otra parte, la presencia en la capa interna de los fosfolípidos aniónicos (PS y PE), responsables de la actividad procoagulante, hace que esta actividad solo se manifieste en plaquetas activadas cuando se produce su traslocación a la capa externa. La asimetría en los fosfolípidos de la membrana es mantenida por las enzimas aminofosfolípido translocasa y escramblasa, lo que depende de la concentración de calcio intracitoplasmático, ATP y temperatura.

Los lípidos plaquetarios tienen tanto un papel estructural como metabólico, participando como mediadores lipídicos de la activación plaquetaria y en procesos de transmisión de señales. Recientemente se han descrito zonas especializadas de la membrana plaquetaria ricas en glicolípidos, también llamados «rafts» de membrana, que se asocian a la señalización de las plaquetas a través de receptores inmunológicos. Estas regiones especializadas son ricas en colesterol, esfingolípidos y ácidos grasos saturados y se unen internamente al citoesqueleto y externamente a otras proteínas, por lo que pueden participar en la transmisión de señales.

3.1.2. Glicoproteínas

Muchos de los procesos en que participan las plaquetas son mediados por las glicoproteínas (GP) de membrana. Las GP se identificaron, inicialmente, por marcación con radio-isótopos y migración en geles de poliacrilamida-SDS, por lo que su nomenclatura corresponde a las bandas de migración (I, II, III, etc.). En la tabla 19-1 se enumeran las glicoproteínas mayores de la membrana plaquetaria y sus correspondientes ligandos. Varias de ellas pertenecen a la familia de moléculas de adhesión, denominadas integrinas. Las integrinas son heterodímeros constituidos por

dos subunidades α y β que pueden unir uno o más ligandos y participan activamente en los procesos adhesivos y agregatorios en las plaquetas. Se les denomina integrinas por su capacidad para conectar actividades biológicas entre la zona externa de la membrana y el citosol.

GPIIb-IIIa. La GPIIb-IIIa (CD41-CD61) es el receptor plaquetario para el fibrinógeno y otras proteínas adhesivas como el factor von Willebrand, fibronectina y vitronectina. Es la proteína más abundante de la superficie plaquetaria, constituyendo alrededor del 15% de la masa proteica de la membrana (figura 19-2). Las plaquetas en reposo expresan alrededor de 40.000-50.000 copias por célula y existe un compartimento interno asociado a la membrana de los gránulos alfa, que se expresa en la superficie al activarse las plaquetas. En este complejo glicoproteico, especialmente en la GPIIIa, se encuentra la mayoría de los sistemas antigénicos plaquetarios (ver tabla 19-2).

La formación de puentes de fibrinógeno entre receptores GPIIb-IIIa de plaquetas contiguas es requisito indispensable para la formación de agregados plaquetarios y la unión a las demás proteínas adhesivas facilita la adhesión de las plaquetas con el endotelio dañado. Estructuralmente, esta integrina está formada por un dominio extracelular, una secuencia transmembrana y un corto dominio citoplasmático. Esta estructura permite la transmisión bidireccional de señales entre ambas caras de la membrana plaquetaria lo que, como veremos más adelante, tiene importantes implicaciones en la secuencia activación-agregación plaquetaria. Por otra parte, el complejo GPIIbIIIa interviene en la retracción del coagulo, uniendo la red de fibrina extracelular al sistema contráctil en el interior de la plaqueta. La importancia de este receptor se pone de manifiesto en las anomalías clínicas detectadas en la tromboastenia de Glanzman, una enfermedad hemorrágica congénita, que se caracteriza por una falta total o parcial de GPIIbIIIa en los pacientes. También se evidencia en el efecto clínico-farmacológico de los bloqueantes de este receptor, utilizados en la terapéutica antiplaquetaria en intervenciones de alto riesgo trombótico.

Tabla 19-1. Glicoproteínas mayores de la membrana plaquetaria

Glicoproteína	Designación CD	Integrina	Ligando	Función
GPIIb-IIIa	CD41-CD61	α IIb β 3	Fibrinógeno, FvW, fibronectina, vitronectina	Agregación
Receptor de vitronectina	CD51-CD61	α v β 3	Vitronectina, FvW, fibrinógeno, trombospondina	Adhesión
GPIa-IIa	CD49b-CD29	α 2 β 1	Colágeno	Adhesión
GPIc-IIa	CD49e-CD29	α 5 β 1	Fibronectina	Adhesión
GPIb-IX-V	CD42b,c-CD42a, CD42d		FvW Trombina	Adhesión Agregación
GPIV	CD36		Colágeno, trombospondina	Adhesión Agregación
GPVI			Colágeno	Adhesión
GMP-140 (P-selectina)	CD62P			Interacción plaqueta-leucocito
PECAM-1	CD31			Interacción endotelio

CD, "cluster of differentiation"; FvW, factor von Willebrand.

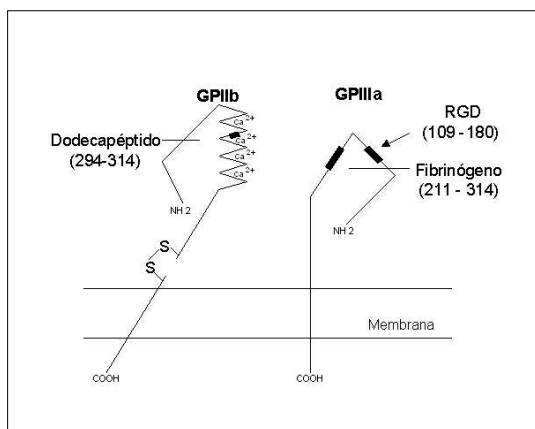


Figura 19-2. Esquema que representa la estructura del complejo GPIIb-IIIa. Estructuralmente GPIIb/IIIa es un heterodímero de las glicoproteínas IIb (α_{IIb}) y IIIa (β_3) asociadas entre sí de forma no covalente. A su vez, la integrina α_{IIb} está formada por una subunidad extracelular de 125 kDa unida mediante un puente disulfuro a otra subunidad más pequeña de 25 kDa, que incluye un dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático. Por su parte, la integrina β_3 está formada por una única cadena de 95 kDa, con un largo dominio extracitoplasmático, una secuencia transmembrana, y una cadena citoplasmática. Estas características estructurales permiten que el receptor participe en la transmisión bidireccional de señales entre ambas caras de la membrana. Presenta 3 dominios de unión al fibrinógeno, dos de ellos en α_{IIb} (fibrinógeno y RGD) y uno en β_3 (dodecapéptido). El dominio RGD es clave para la unión del fibrinógeno y de otras proteínas que contengan esta secuencia, mientras que los otros dominios se cree que participan en la estabilización de la unión del fibrinógeno al receptor.

GP1a-IIa. La GP1a-IIa (CD49b-CD29), integrina $\alpha 2\beta 1$ participa en la adhesión plaquetaria al colágeno de la matriz subendotelial.

GPVI. La GPVI es un miembro importante de las inmunoglobulinas en las plaquetas, y junto con GP1a-IIa ($\alpha 2\beta 1$) actúa como receptor del colágeno.

GPIb. La GPIb (CD42b, c) es un heterodímero compuesto de una cadena β (143 kDa) y una cadena α (23 kDa), unidas por puentes disulfuro. En la membrana plaquetaria se encuentra formando complejo con la GPIX (CD42a) y con la GPV (CD42d) (figura 19-3). La GPIb se compone de dos subunidades unidas por puentes disulfuro y pertenece a la familia de las "proteínas ricas en leucina" (LRG). El complejo GPIb-IX-V actúa como receptor para el factor von Willebrand, interacción esencial en el fenómeno de adhesión de las plaquetas a la pared del vaso dañado y también juega un papel importante en la activación de las plaquetas por la trombina. Existen unas 25.000 copias de GPIb y GPIX y aproximadamente la mitad de GPV por plaqueta. Al contrario de lo que ocurre con GPIIb-IIIa, la activación plaquetaria reduce el nivel de exposición de este complejo en la membrana plaquetaria, ya que se redistribuye en las membranas del sistema canalicular abierto, un proceso mediado por el citoesqueleto plaquetario. Además, la activación de las plaquetas produce la activación de calpaínas, proteasas dependientes de calcio, que degradan el complejo, liberando GPIb y GPV. La degradación por calpaína de GPIb libera un fragmento denominado glicocalicina, que puede detectarse en el plasma normal (1-3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se encuentra elevado en pacientes con trombocitopenia debida a un aumento de destrucción plaquetaria, lo que se ha utilizado para distinguir de trombocitopenia por defecto de producción plaquetaria.

La unión GPIb-IX-V-FVW se incrementa a flujos sanguíneos elevados, posiblemente debido a un cambio conformacional por el flujo tanto del

complejo glicoproteico como del FVW, lo que facilita una unión efectiva entre las plaquetas y el endotelio. También, como se ha visto recientemente, GPIb-IX-V contribuye junto a GPIIb-IIIa a la unión plaqueta-plaqueta durante el crecimiento del trombo, en este caso mediado por el FvW liberado por las plaquetas ya adheridas. Otra función importante de GPIb-IX-V es mediar en la activación y secreción plaquetaria inducida por las fuerzas de cizalladura elevadas, como puede suceder en zonas de estenosis.

El complejo GPIb-IX-V tiene también dos lugares específicos de reconocimiento para la trombina en GPIb y GPV. Existe evidencia de que el punto de unión de alta afinidad para la trombina en GPIb facilita la respuesta de las plaquetas a este importante agonista fisiológico, además de las respuestas a la trombina mediadas por los receptores activados por proteasas (PAR). En este sentido, las plaquetas de los pacientes con síndrome de Bernard Soulier que presentan deficiencias en GPIb-IX-V, o el bloqueo con anticuerpos monoclonales anti-GPIb hace que las plaquetas respondan de modo defectuoso a pequeñas concentraciones de trombina. GPIb une también factores del sistema intrínseco de la coagulación, como el kininógeno de alto peso molecular, FXI y FXII. Otra contribución potencialmente importante del complejo GPIb-IX-V es la aceleración de la generación de trombina en la superficie de plaquetas activadas, ya que la trombina unida a GPIb incrementa la exposición de fosfolípidos procoagulantes de las plaquetas.

Finalmente, la interacción de GPIb-IX-V con la trombina y con el FVW, que a su vez facilita la interacción plaqueta-colágeno inicia la compleja secuencia de transmisión de señales que da lugar a la reorganización del citoesqueleto, el aumento del calcio citosólico y la activación del receptor GPIIb-IIIa. Por ello, el papel de este receptor, todavía no totalmente caracterizado, es más importante de lo que hasta hace poco se creía en la biología plaquetaria.

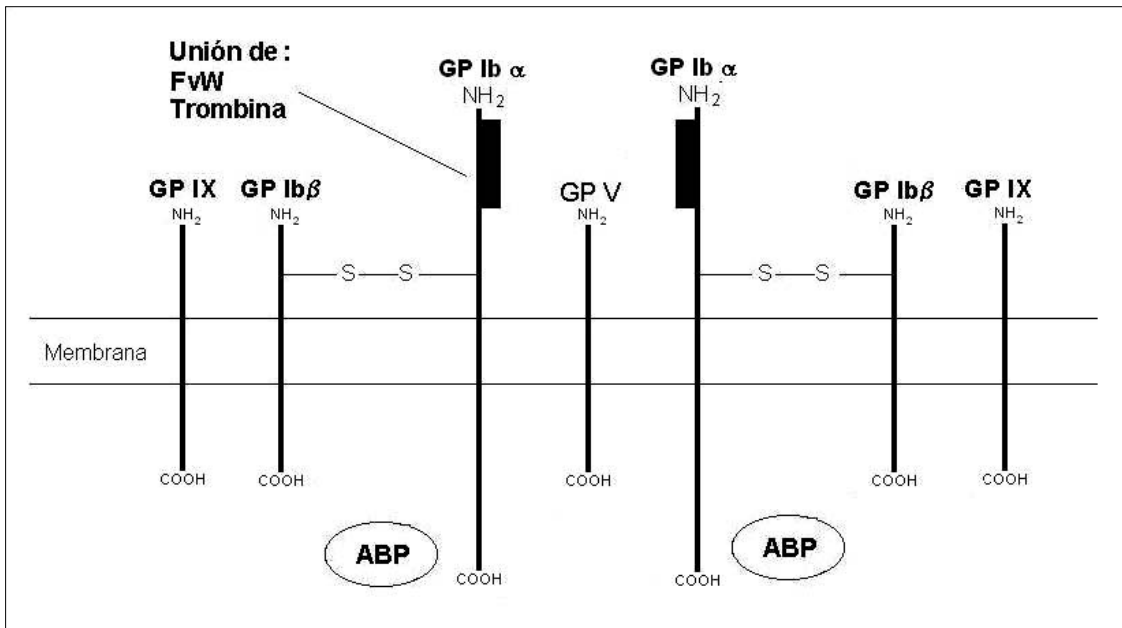


Figura 19-3. Esquema que representa la estructura del complejo GPIb-IX-V.

GPIV. La GPIV (CD36) está presente sobre la superficie de las plaquetas y otras células (monocitos, eritrocitos, células endoteliales). La GPIV ha mostrado tener propiedades de receptor de colágeno, involucrada en las etapas iniciales de la adhesión de plaquetas al colágeno. Además la GPIV une trombospondina, ácidos grasos y lipoproteínas oxidadas. Un aspecto curioso de esta glicoproteína es que se encuentra ausente en 4-7% de sujetos japoneses normales, aunque después se comprobó que esto también ocurre en otras poblaciones como individuos sub-saharianos en África y en mucha menor proporción (0.3%) en otras etnias.

P-selectina. La P-selectina (CD62P) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las Selectinas, presente en los gránulos alfa y que se expresa en la superficie de las plaquetas activadas. También se encuentra en los gránulos Weibel-Palade de las células endoteliales. La función principal de esta GP es mediar la interacción entre plaquetas y leucocitos mediante la unión de la P-selectina expuesta en las plaquetas y su receptor, la P-selectina glicoproteína-1 (PSGL-1) en los leucocitos. La

unión leucocito-plaqueta se refuerza además mediante la unión GPIIb-IIIa en las plaquetas y el receptor CD11-CD18 (Mac-1) en leucocitos mediante puentes de fibrinógeno. Recientemente se ha comprobado que la P-selectina puede unirse también a GPIb en las plaquetas y que las plaquetas también poseen PSGLP-1, lo que permite la interacción plaqueta-endotelio mediado por P-selectina endotelial, así como la participación de estos ligandos en la estabilización de los agregados plaquetarios. Adicionalmente, la unión de P-selectina a los monocitos induce en los mismos la expresión de factor tisular y promueve la formación de fibrina. Estudios recientes sugieren que la emisión de micropartículas por las plaquetas activadas, que expresan P-selectina, pueden contribuir por este mecanismo al proceso de la coagulación y jugar un papel en las interacciones entre las células sanguíneas.

PECAM-1. PECAM-1 (CD31) es una proteína de 130 kDa, miembro de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (SfIg), que se expresa en las plaquetas, células endoteliales, monocitos, granulocitos y células T. Es un importante

mediador de la interacción entre leucocitos y células endoteliales, aparentemente interviniendo en la migración transendotelial de los neutrófilos. La función de PECAM-1 en plaquetas es aún desconocida, pero se supone podría participar en la interacción plaqueta/endotelio ya que ratones deficientes en esta proteína tienen un tiempo de sangría prolongado.

Sistemas antigénicos plaquetarios

Las plaquetas poseen tres tipos de sistemas antigénicos: (a) Antígenos compartidos con los glóbulos rojos, (b) Antígenos de histocompatibilidad (HLA1) y (c) Antígenos plaquetarios específicos (HPA "Human platelet antigen"). Entre estos últimos se conocen suficientemente bien cinco sistemas antigénicos (HPA-1 a HPA-5) y otros en estudio (tabla 19-2).

Tabla 19-2. Sistemas antigénicos plaquetarios

Sist. HPA	Antígeno	Fenotipo(%)	Glicoproteína	Polimorfismo
HPA-1	HPA-1a	67.9	GPIIIa	Leu/Pro 33
	HPA-1b	26.5		
HPA-2	HPA-2a	99.3	GPI	Thr/Met145
	HPA-2b	14.5		
HPA-3	HPA-3a	87.7	GPIIb	Ile/Ser 843
	HPA-3b	64.1		
HPA-4	HPA-4a	>99.9	GPIIIa	Arg/Gln 143
	HPA-4b	>0.2		
HPA-5	HPA-5a	99.2	GPIa	Lys/Glu 505
	HPA-5b	20.6		
HPA-6W	HPA-6bW	<1	GPIIIa	Gln/Arg 489
HPA-7W	HPA-7bW	<1	GPIIIa	Ala/Pro 407
HPA-8W	HPA-8bW	<1	GPIIIa	Cys/Arg 636
HPA-9W	HPA-9bW		GPIIb	Met/Val 837
HPA-10W	HPA-10bW		GPIIIa	Arg/Gln 62

3.1.3. Receptores no glicoproteicos

Desde un punto de vista funcional, a los receptores no glicoproteicos se les puede clasificar en: receptores activadores (Ej. ADP, epinefrina, serotonina, PAF, trombina, tromboxano A_2), receptores inhibidores (Ej. prostaglandinas I_2 y E_1 , prostaglandina D_2 , adenosina) y receptores de fármacos (figura 19-4)

El mecanismo general involucrado en la transducción de la señal lo podemos resumir de la siguiente manera. Cuando un agonista se une a una proteína receptor se inicia una secuencia de eventos, donde la señal biológica es trasladada a un efector celular específico. Después de la interacción de un agonista con receptores asociados a proteína G (o receptores de siete dominios hidrofóbicos), la señalización se inicializa con la activación de proteínas heterotriméricas que unen proteína G, las que

están íntimamente asociadas con el receptor. La señal es posteriormente propagada a través de la disociación en una subunidad $G\alpha$ y un dímero $G\beta\gamma$, y cada uno de los cuales puede activar moléculas efectoras específicas como por ejemplo: adenilato ciclasa, fosfolipasa C, canales iónicos, etc. A pesar que distintos receptores asociados a proteína G parecen funcionar a través de diferentes vías de transducción de la señal, es también evidente que en ciertos puntos, a través de la cascada de activación, que estas vías pueden comunicarse. Es así que, la interacción de un agonista a un receptor puede influir la respuesta celular a otro agonista independiente que interacciona con un receptor distinto. Este fenómeno de intercomunicación entre vías, es el fenómeno de sinergismo, en el cual la respuesta causada por dos agonistas agregados juntos es mayor que la suma aritmética de sus respuestas individuales, causada por cada agonista.

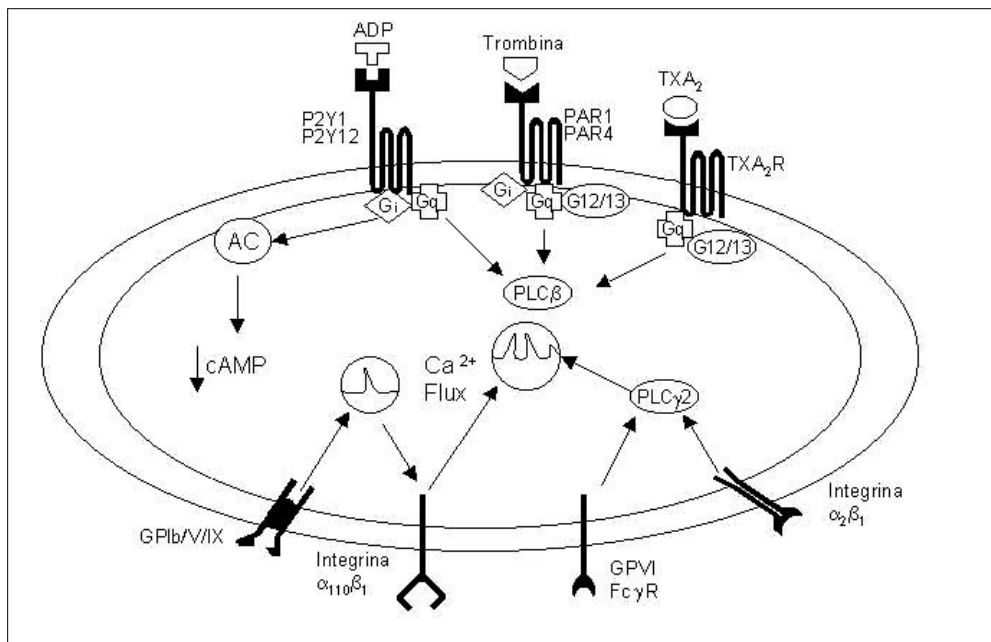


Figura 19-4. Representación esquemática de los principales receptores de las plaquetas.

Receptor de ADP

El ADP es el principal agonista fisiológico que induce la agregación plaquetaria *in vivo*. La existencia de un receptor de ADP fue definida sobre la base de los datos farmacológicos como un receptor responsable de la agregación inducida por ADP, la movilización de calcio intracelular, y la inhibición de la adenilato ciclasa. Este receptor fue llamado P2T (T por trombocitos)

El primer receptor purinérgico **P2Y₁**, que fue clonado, también se encontró en plaquetas humanas. Este receptor contiene 373 aminoácidos, y tiene la clásica estructura del receptor acoplado a proteína G.

Se identificó un segundo receptor para ADP en plaquetas, el receptor **P2Y₁₂**. La importancia de este receptor se manifiesta, por los efectos de clopidogrel, una droga antitrombótica, la cual después de ser metabolizada en el hígado, actúa como un antagonista irreversible para P2Y₁₂.

Los mecanismos de señalización utilizados por estos receptores para inducir la activación plaquetaria son:

- **P2Y₁** está acoplado a G α q y la interacción de este receptor plaquetario está asociado

con el cambio de forma, la elevación del calcio intracelular mediada por la fosfolipasa C β y la activación de la integrina α IIb β ₃ y la iniciación de la agregación.

- **P2Y₁₂** está acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa a través de una proteína G α i₂, y es necesario para la formación y estabilización de agregados plaquetarios grandes.

El receptor P2Y₁ se encontró, por estudios de inmunolocalización, en la membrana plasmática de las plaquetas, pero una mayor proporción de los receptores se encontró en el "pool" de membranas internas (membranas de gránulos α y del sistema canicular abierto) junto al receptor Tromboxano prostanoides (TP)

Receptor de Trombina

La trombina, una serino proteasa, es quizás el más efectivo activador plaquetario y tiene un reconocido protagonismo en promover la formación de trombos. En plaquetas, la trombina evoca cambio de forma y liberación del contenido de gránulos plaquetarios. También activa la síntesis y liberación de tromboxano A₂, la movilización de P selectina (CD62P) y ligando CD40 hacia la superficie plaquetaria, y la activación de GP IIb/IIIa. La

activación de las plaquetas por trombina se realiza a través de múltiples receptores sobre la superficie plaquetaria incluyendo el complejo GPIIb/IIIa y los receptores activados por proteasas (PARs).

En plaquetas humanas, la trombina interactúa y activa dos receptores PAR que están acoplados a miembros de la familia de proteínas G:

- **PAR1.** Es el principal receptor en plaquetas humanas, está acoplado a Gq, G12/13 y G2/i.
- **PAR4.** Está asociado a Gq y G12/13 y es activado cuando la trombina rompe su dominio N terminal, en un sitio específico.

El mecanismo de activación consiste en la escisión de una zona específica del receptor exponiéndose un nuevo aminoácido terminal que lleva una secuencia aminoacídica específica que interacciona con un dominio intramolecular del receptor induciendo una respuesta transmembrana que involucra la activación de la fosfolipasa C β , la fosfoinositol-3 quinasa y la quinasa RhoA/Rho. El receptor para trombina consiste en una proteína de 66 kDa, con siete dominios hidrofóbicos transmembrana. El número de copias por plaquetas es de alrededor de 1.800.

Receptor de Tromboxano A₂

El receptor de tromboxano A₂ (TP) ha sido clonado e identificado como una proteína de 37 kDa, consistente en una cadena polipeptídica, con siete dominios hidrofóbicos transmembrana. El TXA₂ activa las plaquetas por unión a un receptor específico asociado a proteína G, miembros de la familia G α q y G α _{12/13}. La activación plaquetaria a través de G α q activa la fosfolipasa C β , mientras que G α _{12/13} regula la fosforilación de miosina de cadena liviana (MLC), a través de la activación Rho quinasa. La densidad de los receptores TXA₂ es de 1500 receptores por plaquetas. La distribución células y tejidos del receptor TP esta íntimamente relacionada con la enzima tromboxano sintetasa. Ya que el tromboxano A₂ tiene una vida media extremadamente corta, y actúa como un autocoide, la distribución tisular concordante entre la tromboxano sintetasa y TP facilita la rápida acción de TXA₂.

Receptores adrenérgicos

La unión de epinefrina (adrenalina) induce agregación sin cambio de forma y potencia la

acción de otros agonistas. Las plaquetas tienen receptores, predominantemente, del tipo α_2 -adrenérgicos, y su estimulación inhibe la vía de la adenilato ciclasa, acoplado a una proteína G, del tipo Ni, regulada por el balance entre GTP y GDP.

El peso molecular del receptor es 64 kDa y consiste de una sola cadena polipeptídica con siete dominios transmembrana. El número estimado de receptores fluctúa entre 100 a 400 por plaqueta.

Receptor de serotonina (5-HT)

Otro agonista plaquetario es 5-hidroxitriptamina (5HT) o serotonina, que es liberado por las plaquetas agregadas en el sitio del daño vascular. Las plaquetas acumulan serotonina por un proceso activo, dentro de sus gránulos densos y poseen receptores de serotonina (5-HT_{2A}) acoplados a proteínas que unen GTP (proteínas G). La activación del receptor acoplado a una proteína G α q conduce a la activación de fosfolipasa C (PLC β), y así la generación de segundos mensajeros: diacil glicerol (DAG) e inositol-1,4,5 trifosfato (IP3), los que conducen a la activación de proteína quinasa C y la movilización de Ca²⁺ intracelular, respectivamente, moléculas asociadas con la activación plaquetaria. Si bien, 5-HT es un agonista muy débil, potencia la agregación plaquetaria cuando se usa como agonista la epinefrina o el PAF.

3.2. Gránulos plaquetarios

Las plaquetas contienen un número variable de gránulos, morfológicamente diferentes cuando se observan al microscopio electrónico. Se han empleado una gran variedad de técnicas, incluyendo el fraccionamiento subcelular, inmunquímica, radioautografía, histoquímica para desarrollar el conocimiento actual del contenido de los gránulos plaquetarios. Los gránulos que presentan las plaquetas son los gránulos alfa, los densos y los lisosomas.

3.2.1. Gránulos alfa

Los gránulos alfa son los gránulos más abundantes de las plaquetas y tiene un diámetro entre 200-400 nm; cada plaqueta presenta de 35 a 40 gránulos α , constituyendo el 15 % del volumen total de las plaquetas. Éstos almacenan un número importante de proteínas, la mayoría proveniente del plasma, algunas de las cuales juegan un importante rol en la hemostasia

primaria, como el fibrinógeno. Otras proteínas son específicas de linaje, como el factor plaquetario 4 y β -tromboglobulina (tabla 19-3).

Algunas de las proteínas contenidas en estos alfa gránulos pueden también proveer un grado adicional de regulación del balance entre la formación del coágulo y su disolución. Otras

proteínas de los alfa gránulos son los factores de crecimiento o componentes de la matriz extracelular.

Una deficiencia congénita de los alfa gránulos se llama Síndrome de las plaquetas grises.

Tabla 19-3. Contenido de los gránulos plaquetarios

Gránulos	Contenido
Alfa	Proteínas específicas (PF4, β -Tromboglobulina, α IIb β 3); Proteínas adhesivas (Fibrinógeno, Factor von Willebrand, Fibronectina, Trombospondina, Vitronectina, P-selectina); Proteínas del sistema hemostático (Factor V, FVIII, FXI, Proteína S, kininógeno de alto peso molecular, plasminógeno, t-PA, inhibidor-1 activador del plasminógeno, α -2 antiplasmina, α -2 macroglobulina, α -1 antitripsina, Gas6); Factores de Crecimiento (PDGF, EGF, TGF β); Otros: Albúmina, IgG, IgA, Osteonectina
Densos	ADP, ATP, GTP, GDP, Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , serotonina, fosfato
Lisosomas	Proteasas (elastasa, colagenasa, proteasas neutras); fosfatasas/sulfatasas (α glicerol fosfatasa, arilfosfatasa, arilsulfatasa); glucosidasas (β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa, heparinitasa)

PF4, Factor plaquetario 4; t-PA, Activador Tisular del Plasminógeno; Gas6, "Growth arrest - specific gene 6; PDGF, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas; EGF, Factor de Crecimiento Epidérmico.

3.2.2. Gránulos densos

Los gránulos densos (tabla 19-3) se caracterizan por su alta densidad electrónica que le confiere el elevado contenido de calcio y fósforo inorgánico (50% del total). El calcio forma un complejo macromolecular con la serotonina (5 hidroxitriptamina, 5-HT) y nucleótidos de adenosina (ATP, ADP) Los gránulos densos contienen el 60% de los nucleótidos de adenina de las plaquetas, el resto, fundamentalmente ATP, es metabólico y se emplea en las funciones celulares. La liberación del contenido de los gránulos densos, particularmente del ADP y 5-HT juega un papel importante en la amplificación de la respuesta plaquetaria al estímulo y en el crecimiento del trombo.

3.2.3. Lisosomas

Son estructuras citosólicas similares a los gránulos de pequeño tamaño 175-200 nm, contienen proteasas, fosfatasas, sulfatasas y ectoglucosidasas (tabla 19-3). Su función está relacionada con la destrucción intracelular de partículas extrañas. Su contenido se libera al exterior por una fuerte estimulación de las

plaquetas y se ha detectado la exposición de proteínas lisosómicas en la membrana de las plaquetas activadas como la CD63, que se utiliza como un marcador de fuerte activación plaquetaria. La liberación de su contenido en proteasas como la elastasa o la colagenasa en la proximidad del vaso sanguíneo afectado, contribuye al daño endotelial.

3.3. Citoesqueleto plaquetario

El citoesqueleto plaquetario es el responsable de mantener la estabilidad de la membrana, su forma discoide y las modificaciones morfológicas que éstas experimentan cuando son activadas. Otra función importante del citoesqueleto es servir de punto de unión de moléculas de señalización que se traslocan desde el citosol, formando complejos multimoleculares de señalización. De este modo, el citoesqueleto regula la organización espacial de la célula y la integración de mecanismos bioquímicos que conducen a las respuestas celulares.

El citoesqueleto está compuesto de polímeros de tubulina y actina, y otras proteínas asociadas.

En el citoesqueleto se pueden distinguir tres estructuras:

Esqueleto citoplasmático. Contiene una alta proporción de actina, la proteína más abundante en la plaqueta. En la plaqueta en reposo esta actina se encuentra formando filamentos que tienen uniones cruzadas con otras proteínas, lo que condiciona la formación de una malla tridimensional que funciona como un esqueleto celular.

Esqueleto de membrana. Está formado también por filamentos de actina y se encuentra dispuesto inmediatamente por debajo de la membrana celular.

Microtúbulos. Éstos se disponen en una banda circunferencial que está situada inmediatamente por debajo del esqueleto de la membrana y su función principal es mantener la forma discoide de las plaquetas en estado de reposo. El citoesqueleto proteico fundamental de los microtúbulos está formado por polímeros de tubulina unidos a polipéptidos de alto peso molecular a la membrana.

Las subunidades de tubulina (alfa y beta tubulinas), se congregan en forma reversible en largos polímeros llamados microtúbulos. La actina también se congrega en forma reversible, en polímeros polarizados, los cuales comprenden los apoyos de una malla citoplasmática rígida, tanto en plaquetas en reposo como activadas. Mientras circula en la sangre, el 40% del total de actina de las plaquetas en reposo está ensamblada entre 2000 a 5000 filamentos.

Proteínas contráctiles de las plaquetas

Las plaquetas son particularmente ricas en proteínas contráctiles, representando alrededor del 50% del total de las proteínas plaquetarias. Varias respuestas plaquetarias incluyendo secreción, cambio de forma, agregación y retracción del coágulo, requieren la fuerza generada por proteínas contráctiles.

A continuación se describen algunas propiedades bioquímicas de las proteínas contráctiles de las plaquetas:

Actina. La actina (42 kDa) es la proteína más abundante del citosol plaquetario, representa el 20-30% del total de las proteínas plaquetarias. La α -actina es el mayor componente de actina muscular. La actina existe en dos formas como

monómero (G-actina) y polimerizada (F-actina). En las plaquetas en reposo 30-40% de la actina está polimerizada en filamentos. La polimerización de los monómeros de actina es prevenida por proteínas como profilina. La actina tiene un sitio de unión para un compuesto nucleótido dimetal, usualmente ATP- Ca^{2+} , la unión del nucleótido sirve para estabilizar la estructura de monómero, así, si no ocurre esta unión, los monómeros son rápidamente denaturados.

En bajas concentraciones de sal y nucleótidos bivalentes, la actina permanece en forma monomérica, subiendo las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} ocurre la polimerización sobre la larga hebra de F-actina. Cuando se polimeriza la actina, el ATP unido es hidrolizado a ADP, así el nucleótido unido a F-actina es ADP. Los filamentos de F-actina contienen 2 hebras de monómeros de actina ordenados en dos hélices entrelazadas.

Existen tres tipos de proteínas que se unen a actina: (i) Proteínas que se unen a monómeros G-actina estabilizándolos, (ii) Proteínas “camping” que se unen a los filamentos de F-actina terminal y van inhibiendo la polimerización al final de éstos, y (iii) Proteínas que se unen a filamentos de F-actina favoreciendo su estabilización.

Profilina. Es una proteína de 15 kDa que se encuentra en gran cantidad en las plaquetas; forma un complejo reversible con los monómeros de actina llamado profilactina, su función es recargar con ATP las subunidades de actina-ADP desprendidas de los filamentos de actina para reincorporarlos y alargar la estructura filamentosa.

Gelsolina. Es una proteína de 91 kDa. Requiere Ca^{2+} . Convierte geles de F-actina en soluciones menos viscosas. Se encuentra en plaquetas y plasma. Clasificada como una proteína “camping” se une al extremo terminal de los microfilamentos. Presenta 6 dominios homólogos repetidos (14 kDa cada uno) que contienen 3 sitios de unión a actina. Gelsolina aumenta el porcentaje de nucleación de los monómeros de actina a filamentos entrelazados. Se produce el acortamiento de los filamentos probablemente por el aumento en el número de núcleos. Similarmente a la profilina, se forman complejos de actina-gelsolina, transitoriamente durante la activación plaquetaria.

Tropomiosina. La tropomiosina plaquetaria (28 kDa) es más pequeña que la tropomiosina muscular, la tropomiosina plaquetaria une 6 moléculas de actina cuando ésta se encuentra saturada con tropomiosina, otras proteínas de unión a actina sólo pueden interactuar con microfilamentos terminales.

Caldesmon. Es una proteína de 80 kDa, contiene distintos dominios de unión a actina, tropomiosina, miosina y calmodulina. La unión es regulada por el Ca^{2+} .

Proteína de unión a actina. Esta proteína (abp, "Actin Binding Protein") es un dímero de alto peso molecular y representa el 2-3% del total de las proteínas plaquetarias, su principal actividad se asocia a entrecruzamiento de los filamentos de actina para formar un gel, los filamentos forman una red donde éstos son perpendiculares unos con otros. (ABP) es una fosfoproteína que contiene 2 moléculas de fosfato por molécula. Al mover una molécula de fosfato se pierde su capacidad de entrecruzamiento. Una kinasa dependiente de cAMP cataliza la fosforilación de la ABP.

Talina. Proteína de 235 kDa, se encuentra en altas concentraciones en plaquetas. Se une a vinculina y ambas proteínas pueden interactuar con proteínas de transmembrana de la familia de las integrinas.

Vinculina. Proteína globular de 130 kDa. No es una proteína integral de membrana pero participa en anclaje de filamentos de actina a membranas.

Miosina. Representa un 2-5% del total de proteínas plaquetarias. Es un hexámero de 480 kDa, cada molécula de miosina contiene 2 cadenas pesadas de 20 kDa y 2 cadenas livianas de 20 y 16 kDa. La cadena pesada de miosina es una estructura polar, la parte C-terminal de la cadena pesada de miosina forma una cabeza globular. Las regiones α -hélice de las 2 cadenas pesadas interactúan para formar una cola enrollada del filamento de miosina.

Kinasa de cadena liviana de miosina. Esta proteína es inactiva a menos que se añada Ca^{2+} y éste se encuentre unido a calmodulina. La kinasa de cadena liviana de miosina contiene 3 dominios distintos: una región N-terminal con función desconocida, un centro catalítico y una región C-terminal regulatoria de la unión a calmodulina.

Calmodulina. Proteína ácida de 17 kDa con 4 sitios de unión para Ca^{2+} . Esta proteína regula la dependencia de Ca^{2+} de muchas proteínas incluyendo la kinasa de cadena liviana de miosina.

3.4. Sistema de membrana interno

Las plaquetas tienen dos sistemas de membrana internos, el Sistema canicular abierto y el Sistema tubular denso.

3.4.1. Sistema canicular abierto

El sistema canicular abierto, a menudo llamado sistema canicular conectado a la superficie, está formado por invaginaciones de la membrana plasmática al interior de la célula, (estructura única con 15-20 aberturas) el cual interconecta con otros, al igual que el sistema tubular denso. El sistema canicular abierto juega un papel importante en la fisiología de las plaquetas humanas, aumentando la superficie total de contacto, permite el intercambio de sustancias en profundidad, como también ofrece un sitio para la salida del contenido de los gránulos alfa y una ruta para la incorporación de material soluble y particulado desde el medio que las rodea, *in vivo* el plasma.

3.4.2. Sistema tubular denso

El sistema tubular denso; está constituido por canales delgados internos con un contenido amorfo que aparece cerca de los microtúbulos y rodea a los organelos. Tiene funciones similares a las del retículo endoplásmico liso de otras células. Es un regulador de la activación plaquetaria mediante la liberación o secuestro de calcio iónico, del cual es su principal depósito. También contiene enzimas oxidativas y enzimas del metabolismo de prostaglandinas.

4. ENVEJECIMIENTO Y REMOCIÓN PLAQUETARIA

Normalmente las plaquetas circulan 8 a 10 días en un número que va desde 140.000 a 400.000 células/uL. El 30% de las plaquetas circulante se encuentra secuestradas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), especialmente del bazo.

La desaparición de las plaquetas de la circulación, ya sea como parte de un proceso de envejecimiento fisiológico o como manifestación de destrucción aumentada, ha sido motivo de intensa investigación.

La supervivencia de las plaquetas en la circulación se puede estudiar mediante distintas técnicas; la más aceptada es la marcación de una muestra de plaquetas con un isótopo radioactivo (^{51}Cr o ^{111}In), que se reinyecta y se mide la desaparición de la radioactividad en el tiempo. Las curvas de supervivencia, obtenidas con esta técnica, en condiciones normales han mostrado una desaparición de la radioactividad que sigue una función de tipo lineal; esto significa que las plaquetas en la circulación sufren un proceso de envejecimiento y son removidas en función de su edad.

4.1. Envejecimiento de las plaquetas en la circulación

Durante su envejecimiento en la circulación, las plaquetas sufren una serie de cambios físicos, bioquímicos y funcionales que determinan en forma importante su heterogeneidad. De la gran variedad de cambios demostrados durante el envejecimiento de las plaquetas, algunos han sido mejor caracterizados, e incluso se ha sugerido pudieran representar marcadores de su edad. Entre éstos, es importante analizar los cambios en la densidad, contenido granular y en estructuras de membrana, como representativos de tres compartimentos de las plaquetas que sufren modificaciones con la edad en la circulación.

4.1.1. Densidad

Aunque la heterogeneidad de densidad de las plaquetas está determinada en gran medida a nivel de la médula ósea durante la megacariopoyesis, al envejecer en la circulación éstas cambian de densidad en un sentido que depende de la especie en estudio. Así, las plaquetas humanas y de algunas especies de primates, aumentan de densidad con la edad. En caninos, conejos y monos rhesus la densidad de las plaquetas disminuye con su edad. Dado que el cambio de densidad de las plaquetas con la edad es dependiente de la especie estudiada, no se pueden extrapolar los resultados obtenidos en otras especies para analizar la relación entre la heterogeneidad física de las plaquetas humanas y su edad en la circulación. El conocer la relación densidad/edad de las plaquetas circulantes en distintas especies, es de gran utilidad desde un punto de vista experimental, ya que da la posibilidad de estudiar plaquetas de diferente edad en estado estacionario.

4.1.2. Contenido granular

Durante el envejecimiento de las plaquetas en la circulación el contenido de algunos de los componentes de los gránulos específicos cambia en relación a su edad.

Con respecto a los **gránulos alfa**, tanto las plaquetas humanas como caninas con la edad acumulan fibrinógeno en la circulación, lo que indicaría que el fibrinógeno intraplaquetario provendría del exterior y no por síntesis megacariocítica.

En cuanto al comportamiento de los **gránulos densos** con el envejecimiento en plaquetas humanas y caninas el contenido de serotonina (5-Hidroxitriptamina) aumenta con la edad de las plaquetas en la circulación, implicando un proceso de acumulación *in vivo* de la amina. Este cambio también es útil experimentalmente, ya que se puede utilizar como marcador de edad plaquetaria.

4.1.3. Membrana plaquetaria

A nivel de la membrana plaquetaria se ha observado que las plaquetas humanas de baja densidad, enriquecidas con plaquetas jóvenes, expresan 55% más antígenos del sistema HLA clase I que las plaquetas de alta densidad, las que tienen en promedio mayor edad. Estas observaciones sugieren que los antígenos de este sistema pudieran perderse con el desgaste y envejecimiento de las plaquetas en la circulación. No se ha demostrado pérdida de otras glicoproteínas de membrana (GPIIb-IIIa) con el envejecimiento.

La expresión de CD36 (GPIV) y la exposición de CD62P (P-selectina), no presentan diferencias en subpoblaciones plaquetarias de alta densidad (PAD) y de baja densidad (PBD) humanas, lo que permite concluir que no cambian, significativamente, con la edad de las plaquetas en la circulación.

Por otra parte, en plaquetas envejecidas se ha descrito aumento de la expresión de fosfatidilserina (FS) y aumento de la IgG asociada a las plaquetas (PAIgG) (ver punto 4.2).

4.2. Remoción fisiológica de plaquetas

Algunas alteraciones o cambios descritos en plaquetas que envejecen en la circulación, si

bien constituyen marcadores inequívocos de edad (ej. densidad, 5-HT) parecen no ser determinantes de la remoción de las células de la circulación. Los macrófagos del SFM (bazo e hígado y en menor grado de la médula ósea) deben detectar cambios asociados al envejecimiento plaquetario que activan su remoción. Aquí se resumirán los dos mecanismos propuestos para la eliminación de células envejecidas en otros sistemas: **mecanismo no inmune y mecanismo inmune.**

4.2.1. Mecanismo inmune de remoción plaquetaria

La **PAIgG** aumenta con la edad de las plaquetas en la circulación. La evidencia se basa en:

a) la subpoblación de plaquetas de alta densidad (PAD) humanas, enriquecida con plaquetas de mayor edad, expresan mayor PAIgG que la subpoblación de plaquetas de baja densidad (PBD), enriquecida con plaquetas jóvenes, (b) la subpoblación PBD caninas (de mayor edad promedio), expresan mayor PAIgG que la subpoblación PAD, y (c) en el modelo de supresión de la trombopoyesis, en el cual se obtienen plaquetas que envejecen *in vivo*, la PAIgG aumentó progresivamente con la edad de las plaquetas en la circulación.

Posiblemente esto se explique por la aparición de neoepítipo(s) en alguna de las proteínas de membrana, lo que se podía asociar a la unión de anticuerpos naturales. Un fenómeno similar ha sido descrito en glóbulos rojos; los eritrocitos senescentes expresan un neoepítipo en la proteína banda 3. Al estudiar la **especificidad** de los autoanticuerpos antiplaquetarios (que explican el aumento de la PAIgC en plaquetas envejecidas), se ha observado que: (a) las plaquetas no expresan banda 3, por lo que esta proteína no participaría en el mecanismo de remoción fisiológica de las plaquetas, como lo hace en los eritrocitos, (b) Otro neoantígeno, descrito en las plaquetas envejecidas *in vitro*, expresado por la GPIIb-IIIa (epítipo del anticuerpo 5E5), tampoco parece jugar un papel relevante.

Como demostración experimental del mecanismo de remoción inmune se ha observado que las plaquetas frescas sensibilizadas con anticuerpo anti-PIA¹ presentaron mayor interacción con monocitos estimulados (por IFN γ), que las no sensibilizadas. En ambos tipos de plaquetas un escaso porcentaje de éstas expuso FS y la PAIgG fue

significativamente mayor en las sensibilizadas. Dicha interacción fue inhibida por bloqueo de los Fc γ R de los monocitos con IgG purificada.

Por otra parte, aparentemente el receptor de fragmentos del complemento, CR2 no participaría en la remoción fisiológica de plaquetas.

4.2.2. Mecanismos no inmunes de remoción plaquetaria

La exposición de **FS** aumenta en las plaquetas envejecidas; esto se basa en las siguientes evidencias: (a) un mayor porcentaje de PAD humanas que PBD, expone FS, (b) plaquetas de perro envejecidas en circulación exponen más FS que las plaquetas jóvenes, y (c) las PAD humanas presentan mayor cantidad de Ca²⁺.

La exposición de FS es una de las manifestaciones tempranas de apoptosis, precediendo la fragmentación del DNA (en células nucleadas) y la pérdida de la integridad de membrana. Los cambios nucleares son a menudo considerados como un sello o marca de la muerte celular programada o apoptosis; sin embargo, en las células anucleadas, como las plaquetas, al parecer no sería un elemento indispensable como evento iniciador. Las plaquetas podrían ser capaces de sufrir cambios similares a los observados en los eventos apoptóticos de las células nucleadas. Pareciera que las plaquetas contienen componentes moleculares de la apoptosis que participan a nivel citoplasmático. Las plaquetas envejecidas *in vitro* presentan pérdida de la asimetría fosfolipídica y activación de la caspasa 3. Por otra parte, se ha descrito que el envejecimiento *in vivo* de las plaquetas se asocia con activación de la apoptosis, encontrándose que sus mitocondrias sufren importantes cambios en la integridad de su membrana, antes que una señal clásica de apoptosis, como es la exposición de FS, sea observada.

Como evidencia experimental de la interacción a través de mecanismo no inmune, se ha observado que plaquetas almacenadas más de 6 días (concentrado de plaquetas de Banco de Sangre) presentan mayor interacción con monocitos estimulados, que las plaquetas frescas. En ambos tipos de plaquetas la PAIgG fue normal y la expresión de FS fue significativamente mayor en las almacenadas. Dicha interacción fue inhibida con liposomas de FS y con anticuerpo monoclonal anti-CD36.

El conjunto de estas observaciones permite postular que en el fenómeno de remoción fisiológica de las plaquetas envejecidas desde la circulación, participaría más de un mecanismo: (a) mecanismo inmune explicado por el aumento de PAIgG autóloga sobre las plaquetas envejecidas que promueve la interacción con FcγR de los monocitos, y (b) mecanismo no inmune, en el cual la exposición de FS en la cara externa de la membrana de las plaquetas envejecidas (por apoptosis), con participación del receptor CD36 y eventualmente otro receptor que reconozca fosfolípidos como su ligando natural.

5. FORMACIÓN DEL TROMBO PLAQUETARIO

En respuesta a un daño vascular las plaquetas, que normalmente circulan como células aisladas, se encuentran con el entorno trombogénico de la matriz subendotelial. Esto inicia interacciones entre las proteínas adhesivas de la pared como el factor von Willebrand y los correspondientes receptores en la membrana plaquetaria. Esta etapa adhesiva facilita, a su vez, la interacción de las plaquetas con el colágeno y el inicio de la etapa de activación. Posteriormente se genera trombina, que es también un fuerte inductor de activación en las plaquetas. La activación produce cambios estructurales en la membrana, y cambios de forma con emisión de pseudópodos si están circulantes. También se inicia una secuencia de procesos bioquímicos, que propician la agregación y la liberación al medio extracelular de productos granulares y productos metabólicos liberables como el tromboxano A_2 (TXA_2). Algunas de estas sustancias liberadas por las plaquetas (ADP, serotonina, TXA_2 , etc.) son también estímulos plaquetarios que refuerzan la activación y la agregación, y promueven el reclutamiento de nuevas células al trombo en formación. Finalmente, las plaquetas activadas desarrollan una actividad procoagulante que favorece la formación de fibrina y la consolidación del trombo (figura 19-5) En condiciones normales estos mecanismos controlan la hemorragia. Sin embargo, en condiciones patológicas los mecanismos de control pueden fallar, produciendo trombosis o diatesis hemorrágica.

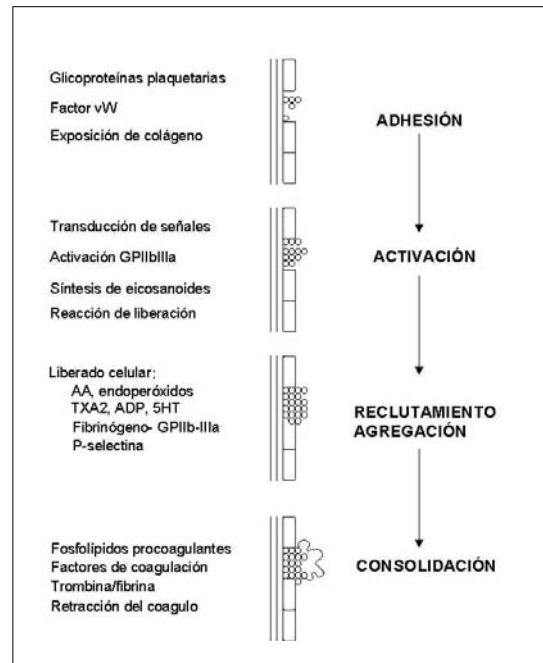


Figura 19-5 - Secuencia de formación del trombo plaquetario.

5.1. Adhesión y extensión de las plaquetas

El proceso de adhesión comprende el transporte de las plaquetas hacia la superficie reactiva y la interacción de los receptores de la membrana plaquetaria con sus ligandos en las estructuras de la pared lesionada. Entre las proteínas adhesivas de la matriz se incluyen: colágeno, fibronectina, factor von Willebrand, laminina, vitronectina y trombospondina. Varias glicoproteínas de membrana plaquetaria y sus ligandos extracelulares (tabla 19-1) pueden mediar la adhesión plaquetaria al endotelio lesionado.

Las plaquetas no se adhieren a las células vasculares endoteliales normales, pero en áreas de lesión endotelial sí lo hacen a varios componentes del tejido conectivo subendotelial. En los segundos siguientes a la lesión, las plaquetas se adhieren y se activan con el colágeno del subendotelio vascular a través de la GPIa-IIa y GPVI. Esta interacción es estabilizada por la interacción adhesiva entre el complejo GPIb-IX-V y el factor von Willebrand

(FVW), una glicoproteína plasmática adhesiva que permite a las plaquetas permanecer unidas a la pared del vaso a pesar de la elevada fuerza de cizalla. El FVW también tiene dominios de unión para el colágeno subendotelial. La adhesión y activación de las plaquetas por el colágeno induce la activación del complejo GPIIb-IIIa que también participa en la adhesión plaquetaria, sobre todo en condiciones de alta velocidad de cizalla local, uniéndose al factor FVW. Una vez adheridas al subendotelio, las plaquetas se extienden sobre la superficie y luego se unen plaquetas adicionales (reclutamiento).

Fuerza de cizalla

La fuerza mecánica más relevante en la hemostasia es la fuerza de cizalla. El término «shear» tiene el significado de movimiento deslizante entre dos planos adyacentes, mientras el concepto «stress» denota fuerza por unidad de área. La sangre es un fluido viscoso con flujo laminar, el que se entiende por el tipo de movimiento en el que el fluido se mueve como una serie de láminas individuales, con cada estrato moviéndose a una velocidad diferente de sus láminas vecinas. La fuerza de cizalla, por tanto, se define como la fuerza de unidad por área entre láminas, expresándose en dinas/cm². El valor de esta fuerza de cizalla local es cero en el centro del vaso y máximo en la periferia, donde tienden a estar las plaquetas. La fuerza de cizalla en venas es de menos de 2 dinas/cm², en arterias es de 20-30 dinas/cm² y en arterias estenosadas pueden ser mayor a 200 dinas/cm².

La agregación plaquetaria en respuesta a valores elevados de «shear stress» depende de la presencia del FVW plasmático y los complejos receptores GPIb-IX-V y GPIIb-IIIa. El FVW es una proteína plasmática multimérica, que tiene sitios de unión para dichos receptores plaquetarios y para constituyentes del subendotelio (colágeno tipo I, III y VI). La unión del FVW con el complejo GPIb-IX-V es fundamental para la adhesión y agregación. La unión de la GPIIb-IIIa al FVW en condiciones estáticas es mínima, pero en plaquetas bajo el efecto de la fuerza de cizalla la interacción presenta la misma intensidad que con la GPIb-IX-V. Estos complejos glicoproteicos tienen sitios de unión para el FVW inducibles por la fuerza de cizalla. Solo una minoría de las plaquetas une al FVW y la unión es reversible y

no saturable. También se ha observado que los multímeros más grandes de FVW promueven una agregación más efectiva y que el efecto de la fuerza de cizalla en la formación del trombo plaquetario en el complejo *in vivo* es potenciado por agonistas químicos. Esta puede ser la razón por la que los infartos pueden ocurrir en pacientes con un grado relativamente bajo de estenosis, el efecto de la fuerza de cizalla es sobre los receptores plaquetarios, más que sobre el FVW mismo.

En cuanto a la inhibición de estos procesos plaquetarios activados por la fuerza de cizalla, se ha visto que el cAMP o el cGMP inhiben la adhesión y la agregación. La aspirina tiene un pequeño efecto en inhibir la agregación inducida por la fuerza de cizalla. Agentes fibrinolíticos inhiben la respuesta plaquetaria a la fuerza de cizalla, debido a la proteólisis del FVW por la plasmina y t-PA.

El mecanismo exacto por el cual la fuerza de cizalla induce agregación plaquetaria no se conoce. Se ha observado una elevación del Ca⁺² citoplasmático. Los multímeros de FVW interactúan con la GPIb, causando aumento de calcio y la agregación plaquetaria, efectos que serían potenciados por la unión del FVW al complejo activado GPIIb-IIIa en presencia de ADP liberado por las plaquetas activadas. Se sabe que la participación de una compleja red de señales intracelulares, en que participan diversas proteínas kinasas e interacciones entre las proteínas de membrana plaquetaria con el citoesqueleto, como se comentará más adelante.

La fuerza de cizalla, además de actuar sobre las plaquetas, también provoca en las células endoteliales la secreción de prostaciclina (PGI₂), la cual tiene acción vasodilatadora e inhibe la agregación plaquetaria. También secreta óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador e inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria.

El recuento de las plaquetas y la fuerza de cizalla están directamente relacionadas con la frecuencia de colisión (número de contactos plaqueta-plaqueta por unidad de tiempo) y eficiencia de colisión (colisiones plaquetarias que resultan en adhesión o agregación), promoviendo por tanto la agregación plaquetaria.

En la circulación sanguínea, la fuerza de cizalla elevada (debido al flujo sanguíneo rápido), tiende en parte a diluir las moléculas procoagulantes y previenen la formación de fibrina insoluble. El fenómeno trombogénico es multifactorial y hay mayor propensión a que ocurra cuando el flujo sanguíneo es lento.

Como se ha indicado, las plaquetas no se adhieren a una capa de células endoteliales intactas, aunque estén sujetas a una elevada fuerza de cizalla, pero sí lo hacen fuertemente a un subendotelio expuesto. Se han estudiado diversas moléculas del subendotelio para intentar definir qué molécula es la más importante en mediar la adhesión bajo el efecto de la fuerza de cizalla: (i) El **colágeno** fibrilar tipo I y III está presente en altas concentraciones en arterias y ambos unen FvW. Los monómeros de FvW muestran dos sitios de unión para estos tipos de colágeno, de los cuales solo uno es relevante. El tipo VI también une este factor, pero está en menor cantidad en sector arterial. Este tipo de colágeno no responde a la fuerza de cizalla elevada, pero sí a baja fuerza de cizalla, uniéndose así a las plaquetas; este hecho sugiere que el colágeno tipo VI media la adhesión plaquetaria en vénulas y capilares, donde la fuerza de cizalla es menor; (ii) El **FvW** subendotelial, derivado de células endoteliales, puede ser más activo que el FvW plasmático en la iniciación de la adhesión a flujo lento, pero por sí solo no promueve la adhesión plaquetaria en ausencia de «shear stress»; sin embargo, en compañía de otros componentes, baja el nivel del umbral de esta fuerza para que se produzca la adhesión; (iii) El **fibrinógeno** también se encuentra en la superficie del endotelio vascular y junto a la fibrina en placas ateroscleróticas. La fibrina también une a las plaquetas y se ha visto que en fuerzas de cizalla elevadas la formación de trombo plaquetario sobre la fibrina es relativamente más dependiente de FvW y GPIIb, mientras que en niveles más bajos es relativamente más dependiente de GPIIb-IIIa; (iv) Otras moléculas implicadas en la adhesión y que interactuarían con las glicoproteínas plaquetarias son laminina, trombospondina, fibulina-1 y fibronectina. La fibulina-1,

recientemente descrita, es una proteína que puede asociarse a otros constituyentes de la matriz como la laminina y la fibronectina y también al fibrinógeno; favorece la adhesión mediante formación de puentes de fibrinógeno con las plaquetas. La fibronectina media la adhesión plaquetaria a través de su unión a GPIIb-IIIa y GPIIb-IIIa en las plaquetas. La trombospondina se piensa que se une a CD36.

5.2. Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria es el proceso de unión de las plaquetas entre sí para formar el trombo. Entre los agonistas plaquetarios que se han estudiado *in vitro*, los que tienen mayor relevancia fisiológica parecen ser la trombina, el ADP, la adrenalina, el colágeno, y el ácido araquidónico. En la tabla 19-4 se muestran los agonistas, clasificados según su capacidad de activación plaquetaria. Como agonistas fuertes se consideran los que pueden inducir la secreción con independencia de la agregación, y a altas concentraciones, de modo independiente a la síntesis de tromboxano. En cambio los agonistas débiles requieren agregación y síntesis de tromboxano para una respuesta completa.

Si la activación se realiza en plaquetas en suspensión, la primera respuesta morfológica al inductor es su cambio de forma, de disco a esfera con emisión de pseudópodos. Desde el punto de vista bioquímico, es necesario el cambio conformacional del receptor GPIIb-IIIa a la forma adhesiva, capaz de unir fibrinógeno y formar puentes entre plaquetas físicamente próximas para producir agregación plaquetaria con cualquier inductor. La unión del fibrinógeno, a su vez, refuerza la activación plaquetaria, y favorece la secuencia bioquímica que lleva a la secreción y la síntesis de TXA_2 .

El uso de técnicas agregométricas ha permitido el estudio bioquímico y fisiopatológico de este proceso. La agregometría óptica es el método más utilizado y el que ha proporcionado más información sobre la fisiopatología plaquetaria y el efecto de fármacos antitrombóticos.

Tabla 19-4. Agonistas más comunes que inducen respuesta plaquetaria

Fuerza del estímulo	Agonista
Débil	ADP, adrenalina, colágeno (dosis baja), vasopresina, Serotonina, PAF
Intermedia	Tromboxano A2
Fuerte	Trombina, colágeno (dosis alta), ionóforo A23187

PAF, "Platelet activating factor"

5.3. Secreción y reclutamiento

La reacción de liberación consiste en la extrusión de los gránulos citoplasmáticos y su contenido al medio extracelular. La secreción de los gránulos α requiere una menor estimulación que la de los gránulos densos o lisosomas. Este proceso es dependiente del calcio citosólico. Morfológicamente, en una primera etapa, se produce la centralización de los gránulos y posteriormente una fusión de los mismos con la membrana del sistema canalicular abierto y la ulterior salida a través de los poros que comunican este sistema con el exterior.

La secreción tiene una gran importancia funcional ya que amplifica la respuesta activante del estímulo inicial en las plaquetas secretoras. Adicionalmente, el liberado de las plaquetas activadas es un agonista fisiológico complejo que promueve la activación de otras plaquetas induciendo el reclutamiento, una etapa esencial en el crecimiento del trombo. Estudios recientes indican que tanto la secreción plaquetaria como la actividad reclutadora de los liberados de las plaquetas activadas se modulan por su interacción con otras células sanguíneas. La interacción leucocito-plaqueta inhibe, mientras que la interacción eritrocito-plaqueta incrementa la reactividad plaquetaria. Estos son procesos regulados bioquímicamente y modifica el efecto de algunos fármacos antitrombóticos, especialmente de la aspirina.

Por otra parte, las sustancias liberadas o expuestas en la membrana de las plaquetas activadas participan en las interacciones de las plaquetas con las restantes células sanguíneas y el endotelio.

5.4. Consolidación del trombo

La activación plaquetaria libera factores de la coagulación contenidos en sus gránulos y convierte la superficie de las plaquetas en una superficie procoagulante que contribuye a la generación de trombina. También el daño al endotelio inicia la cascada de la coagulación que culmina en la generación de trombina y en la transformación de fibrinógeno en fibrina. La formación de trombina es la etapa final de la hemostasia primaria. La fibrina formada, se intercala entre las células del trombo plaquetario y en la superficie externa del mismo. El trombo se consolida mediante la retracción del coágulo, un proceso mediado por GPIIb-IIIa, que asocia fuertemente las células a la fibrina, haciendo el tapón hemostático prácticamente impermeable y capaz de resistir la presión del flujo sanguíneo.

La activación de las plaquetas con colágeno o trombina produce la emisión de microvesículas, con un diámetro de 200-800 nm. En general exponen fosfolípidos procoagulantes y pueden unir algunos factores de coagulación como Xa, Va, proteína S y fibrina, por lo que se cree contribuyen a la actividad procoagulante y a la formación del trombo. También se ha comprobado que pueden exponer P-selectina, y por tanto interaccionar con otras células que unen el ligando, como leucocitos u otras plaquetas.

6. SECUENCIA BIOQUÍMICA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La activación plaquetaria es un proceso modulado dinámicamente por señales activantes e inhibitoras a las que se encuentra

expuesta la superficie de la célula. Como se ha mencionado, entre los agonistas plaquetarios se incluyen macromoléculas de la matriz subendotelial (colágeno, FVW) hormonas circulantes (adrenalina, vasopresina), sustancias generadas en la lesión vascular como trombina, sustancias liberadas por las plaquetas activadas (ADP, TXA₂, serotonina) o generadas por otras células. Las sustancias inhibitoras más relevantes son la prostaciclina, el óxido nítrico y las ecto-ADP-asas de membrana, que ejercen una función tromborreguladora.

Las plaquetas poseen diversos mecanismos y

estrategias por los que los estímulos extracelulares se transmiten al interior de la célula, que resulta en la respuesta funcional apropiada. Esto se lleva a cabo con la participación de distintos mecanismos complejos y altamente coordinados de transmisión de señales, aún no bien caracterizados. Estos incluyen, los receptores, la activación de proteínas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G), metabolismo del fosfatidilinositol, metabolismo del ácido araquidónico, movimientos de calcio, reorganización del citoesqueleto y diversos procesos de fosforilación de proteínas en serina/treonina y/o en tirosina que juegan un papel esencial en la transmisión de señales (figura 19-6).

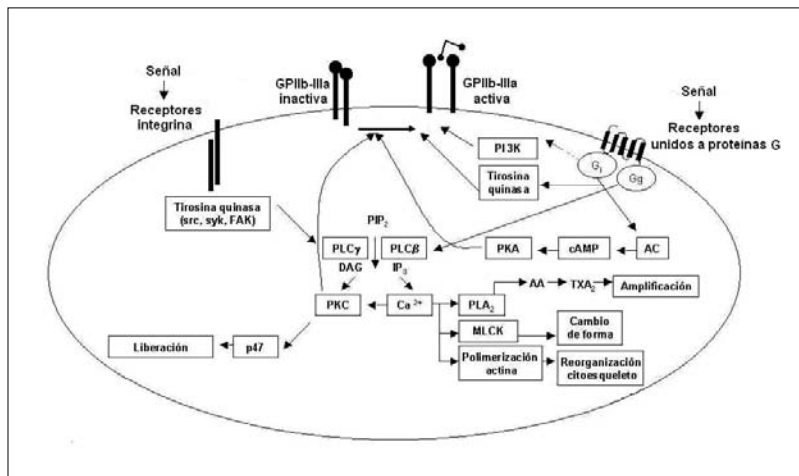


Figura 19-6. Transducción de señales en la activación plaquetaria. Aunque los distintos agonistas plaquetarios muestran diferencias específicas en los mecanismos de transducción de señales, también existen elementos comunes. Algunos agonistas solubles como la trombina o el TXA₂ actúan a través de receptores unidos a proteínas G, que activan la fosfolipasa beta (PLCβ), iniciando el metabolismo del fosfatidilinositol para dar lugar a la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), que a su vez, activan a la proteína quinasa C (PKC) y promueven el aumento de la concentración de calcio en el citosol [Ca²⁺]_i. En cambio, la señalización a través de receptores integrina inician la señal por activación de proteína (s) kinasa, que a su vez se requieren para activar a la fosfolipasa gamma (PLCγ), lo que igualmente inicia el metabolismo del fosfatidilinositol. El aumento de calcio citosólico [Ca²⁺]_i, a su vez, activa varios procesos dependientes de calcio, como la activación de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que participa en el cambio de forma de las plaquetas, la activación de la fosfolipasa A2 (PLA₂), que libera ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos para la síntesis de TXA₂ y de otros eicosanoides o la polimerización de actina y la reorganización del citoesqueleto, que permite el ensamblaje de moléculas de señalización. La activación de la PKC fosforila P-47 (pleckstrina), que contribuye al proceso secretor. PKC y tiosina kinasa participan en el cambio conformacional de GPIIb-IIIa a la forma adhesiva, capaz de unir fibrinógeno, que es el punto central del proceso agregatorio. A su vez, la unión del fibrinógeno al receptor inicia otra cascada de señalización mediada por fosforilación de proteínas en residuos tiosina.

6.1. Receptores plaquetarios que participan en la transducción de señales. Los receptores plaquetarios, en lo que se refiere a los mecanismos de señalización, pueden dividirse en dos grandes grupos. Por una parte, los que inician la señalización por proteínas G y

responden a agonistas solubles como la trombina, el tromboxano o el ADP y por otra, los receptores integrina cuyo mecanismo de señalización se inicia por fosforilación de proteínas en tiosina, aunque en ambos casos, la fosforilación de proteínas juega un papel

importante en la señalización subsiguiente.

Los receptores unidos a proteínas G, tienen un dominio extracelular, siete dominios transmembrana unidos entre sí y un corto dominio intracelular al que se acopla la proteína G. Los receptores integrina tienen en común que pueden enviar señales de modo bidireccional entre sus dominios extracelulares e intracelulares. El ejemplo más representativo es el receptor GPIIb-IIIa. Como se muestra esquemáticamente en la figura 19-6, los dos tipos de receptores activan una fosfolipasa C (PLC) que inicia el metabolismo del fosfatidilinositol.

Señalización iniciada por el TXA₂. La interacción del TXA₂ con su receptor se acopla a Gq y G12/G13 y como se ha dicho, activa a la PLCβ, mientras G12/G13 regula la fosforilación de MLCK. El aumento del calcio citosólico y la activación de PKC, activa al receptor GPIIb-IIa y el proceso secretor.

Señalización iniciada por trombina. La trombina estimula a las plaquetas por varios receptores, incluyendo el complejo GPIb-IX-V y los conocidos como receptores activados por proteasas (PAR). En plaquetas, la trombina actúa sobre PAR-1 y PAR-4, ambos unidos a proteínas G (Gq y probablemente, G12/13), aunque PAR-1 se cree que puede actuar también sobre Gi. El efecto de trombina sobre PAR-1 inicia diversas vías señalizadoras y activación de varias quinasas incluyendo tirosina, serina/treonina, MAPK y PI3K (ver más adelante). PAR-4 también inicia la activación, pero es menos efectivo que PAR-1. La activación del complejo GPIb-IX-V y de los receptores PAR, activa la PLC, iniciando el metabolismo de fosfoinosítidos (figura 19-6), que concluye con la activación de GPIIb-IIIa. A los mecanismos señalizadores que regulan la actividad de GPIIb-IIIa, nos referiremos más adelante.

Señalización iniciada por el ADP. Como se ha mencionado anteriormente, el ADP estimula a las plaquetas a través de dos receptores purinérgicos, P2Y1 y P2Y12. El receptor P2Y1 está unido a Gq y su activación se asocia con la PLCβ, mientras que P2Y12 se asocia a Gi, y actúa inhibiendo la adenilato ciclasa, lo que potencia la activación plaquetaria por inhibición de la síntesis de AMPc. Ambos receptores tienen un papel complementario, el P2Y1 inicia la activación y el P2Y12 la mantiene. La activación plaquetaria mediada por ADP tiene un papel importante en la activación plaquetaria en

sistemas de flujo elevado y en el reclutamiento plaquetario. El bloqueo de P2Y12 por tienopiridinas (ticlopidina, clopidogrel) en pacientes con patología vascular, ha mostrado un efecto equivalente al de la aspirina como droga antitrombótica.

6.2. Proteínas G

Las proteínas G son una familia de guanosintrifosfato hidrolasas compuestas de subunidades α y β y γ . Se han identificado, al menos 20 isoformas de la cadena α , 5β y 10γ . Las subunidades β y γ forman un complejo que puede unirse a diferentes unidades para formar el heterodímero. Es la subunidad α la que se utiliza para clasificar las proteínas G. Se localizan en la cara interna de la membrana donde sirven de puente entre los receptores de membrana y moléculas efectoras intracelulares, que generan segundos mensajeros o regulan canales iónicos. Funcionan como interruptores moleculares, cambiando entre una conformación inactiva en la que unen GDP a la forma activa en la que unen GTP. En las plaquetas las proteínas G mejor caracterizadas son: Gq, G12, Gi y Gs. Gq y G12 se asocian a la activación de PLC. La señalización vía Gi o Gs regula la formación AMPc mediante inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa (Gi) o su activación (Gs), respondiendo a señales activantes o inhibitorias, respectivamente.

La activación de la adenilato ciclasa por un estímulo inhibitorio (ej. prostaciclina) vía Gs, aumenta la tasa de ampc, que activa una proteína quinasa (PKA) que se opone al aumento del calcio citosólico e inhibe la activación (figura 19-6).

6.3. Fosfolipasa C. El estímulo plaquetario a través de un receptor que señala por Gq o G12 induce la activación de PLCβ, que inicia el metabolismo del fosfatidil inositol y la formación de importantes mediadores lipídicos: el diacilglicerol (DAG) y el inositol (1,4,5)-trifosfato (IP3). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC) que media en varios aspectos de la activación plaquetaria, ej. el cambio conformacional del receptor GPIIb-IIIa. El IP3 induce la liberación del calcio del sistema tubular denso produciendo un aumento del calcio citosólico. Este aumento del calcio citosólico, a su vez iniciará la activación de los procesos dependientes del calcio en la plaqueta, indispensables para la continuación del proceso activante (figura 19-6).

6.4. Calcio. El incremento de calcio en las

plaquetas activadas está regulado por su liberación de los depósitos intracelulares por un mecanismo asociado a IP₃ y su entrada a través de canales de calcio en la membrana. Una vía importante de entrada de calcio es el regulado por el contenido de calcio de los depósitos o SMCE (“store-mediated calcium entry”), un proceso todavía no resuelto, en el que se han propuesto mecanismos de fosforilación de proteínas en serina/treonina y en tirosina. El nivel de calcio en el citoplasma de las plaquetas se encuentra también regulado por las tasas de AMPc en la célula.

6.5. Fosfolipasa A₂. La fosfolipasa A₂ (PLA₂) libera ácido araquidónico (AA) de la posición 2 de los fosfolípidos de la membrana, que es el paso inicial y limitante en la síntesis de eicosanoides. De las distintas fosfolipasas celulares la PLA₂ citosólica de 85 kDa es la encargada de liberar AA. La activación de cPLA₂ está regulada por la tasa de calcio citosólico, necesario para la unión de la enzima a la membrana, y su fosforilación en los residuos Ser⁵⁰⁵ y Ser⁷²⁷ por la p38 MAPK y MNK1 kinasas, respectivamente. El AA liberado se metaboliza por la ciclooxigenasa (COX-1) o endoperóxido sintetasa a endoperóxidos cíclicos PGG₂/PGH₂, compuestos proagregatorios muy inestables que se transforman por la tromboxano sintetasa a TXA₂. El AA liberado, también se metaboliza por la 12-lipoxigenasa de las plaquetas al hidroxiaácido 12-HETE, que junto con restos de AA libre en los segundos iniciales de la activación plaquetaria participa en el metabolismo transcelular de eicosanoides con otros tipos celulares de la sangre. Esta comunicación bioquímica mediada por eicosanoides entre distintos tipos celulares modifica la reactividad de las células participantes y contribuye a los efectos de las interacciones celulares entre las plaquetas, otras células sanguíneas y el endotelio.

Desde un punto de vista funcional, la síntesis de TXA₂ es relevante como amplificador de la respuesta plaquetaria e inductor del reclutamiento. Recientemente se ha evidenciado su capacidad para inducir exposición de fosfatidilserina en un porcentaje de eritrocitos normales, que adquieren así un fenotipo protrombótico. La inhibición de la COX-1 por aspirina, y consecuentemente de la síntesis de TXA₂, reduce en un 25% la aparición de eventos isquémicos en pacientes con patología vascular.

6.6. Fosforilación de proteínas en las plaquetas. Entre las kinasas con mayor interés para la función de las plaquetas están la proteína kinasa C (PKC), la kinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), las “mitogen-activated kinasas” (MAPKs), la proteína kinasa A (PKA) y las proteínas tirosina kinasas (PTKs) principalmente.

6.6.1. Proteína kinasa C. La PKC es en realidad una familia de kinasas que fosforilan proteínas en los aminoácidos serina/treonina. Actualmente se conocen nueve miembros de esta familia de kinasas codificadas por genes distintos, de las que seis se han encontrado en las plaquetas. Es una enzima citosólica que requiere para su activación DAG. El DAG formado, como se ha dicho, por la PLC actuando sobre el PIP₂, queda unido a la membrana de la plaqueta, y la PKC citosólica pasa a la membrana uniéndose al DAG para ser activada en presencia de calcio y de fosfatidilserina. La activación de esta kinasa da lugar a la fosforilación de una proteína de 47 kDa denominada pleckstrina, de función no bien esclarecida, aunque se piensa que participa en el proceso de liberación plaquetaria, y se utiliza como marcador experimental de la activación de la kinasa. Los ésteres de forbol producen experimentalmente una estimulación directa de la PKC asociada a la agregación de las plaquetas. Esta acción se ha sugerido que pueda estar mediada por la fosforilación del dominio citoplasmático de ₃ de la GPIIb-IIIa lo que podría facilitar la unión del fibrinógeno y por tanto la agregación. Se ha sugerido que la PKC puede contribuir tanto a la activación de las plaquetas como a su inhibición, posteriormente. El efecto inhibitorio podría tener lugar reduciendo la actividad de la PLC o, como se ha descrito más recientemente, por el efecto de su substrato fosforilado, la pleckstrina, que forma un complejo con otra enzima para bloquear la señalización calcio dependiente. El aumento del calcio citoplasmático mediado por el IP₃ también activa a la MLCK que cuando está asociada a la calmodulina fosforila la cadena ligera de la miosina (20 kDa), la cual participa en el proceso de cambio de forma de la plaqueta.

6.6.2. MAP kinasas. Otros mecanismos interesantes de fosforilación en las plaquetas activadas son los mediados por las MAP kinasas (MAPK) que son serina/treonina kinasas. Su actividad está a su vez regulada por fosforilación en tirosina y/o en serina/treonina. Las MAPK

participan, activamente, en la transmisión del estímulo de células nucleadas donde juegan un papel central en los procesos de diferenciación y proliferación celular. La estimulación de las plaquetas produce la activación de la cascada de MAPK, de las que hasta ahora se conocen tres: p42 MAPK, p44 MAPK, p38 MAPK. La estimulación de las plaquetas con trombina activa a la p42 MAPK y la p38 MAPK. Esta última, es conocido que fosforila a la PLA₂ citosólica, aumentando su actividad catalítica.

6.6.3. Tirosina Kinasa. La primera proteína tirosina kinasa (PTK) identificada por Hunter y Sefton fue la proteína transformadora del virus del sarcoma de Rous, una proteína de 60 kDa denominada pp^{60src}. Las proteínas tirosina kinasa que hoy conocemos pueden clasificarse en dos grupos: (a) los receptores con actividad tirosina kinasa, que poseen un dominio extracelular y participan en la señalización de factores de crecimiento y hormonas como la insulina, y (b) las PTKs intracelulares, que carecen por tanto de dominios extracelular o transmembrana. Estas últimas son las más abundantes e importantes en la regulación de la función de las plaquetas.

Se cree que los receptores que poseen actividad tirosina kinasa se autofosforilan en su dominio citoplasmático al recibir el estímulo e inician así la cascada de señalización. Sin embargo, la activación de las PTKs intracelulares requiere la participación de otros mediadores transmembrana y/o intracelulares que conecten la señal del receptor de membrana con las kinasa. El modo en que esto ocurre no es conocido y será probablemente, por su importancia, un objetivo en la investigación en los próximos años.

En la actualidad se han identificado distintos grupos de PTKs no receptoras. Estos incluyen las conocidas como src, FAK, syk, JAK y csk, entre otras, siendo las mencionadas las más asociadas a la transmisión del estímulo en las plaquetas. En realidad, cada uno de estos tipos de PTKs es una familia compuesta por varios miembros que comparten entre sí distintos grados de homología. Por ejemplo, la familia src está compuesta por 8 tirosina kinasa: fyn, lyn, hck, yes, lck, fsr, blk e yrk. De ellas, las cuatro primeras se han identificado en las plaquetas y

además, varias de ellas pueden presentarse en distintas isoformas. Sus masas moleculares aproximadas son: fyn 59-60 kDa, lyn 54-58 kDa y hck 61 kDa. Src es la tirosina kinasa más prominente, y constituye el 0,2-0,4% de las proteínas totales de las plaquetas, mientras el resto presenta concentraciones entre 10 y 50 veces menores que src.

La figura 19-7A muestra, como ejemplo, los componentes estructurales comunes a las PTKs de la familia src. Constan de un dominio catalítico, también denominado SH-1. El dominio SH-2, de aproximadamente 100 aminoácidos presenta una característica muy interesante, y es que puede unirse a otras proteínas que tengan una secuencia específica de aminoácidos conteniendo una o varias tirosinas fosforiladas. El dominio SH-3 de aproximadamente 75 aminoácidos, que de un modo análogo, es capaz de asociarse a secuencias ricas en prolina de otras proteínas. La capacidad de estas regiones SH-2 y SH-3 para ensamblar a las PTKs entre sí o con otras proteínas es el mecanismo por el cual las PTKs participan en la formación de complejos multimoleculares de señalización. Hay que indicar que estos dominios SH-2 y SH-3 no son exclusivos de las PTKs, sino que aparecen en un gran número de proteínas de otro tipo, como proteínas del citoesqueleto o proteínas señalizadoras. De este modo puede producirse la interacción proteína-proteína entre dominios SH-2 y residuos fosforilados en tirosina o dominios SH-3 y regiones ricas en prolina, respectivamente. De esta forma se pueden formar una gran variedad de complejos entre proteínas que presentan en su secuencia uno o varios de estos motivos estructurales. Además las PTKs de la familia src pueden acilarse en su extremo N-terminal, permitiendo el anclaje de la PTK a la membrana celular. En estado inactivo, src presenta una fosforilación en la tirosina 527. Esto provoca que la molécula se pliegue sobre sí misma, de forma que se una Y527 intramolecularmente con su propio dominio SH-2 (figura 19-7B). Se crea así una estructura cerrada de la proteína, en la que no están accesibles el dominio kinasa ni los dominios SH-2 y SH-3. No está claro cuál es la kinasa que provoca esta fosforilación inactivante, aunque podría tratarse de la kinasa csk.

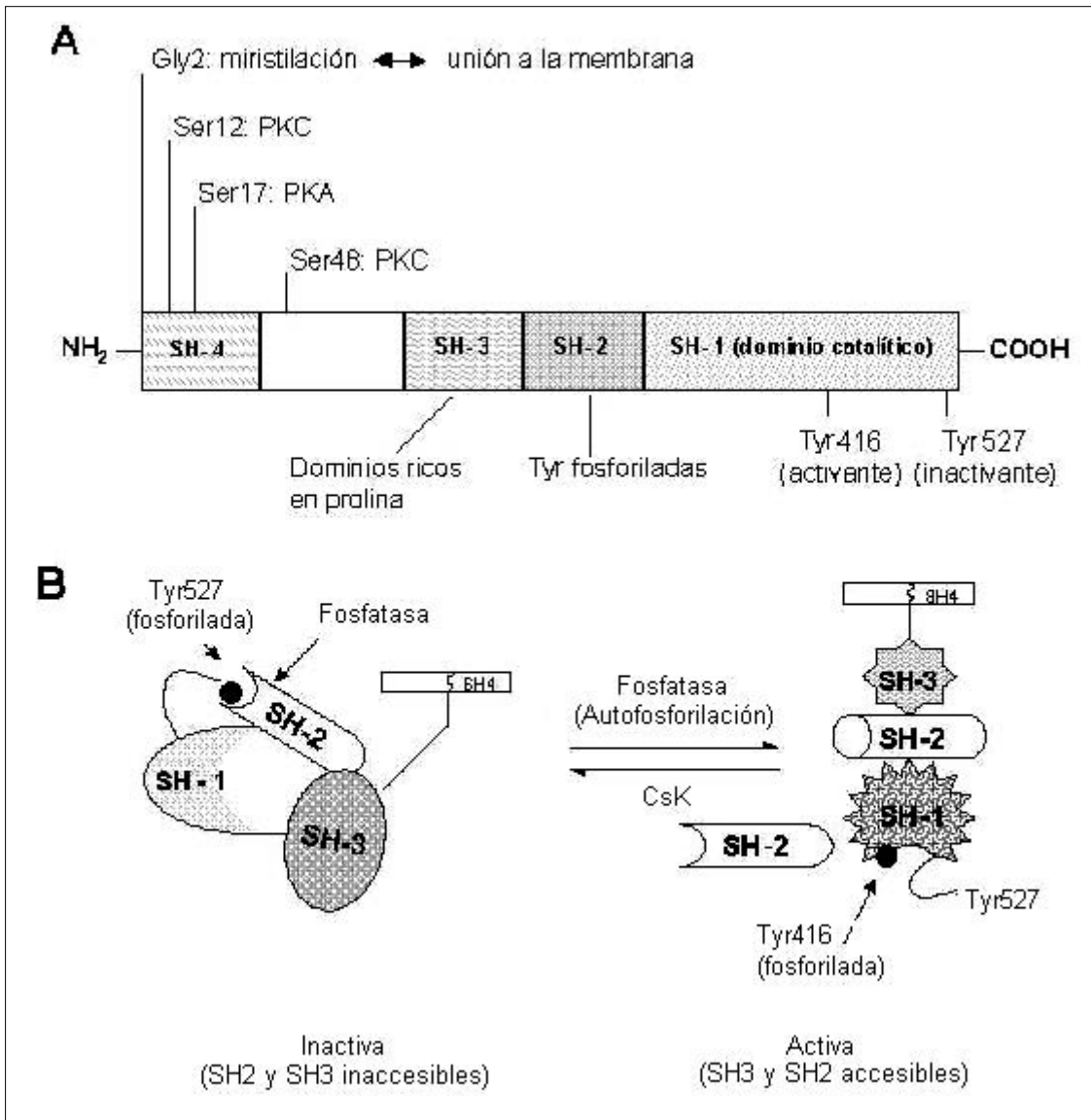


Figura 19-7. Estructura (A) y esquema de activación (B) de la proteína kinasa src.

Cuando la plaqueta se activa, una fosfatasa no identificada defosforila Y527, lo que provoca que se despliegue la kinasa, adoptando una conformación en la que son accesibles todos sus dominios. Adicionalmente, se requiere la autofosforilación de Y416 para activar completamente la kinasa. En su extremo N-terminal src presenta varios puntos fosforilables por PKC. Se ha postulado que la fosforilación de estas serinas por PKC podría aumentar la afinidad de src por sus substratos. Una vez activada, la kinasa src se trasloca al citoesqueleto, donde se encuentra asociada con distintas proteínas de señalización, como la

fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3-K), o la tirosina fosfatasa PTP1B.

La tirosina kinasa Syk (72 kDa) se detectó, en las plaquetas, en 1992. Presenta dos dominios SH-2 y se activa rápidamente (10 segundos) cuando las plaquetas se estimulan con trombina. Sin embargo, su activación completa solo ocurre después de la unión del ligando a la GPIIb-IIIa. Su actividad está regulada por fosforilación, aunque se desconoce si se trata de una autofosforilación o si ésta se produce por otras kinasas. Se ha asociado con los receptores del colágeno y los del tipo Fcγ-RIIA, ya que su

actividad aumenta rápidamente al estimular los mismos.

La tirosina kinasa FAK (125 kDa), no tiene dominios SH-2 ni SH-3. Su actividad se regula por fosforilación en tirosina, probablemente por autofosforilación, en plaquetas estimuladas, lo que puede permitir que por esta vía pueda asociarse a otras proteínas, kinasas o no, que posean secuencias SH-2. La fosforilación de la kinasa FAK ocurre en etapas tardías de la agregación de las plaquetas y depende totalmente de la activación del receptor GPIIb-IIIa y de la reorganización del citoesqueleto. En este sentido se ha comprobado que su activación no tiene lugar en plaquetas de pacientes con tromboastenia de Glanzmann. Las tirosinas kinasas JAK son en realidad una familia de proteínas (JAK 1, JAK2, JAK3) que también se autofosforilan en tirosina, en plaquetas estimuladas con trombina. Estas tirosinas kinasas carecen de dominios SH-2 y SH-3.

Se piensa que la PTKs están localizadas en la parte interna de la membrana plasmática, desde donde están bien situadas para servir de nexo entre los receptores transmembrana, las proteínas del citoesqueleto y diversos sistemas enzimáticos del citoplasma que participan en el sistema de señalización. En relación a su función, aunque no bien esclarecida en la actualidad, se piensa que van a propiciar y a regular interacciones proteína-proteína, que a su vez van a favorecer la relocalización de moléculas señalizadoras en el interior de la célula a posiciones efectivas para su acción. Esto es importante, por ejemplo, en relación a los complejos de kinasas-fosfatasa necesarios para asegurar el control ajustado de los procesos de fosforilación, o de las moléculas de señalización que se traslocan del citoplasma al citoesqueleto reorganizado después de la activación de las plaquetas (como varias de las fosfolipasas C, tirosina kinasas, etc.), donde se ensamblan para formar complejos multimoleculares que pueden presentar unas estructuras parecidas a las zonas de adhesión focal presentes en otras células.

Además de las PTKs existen en las plaquetas tirosina fosfatasa. Hasta el momento se han identificado tres: PTP1B, SPH-1 y SPH-2. Su papel está probablemente asociado al mantenimiento de un nivel bajo de proteínas fosforiladas en tirosina en las plaquetas en reposo. Esto se infiere del hecho de que un inhibidor de las mismas, el pervanadato, produce un espectacular incremento de la

fosforilación en tirosinas y además induce agregación plaquetaria. El papel regulador de las tirosina fosfatasa es importante, ya que hoy existe evidencia de que la de fosforilación en tirosina en las plaquetas que controla su función es un fenómeno muy regulado y modulado por la acción coordinada de las tirosina kinasas y fosfatasa. Sin embargo, probablemente su papel va más allá de limitarse a mantener el nivel de fosforilación controlado, ya que existen evidencias de su participación en el proceso de activación de alguna kinasa, como es el caso de la src, al que nos hemos referido anteriormente.

6.6.4 Participación de la fosforilación en tirosina en aspectos funcionales de las plaquetas.

El hecho de que la fosforilación de proteínas en tirosina en las plaquetas pudiese jugar un papel en la función de las plaquetas, empezó a sospecharse a partir de 1986 en que el Dr. Golden y colaboradores encontraron que las plaquetas expresaban altos niveles de la tirosina kinasa pp60^{src}. También se encontró que la estimulación de las plaquetas con trombina producía fosforilación en residuos tirosina en varias proteínas plaquetarias. Asimismo, se comprobó que la aparición de nuevas proteínas fosforiladas en tirosina se produce no solo con trombina, sino también con otros agonistas plaquetarios. El siguiente e importante paso que puso en evidencia la relevancia de esta vía de señalización en las plaquetas, fue su asociación con algunos aspectos de la actividad del receptor GPIIb-IIIa, que es una etapa común a la agregación de las plaquetas inducida por todos los agonistas. La asociación entre la unión del fibrinógeno al receptor GPIIb-IIIa y la subsiguiente fosforilación de proteínas en tirosina se confirmó en pacientes con tromboastenia de Glanzmann que presentan un defecto en este receptor de membrana.

Otro aspecto que confirma la importancia de esta ruta metabólica en la función de las plaquetas deriva del uso de inhibidores específicos de las kinasas/fosfatasa. En este sentido se ha comprobado la inhibición de la agregación y de la secreción de las plaquetas producida por su tratamiento con inhibidores específicos de las tirosina kinasas. La inhibición de las tirosina kinasas reduce la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de las plaquetas y la síntesis de TXA₂, mientras que el vanadato, una sustancia que inhibe las tirosina fosfatasa, produce agregación plaquetaria y

liberación de ácido araquidónico. Estudios recientes en plaquetas tratadas con aspirina han puesto en evidencia que la fosforilación en tirosinas es también un elemento esencial en el control de la función plaquetaria por vías COX-1 independientes.

Teniendo en cuenta que uno de los primeros aspectos que se relacionaron con la fosforilación en tirosinas de las plaquetas fue la unión del fibrinógeno a la GPIIb-IIIa y la importancia de esta glicoproteína en la hemostasia y la trombosis, ésta es una de las vías que presentan actualmente más interés (ver punto 6.6.5).

6.6.5. Señalización a través de la glicoproteína GPIIb-IIIa

La glicoproteína GPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), como se ha comentado antes, es específica de las plaquetas y de su célula precursora el megacariocito, y pertenece a la familia de los receptores integridas. Es capaz de unir proteínas que poseen la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), entre las que se incluyen el factor von Willebrand, el fibrinógeno, la fibronectina, y la vitronectina.

En las plaquetas en reposo, el receptor presenta una conformación inactiva incapaz de unir proteínas adhesivas solubles. Sin embargo, cuando se produce la estimulación plaquetaria, sufre un cambio conformacional que le permite la unión de los ligandos adhesivos. Esta modificación del receptor a la forma adhesiva tiene lugar por mecanismos bioquímicos intracelulares de transmisión de la señal conocidos como señalización “de dentro a fuera” (“inside-out”) del receptor. Por otra parte, la unión del fibrinógeno a la conformación activa del receptor inicia otra secuencia de procesos bioquímicos en dirección “de fuera a dentro” de la membrana (“outside-in”) que refuerza el proceso de agregación.

Un aspecto importante, y actualmente no completamente resuelto de este proceso, es el mecanismo bioquímico por el cual se produce el cambio conformacional del receptor a la forma adhesiva por mecanismos “inside-out”. Se cree que este efecto podría estar mediado por: (a) modificaciones en el dominio citoplasmático del receptor, inducido por diversos mediadores intracelulares o (b) por proteínas de membrana que puedan unirse a la integrina.

La participación de los dominios citoplasmáticos de α_{IIb} o β_3 en el cambio conformacional del

receptor derivan de observaciones en mutaciones naturales o experimentales en esta zona del receptor. En este sentido, se han descrito alteraciones en dos pacientes con una variante de la Tromboastenia de Glanzmann que presentan anomalías genéticas en la región citoplasmática de β_3 . En ambos casos los pacientes tienen alteraciones hemorrágicas de moderadas a severas, y a pesar de tener niveles normales de $\alpha_{IIb}\beta_3$ sus plaquetas activadas no unen fibrinógeno ni agregan. Reproduciendo estas mutaciones en un sistema experimental como las células CHO a las que se hace que expresen $\alpha_{IIb}\beta_3$, se ha confirmado que producen alteraciones en la afinidad de la glicoproteína para unir ligandos adhesivos. Esto confirma la implicación de la zona β_3 citoplasmática en esta etapa inicial de activación.

Es posible que el cambio de afinidad del receptor se produzca por la unión a la zona citoplasmática de moléculas reguladoras. Se ha comprobado la existencia de varias de estas moléculas en experimentos *in vitro*. Estas incluyen, por ejemplo, proteínas del citoesqueleto (F-actina, α -actinina, talina) o moléculas de señalización (pp^{125FAK}, calreticulina, β_3 -endonexina), aunque en la actualidad no existe evidencia de que esto tenga lugar en las plaquetas *in vivo*. De entre ellas, la β_3 -endonexina se ha comprobado que además de tener capacidad para unirse a la zona citoplasmática de la β_3 , puede modular la afinidad del receptor. No obstante, en la actualidad no existe evidencia de que estas uniones tengan lugar en plaquetas intactas. Entre las proteínas de membrana que podrían interactuar con el receptor para cambiar su afinidad se han descrito varias que co-precipitan con la integrina como la calveolina, la CD47 y varias proteínas tirosina kinasas.

Otra posible vía para inducir el cambio conformacional del receptor a la forma adhesiva es la fosforilación de los dominios citoplasmáticos del receptor. Se ha sugerido la participación de procesos de fosforilación tanto en serina/treonina como en tirosina.

La participación funcional de las fosforilaciones en tirosina en el cambio conformacional del receptor deriva de las observaciones iniciales del Dr. Shattil utilizando el anticuerpo monoclonal PAC-1, que reconoce específicamente la forma activa del receptor que ha sido posteriormente confirmado por otros autores. No es conocido sin embargo, si

la fosforilación es el mecanismo efector de la activación del receptor, o si esta fosforilación es una etapa necesaria para producir el ensamblaje del dominio citoplasmático de β_3 con otras moléculas intracelulares que tengan dominios SH-2.

Como hemos indicado anteriormente, la unión del fibrinógeno a la configuración activa del receptor va a iniciar un proceso secuencial de señalización “outside-in” del que van a depender en último término la adhesión de las plaquetas a la matriz subendotelial, el tamaño de los agregados plaquetarios, la retracción del coágulo y la actividad procoagulante de las plaquetas.

En esta etapa es importante la oligomerización del receptor, el agrupamiento de varios receptores unidos por proteínas adhesivas en el plano de la membrana y la unión por puentes de fibrinógeno entre plaquetas contiguas. De este modo, la señal extracelular se transmite al interior de la célula y el receptor, además de actuar como punto de unión de ligandos adhesivos se comporta como un emisor de señales a través de la membrana hasta la zona intracelular (figura 19-5). En esta etapa, además de la propia integrina participan moléculas de señalización y proteínas del citoesqueleto, propiciándose la polimerización de la actina, el ensamblaje del citoesqueleto y la formación de complejos multimoleculares por las interacciones proteína-proteína.

6.7. Kinasas lipídicas

Un aspecto reciente e interesante es la participación de una kinasa lipídica en este sistema de señalización de las plaquetas, la PI3-K. Este enzima fosforila los inositoles en la posición 3 del anillo bencénico, para formar PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃. Existen dos isoformas de la enzima, activables por fosforilación en tirosina. El inicio de su actividad está asociada a la activación de la GPIIb-IIIa ya que se presenta alterada en pacientes con tromboastenia de Glanzmann y se bloquea con RGDS o inhibición de tirosina kinasas con tyrphostin. Se ha visto que esta enzima co-precipita con las PTKs syk y src en lisados de plaquetas activadas. Su papel no está todavía bien definido pero utilizando la wortmanina (un inhibidor de esta enzima) se ha visto que la agregación plaquetaria se hace reversible posiblemente por inhibición de la activación sostenida del receptor. También se ha descrito que la inhibición de la PI3-K bloquea parcialmente la señalización “outside-in” del

receptor GPIIb-IIIa en el ensamblaje de la actina, y en la agregación de las plaquetas. La PI3-K se trasloca al citoesqueleto y en esta localización subcelular se ha comprobado que se asocia a través de una región SH-3 a la kinasa de adhesión focal FAK que tiene una secuencia rica en prolina.

6.8. Fosforilación en la inhibición plaquetaria

En los puntos anteriores se han descrito los mecanismos de activación de las plaquetas mediados por GPIIb-IIIa, pero también son de interés fisiopatológico sus vías de inhibición. La prostaciclina actuando a través de una proteína G específica activa a la adenilciclase y a la proteína kinasa A (PKA) dependiente del AMPc. Otro importante tromborregulador del endotelio, el óxido nítrico, activa una kinasa dependiente de la guanilato ciclase, la proteína kinasa G (PKG). Se piensa que tanto la PKA como la PKG tienen un efecto inhibitorio sobre la GPIIb-IIIa a distintos niveles de la transducción del estímulo, aunque el mecanismo último no es todavía conocido. Un posible mecanismo de esta acción es la fosforilación de una proteína de 50 kDa denominada VASP, que se asocia a la actina. VASP se fosforila en serina por sustancias que activan a la PKA y a la PKG, y esta fosforilación se asocia a una inhibición de la función de las plaquetas.

6.9. Reorganización del citoesqueleto

El citoesqueleto de las plaquetas contiene dos componentes estructurales basados en filamentos de actina: (a) filamentos de actina que se encuentran en el citoplasma y median fenómenos de contracción y (b) el citoesqueleto submembranoso, unido a la membrana citoplasmática y que regula su forma y estabilidad. En plaquetas en reposo, sólo el 30-40% de la actina está polimerizada en filamentos.

Una modificación importante que tiene lugar como consecuencia de la activación de las plaquetas, es la reorganización de su citoesqueleto. Esto resulta en un rápido incremento de la polimerización de la actina y en la formación de un entramado de nuevos filamentos en la periferia de la parte interna de la membrana plasmática. Cuando se produce la agregación plaquetaria, la reorganización del citoesqueleto se intensifica y esto resulta en una asociación de la GPIIb-IIIa, varias proteínas que se unen a la actina y moléculas de señalización con el citoesqueleto reorganizado. El

ensamblaje de la glicoproteína a las estructuras del citoesqueleto se piensa que regula las propiedades adhesivas del receptor y estabiliza la unión del fibrinógeno al mismo por mecanismos aún no clarificados.

Durante mucho tiempo se ha considerado la reorganización del citoesqueleto como un componente principalmente mecánico del sistema contráctil, responsable, por ejemplo, del cambio de forma de las plaquetas, la emisión de pseudópodos y la retracción del coágulo. Los datos en la literatura de los últimos años hacen evidente que el citoesqueleto juega también un papel muy importante en la transmisión de señales a través de la membrana y en la regulación de los mecanismos de señalización en las plaquetas.

Existe un gran número de moléculas que en las plaquetas en reposo se encuentran en el citoplasma y que como consecuencia de la activación se relocalizan en el citoesqueleto. Entre éstas se encuentran varias proteínas tirosina kinasas, fosfolipasas y otras moléculas de señalización. De este modo, el citoesqueleto reorganizado da soporte para que se produzca el ensamblaje de glicoproteínas, proteínas contráctiles del propio citoesqueleto y diversas moléculas de señalización (PTKs, PI3-K, PLC, etc.) para formar los complejos multimoleculares que se cree regulan la respuesta funcional de las plaquetas. Aunque el mecanismo exacto de la remodelación del citoesqueleto no es completamente conocido, se ha implicado la participación activa en el mismo tanto de las proteínas G de bajo peso molecular (ρ , rac) como la mediación del metabolismo del fosfatidilinositol regulando los mecanismos de polimerización de la actina a través de efectos en sus proteínas asociadas (ej. profilina). La función de estos complejos multimoleculares en el citoesqueleto podría ser la unión de receptores glicoproteínas con otras proteínas celulares como sistema de señalización hacia el citoplasma de la célula.

Si se impide la reorganización del citoesqueleto por el tratamiento de las plaquetas con citocalpsina D (una sustancia que inhibe la polimerización de la actina) se inhibe la activación mediada por proteínas G de la PLC, disminuye la activación inicial de la GPIIb-IIIa, y se inhibe la fosforilación de proteínas en tirosina dependientes de GPIIb-IIIa. Esto implica una regulación por la polimerización de la actina y la reorganización del citoesqueleto de estos procesos cruciales en la transmisión del estímulo en las plaquetas.

Además de la conocida función contráctil del citoesqueleto y su papel esencial en la retracción del coágulo, el ensamblaje de la actina y de sus proteínas asociadas, toma un papel protagonista en el escenario de la activación de las plaquetas.

Consideraciones finales y perspectivas futuras en estudios de transducción de señales

Las bases moleculares de la activación de las plaquetas podrían ser vistas como un gran puzzle, en cuya construcción se ha avanzado mucho en los últimos años, y del que conocemos actualmente la existencia de muchas piezas, pero aún falta saber dónde y cómo colocar cada una de ellas, para tener una perspectiva completa. Puntos claves de este puzzle son los receptores de membrana, la reorganización del citoesqueleto y los mecanismos bioquímicos de transducción de señales que integran la respuesta funcional de las plaquetas.

Un factor común que parece implicado en la regulación de todos estos puntos claves es la fosforilación de aminoácidos específicos en serina, treonina, y especialmente en tirosina. Se ha hecho también evidente que existen mecanismos que regulan dónde y cuándo deben activarse las diferentes proteínas kinasas o fosfatasa, aunque el funcionamiento de estos mecanismos de regulación todavía es poco conocido.

La idea que podría extraerse de la información actualmente disponible, es que los procesos de fosforilación se comportan como elementos coordinadores del tráfico de señales que llegan a la célula. Esta acción podría tener lugar por una parte, diversificando adecuadamente la señal inicial de membrana para que llegue a las distintas vías metabólicas cuya acción conjunta sea necesaria para la respuesta final de la célula. Por otro lado, parece que puedan actuar integrando y asociando las moléculas de señalización adecuadas y además, que esto tenga lugar en la localización subcelular necesaria.

Estas funciones pueden llevarlas a cabo facilitando, como se ha dicho, las interacciones proteína-proteína dentro de la célula. Esto tiene lugar debido a la existencia de secuencias específicas en algunas de estas proteínas que son susceptibles de unirse a substratos fosforilados en otras, como las secuencias SH-2 y SH-3, formando un entramado.

Existen además otras proteínas que también

contribuyen al ensamblaje de los complejos de señalización como las proteínas adaptadoras, proteínas mantenedoras del complejo de señalización o proteínas de anclaje, que amplían el repertorio de posibilidades por los que puede realizarse el ensamblaje de proteínas y la formación de complejos multimoleculares. Estos elementos estructurales, en distintas combinaciones, pueden dar lugar a diferentes respuestas bioquímicas o funcionales en las células. En las plaquetas se ha descrito la existencia de un cierto número de moléculas adaptadoras (Grb2, shc, vav, c-Cbl, crkl y paxillina), que contienen uno o varios de los motivos estructurales necesarios para propiciar y ampliar las interacciones proteínas-proteínas mediadas por tirosina kinasas. El estudio de su función, de su papel, y de su localización en el puzzle de la transducción del estímulo en las plaquetas, será un área fértil de investigación en los próximos años.

Finalmente se puede señalar, que el avance en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos de transducción de señales permitirá el diagnóstico de defectos congénitos o adquiridos de la función plaquetaria no caracterizados previamente. Por ejemplo, defectos en las distintas etapas de señalización mediadas por el receptor GPIIb-IIIa o participación de estos mecanismos en plaquetas con distintos polimorfismos en las glicoproteínas de membrana.

También el avance de los conocimientos en esta área podría propiciar el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas antitrombóticas. Por ejemplo, varios de los últimos estudios con sustancias que bloquean la unión del fibrinógeno a la GPIIb-IIIa están mostrando resultados clínicos favorables en pacientes de alto riesgo trombótico.

LECTURAS SUGERIDAS

Trombopoyesis

Batar, P., Dale, G.L. "Platelet Turnover and Aging" In **Platelets**. Michelson A.D. (ed.) 1st ed. Amsterdam: Academic Press, 2002, pp. 53-84.

Bono, M.R. "Citoquinas" En **Fundamentos de Inmunología**, Palomo, I., Ferreira, A., Roseblatt, M., Sepúlveda, C. y Vergara, U. (eds.) Editorial Universidad de Talca. Capítulo 10, 1998, pp. 219-249.

Colman, R., Hirsh, J., Marder, V. **Hemostasis and Trombosis: Basic principles and Clinical Practice**. Third Edition, 1994, pp. 557-571

Hartwig, J. and Italiano, J. Jr. "The birth of the platelet". *J Thromb Haemostas* 2003; 1:1580-1586.

Rfkin, R. "The Megacariocyte-Platelet system" In **Clinical Hematology**, Stiene-Marrin, A.E, Lotpeich-Steininger, Ch (eds.). Editorial Lippincot. 2 ed. Vol 2, chapter 55, pp. 689-693,1998.

Stemberg, P.E., Hill, R.J. "Platelets and megakaryocytes" In **Wintrobe's Clinical Hematology**, Lee, G.R., Foerster, J., Lukens, J. Paraskevas, F., Greer, J.P., Rodgers, G.M., (eds.), 10th ed. v. 1. Baltimore, Maryland, USA: Williams and Wilkins, 1999, pp. 615-60.

Estructura plaquetaria

Aznar, J., Santos, M.T., Valles, J., Martinez-Sausor, V. "Effect of oral contraceptives on plasma and platelet lipid composition. Influence of the length duration time of ingestion". *Acta Obstet Gynecol Scand* 1986;65:33-40.

Calvete, J.J. "Platelet integrin GPIIb/IIIa: Structure-function correlations. An update and lessons from other integrins". *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:29-38.

Clemetson, K.J., Clemetson, J.M. "Platelet collagen receptors". *Thromb Haemost* 2001;86:189-97.

Clemetson, K.J. "Platelet receptors" In **Platelets**, Michelson, A.D. (ed.), chapter 5, Academic Press Amsterdam, 2002, pp. 65-84.

Hato, T., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J. "Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ " In **Platelets**, Michelson A.D. (ed.), 1st ed. Amsterdam: Academic Press, 2002, pp. 105-16.

Johnson, G.J. "Platelet Thromboxane Receptors: Biology and Function" In **Handbook of Platelet Physiology and Pharmacology**, Rao, G.H.R. (ed.) Boston/ Dordrecht/ London: Kluwer Academic Publishers, 1999, pp. 39-79.

Kunapuli, S.P., Dorsam, R.T., Kim, S., Quinton, T.M. "Platelet purinergic receptors". *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:175-80.

López, J.A., Smith, D.R., Dong, J.F. "A unique receptor for a unique function: the glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and activation" In **Platelets, Thrombosis and the Vessel Wall**. Michael C. Berndt (ed.), Harwood Academic Publishers, Australia 2000; Chapter 4, pp. 65-82.

Pereira, J. "Estructura, Producción Cinética y Función de las Plaquetas" En **Fisiología de la Sangre**. Mezzano, D. y Pereira, J. eds. Editorial P. Universidad Católica de Chile, 1993, pp. 145-176

Schick, P.K. "Megakaryocyte and platelet lipids" In **Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice**, Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Salzman, E.W.. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1994, pp. 574-589.

Valles, J, Aznar J, Santos MT. Composition of platelet fatty acids and their modulation by plasma fatty acids in humans: effect of age and sex. *Atherosclerosis* 1988;71:215-25.

Valles J, Aznar J, Santos MT. Effect of aspirin on platelet phospholipids. *Thromb Haemostas* 1976;36:628-33.

Valles J, Aznar J, Santos MT. Influence of some plasma fatty acids on the phospholipid fatty acid pattern of human platelets- An «ex vivo» experience. *Thromb Haemostas* 1984;52:232-5.

Envejecimiento plaquetario

Aranda, E., Pereira, J., Ajenjo, C., Prieto, C., Sepúlveda, S., Mezzano, D. "Human intraplatelet 5-hydroxytryptamine is correlated with mean platelet survival time". *Thromb Res* 84:67-72, 1996.

Batar, P., Dale, G.L. "Platelet turnover and aging" In **Platelets**. Michelson, AD. (ed.) Academic Press Amsterdam, chapter 4, 2002, pp. 53-64.

George, J.N., Dale, G.L. "Platelet kinetics" In Beutler E, **Hematology**, Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J., McGraw-Hill, Inc. New York, 1995, pp. 1202-1205.

Mezzano, D., Aranda, E., Foradori, A., Rodríguez, S., Lira, P. "Kinetics of platelet density subpopulations in splenectomized mongrel dogs". *Am J Hematol* 17:373-382, 1984.

Mezzano, D., Aranda, E., Foradori, A. "Comparative study of size, total protein, fibrinogen and 5-HT content of human and canine platelet density subpopulations". *Thromb Haemostas* 56:288-292, 1986.

Mezzano, D., Aranda, E., Rodríguez, S., Foradori, A., Lira, P. "Increase in density and accumulation of serotonin by human aging platelets". *Am J Hematol* 17:11-21, 1984.

Mezzano, D., Del Pino, G.E., Montesinos, M., García, M.E., Aranda, E., Foradori, A. "Platelet 5-Hydroxytryptamine increases with platelet age in dogs". *Thromb Haemostas* 66:254-258, 1991.

Mezzano, D., Hwang, K.L., Catalano, P., Aster, R.H. "Evidence that platelet buoyant density, but not size, correlates with platelet age in man". *Am J Hematol* 11:61-76, 1981.

Pereira, J., Cretney, C., Aster, RH. "Variation of class I HLA antigen expression among platelet density cohorts: a possible index of platelet age?" *Blood* 71:516-519, 1988.

Pereira, J., Palomo, I., Ocqueteau, M., Soto, M., Aranda, E., Mezzano, D. "Platelet aging in vivo is associated with loss of membrane phospholipid asymmetry". *Thromb Haemost.* 1999; 82:1318-1321.

Pereira, J., Soto, M., Palomo, I., et al. "Platelet aging in vivo is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs". *Thromb Haemost.* 2002; 87:905-909.

Zwaal, R., Scharf, A. "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells". *Blood* 89(4):1121-1132, 1997.

Adhesión, agregación, secreción

Marcus, A.J. "Platelets and their disorders" In **Disorders of Hemostasis**, Ratnoff, O.D., Forbes, C.D. (eds). 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996, pp. 79-137.

Merten, M., Thiagarajan, P. "P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates". *Circulation* 2000;102:1931-6.

Reed, G.L. "Platelet Secretion" In **Platelets**, Michelson, A.D. (ed.) 1st ed. Amsterdam: Academic Press, 2002, pp.181-96.

Santos, M.T., Valles, J., Aznar, J. "La plaqueta en la hemostasis y la trombosis" En **Clínica ginecológica. Alteraciones de la hemostasis en obstetricia**, Gilabert, J., Galbis, M., Aznar, J., Monleon, J., (eds) v. 11, Barcelona, Salvat Editores, 1988, pp. 50-71.

Savage, B., Ruggery, Z.M. "Platelet thrombus formation in flowing blood" In **Platelets** Michelson, A.D. (ed.) 1st ed. Amsterdam, Academic Press, 2002 pp. 197-213.

Reclutamiento e interacciones celulares

Marcus, A.J. "Platelets: their role in hemostasis, thrombosis and inflammation" In **Inflammation: basic principles and clinical correlates**, Gallin, J.I., Snyderman, R., (ed.) Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1999, pp. 77-95.

Marcus, A.J. "Thrombosis and inflammation as multicellular processes: patophysiological significance of transcellular metabolism" *Blood* 1990;76:1903-7.

Santos, M.T., Aznar, J. "Interacción plaquetas-hematíes en la patogenia de la trombosis" En **Enciclopedia Iberoamericana de Hematología**, Lopez-Borrascas, A., Arocha-Piango, C.L., Campos-Guerra, C.C., Parreira, A., Pavlovski, S., Ruiz-Arguelles, G., et al., (eds.) 1st ed. v. III. Salamanca, Ediciones Universidad de Salamanca, 1992.

Santos, M.T., Valles, J., Aznar, J., Marcus, A.J., Broekman, M.J., Safier, L.B. "Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity: reduction by aspirin". *Circulation* 1997;95:63-8.

Santos, M.T., Valles, J., Marcus, A.J., Safier, L.B., Broekman, M.J., Islam, N., et al. "Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes". *J Clin Invest* 1991;87:571-80.

Valles, J., Santos, M.T., Aznar, J., Marcus, A.J., Martinez-Sales, V., Portoles, M., et al. "Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, ADP release, and recruitment". *Blood* 1991;78:154-62.

Valles, J., Santos, M.T., Aznar, J., Martinez, M., Moscardo, A., Pinon, M., et al. "Platelet-erythrocyte interactions enhance $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo". *Blood* 2002;99:3978-84

Valles, J., Santos, M.T., Marcus, A.J., Safier, L.B., Broekman, M.J., Islam, N., et al. "Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins". *J Clin Invest* 1993;92:1357-65.

Generación de trombina, retracción del coágulo

Beguín, S., Kumar, R., Keularts, I., Seligsohn, U., Coller, B.S., Hemker, H.C. "Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIIb receptors and von willebrand factor". *Blood* 1999;93:564-70.

Briede, J.J., Heemskerk, J.W., Van't Veer, C., Hemker, H.C., Lindhout, T. "Contribution of platelet-derived factor Va to thrombin generation on immobilized collagen- and fibrinogen-adherent platelets". *Thromb Haemost* 2001;85:509-13.

Carr, M.E. Jr., Martin, E.J., Carr, S.L. "Delayed, reduced or inhibited thrombin production reduces platelet contractile force and results in weaker clot formation". *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:193-7.

Nieuwland, R., Sturk, A. "Platelet-derived microparticles". In **Platelets**, Michelson, A.D. (ed.) 1st ed. Amsterdam: Academic Press, 2002, pp. 197-213.

Solum, N.O. "Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2841-6.

Secuencia bioquímica de activación plaquetaria

Jackson, S.P., Nesbitt, W.S., Kulkarni, S. "Signaling events underlying thrombus formation". *J Thromb Haemost* 2003;1:1602-12.

Parise, L.V., Boudignon-Proudhon, C., Kelly, P.J., Naik, U.P. "Platelets in Hemostasis and Thrombosis" In **Wintrobe's Clinical Hematology**, Lee, G.R., Foerster, J., Lukens, J., Paraskevas, F., Greer, J.P., Rodgers, G.M. (eds.), 10th ed. v. 1. Baltimore, Maryland, USA: Williams and Wilkins, 1999, pp. 661-83.

Prevost, N., Woulfe, D., Tognolini, M., Brass, L.F. "Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation". *J Thromb Haemost* 2003;1:1613-27.

Woulfe, D., Yang, J., Prevost, N., O'Brien, P.J., Brass, L.F. "Signal transduction during the initiation, extension and perpetuation of platelet plug formation" In **Platelets**, Michelson, A.D. (ed.) 1st ed. Amsterdam: Academic Press, 200, pp. 197-213.

a) Proteínas G

Brass, L.F., Manning, D.R., Cichowski, K., Abrams, C.S. "Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond". *Thromb Haemost* 1997;78:581-9.

Ibarrondo, J., Joubert, D., Dufour, M.N., Cohensolal, A., Homburger, V., Jard, S., et al. "Close association of the alpha subunits of G(q) and G(11) G proteins with actin filaments in WRK(1) cells: Relation to G protein-mediated phospholipase C activation". *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8413-7.

Offermanns, S. "The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation". *Biol Chem* 2000;381:389-96.

Werry, T.D., Wilkinson, G.F., Willars, G.B. "Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺". *Biochem J* 2003 Sep 1;374(Pt 2):281-96.

b) PLC y metabolismo fosfatidilinositol

Berridge, M.J. "Inositol trisphosphate and calcium signaling". *Ann N Y Acad Sci* 1995;766:31-43.

Campbell, J.F., Brown, S., Munday, A.D., Mitchell, C.A. "The role of the phosphoinositide-derived second messenger molecules in platelet activation" In **Platelets**, Berndt, M.C. (ed.) Thrombosis and the vessel wall. 1st ed. v. 1. Victoria, Australia, Harwood Academic Publishers, 2000, pp. 127-48.

c) Calcio

Berridge, M.J. "Capacitative calcium entry". *Biochem J* 1995;312:1-11.

Patterson, R.L., Van Rossum, D.B., Gill, D.L. "Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model". *Cell* 1999;98:487-99.

Putney, J.W. Jr, Broad, L.M., Braun, F.J., "Lievremont JP, Bird GS. Mechanisms of capacitative calcium entry". *J Cell Sci* 2001 Jun;114:2223-9.

d) Fosfolipasa A2

Hefner, Y., Borsch-Haubold, A.G., Murakami, M, Wilde, J.I., Pasquet, S., Schieltz, D., et al. "Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases". *J Biol Chem* 2000;275:37542-51.

Kramer, R.M., Roberts, E.F., Um, S.L., Borschhaubold, A.G., Watson, S.P., Fisher, M.J., et al. "p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets - evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2". *J Biol Chem* 1996;271:27723-9.

Leslie, C.C. "Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2". *J Biol Chem* 1997;272:16709-12.

Nalefski, E.A., Sultzman, L.A., Martin, D.M., Kriz, R.W., Towler, P.S., Knopf, J.L., et al. "Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain". *J Biol Chem* 1994;269:18239-49.

e) Fosforilación de proteínas

e1) PKC

Newton, A.C., Johnson, J.E. "Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules". *Biochim Biophys Acta* 1998;1376:155-72.

e2) MAPK

Elion, E.A. "Signal transduction - routing MAP kinase cascades". *Science* 1998;281:1625-6.

Keyse, SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling". *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:186-92.

e3) PI3K

Rittenhouse, S.E. "Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function". *Blood* 1996;88:4401-14

Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases". *Exp Cell Res* 1999;253:239-54.

e4) Tirosina kinasas y fosfatasa

Clark, E.A., Shattil, S.J., Brugge, J.S. "Regulation of protein tyrosine kinases in platelets". *Trends Biochem Sci* 1994;19:464-9.

Corey, S.J., Anderson, S.M. "Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis". *Blood* 1999;93:1-14.

Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M, Yuan, Y., Salem, HH., Cooray, P. "Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets". *Thromb Haemost* 1996;76:640-50.

f) Señalización GPIIb-IIIa

Levy-Toledano, S., Gallet, C., Nadal, F., Bryckaert, M., Maclouf, J., Rosa, J.P. "Phosphorylation and dephosphorylation mechanisms in platelet function: A tightly regulated balance". *Thromb Haemost* 1997;78:226-33.

Levy-Toledano, S. "Platelet signal transduction pathways: Could we organize them into a 'hierarchy'?" *Haemostasis* 1999;29:4-15.

Millward, T.A, Zolnierowicz, S., Hemmings, B.A. "Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2^a". *Trends Biochem Sci* 1999;24:186-91.

Santos, M.T., Moscardo, A., Valles, J., Martinez, M., Pinon, M., Aznar, J., et al. "Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal

reorganization, $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin receptor activation, and aspirin-insensitive mechanisms of thrombin-stimulated human platelets". *Circulation* 2000;102:1924-30.

Shattil, S.J, Kashiwagi, H., Pampori, N. "Integrin signaling: the platelet paradigm". *Blood* 1998;91:2645-57.

g) Reorganización del citoesqueleto

Clark, E.A., Brugge, J.S. "Redistribution of Activated pp60c-src to Integrin-Dependent Cytoskeletal Complexes in Thrombin-Stimulated Platelets". *Mol Cell Biol* 1993;13:1863-71.

Fox, J.E. Cytoskeletal proteins and platelet signaling". *Thromb Haemost* 2001;86:198-213.

Fox, J.E.B., Lipfert, L., Clark, E.A., Reynolds, C.C., Austin, C.D., Brugge, J.S. "On the Role of the Platelet Membrane Skeleton in Mediating Signal Transduction - Association of GP-IIb-IIIa, pp60(c-src), pp62(c-yes), and the p21(ras) GTPase-Activating Protein with the Membrane Skeleton". *J Biol Chem* 1993;268:25973-84.

Furman, M.I., Gardner, T.M., Goldschmidtclermont, P.J. "Mechanisms of Cytoskeletal Reorganization During Platelet Activation". *Thromb Haemost* 1993;70:229-32.

Hartwig, J.H., Barkalow, K., Azim, A., Italiano, J. "The elegant platelet: Signals controlling actin assembly". *Thromb Haemost* 1999;82:392-8.

Li, R.Y., Ragab, A., Gaits, F., Ragabthomas, J.M.F., Chap, H. "Thrombin-induced redistribution of protein-tyrosine-phosphatases to the cytoskeletal complexes in human platelets". *Cell Mol Biol* 1994;40:665-75.

h) Formación de complejos de señalización

Pawson, T., Scott, J.D. "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins". *Science* 1997;278:2075-80.

Rao, A.K., Gabbeta, J. "Congenital disorders of platelet signal transduction". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:285-9.

Schillace, R.V., Scott, J.D. "Organization of kinases, phosphatases, and receptor signaling complexes". *J Clin Invest* 1999;103:761-5.

SISTEMA DE LA COAGULACIÓN Y SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Iván Palomo G., Patricia Fardella B. y Jaime Pereira G.

1. Introducción

2. Sistema de la coagulación

- 2.1. Nomenclatura
- 2.2. Secuencia clásica de las reacciones
 - 2.2.1. Vía intrínseca
 - 2.2.2. Vía extrínseca
- 2.3. Estructura, síntesis y función de los factores de la coagulación
 - 2.3.1. Estructura genérica de las enzimas de la coagulación
 - 2.3.2. Estructura y activación de los factores del sistema de contacto
 - 2.3.3. Factores vitamina K dependientes
 - 2.3.4. Factor tisular
 - 2.3.5. Cofactores V y VIII
 - 2.3.6. Complejos macromoleculares
 - 2.3.7. Fibrinógeno, trombina, factor XIII y formación de fibrina
- 2.4. Vida media de los factores
- 2.5. Sistema de la coagulación *in vivo*
- 2.6. Regulación del sistema de la coagulación
 - 2.6.1. Sistema antitrombina III
 - 2.6.2. Sistema de la proteína C
 - 2.6.3. Inhibidor de la vía extrínseca
 - 2.6.4. Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z
 - 2.6.5. Anexinas

3. Sistema fibrinolítico

- 3.1. Componentes del sistema fibrinolítico
 - 3.1.1. Plasminógeno
 - 3.1.2. Activadores del plasminógeno
 - 3.1.3. Plasmina
- 3.2. Regulación del sistema fibrinolítico
 - 3.2.1. PAI-1 y PAI-2
 - 3.2.2. Alfa 2 antiplasmina
 - 3.2.3. Inhibidor fibrinolítico dependiente de trombina

Resumen

La hemostasia es el proceso por el cual se detiene el sangrado después que se ha producido la ruptura de un vaso. En este proceso intervienen los vasos sanguíneos y fenómenos de vasoconstricción, las estructuras de soporte, las plaquetas y su interacción con los vasos a través del Factor von Willebrand, la cascada de coagulación con sus dos vías (extrínseca e intrínseca) que transformará el tapón plaquetario en un coágulo estable. Este proceso está finamente regulado por sistemas anticoagulantes naturales que inactivan los factores activados; entre éstos, encontramos a la antitrombina III que es uno de los principales anticoagulantes, el sistema de la proteína C y S y el inhibidor del factor tisular. Otro proceso importante es el de fibrinólisis, es decir la ruptura de los coágulos de fibrina para recanalizar el vaso y finalmente la reparación de éste.

Hasta hace unos años atrás se describía que la cascada de la coagulación era iniciada por activación de la vía intrínseca a través de los factores de contacto; en la actualidad se sabe que la cascada es iniciada a través de la vía extrínseca, con activación del factor VII por el factor tisular y que posteriormente se activan los factores de la vía intrínseca de la coagulación.

Cabe destacar el rol de la trombina como una de las principales proteínas de la coagulación, la cual cumple múltiples funciones; agonista en la agregación plaquetaria por acción sobre el receptor de trombina de la plaqueta, activador de factores de coagulación como factor VIII, V y XI, transformar el fibrinógeno en fibrina y activar al factor XIII para que estabilice los monómeros de fibrina. Participa en la activación de la proteína C como anticoagulante natural a través de su unión con la trombomodulina y, finalmente, activar el inhibidor de la fibrinólisis (TAFI).

Otra proteína de la coagulación que debe destacarse es la plasmina, la cual al actuar sobre el fibrinógeno produce los productos de degradación del fibrinógeno o FDP, los cuales tienen una actividad que favorece los fenómenos hemorrágicos, ya que por una parte interfieren con la polimerización de la fibrina y por otra producen disfunción plaquetaria. Cuando actúa sobre la fibrina rompe las uniones covalentes de los dímeros de fibrina produciendo fragmentos conocidos como dímero D. Además la plasmina biodegrada algunos factores de coagulación como el factor V, VIII, IX y XI.

La pérdida por cualquier razón del balance entre factores procoagulantes y anticoagulantes, producirá trastornos que se pueden traducir clínicamente en episodios de hemorragias o trombosis.

1. INTRODUCCIÓN

El concepto de hemostasia incluye los mecanismos que permiten detener el sangrado una vez producida la ruptura de un vaso sanguíneo y mantener la sangre en forma fluida. Para facilitar su comprensión a la hemostasia se le separa, en hemostasia primaria y hemostasia secundaria. En la primera participan los vasos sanguíneos, estructuras de sostén (vasoconstricción) y las plaquetas que van a formar el tapón plaquetario (ver capítulo 19). La denominada hemostasia secundaria se refiere al sistema de la coagulación en que participan una serie de proteínas plasmáticas, las que una vez activadas van a formar fibrina que es la que da consistencia al tapón plaquetario. El proceso de coagulación es autorregulado por la activación de anticoagulantes naturales para impedir la propagación del coágulo. Finalmente es el sistema fibrinolítico el encargado de iniciar

el proceso de reparación de los vasos por medio de la degradación de la fibrina.

El sistema de la coagulación está formado por proteínas plasmáticas solubles llamadas factores de la coagulación, los que interactúan en una serie de reacciones enzimáticas en cadena para transformar el fibrinógeno soluble del plasma en un coágulo de fibrina, que se localiza en el sitio de ruptura vascular. Este sistema contiene varios mecanismos de regulación necesarios para delimitar el proceso de la coagulación, evitando el riesgo de generación de fibrina en el resto del sistema vascular.

La ausencia o disminución de uno de los factores de la coagulación altera el sistema y de acuerdo a la magnitud se va a manifestar como una enfermedad hemorrágica. Por otra parte, la ausencia, disminución o disfunción de alguna proteína reguladora del sistema de la

coagulación podría asociarse a fenómenos de trombosis. Situaciones similares se han descrito cuando se altera el sistema fibrinolítico.

2. SISTEMA DE LA COAGULACIÓN

2.1. Nomenclatura

Los factores de la coagulación son proteínas,

fosfolípidos, lipoproteínas y calcio iónico. Estos factores han sido denominados por números romanos de I a XIII, de acuerdo con el orden de su descubrimiento y no al orden en que intervienen en el proceso o cascada de la coagulación. En la tabla 20-1 se enumeran los factores de la coagulación y se indican sus sinónimos y funciones.

Tabla 20-1. Nomenclatura y función de los factores de la coagulación

Factor	Sinónimo	Función
I	Fibrinógeno	Estructural
II	Protrombina	Serino Proteasa
III	Factor tisular, tromboplastina tisular	Cofactor/iniciador
IV	Calcio	
V	Factor lábil, proacelerina	Cofactor
VI	No asignado	
VII	Proconvertina, Factor estable	Serino proteasa
VIII	Globulina o Factor antihemofílico A	Cofactor
IX	Factor Christmas o antihemofílico B	Serino proteasa
X	Factor Stuart Prower	Serino proteasa
XI	Factor antihemofílico C	Serino proteasa
XII	Factor de Hageman	Serino proteasa
PK	Precalicroeína o Factor de Fletcher	Serino proteasa
HMWK	Cininógeno de alto peso molecular	Cofactor
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	Transglutaminasa

Los factores circulan en la sangre en forma inactiva, como cimógenos, excepto el factor III (factor tisular, FT) que normalmente no está en el plasma sino que se expresa sobre la superficie de diversas células, entre otras, monocitos, células endoteliales activadas y fibroblastos. Cuando un factor se activa, es decir, se transforma en enzima, se le agrega la letra "a" a la designación numérica (por ejemplo el factor IX activado se designa como IXa).

Existen varias excepciones a esta terminología, el factor II (protrombina) en su forma activa se le conoce como trombina, más que como IIa y cuando el factor I (fibrinógeno) sufre proteólisis parcial por la acción de trombina, se denomina fibrina, la cual constituye el producto final de la cascada de la coagulación. El factor tisular y el calcio no son cimógenos y no tienen forma activada.

Los cimógenos son activados a enzimas por una proteólisis parcial (figura 20-1). Un cimógeno es a su vez sustrato de una enzima que lo antecede en la secuencia de reacciones. Como enzima actúa sobre otro sustrato que lo sigue

en la secuencia transformándolo a su vez en enzima.

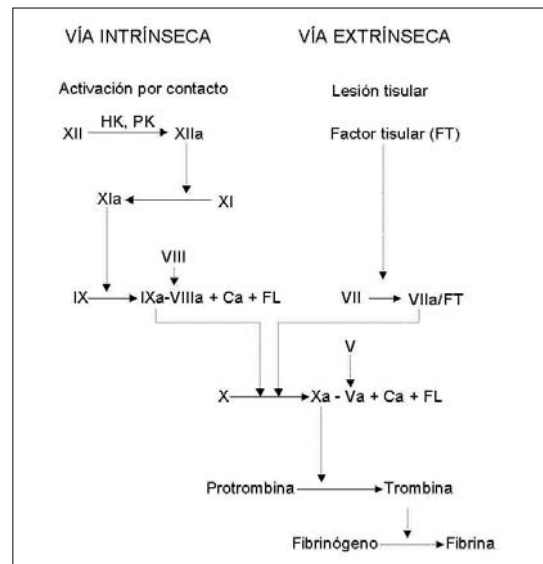


Figura 20-1. Representación esquemática de la activación de los factores de la cascada de la coagulación. Los factores circulan como proteínas inactivas (cimógenos) hasta que se activan a enzimas por proteólisis parcial.

Los factores V y VIII circulan como procofactores y participan como activadores no proteolíticos (cofactores) de enzimas, para ello deben activarse, denominándose Va y VIIIa.

2.2. Secuencia clásica de las reacciones

Aunque la activación *in vivo* de la coagulación ocurre en forma diferente a lo que, clásicamente, se ha conocido como vía intrínseca y vía extrínseca, esta forma de abordar el proceso de la coagulación es útil fundamentalmente para una mejor comprensión de las pruebas de laboratorio. En la vía intrínseca participan los factores «intrínsecos» de la sangre, y la vía extrínseca se caracteriza por requerir una sustancia activadora «extrínseca», el factor tisular (FT) (figura 20-2). Cada vía comprende reacciones entre un grupo específico de factores.

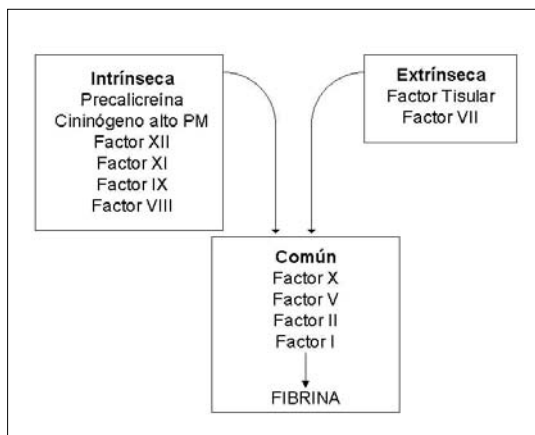


Figura 20-2. Esquema clásico de la coagulación con las vías intrínseca, extrínseca y común.

2.2.1. Vía intrínseca

La vía intrínseca se inicia con la activación del factor XII sobre superficies con carga negativa como proteínas de la matriz, una de ellas es el colágeno; en esta reacción interviene la caliceína y el cininógeno de alto peso molecular (HMWK) constituyendo el sistema de contacto. En condiciones *in vitro*, la superficie de activación o contacto corresponde al vidrio del tubo que contiene la sangre y se utilizan activadores como el kaolín, sílica y otros.

Una vez activado el factor XIIa cataliza la conversión del factor XI (cininógeno) a XIa y en presencia de iones calcio el factor XIa activa al factor IX a IXa.

El factor IXa junto al VIIIa se unen a fosfolípidos de membrana y en presencia de calcio forman el “complejo tenasa” que transforma el FX a FXa. A partir de la activación del FX ambas vías continúan una vía común hasta la formación de fibrina. El factor Xa se une al factor Va sobre la superficie de una membrana fosfolipídica en presencia de calcio, generando el “complejo protrombinasa” que convierte la protrombina en trombina. Al romperse la protrombina se forma trombina y se libera un fragmento proteico de mayor tamaño que es el fragmento 1+2 de la protrombina.

El sustrato natural de la trombina es el fibrinógeno, al actuar la fibrina sobre él se generan fibrinopéptidos A y B y los monómeros de fibrina que posteriormente se polimerizan y forman un coágulo de fibrina estable. Inicialmente los monómeros de fibrina se entrelazan por uniones no covalentes, pero el factor XIIIa crea un coágulo estable.

2.2.2. Vía extrínseca

La vía extrínseca comprende la participación del factor VII (proteína plasmática) y el factor tisular (cofactor), los cuales forman un complejo que se une a la superficie fosfolipídica por medio de puentes de calcio.

El complejo FT-FVIIa activa el factor X a factor Xa. Como antes se indicó a partir de la activación del FX la secuencia de reacciones es la misma que si la activación del sistema se iniciara por la vía intrínseca.

2.3. Estructura, síntesis y función de los factores de la coagulación

Usando técnicas de biología molecular se ha podido conocer la ubicación cromosómica y secuencia nucleotídica de los genes que codifican los factores de la coagulación.

En la tabla 20-2 se resumen las características estructurales, cinéticas y funcionales de los factores de la coagulación.

Tabla 20-2. Características de los factores de la coagulación

Factor	PM (kDa)	Sitio de síntesis	Nivel plasmático	Nivel hemostático ¹
I	340	Hígado	2.500	>50 mg/dL
II	72	Hígado	100	15 – 25%
III	37	Monocitos, Endotelio no vascular	0	-
V	300	Hígado ²	10	10 – 15%
VII	53	Hígado ²	0	10 – 15%
VIII	300	Hígado	0.1	10 – 20%
IX	57	Hígado	5	10 – 20%
X	67	Hígado	10	>20%
XI	160	Hígado	5	10%
XII	80	Hígado	30	10 – 15%
PK	120	Hígado	50	³
HMWK	100	Hígado	50	³
XIII	300	Hígado, Megacariocitos	10	2 – 3%

¹ El porcentaje expresa la cantidad mínima del factor que permite una hemostasia adecuada en condiciones fisiológicas. Se considera que la actividad promedio normal para la población es de 100%.

² Los factores V y VII también se sintetizan en otros sitios.

³ Su disminución no afecta la capacidad hemostática del organismo. Su disminución sí afecta las pruebas de la coagulación *in vitro*.

2.3.1. Estructura genérica de las enzimas de la coagulación

Los factores XII, XI, IX, X, VII, II y precalicreína una vez activados son enzimas que pertenecen a la misma familia de las proteasas digestivas,

tripsina y quimiotripsina. Por su potente actividad proteolítica procoagulante y por actuar en el interior de los vasos sanguíneos, estos factores requieren de regulación muy precisa. Su estructura se muestra en la figura 20-3.

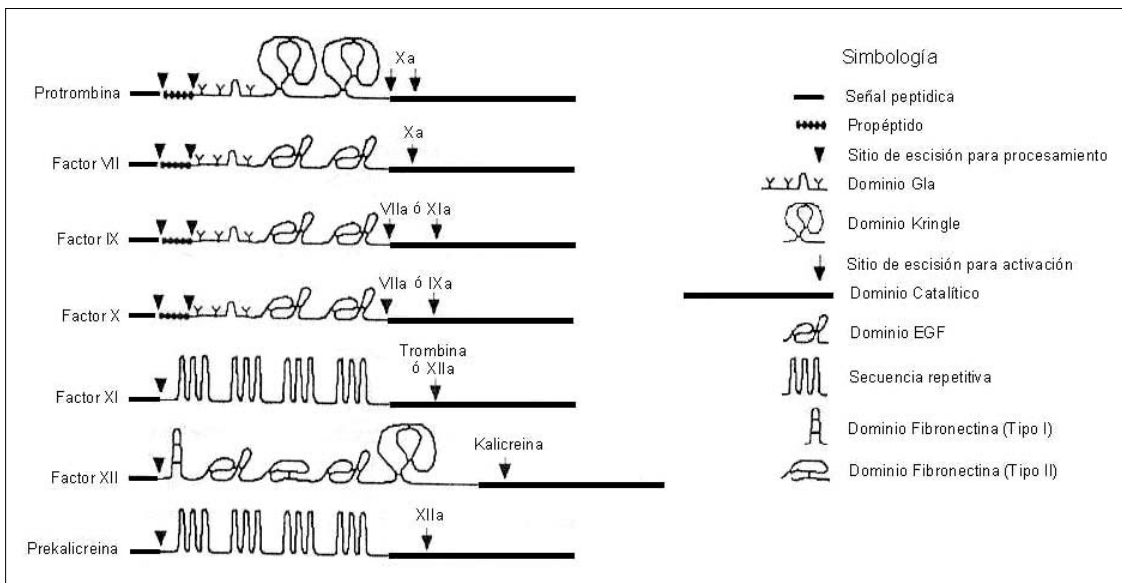


Figura 20-3. Esquema de la estructura de los factores II, VII, IX, X, XI, XII y PK.

Las enzimas de la coagulación son de mayor peso molecular que la tripsina y la quimiotripsina; tienen varios sitios funcionales y un sitio catalítico ubicado en la mitad del extremo carboxilo-terminal de las moléculas. Estructuralmente corresponden a las llamadas serino-proteasas que poseen un residuo de ácido aspártico (D), serina (S) e histidina (H) en el sitio catalítico. Esta zona es la encargada de la ruptura de los enlaces peptídicos, de reconocer los sustratos macromoleculares y de interactuar con los inhibidores que regulan su actividad.

Cerca del extremo amino-terminal de factores vitamina K dependiente (Factores II, VII, IX y X), se encuentra un dominio rico en residuos de ácido λ -carboxiglutámico. Esta región consta de un sitio de reconocimiento que dirige la γ -carboxilación luego de su síntesis, y de 10 a 12 residuos de ácido γ -carboxiglutámico, que unen calcio e interactúan con las membranas celulares, hecho de gran importancia durante la activación del sistema de la coagulación. Las proteínas C, S y Z, inhibidores naturales de la coagulación (ver punto 2.6.2 y 2.6.4), también son proteínas vitamina K dependientes.

2.3.2. Estructura y activación de los factores del sistema de contacto

La vía intrínseca se inicia con la activación de los factores del sistema de contacto, en el que participan los factores XII, precalicreína (PK) y el cofactor HMWK, los cuales activan al factor XI.

Los factores contacto interrelacionan con el sistema del complemento, la pro-renina, bradicinina y plasminógeno (figura 20-4).

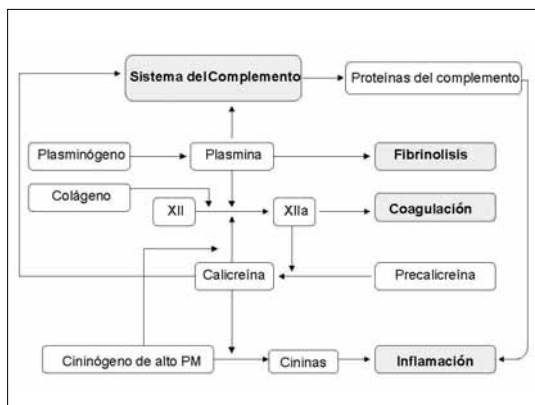


Figura 20-4. Función de los factores de contacto en otros sistemas fisiológicos.

El **factor XII** es una glicoproteína formada por una cadena polipeptídica (80 kDa), que se activa por proteólisis dando lugar a fragmentos menores, algunos de ellos con actividad enzimática.

La **precalicreína** (100 kDa) forma complejo 1:1 con el HMWK. Por proteólisis genera su forma activa, la caliceína, en que está formada por 2 cadenas polipeptídicas, una pesada (52 kDa) y una liviana (33 kDa) unidas por puentes disulfuro.

El **HMWK** (120 kDa) circula en complejo con el factor XI y las PK, facilitando la adhesión de estos factores a la superficie de contacto.

La activación de este sistema se inicia por la adherencia del factor XII a superficies con carga negativa a través de una secuencia aminoácídica con carga positiva. La unión produce un cambio conformacional que lo hace muy sensible a la autoactivación por cantidades traza de factor XIIa.

Sustancias inertes como el vidrio, kaolín, ácido elálgico y celita activan el factor XII; esta propiedad se usa *in vitro* para activar el factor XII y realizar las pruebas de coagulación que se utilizan en la práctica clínica. También existen activadores biológicos como el colágeno, el cartílago articular y la piel, entre otros.

La formación de complejos entre el HMWK, la PK y el factor XI favorece su unión a superficies donde las proenzimas sufren una proteólisis limitada por acción del factor XIIa. Este último convierte la PK y el factor XI en serino proteasas activas: caliceína y factor XIa, respectivamente. La caliceína activa el factor XII adherido a superficies en una reacción más rápida que la autoactivación inicial. La caliceína hidroliza el HMWK liberando bradiquinina, que actúa como vasodilatador y aumenta la permeabilidad vascular. La molécula de HMWKa tiene más afinidad por las superficies aniónicas y más actividad como cofactor en la generación de caliceína y factor XIa.

Además, la caliceína activa directamente al plasminógeno transformándolo en plasmina, escinde el C3b del complemento y convierte la pro-renina en renina. Así, la activación del sistema de contacto asocia el mecanismo de la coagulación con la respuesta inflamatoria y la reparación tisular.

Las deficiencias de los factores de contacto son

muy poco frecuentes en clínica. Se manifiestan por un tiempo de tromboplastina parcial activado (TPPA) prolongado en ausencia de sangrado.

El déficit hereditario de Factor XII es el más frecuente dentro del grupo de los factores de contacto y es heredado en forma autonómica recesiva. Los niveles plasmáticos en el homocigoto son <0.01 U/mL y en el heterocigoto 0.17-0.83 U/mL. Como se señaló previamente son pacientes que no sangran y pueden tener tendencia a la trombosis. La prolongación del TPPA es importante en el homocigoto y de menor magnitud en el heterocigoto. El diagnóstico se confirma cuantificando este factor.

El déficit de precalicreína es un desorden poco frecuente y con pocas manifestaciones clínicas; sin embargo se manifiesta como un TPPA muy prolongado sin tendencia al sangrado. Se hereda en forma autosómica recesiva, los heterocigotos tienen niveles intermedios de precalicreína. Si se realiza un estudio de mezcla 1:1 con plasma normal y se deja incubar durante 10 min y el TPPA corrige se sospecha un déficit de precalicreína.

El déficit congénito de cininógeno de alto peso molecular es el menos frecuente dentro de su grupo.

El **factor XI** es un homodímero (160 kDa) compuesto por dos subunidades idénticas unidas por enlaces disulfuro. Es codificado en el brazo largo del cromosoma 4. En circulación también forma un complejo con el HMWK. Su activación rompe cada subunidad en un sitio, originando una estructura tetramérica, con 2 cadenas pesadas y 2 livianas; estas últimas tienen el sitio activo. El factor XI activa al factor IX en presencia de calcio. En condiciones fisiológicas es inhibido por antitrombina III, a1 antitripsina y por el inhibidor liberado de plaquetas anti-Xa.

2.3.3. Factores vitamina K dependientes

Los factores serino proteasas II, VII, IX y X, además de las proteínas reguladoras C, S y Z dependen de la vitamina K para expresar su potencial procoagulante y anticoagulante respectivamente. Estas proteínas tienen 10 a 12 residuos de ácido glutámico cerca del extremo amino-terminal llamados dominios Gla (figura 20-5), los cuales se generan en la

carboxilación del glutamato por la enzima carboxilasa vitamina K dependiente, localizada en la membrana del retículo endoplásmico rugoso. Los dominios Gla permiten unir calcio, hecho que favorece la unión a los fosfolípidos aniónicos de las superficies celulares activadas, especialmente las plaquetas.

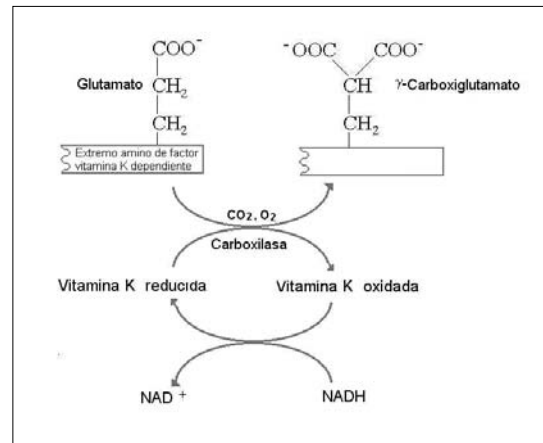


Figura 20-5. Gamma-carboxilación de los factores vitamina K dependientes.

La vitamina K necesaria para la síntesis de estos factores debe estar en su forma reducida (Vitamina K-Hidroquinona, KH₂); en el hígado se encuentra en estado de quinona, la que debe ser reducida por la vitamina K reductasa a KH₂ que participa en el proceso de carboxilación del glutamato. Luego ésta se oxida por acción de la carboxilasa a vitamina K epóxido y ésta por la epóxido reductasa es reducida a vitamina K quinona, completando así el ciclo de la vitamina K. La estructura de la vitamina K se muestra en la figura 20-6.

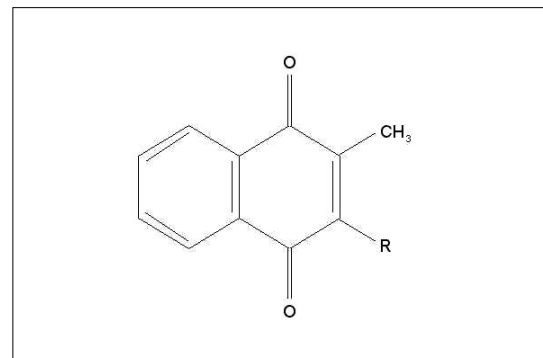


Figura 20-6. Estructura química de la vitamina K.

La carboxilasa dependiente de vitamina K es una proteína de transmembrana (758 aminoácidos) que se encuentra en el retículo

endoplásmico rugoso. Su extremo amino-terminal es hidrofóbico, presenta varios dominios transmembrana y está en contacto con el citoplasma de la célula. El extremo carboxi-terminal es hidrofílico y está en contacto con el lumen del retículo endoplásmico rugoso (figura 20-7).

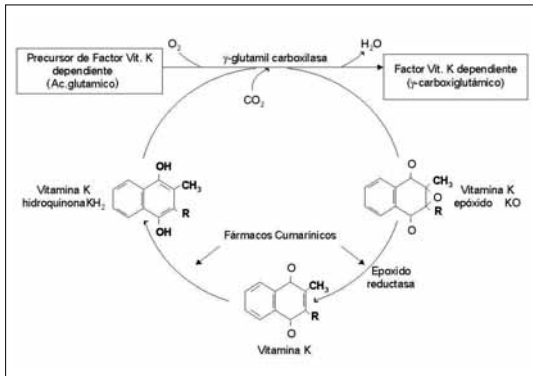


Figura 20-7. Función de la vitamina K en la biosíntesis de los factores II, VII, IX y X.

La γ -glutamil carboxilasa cataliza dos reacciones químicas: (a) adición de dióxido de carbono (CO_2) al glutamato formando Gla y (b) oxidación de la vitamina K hidroquinona a vitamina K 2,3 epóxido, con la concomitante formación de oxígeno y agua. Se ha visto *in vitro* que en presencia de concentraciones adecuadas de sustrato se forma Gla y vitamina K epóxido en relación 1:1. Este aparente acoplamiento de la epoxidación y γ -carboxilación sugiere que existe un mecanismo por el cual la enzima utiliza la energía liberada por la oxidación de vitamina K y la conduce a la reacción de γ -carboxilación. En el paso de vitamina K hidroquinona a vitamina K epóxido se sintetiza un intermediario, vitamina K alcoxide, el cual actúa sobre el grupo γ -metileno del glutamato y formando un intermediario del glutamato llamado glutamato carbonion; luego por la adición de CO_2 a este intermediario se forma el Gla. En la carboxilasa existen dos cisteínas catalíticas (Cys99 y Cys950), una cisteína que actúa como una base débil y cataliza la desprotonización de KH_2 y formando así al intermediario alcoxide; la otra cisteína coordina al CO_2 catalizando el acceso de esta molécula al glutamato carbonion y formando Gla. Mutaciones en dichas cisteínas causan marcada disminución en la actividad de la carboxilasa.

Los factores vitamina K dependientes unen un propéptido de aproximadamente 18

aminoácidos ubicados en el extremo amino-terminal. El propéptido se une al sitio de unión de la enzima, el cual es distinto al sitio activo de la misma. Los factores vitamina K dependientes son sintetizados en forma de precursor (pre-pro-proteína). El propéptido permite la traslocación del precursor a través de una pre-convertasa en la membrana del retículo endoplásmico rugoso en donde es sintetizada. La pre-secuencia se adhiere a un péptido señal ubicado en el lumen del retículo endoplásmico y así la pro-proteína es reconocida por la carboxilasa. También se ha visto que mutaciones puntuales, en este propéptido reducen o eliminan sustancialmente la carboxilación del sustrato en cultivos celulares. Luego que se produce la γ -carboxilación la proteína sanguínea es transportada al aparato de Golgi, en donde el propéptido es removido y el factor vitamina K dependiente sale a circulación en forma de zimógeno.

El propéptido es el mejor determinante de afinidad de las proteínas vitamina K dependientes para la carboxilasa, mientras que los dominios vecinos Gla parecen jugar un rol menos importante en su reconocimiento. Existe marcada homología entre los propéptidos de los diferentes factores vitamina K dependientes humanos, lo que supone similar afinidad por la carboxilasa.

Farmacológicamente, los antagonistas de la vitamina K poseen estructuras similares a los distintos tipos de vitamina K, así los derivados de las indandiona simulan la vitamina K epóxido, actuando como sustrato de la enzima vitamina K epóxido reductasa dando lugar a una molécula similar pero no igual a vitamina K quinona, la cual no podrá ser convertida en vitamina K hidroquinona, produciéndose carencia de esta última y generando factores inactivos. Por otro lado, los derivados de la cumarina, que poseen una estructura muy similar a vitamina K quinona compiten como sustrato por la vitamina K quinona reductasa que las convierte en una molécula similar a la vitamina K hidroquinona pero que no es funcional. El déficit de vitamina K o su inhibición por cumarínicos se traduce en síntesis hepática y secreción a la sangre, de factores vitamina K dependiente descarboxilados o parcialmente carboxilados, sin capacidad para unir calcio y fijarse a las membranas, y por lo tanto con una escasa o nula función procoagulante.

Los factores dependientes de vitamina K son

esencialmente sintetizados en los hepatocitos. Los macrófagos también sintetizan los factores II, VII, IX y X, y las células endoteliales tienen la capacidad de síntesis y secreción de la proteína S.

2.3.4. Factor tisular

El FT es una proteína de membrana que se expresa en la mayoría de las células no vasculares. Actúa como receptor, y al mismo tiempo, como cofactor del factor VII.

El FT (45 kDa) está compuesto de 263 aminoácidos de los cuales 219 se localizan en el dominio extracelular, 23 en la porción transmembranal y 21 en el dominio intracelular (figura 20-8).

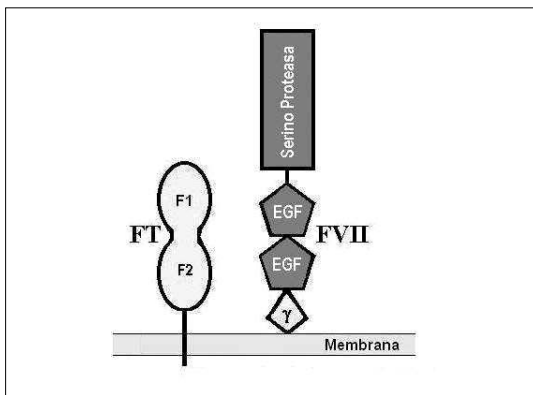


Figura 20-8. Estructura general del factor tisular y del factor VII. F1 y F2, dominios fibronectina tipo 3; EGF, Factor de crecimiento endotelial; γ, dominio Gla.

En muchos tejidos el FT forma complejo con fosfolípidos de membrana que aceleran la coagulación, ya que proveen sitios de unión para que los factores de la coagulación reaccionen sobre superficies celulares.

El gen que codifica el FT está localizado en el cromosoma 1p21-p22 y consiste en 6 exones y 5 intrones.

El FT en condiciones normales no circula en el plasma; su expresión en superficie de los monocitos y en las células endoteliales puede ser inducida por lipopolisacáridos, bacterias y citoquinas inflamatorias. Su expresión intravascular puede contribuir al estado procoagulante asociado con inflamación o infección. La principal función del FT es formar complejo con el factor VII e iniciar la vía extrínseca de la coagulación.

La expresión anormal del FT juega un papel importante en la actividad procoagulante observada en la coagulación intravascular diseminada, sepsis, cáncer, trombosis arterial, y otras patologías. Existe una asociación entre el FT y los procesos malignos; es así como el FT se ha relacionado con fenómenos de invasión y metástasis tumoral. Los eventos proteolíticos que se generan en el cáncer son dependientes de la expresión del FT, el cual se encarga de la formación de una cubierta de fibrina en la superficie de células malignas que entran a la circulación sanguínea después de desprenderse de un tumor primario; esta cubierta de fibrina protege a las células tumorales circulantes de la actividad inmunológica del organismo hasta que se puedan adherir al endotelio de un lecho capilar y establecerse como una lesión metastásica.

En las lesiones ateromatosas el FT se localiza alrededor del centro necrótico rico en lípidos, por ello se postula que el colesterol LDL y los lípidos oxidados inducen la expresión del FT. Por otro lado, la proteína C reactiva, asociada a procesos inflamatorios, también induce la expresión del FT sobre las superficies celulares.

2.3.5. Cofactores V y VIII

Los cofactores V y VIII presentan bastante homología estructural (figura 20-9) y funcional.

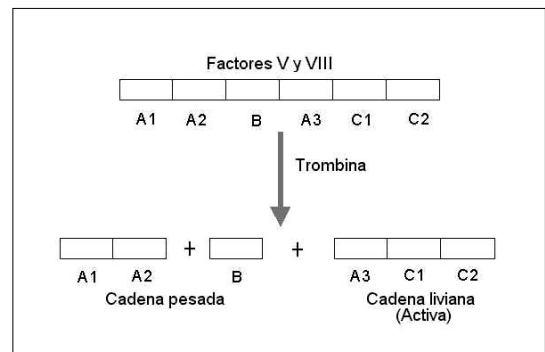


Figura 20-9. Secuencia estructural de los cofactores V y VIII, y mecanismo de activación mediado por trombina.

La trombina es la proteína de la coagulación que activa a los Factores V y VII, aunque también pueden ser activados por el factor Xa. Este proceso de activación como cofactores se expresa preferentemente luego de una proteólisis limitada por acción de trombina, y consiste en la remoción del dominio B, de la molécula, formándose una cadena liviana y una

pesada.

Ambos factores activados se unen con gran afinidad a fosfatidilserina, translocada al exterior de la membrana de células activadas, especialmente las plaquetas. La interacción ocurre a través de la cadena liviana compuesta por los dominios A3-C1-C2.

El factor VIIIa facilita la acción del factor IXa sobre el factor X, en el complejo tenasa y el factor Va favorece la acción del factor Xa sobre la protrombina a través de la formación del complejo protrombinasa. Ambas reacciones ocurren en presencia de calcio y fosfolípidos.

Los factores V y VIII han sido denominados factores lábiles, porque se inactivan y degradan con gran rapidez, y por la facilidad con que se pueden activar *in vitro*.

a) Factor V

El factor V es sintetizado en los hepatocitos, en las células del sistema fagocítico mononuclear y en los megacariocitos. Es una glicoproteína de una sola cadena (300 kDa) activada por la trombina o el factor Xa.

La proteólisis de 3 enlaces peptídicos da origen al factor Va; la cadena pesada (110 kDa) y la cadena liviana (78 kDa) se unen por enlaces no covalentes (figura 20-10).

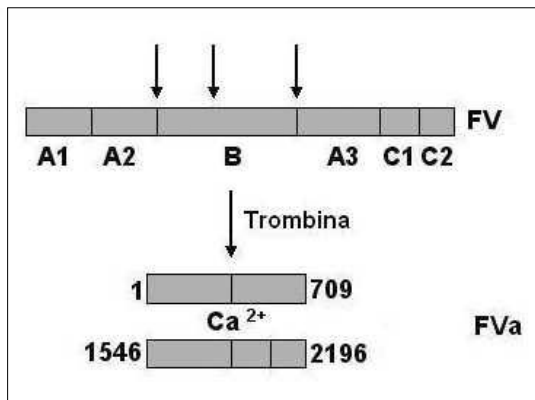


Figura 20-10. Esquema de la estructura del factor V y la activación de éste para originar el Factor Va.

El 20 a 25% del factor V se encuentra en los gránulos α de las plaquetas y es secretado durante la activación de éstas. El factor V plaquetario es fisiológicamente significativo porque: (a) las plaquetas tienen sitios de unión para FVa en su membrana, (b) el ensamblaje del

complejo protrombinasa se efectúa en la superficie de las membranas plaquetarias (fosfolípidos) y (c) la deficiencia de factor V se asocia a enfermedad hemorrágica.

Las deficiencias hereditarias de factor V se transmiten en forma autonómica recesiva y producen sangrado leve a moderado. La magnitud del sangrado no tiene correlación estricta con los niveles de factor en el plasma y se correlacionaría mejor con los niveles de factor V plaquetario. Los pacientes heterocigotos en general son asintomáticos. Estos pacientes pueden tener prolongación del TTPA, TP y tiempo de sangría y también pueden observarse deficiencias combinadas de V y VIII.

b) Factor VIII

El factor VIII es sintetizado en los hepatocitos, el tejido esplénico y el tejido linfóide. Es sintetizado como una proteína de cadena única (300 kDa), luego es glicosilado y escindido en dos cadenas (figura 20-11). La estructura heterodimérica es mantenida por calcio. El factor von Willebrand (FvW) que es una proteína de alto peso molecular promueve la asociación entre ambas cadenas del FVIII, además lo estabiliza, transporta, y regula su actividad en el plasma. También el FvW protege al factor VIII plasmático de su activación por el factor Xa, por esta razón los pacientes portadores de enfermedad de von Willebrand tienen niveles más bajos de factor VIII.

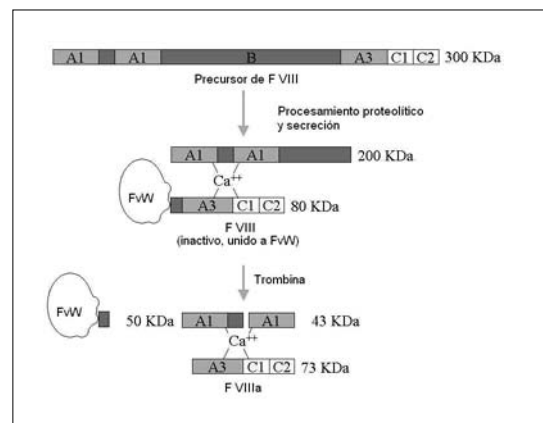


Figura 20-11. Estructura del factor VIII y su activación por trombina. FvW, Factor von Willebrand.

La trombina hidroliza al factor VIII unido a FvW en tres enlaces Arg-Ser (figura 20-13). El factor VIIIa se libera del FvW pudiendo unirse a

plaquetas activadas o superficies fosfolípídicas, promoviendo la activación del factor Xa. El factor VIIIa, a diferencia del factor VIII, pierde su capacidad para unirse al FVW.

2.3.6. Complejos macromoleculares

En la secuencia de reacciones de la coagulación existen tres instancias en que se forman complejos esenciales en el proceso. Estos complejos macromoleculares se ensamblan sobre la superficie de células estimuladas que se ubican en los sitios de injuria vascular. La formación de estos complejos enzimáticos facilita la interacción entre sus componentes, acelerando y proporcionando relevancia fisiológica a las reacciones en que participan.

a) Complejo FT-FVII

Cuando se expresa el factor tisular sobre células activadas se unen trazas de FVIIa presentes en la circulación, al FT formando el complejo FT-FVIIa, lo que constituye la primera etapa de la denominada vía extrínseca.

La capacidad catalítica del complejo FT-VIIa es 800 a 900 veces mayor que la actividad del factor VIIa en solución.

El complejo FT-VIIa activa no solo al factor X, sino que también al factor IX (figura 20-12) actualmente se sabe que este complejo es el que inicia el proceso de la coagulación *in vivo*. Así la activación del FIX por el FXI no parece estrictamente necesaria; el complejo FT-VIIa actúa como puente entre la vía extrínseca a la vía intrínseca (ver punto 2.5).

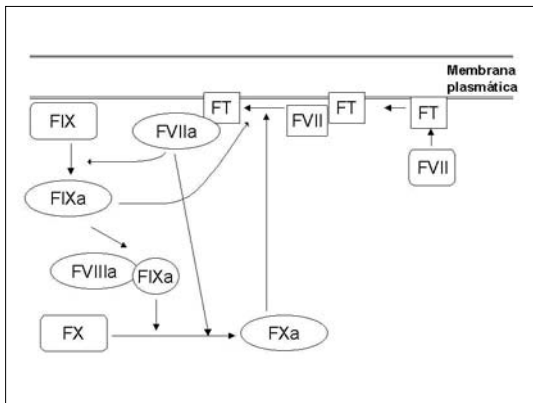


Figura 20-12. Función del FT en la activación de la coagulación. La expresión del FT en la superficie de algunas células y la formación de complejo con el factor VII inicia la vía extrínseca.

b) Complejo FIXa-FVIIIa

El complejo macromolecular formado por el factor IXa con su cofactor VIII es ensamblado sobre fosfolípidos de membrana en presencia de calcio y su principal función es la activación del factor X, de allí el nombre de complejo «tenasa».

La activación del factor IX es relativamente lenta; en comparación con otras proteasas no requiere de cofactores y puede efectuarse sobre las membranas celulares o en solución. El ensamblaje del complejo requiere la unión del factor VIIIa y del IX a fosfolípidos aminoácidos. La interacción de ambos induce un cambio conformacional del factor IXa que favorece la proteólisis parcial que ejerce el FXIa. En presencia de fosfolípidos y Ca^{2+} , la V_m de la activación del factor X por el IXa es 10.000 veces mayor en presencia de VIIIa que en su ausencia.

La deficiencia congénita de factor IX se conoce como hemofilia B y tiene manifestaciones clínicas similares a la hemofilia B. Su frecuencia es menor.

c) Complejo protrombinasa

El complejo protrombinasa está formado por los factores Xa y Va (cofactor), y se forma sobre la superficie fosfolípídica en presencia de calcio (figura 20-13).

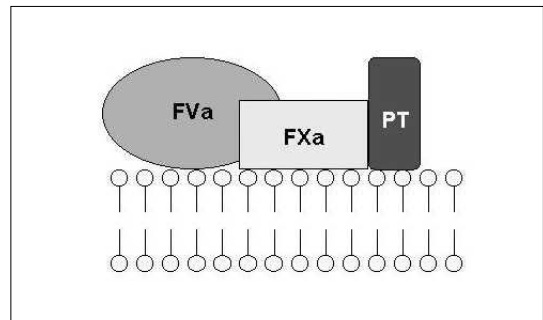


Figura 20-13. Modelo de activación de la protrombina por el complejo protrombinasa. La interacción de los residuos γ -carboxiglutámicos de los factores vitamina K dependientes Xa y protrombina facilita la exposición de los sitios de unión a membrana de estos factores. el cofactor Va unido a fosfatidilserina en las membranas celulares facilita el ensamblaje del complejo protrombinasa, actuando el factor Ixa sobre la protrombina.

El factor X circula como una glicoproteína de 2 cadenas unidas por puentes disulfuro. Es activado por el complejo FT-VIIa y el complejo

tenasa (ver punto 2.3.6.b).

El factor Va favorece que se produzca un cambio conformacional en el sitio activo del factor Xa lo que le permite interactuar en forma óptima sobre la protrombina para generar trombina. La velocidad de activación de la protrombina por el complejo protrombinasa es 300.000 veces mayor que por el factor Xa aislado.

2.3.7. Fibrinógeno, trombina, factor XIII y formación de fibrina

Los principales componentes de la etapa final

de la formación del coágulo y su estabilización son la trombina, el fibrinógeno y el factor XIII.

a) Fibrinógeno

Es una proteína estructural que circula en el plasma en una concentración que varía entre 200-300 mg/dL; también se encuentra en los gránulos α de las plaquetas, donde ingresa por endocitosis desde el plasma.

El fibrinógeno es una glicoproteína dimérica (340 kDa) compuesta por dos mitades idénticas, cada una compuesta por 3 cadenas peptídicas idénticas $A\alpha$, $B\beta$ y γ (figura 20-14).

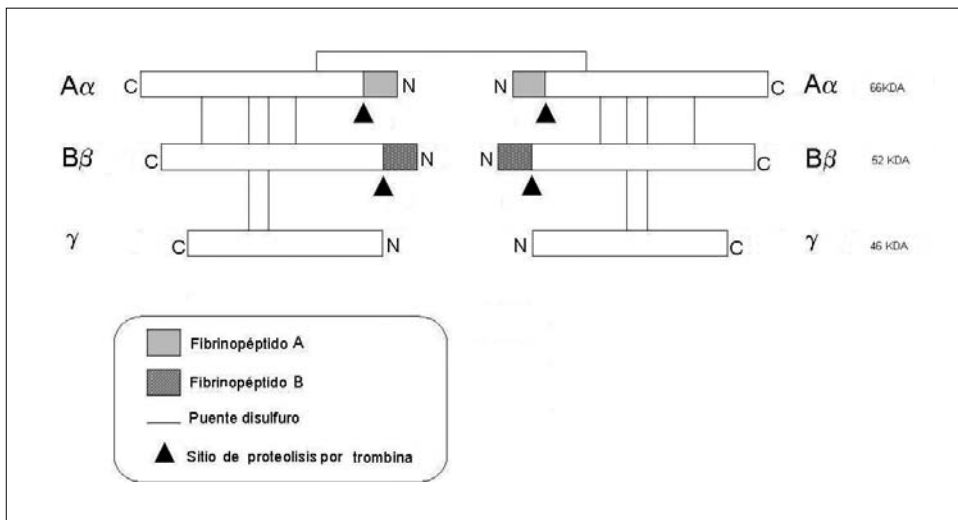


Figura 20-14. Estructura del fibrinógeno

Los 16 aminoácidos del extremo amino-terminal de las cadenas $A\alpha$ forman el fibrinopéptido A (FpA) y los 14 aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena $B\beta$ forman el fibrinopéptido B (FpB).

La síntesis de las cadenas está codificada por 3 genes diferentes; luego de su ensamblaje y glicosilación de las cadenas $B\beta$ y $A\alpha$, la molécula madura es secretada por las células del parénquima hepático a la circulación.

Las dos mitades de la molécula, hacia el extremo amino-terminal de sus 3 cadenas están unidas por puentes disulfuro, y los extremos N-terminales de las 2 cadenas $A\alpha$ y 2 cadenas $B\beta$ están unidas entre sí por los mismos enlaces. Esta asociación conforma un dominio central llamado E.

Los extremos carboxi-terminales de los 3 pares de cadenas se extienden en sentido opuesto desde el dominio central, dando origen a 2 regiones periféricas denominados dominios D.

El fibrinógeno es una proteína reactante de fase aguda por esta razón sus niveles plasmáticos pueden aumentar varias veces sobre el nivel normal en respuesta a la inflamación o a cuadros infecciosos agudos.

Pueden producirse diferentes trastornos genéticos que conducen a hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia o afibrinogenemia; las manifestaciones clínicas pueden ser hemorragias, tendencia a trombosis, trastornos de la cicatrización o pueden cursar asintomáticos. La alteración genética más frecuente es la disfibrinogenemia y se transmite

en forma autonómica dominante, por lo que al menos el 50% de los integrantes de una familia son sintomáticos. Al laboratorio presentan prolongación del tiempo de trombina, con niveles de fibrinógeno normal o disminuido según se trate de hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia; el TTPA y el TP pueden estar discretamente prolongados.

b) Trombina

La trombina, generada a partir de protrombina por acción del complejo protrombinasa, es la última serino proteasa que participa en la cascada de la coagulación. La trombina consta de 2 cadenas unidas por un puente disulfuro. Los residuos His, Asp y Ser, característicos del sitio activo de las serino proteasas, se encuentran en la cadena B pesada. En la molécula de fibrinógeno rompe los enlaces Arg16-Gly17 de las cadenas A α y Arg14-Gly15 de las cadenas B β . Como consecuencia se escinden el FpA y luego el FpB; ocurrido esto la molécula de fibrinógeno se transforma en monómero de fibrina. Una vez que se forma el monómero de fibrina, la trombina se une a él y queda protegida de sus inhibidores naturales, sin embargo continúa ejerciendo su actividad por lo que puede amplificar su propia formación y activar las plaquetas.

La molécula de trombina tiene 3 sitios de unión y un sitio catalítico. Los tres sitios de unión son de reconocimiento de fibrinógeno y otros sustratos (S), el sitio de unión de la heparina, en el cual la heparina se une a Antitrombina III para aproximarla a la trombina (H) y el sitio de unión a fibrina (F) a través del cual la trombina se une a la fibrina después de que ha transformado el fibrinógeno. Finalmente el centro catalítico o C es el sitio en el cual la trombina escinde los sustratos. En suma podemos resumir la actividad de la trombina como: acción sobre el fibrinógeno transformándolo en fibrina, activación de los factores V, VIII, XI y XIII de la coagulación, unión al receptor de trombina de las plaquetas activándolas e inhibición de la fibrinólisis ya que activa al inhibidor de la fibrinólisis activada por trombina (TAFI).

La trombina también tiene efectos regulatorios en el sistema de la coagulación: (a) inhibe su propia generación al actuar sobre la protrombina, rompiendo enlaces en dos

regiones de la molécula, desconectando el dominio de los ácidos carboxiglutámico e impidiendo la unión a fosfolípidos y (b) promueve activa el sistema anticoagulante natural por medio de la activación de la proteína C por medio de su unión a la trombomodulina. La proteína C inactiva los factores Va y VIIIa (ver punto 2.6.2.a).

Factor XIII

El factor XIII es una proteína (320 kDa) tetramérica compuesta por 2 cadenas a y 2 cadenas b. Corresponde a una transglutaminasa, la única enzima de la coagulación que no es serino proteasa; la acción catalítica se localiza en la cadena a, que tiene varios residuos -SH, uno ubicado en el centro.

Para su activación el factor XIII requiere trombina y calcio. La trombina hidroliza un enlace Arg-Gly de las cadenas a, facilitando la unión de calcio; éste induce un cambio conformacional que expone un residuo de cisteína en el sitio activo. Los genes del factor XIII se localizan en el cromosoma 6 y sus defectos se transmiten en forma autonómica recesiva.

Formación de la fibrina

La conversión del fibrinógeno soluble en un polímero insoluble de fibrina ocurre en tres etapas:

- Acción de la trombina sobre el fibrinógeno. La trombina rompe enlaces Arg-Gly liberando los dos FpA de los extremos N-terminales de las cadenas A α , y después los 2 FpB de las cadenas B β . La estructura restante, 2(α , β , γ), corresponde al monómero de fibrina.
- Polimerización espontánea de los monómeros de fibrina mediante asociación no covalente (figura 20-15). La pérdida de los FpA expone sitios de unión en el dominio E central de los monómeros, que interactúan con sitios complementarios de la cadena γ y del dominio D de un monómero adyacente. La unión forma un dímero que es la unidad estructural básica de la malla de fibrina. Por otra parte, la pérdida del FpB expone sitios de unión en el dominio D que promueve el contacto D-D produciendo el crecimiento lateral de la malla.

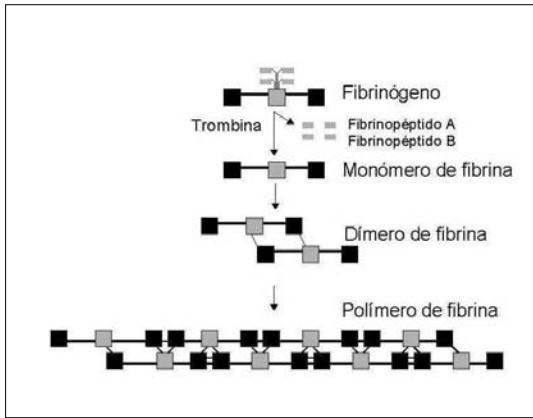


Figura 20-15. Polimerización de la fibrina.

- Estabilización del coágulo por formación de enlaces covalentes entre grupos ϵ -amina de lisina y γ -carboxilo de glutamina. El enlace covalente que se forma entre moléculas adyacentes de fibrina ocurre por acción del factor XIIIa, una transglutaminasa (figura 20-16). Al comienzo estos enlaces covalentes se producen entre las cadenas γ en las zonas de unión D-D, estabilizando longitudinalmente el monómero de fibrina. Luego se extienden con entrecruzamientos progresivos que ligan una cadena con 2 cadenas α de una cadena vecina aumentando notoriamente la rigidez. El coágulo adquiere resistencia, tanto a la ruptura mecánica como a la acción de la plasmina.

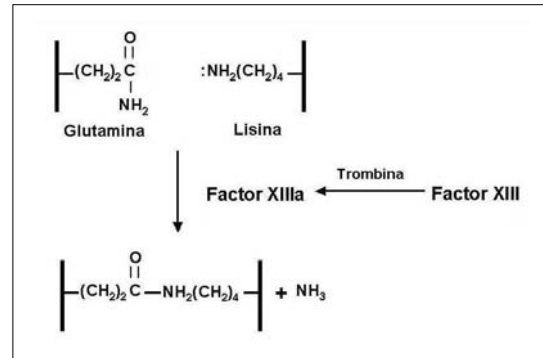


Figura 20-16. Actividad de transglutaminación del factor XIIIa.

2.4. Vida media de los factores

La remoción de los factores de la coagulación desde la circulación se asocia a la pérdida de los residuos de ácido siálico que contienen los carbohidratos. Este fenómeno expone otros carbohidratos terminales como fructosa y galactosa, para los cuales existen receptores en hepatocitos y células de Küpfer. La unión inicial a los receptores es seguida de la internalización por endocitosis de los factores en vesículas recubiertas de clatrina.

El tiempo medio de decaimiento del 50% del factor de la concentración inicial de cada uno de los factores en la sangre es distinto y sus valores se muestran en la tabla 20-3. En clínica es importante conocer estos parámetros, porque determina la periodicidad con que debe realizarse la infusión endovenosa de cada factor.

Tabla 20-3. Muestra la vida media de cada factor de la coagulación expresado en horas

Factor	Vida media en circulación (horas)
I (Fibrinógeno)	96 - 120
II (Protrombina)	72 - 96
III	-
V	12
VII	12
VIII	8 - 12
IX	18 - 30
X	24 - 48
XI	60
XII	50 - 70
PK (Precalicroína)	35
HMWK (Cinínógeno de alto peso molecular)	35
XIII	240

2.5. Sistema de la coagulación *in vivo*

Las vías fisiológicas que operan *in vivo* parecen ser diferentes a las descritas en la figura 18-2 (*in vitro*). Al respecto, algunos antecedentes son los siguientes: (a) los individuos con deficiencia de alguno de los factores de contacto (FXII, PK, HMWK) presentan alteración de las pruebas de la coagulación, pero no sufren hemorragias, a diferencia de lo que ocurre en la deficiencia de otros factores del sistema de la coagulación. Lo anterior indicaría que los factores de contacto no participan en el sistema de la coagulación *in vivo*, (b) se sabe que el FT que se expresa en sitios vasculares en donde se ha producido una injuria, en monocitos estimulados y en las células endoteliales, es capaz de iniciar la coagulación, (c) el complejo FT-VIIa, no sólo activa al factor X, sino que también al factor IX, estableciendo así un puente entre las denominadas vías intrínseca y extrínseca.

El modelo operativo actual del sistema de la coagulación *in vivo* (figura 20-17) se inicia con la expresión del FT sobre la membrana celular, especialmente a nivel de componentes del subendotelio, expuesto a las proteínas de la sangre en los sitios de ruptura vascular. Como antes se indicó, el FT forma un complejo con trazas de FVIIa circulante; el complejo FT-VIIa formado activa los factores IX y X a FIXa y FXa, respectivamente. Estos factores activados realimentan la formación de factor VIIa. Este proceso conduce a la formación de trombina que activa los cofactores V y VIII e induce la agregación de las plaquetas, construyendo así la superficie de reacción y receptores para varios factores de la coagulación. Además la trombina activa al factor XI, el que activado (FXIa) actúa como proteasa del FIX, activándolo a FIXa.

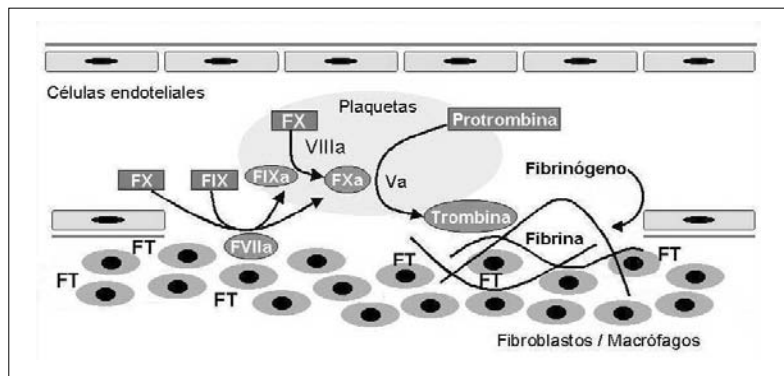


Figura 20-17. Secuencia postulada de las reacciones de la coagulación *in vivo*. Se inicia el proceso con la formación del complejo FT-FVIIa, que activa los factores IX y X generándose inicialmente pequeñas cantidades de trombina. Ésta activa los factores V y VIII amplificando el proceso.

La generación inicial de factor Xa, desencadena un efecto inhibitorio del Inhibidor de la Vía Extrínseca (IVE) (ver punto 2.6.3). El complejo IVE/Xa inhibe el FT/VIIa previniendo la ulterior producción de factores Xa y IXa a través de esta vía. En estas condiciones el factor Xa adicional sólo puede ser producido por el complejo «tenasa».

2.6. Regulación del Sistema de la coagulación

La localización y la limitación del proceso hemostático a los sitios de daño vasculares es la principal característica del sistema hemostático.

Existen 4 sistemas anticoagulantes naturales: el Sistema Antitrombina III-Heparina, el Sistema de la proteína C, el Inhibidor de la Vía extrínseca

(IVE), y el Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z.

2.6.1. Sistema antitrombina III

La antitrombina III (ATIII) es una glicoproteína que pertenece a la familia de las serpinas. Neutraliza las proteasas de la coagulación (trombina, FIXa, FXa, FXIa y FXIIa) formando complejos con los factores activos.

La heparina acelera la inactivación de las proteasas en aproximadamente mil veces. La heparina y el heparán sulfato son polímeros heterogéneos de ácido iurónico y glucosamina sustituido con grupos N-sulfatos y O-sulfatos. En la sangre no existe heparina circulante, pero el

endotelio vascular es rico en proteoglicanos con cadenas laterales de heparina/heparán que son necesarias para el reconocimiento por la ATIII.

La ATIII neutraliza las proteasas de la coagulación a través de la interacción de un sitio reactivo (arginina) y un centro activo (serina) (figura 20-18).

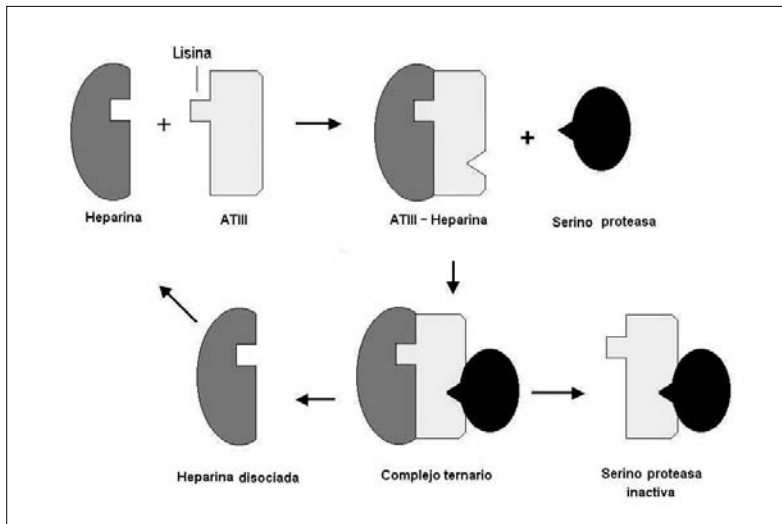


Figura 20-18. Inhibición de serino proteasas por la antitrombina III en presencia de heparina. La ATIII neutraliza las proteasas de la coagulación (ej. trombina) formando un complejo 1:1 con ellas. La unión de heparina a los residuos de lisina de la ATIII induce un cambio conformacional de la molécula, aumentando alrededor de 1.000 veces la velocidad de formación del complejo.

El sistema ATIII-heparina es el mecanismo principal de neutralización de los factores activados de la vía intrínseca. El factor VIIa y la proteína C activada son mínimamente inactivados por este sistema. Otras reacciones en que no participan serino proteasas no son afectadas por el sistema ATIII-heparina.

2.6.2. Sistema de la proteína C

El sistema proteína C inhibe dos cofactores: el factor Va y el factor VIIIa. Este sistema está constituido por la proteína C, la proteína S y la trombomodulina.

a) Proteína C. Es una glicoproteína (62 kDa) dependiente de vitamina K que circula en el plasma como precursor de serino proteasa, en una concentración de 3 a 5 mg/L. Es sintetizada en el hígado y secretada como un polímero de cadena única.

Las proteínas de este sistema anticoagulante natural (proteína C, proteína S y trombomodulina) tienen 3 regiones comunes: (a) dominios Gla donde se encuentran los dominios γ carboxiglutámicos necesarios para la interacción con la membrana celular, (b) región homóloga al factor de crecimiento epidérmico, y (c) región del sitio activo que posee

65% de homología a la quimotripsina.

El receptor de proteína C es una proteína de transmembrana expresada en las células endoteliales. Une la PC a través de los dominios Gla y contribuye a la activación de la proteína.

b) Proteína S. Es la única proteína dependiente de vitamina K que no es una enzima, sino que es un cofactor de la proteína C activada. Es una proteína de cadena única de 69 kDa en la que se distinguen 4 dominios (figura 20-23): (a) dominio Gla que contiene 12 residuos de ácido γ carboxiglutámico, (b) una región sensible a la trombina, (c) cuatro dominios tipo factor de crecimiento epidérmico y (d) una región carboxilo-terminal distinta a otros factores vitamina K dependiente; participa en la interacción con la C4bBP (proteína de unión de C4b).

En el plasma la proteína S circula en dos formas, 40% en forma libre y 60% unida a la C4bBP.

c) Trombomodulina. Es una glicoproteína de transmembrana (74 kDa) que une específicamente trombina y actúa como cofactor para la activación de la proteína C por trombina (figura 20-19).

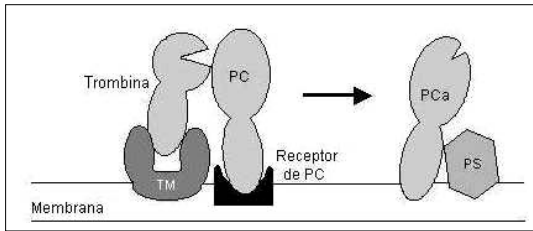


Figura 20-19. Mecanismo de activación de la proteína C (PC). La formación de un complejo entre la trombina y la trombomodulina (TM) induce un cambio conformacional de la trombina. Este complejo reconoce la conformación estabilizada de la proteína C, la cual de esta forma es activada (Pca). Esta proteína actúa con un cofactor como es la proteína S (PS).

En la figura 20-20 se muestra, esquemáticamente, la acción inactivadora que la PCa presenta sobre los factores Va y VIIIa.

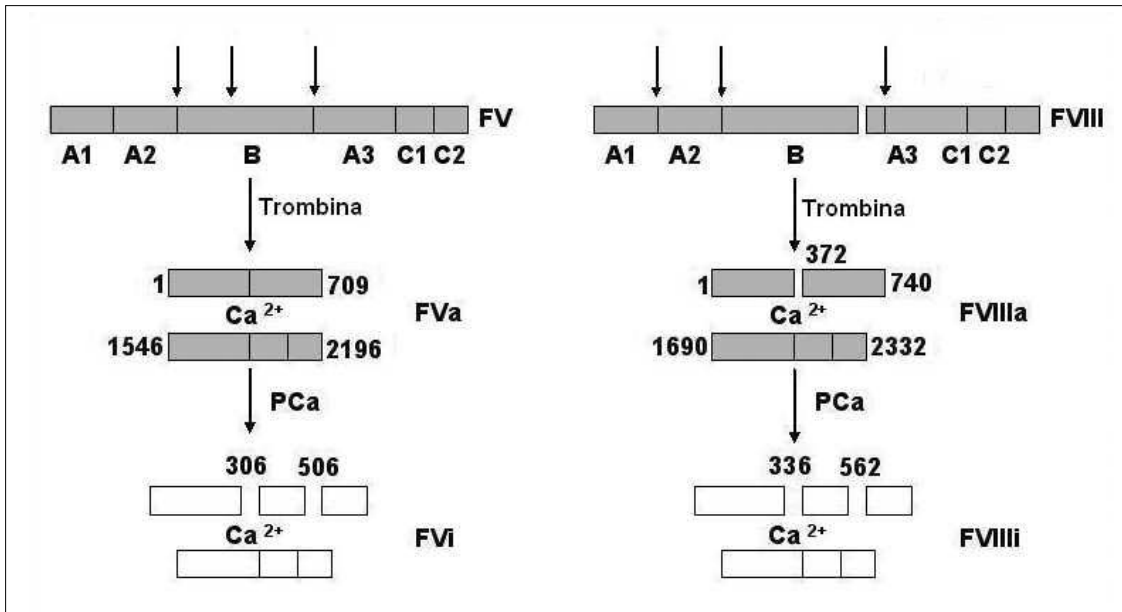


Figura 20-20. Inactivación de los factores Va y VIIIa por la proteína C (PCa)

Para que la proteína C cumpla su función anticoagulante debe ser activada (APC) sobre la superficie de las células endoteliales, donde se forma un complejo reversible de alta afinidad entre la trombina y la trombomodulina. Este complejo activa catalíticamente a la proteína C, la cual se disocia rápidamente de este complejo.

2.6.3. Inhibidor de la vía extrínseca

La regulación del complejo macromolecular, factor VII-FT, está mediado por el Inhibidor de la vía extrínseca (IVE).

El IVE es una molécula cargada negativamente en su extremo amino terminal, seguida por tres dominios inhibitorios tipo Kunitz y un extremo

carboxilo-terminal cargado positivamente.

El complejo factor VII-FT puede ser inhibido sólo después que se ha iniciado el proceso de la coagulación. La reacción de inhibición requiere la presencia del factor Xa, que es el producto directo de la reacción del FVII-FT sobre sus sustratos. El IVE no es miembro de las serpinas sino que pertenece a un grupo de inhibidores de serino proteasas tipo Kunitz.

El IVE se encuentra en el plasma en dos formas con distinto peso molecular, 33 kDa y 40 kDa. Las células endoteliales son su principal fuente y en el plasma aproximadamente el 50% se encuentra asociado a lipoproteínas. Las plaquetas contienen el 8% del IVE de la sangre en gránulos distintos a los y en lisosomas; el IVE es secretado durante la activación plaquetaria.

El IVE puede unirse al FXa e inhibir su función enzimática en una reacción que requiere el dominio Gla del FXa. Sin embargo, el dominio Gla y el calcio son necesarios para la inhibición del FVIIa-FT por el IVE.

La inhibición ocurre en 2 etapas: (a) el IVE se une al FXa en presencia de calcio en una reacción que requiere el sitio activo del FXa, y (b) el complejo IVE-FXa se une al FXa-FT por un mecanismo que necesita FXa en su conformación dependiente de calcio. En este paso el complejo IVE-FXa actúa uniéndose al factor VIIa-FT en una conformación que permite que un segundo dominio inhibitorio del IVE interactúe con el FVIIa.

2.6.4. Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z

La proteína Z (PZ) es un factor vitamina K dependiente (62 kDa). Su organización génica en el cromosoma 13 y su estructura molecular son muy similares a los factores VII, IX, X, y proteína C, pero en contraste a éstos, la típica tríada de activación (histidina, serina, ácido aspártico) está ausente, por lo tanto, la PZ no tiene función proteolítica (serino proteasa). En su extremo amino terminal posee un dominio rico en ácido γ -carboxiglutámico que le sirve a la proteína para interactuar con las membranas celulares en presencia de calcio, que al mismo tiempo sirve como cofactor para la inhibición del factor Xa por el Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z (ZPI).

La PZ humana tiene una vida media de 2,5 días y su concentración normal en el plasma va desde 1,9 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$. Como otros factores vitamina K dependiente, los niveles de PZ en pacientes con tratamiento cumarínico y en recién nacidos son menores.

La actividad procoagulante del factor Xa es inhibida en presencia de PZ. Esta inhibición es mediada por otra proteína, el inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z (ZPI) que circula en el plasma formando complejos con PZ. Ambas son sintetizadas mayoritariamente en el hígado y están codificadas en el cromosoma 13.

El ZPI es una glicoproteína (72 kDa) de cadena única que pertenece a la superfamilia de las serpinas, inhibidoras de serino proteasas.

El ZPI, en presencia de PZ y de calcio iónico

inhibe rápidamente el factor Xa sobre superficies celulares en presencia de calcio. Para esto se han descrito dos vías: (a) La PZ y el factor Xa formarían un complejo en la superficie fosfolipídica que luego sería reconocido por ZPI, y (b) la PZ y ZPI formarían un complejo en circulación que luego se uniría al factor Xa adosado a la superficie fosfolipídica. El resultado final de cualquiera de las dos vías es la formación de un complejo dependiente de calcio que contiene PZ, factor Xa y ZPI.

La inhibición por parte del sistema ZPI se produce antes de la formación del complejo protrombinasa (FXa-FVa).

El factor XIa es inactivado por ZPI en una reacción que no requiere la presencia de PZ, fosfolípidos o calcio, y además no es afectada por la presencia de HMWK. La heparina aumenta esta inhibición y la prolonga en el tiempo. Aunque la relevancia de esta inhibición es incierta, aparentemente el ZPI compite con otros inhibidores del factor XIa y también bloquea la activación del factor IX que luego formaría parte del complejo «tenasa».

2.6.5. Anexinas

Las anexinas constituyen una superfamilia de proteínas que se caracterizan por la presencia de una endonexina que media la unión del calcio con los fosfolípidos. Más de 90 anexinas han sido encontradas en 45 especies. Las anexinas son consideradas primariamente como una proteína intracelular, compuestas de una superficie cóncava y una convexa de acuerdo a la imagen cristalográfica.

Las anexinas tienen una particular predilección a unirse a fosfolípidos aniónicos y aunque son intracelulares, algunas de ellas se exteriorizan y ejercen diferentes actividades biológicas como por ejemplo: la anexina A1 inhibe la inflamación, la anexina A2 funciona como receptor de t-PA y regula la formación de plasmina sobre la superficie celular.

La importancia de las anexinas ha quedado demostrada recientemente al encontrarse que las anexinas A2 y A5 juegan un papel importante en la fisiopatología de la fibrinólisis que se produce en la leucemia aguda promielocítica, donde se han encontrado altos niveles de anexina A2; por otra parte, la deficiencia de Anexina A5 se ha asociado con trombosis.

3. SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Los mecanismos de regulación de la coagulación sanguínea dependen de procesos que se llevan a cabo sobre la célula endotelial. La fibrinólisis es un proceso enzimático compuesto por una serie de activadores e inhibidores, los cuales regulan la conversión de la proenzima circulante, plasminógeno, en la enzima activa, plasmina, la cual produce finalmente la lisis de la fibrina.

3.1. Componentes del Sistema Fibrinolítico

Los componentes del sistema fibrinolítico son el plasminógeno (Pg), los activadores del plasminógeno (tipo tisular y urokinasa), plasmina, inhibidores de los activadores del plasminógeno 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2) y la α 2 antiplasmina.

3.1.1. Plasminógeno. El Pg es el cimógeno de la enzima fibrinolítica plasmina; es una glicoproteína monocatenaria de 92 kDa y 790 aminoácidos. Es sintetizada en el hígado, presenta una concentración plasmática de 20 mg/dL y su vida media es de 2,2 días.

El gen que codifica esta proteína está localizado en el cromosoma 6. Existen dos isoenzimas presentes en el plasma denominados Pg1 y Pg2 presentando una idéntica secuencia aminoacídica, pero se diferencian en algunas propiedades fisicoquímicas, entre éstas su contenido de carbohidratos y su afinidad por los activadores.

La región amino terminal presenta 5 dominios con forma de asas denominadas "kringles" en donde se ubican las regiones de unión a la lisina y por medio del cual el Pg se une específicamente a la fibrina, como también a células endoteliales, lo que favorece su activación. Hacia su extremo carboxilo terminal se encuentra el sitio activo, el cual está compuesto principalmente por serina, ácido aspártico e histidina.

En su forma nativa el plasminógeno contiene ácido glutámico en su extremo amino terminal denominándose Glu-plasminógeno, pudiendo ser convertido por pequeñas concentraciones de plasmina en Lis plasminógeno, el cual posee mayor sensibilidad por los activadores, como también mayor afinidad por la fibrina.

3.1.2. Activadores del plasminógeno

La activación del Pg se produce por la escisión del enlace Arg560-Val por acción de diversos activadores, los cuales se dividen en activadores extrínsecos (activador tisular y tipo uroquinasa) (figura 20-21), intrínsecos, y exógenos (terapéuticos). Además existen algunos potenciadores de estos activadores como son las proteínas de la matriz extracelular y la membrana de las células endoteliales.

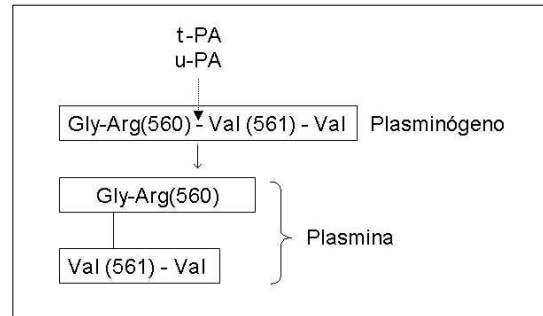


Figura 20-21. Activadores del plasminógeno

a) Activador de Pg tipo tisular (t-PA). El t-PA es una serinoproteasa codificada en el cromosoma 6. Tiene un peso molecular de 68 kDa y 530 aminoácidos; presenta una vida media de 5 minutos y una concentración plasmática de 2 μ g/L.

El t-PA es sintetizado por las células endoteliales como una enzima monocatenaria, pero en el plasma por acción de plasmina, calicreína o factor Xa es convertida en una molécula de 2 cadenas lo que va a provocar un aumento en la afinidad por fibrina y producto de esta unión el t-PA potencia su actividad.

En su estructura presenta dominios homólogos a otras proteínas, por ejemplo un dominio *finger* similar a fibronectina, también posee 2 dominios *kringles* homólogos a los del Pg. La función de estas estructuras es la unión específica a la fibrina formando un complejo ternario entre el Pg, el t-PA y la fibrina provocando un cambio conformacional en la enzima y el sustrato, lo que favorece la formación local de plasmina y la degradación de fibrina.

b) Activadores del Pg tipo uroquinasa (UK) y pro-uroquinasa (scu-PA). La UK es una serinoproteasa bicatenaria similar a la tripsina,

compuesta por dos cadenas polipeptídicas de 20 y 34 kDa unidas por un puente disulfuro. Se encuentra en la orina humana donde es secretada por células renales. Activa directamente del Pg mediante la escisión de un enlace Arg560Val con formación de Glu-plasmina, pero a diferencia del t-PA, carece de afinidad específica por la fibrina, activando tanto al Pg circulante como al unido a la fibrina.

La scu-PA es una glicoproteína (54 kDa), precursora inactiva de la UK presente en el plasma, a una concentración de 4 µg/L. Es activada por la plasmina al hidrolizar el enlace Lis158-Ile. En su estructura presenta un dominio *kringle* homólogo al Pg pero no contiene dominios *finger*, lo que podría explicar su poca afinidad por la fibrina.

3.1.3. Plasmina

La molécula de plasmina está compuesta por una cadena pesada A que se origina del extremo amino terminal y una cadena liviana B que forma el extremo carboxilo terminal y contiene el sitio catalítico de la molécula. El plasminógeno es convertido en plasmina por ruptura de una unión peptídica en la posición Arg560-Val561.

La plasmina circulante provoca una proteólisis parcial el grupo carboxiterminal del fibrinógeno generando los productos de degradación del fibrinógeno o PDF (X, Y, D y E), los cuales

interfieren con la polimerización de la fibrina solubilizándola y conduciendo por tanto a la hemorragia. Los fragmentos D y E se unen a la membrana plaquetaria ocasionando disfunción plaquetaria y contribuyendo a la hemorragia.

La plasmina actúa también sobre la fibrina liberando el dímero D (D-D) y puede activar el complemento, especialmente la fracción C1 y C3 y eventualmente las fracciones C8 y C9, con lisis de glóbulos rojos y lisis plaquetaria.

En la Coagulación Intravascular Diseminada (CID) aumentan los PDF, hecho que junto a la disminución progresiva y rápida del recuento plaquetario, y prolongación de los tiempos de coagulación (Tiempo de protrombina y Tiempo de tromboplastina parcial activada, entre otros), contribuyen a su diagnóstico (ver capítulo 23).

Los PDF tienen acción inhibitoria sobre la trombina, inhiben la polimerización de la fibrina e inhiben la agregación plaquetaria. Por lo tanto tienen acción anticoagulante propia. De esta manera, una fibrinólisis extensa produce un efecto antihemostático importante.

3.2. Regulación del sistema fibrinolítico

El sistema fibrinolítico es inhibido a nivel de la plasmina por acción de la $\alpha 2$ antiplasmina o a nivel de los activadores del plasminógeno por el PAI-1 y PAI-2 (figura 20-22).

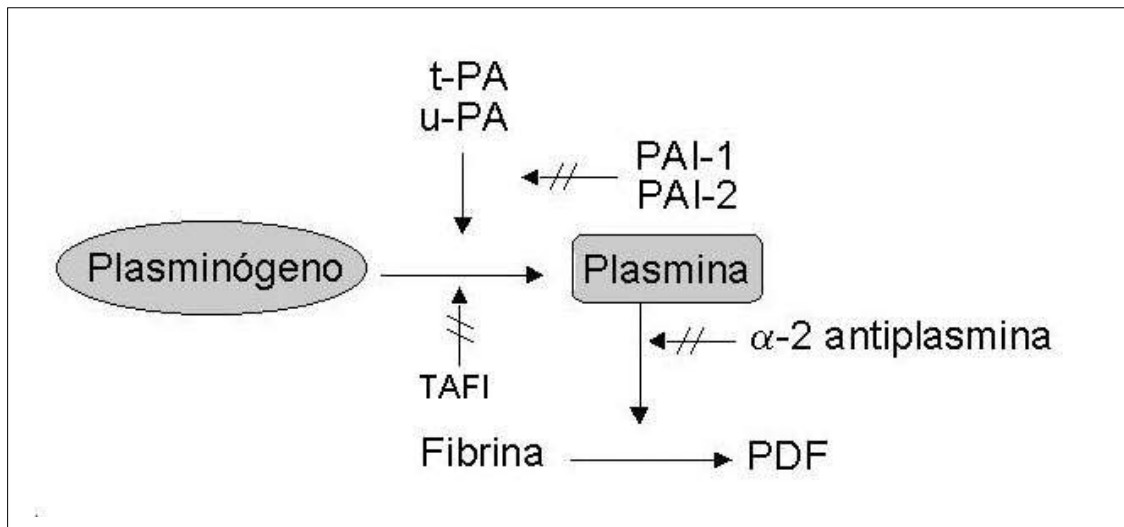


Figura 20-22. Regulación del sistema fibrinolítico.

3.2.1. PAI-1 y PAI-2

El **PAI-1** es el inhibidor primario del t-PA y u-PA en el plasma. El PAI-1 es una glicoproteína de 52 kDa (379 aminoácidos) y pertenece al grupo de las serpinas, con las cuales tiene un 30-50% de homología. Reacciona con el t-PA de cadena única y doble y con el u-PA de cadena doble, pero la capacidad de inhibir el u-PA de cadena única es muy limitada.

El gen del PAI-1 se encuentra en el cromosoma 7 y está estrechamente ligado al gen de la fibrosis quística. El PAI-1 está presente en el plasma y en sitios extracelulares, donde forma complejo con la vitronectina y las plaquetas (gránulos α); es almacenado y sintetizado en las células endoteliales y hepatocitos.

El PAI-1 es el más activo inhibidor del plasminógeno. Sus niveles normales son 0.5-68 U/mL para su actividad y 6-600 ng/mL para el antígeno; estos rangos tan amplios sugieren que puede comportarse como un reactante de fase aguda.

Las deficiencias congénitas de PAI-1 producen sangrados prolongados en presencia de pruebas de coagulación normales, excepto por un acortamiento del tiempo de euglobulinas que indica fibrinólisis.

El **PAI-2** tiene un espectro de acción similar al PAI-1, inhibe los activadores del plasminógeno con menor eficiencia que el PAI-1. El PAI-2 se encuentra en residuos de placenta humana y en los macrófagos. No se ha podido medir en el plasma en condiciones basales pero suele aumentar en el primer trimestre del embarazo.

3.2.2. Alfa 2 antiplasmina

Es una glicoproteína de cadena única de 70 kDa. Pertenece al grupo de las serpinas, la concentración en el plasma es de 7 mg/dL y su vida media es de 3 días. Es sintetizada en el hígado y se une al plasminógeno (70%) o queda en su forma libre que tiene menos actividad inhibidora.

La alfa 2 antiplasmina en el plasma reacciona rápido con la plasmina, primero a través de los sitios de unión a lisina y posteriormente formando complejo estable con la cadena liviana de la plasmina.

La alfa 2 antiplasmina unida a la fibrina es más

resistente a la inactivación, porque los sitios de unión de lisina están unidos a fibrina y no están disponibles para la unión de los inhibidores.

La alfa 2 antiplasmina se puede unir a la fibrina por el entrecruzamiento con la cadena alfa, inducido por el factor XIII, lo que produce la resistencia a la lisis que presentan los coágulos de fibrina entrecruzados.

Su concentración plasmática puede ser medida en forma funcional (en general cromogénica) o inmunológica. También se pueden medir los complejos de alfa 2 antiplasmina-plasmina por técnicas inmunológicas las cuales indican activación *in vivo* de la fibrinólisis.

Los defectos hereditarios de alfa 2 antiplasmina producen hemorragias severas en los pacientes homocigotos (niveles de actividad 0.02-0.15 U/mL) y leve hasta asintomático en heterocigotos (niveles de actividad 0.35-0.70 U/mL), se trata de delecciones que se manifiestan por alteración de las pruebas funcionales. Los ensayos habituales de coagulación son normales y ocasionalmente puede observarse un estudio de lisis de euglobulinas acortado, pero en general no hay evidencias de hiperfibrinólisis

3.2.3. Inhibidor fibrinolítico dependiente de trombina

El inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI: «Trombin Activable Fibrinolysis Inhibitor») es una proteína plasmática de 60 kDa que circula en el plasma en concentraciones de 75 nM, es un zimógeno que es activado a una enzima tipo carboxipeptidasa B mediante una ruptura del aminoácido arginina, reacción que es catalizada por la trombina. El TAFI cataliza la ruptura en los residuos arginina y lisina de la región carboxiterminal de la fibrina, como consecuencia de esto la retroalimentación positiva sobre la activación del plasminógeno es eliminada y el proceso de fibrinolítico suprimido.

La trombina, generada en altas concentraciones al formarse el coágulo de fibrina, se une al cofactor celular trombomodulina que puede activar al TAFI en cantidades suficientes, con una eficiencia catalítica 1250 veces mayor que la trombina sola. El TAFI activado (TAFIa) *in vitro* puede romper los residuos carboxiterminales de varios péptidos, incluyendo péptidos biológicamente activos como bradicinina y anafilotoxinas.

Normalmente los residuos de lisina de la región carboxiterminal de la fibrina se unen con una elevada afinidad al plasminógeno y al activador tisular del plasminógeno (t-PA) generando plasmina sobre el coágulo de fibrina. La activación del TAFI durante la formación del coágulo de fibrina resulta en la eliminación de los residuos de lisina y en consecuencia en una menor producción de plasmina.

Condiciones clínicas que se relacionan a hiperfibrinólisis:

- Excesivo activador del plasminógeno: enfermedad benigna o maligna de próstata, terapia trombolítica, neoplasias (leucemia aguda promielocítica).
- Deficiencia de los inhibidores: enfermedad hepática, amiloidosis, trastornos hereditarios.
- Enfermedad hepática y trasplante hepático: el hígado es incapaz de degradar los activadores de plasminógeno y plasmina.

LECTURAS SUGERIDAS

Broze, G. "Protein Z-dependent regulation of coagulation". *Thromb Haemost.* 86(1): 8-13, 2001.

Colman, R., Hirsh, J., Marder, V., Salzman, E. **Hemostasis and Thrombosis**. Editorial J. B. Lippincott Company. Chapter 54, 1994, pp. 1076-1080.

Colman, R., Schmaier, A. "Contact System: A vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes". *Blood* 90(10):3819-3843, 1997.

Fischbach, D., Fogdall, R. "Trastornos de la coagulación" En: **Coagulación: fundamentos**, Fischbach, D., Fogdall, R. (editores). Editorial Médica Panamericana. Capítulo 5, pp 77-99, 1985.

Foerster, J, Lukins, J, Paraskevas, F, Greer, J, Rodgers, G. **Endothelium and the regulation of hemostasis. Wintrob's Clinical Hematology**. Vol I, décima edición, cap. 25:, 1998, pp. 765-771.

Furie, B, Bouchard, B., Furie, B. "Vitamin K-Dependent Biosynthesis of Gamma-Carboxyglutamic Acid". *Blood* 93(6): 1798-1807, 1999.

Han, X., Fiehler, R., Broze, G. "Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor". *Blood* 96(9): 3049-3055, 2000.

Jaffe, E., Nachman, R., Becker, C., Minick, C. "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morfologic criteria". *J Clin Invest* 52:2745-2756, 1973.

Lee, R., Foerster, J., Lukens, J., Paraskevas, F. **Wintrobe's Clinical Hematology**. Editorial Williams and Wilkins. Vol . 1999, pp. 688-696,

Montgomery, R, Conway, T., Spector, A., Chappell, D. (eds.). **Bioquímica: casos y texto**. Editorial Harcourt Brace. Capítulo 1, 1999, pp. 2-23.

Stiene-Martin, A., Lotspeich-Steininger, C., Koepke, J. **Clinical Hematology**. Editorial Lippincott. 1998, pp. 613-616.

TROMBOCITOPENIAS Y TROMBOCITOPATÍAS

Jaime Pereira G., Diego Mezzano A. y Vicente Vicente G.

1. Introducción

2. Trombocitopenias

2.1. Trombocitopenias hereditarias

- 2.1.1. Generalidades
- 2.1.2. Trombocitopenias amegacariocíticas
- 2.1.3. Trombocitopenia y radio ausente
- 2.1.4. Síndrome de Wiskott-Aldrich y Trombocitopenia ligada a X
- 2.1.5. Síndrome velocardiofacial
- 2.1.6. Enfermedades relacionadas a MYH9

2.2. Trombocitopenias adquiridas

- 2.2.1. Trombocitopenias por disminución de la producción
 - a) Hipoplasia megacariocítica inducida por drogas
 - b) Hipoplasia megacariocítica asociada a infección viral
- 2.2.2. Trombocitopenias por aumento de la destrucción
 - a) Trombocitopenias inmunes
 - a1) Trombocitopenias autoinmunes primarias
 - Púrpura trombocitopénica inmunológica aguda
 - Púrpura trombocitopénica inmunológica crónica
 - a2) Trombocitopenias autoinmunes secundarias
 - Trombocitopenias asociadas al uso de drogas
 - Trombocitopenia inducida por heparina
 - a3) Trombocitopenias aloinmunes
 - Púrpura aloinmune neonatal
 - Púrpura postransfusional
 - b) Trombocitopenias no inmunes
 - b1) Púrpura trombótica trombocitopénica/síndrome hemolítico urémico
 - b2) Trombocitopenia del embarazo
 - b3) Preeclampsia/eclampsia
 - b4) Trombocitopenia asociada a infección
 - b5) Trombocitopenia asociada a exposición a superficies no biológicas
- 2.2.3. Trombocitopenia por secuestro esplénico
- 2.2.4. Trombocitopenia dilucional

3. Trombocitopatías

3.1. Trombocitopatías hereditarias

- 3.1.1. Defectos hereditarios de la adhesión plaquetaria
 - a) Patología del complejo glicoproteico Ib-IX-V: Síndrome de Bernard-Soulier y pseudo-von Willebrand.
 - a1) Síndrome de Bernard-Soulier (SBS)
 - a2) Síndrome de pseudo-von Willebrand

b) Patología de los receptores plaquetarios del colágeno: complejo glicoproteico Ia-IIa, GPVI, GPIV.

- b1) Patología del complejo GPIa-IIa
- b2) Patología de la GPVI
- b3) Patología de la GPIV

3.1.2. Defectos hereditarios de la agregación plaquetaria: Tromboastenia de Glanzmann

3.1.3. Defectos congénitos de la secreción plaquetaria: Anormalidades granulares.

- a) Síndrome de las plaquetas grises
- b) Deficiencia en el almacenamiento de gránulos α y δ
- c) Deficiencia combinada de gránulos α y δ
- d) Alteración plaquetaria tipo Quebec

3.1.4. Defectos hereditarios en los mecanismos implicados en la transmisión de señales de activación plaquetaria.

- a) Defectos en los receptores para agonistas
- b) Defectos en otros elementos intraplaquetarios implicados en la activación: proteínas G, enzimas efectoras, segundos mensajeros, fosforilación de proteínas.
- c) Defectos en el metabolismo del ácido araquidónico y/o en la producción de tromboxano A_2 .

3.1.5. Alteraciones congénitas de la actividad procoagulante de las plaquetas

3.1.6. Otras trombocitopatías

3.2. Trombocitopatías adquiridas

3.2.1. Asociadas a enfermedades sistémicas

- a1) Trombocitopatía urémica
- a2) Anomalía funcional de las plaquetas en insuficiencia hepática
- a3) Alteraciones plaquetarias inducidas por la cirugía con circulación extracorpórea
- a4) Disfunción plaquetaria en leucemias, mielodisplasias y disproteinemias

3.2.2. Disfunciones plaquetarias inducidas por drogas y alimentos

- b1) Aspirina y antiinflamatorios no esteroideos (AINE)
- b2) Antibióticos β -lactámicos
- b3) Heparina y fibrinolíticos
- b4) Drogas que aumentan la concentración de cAMP y Cgmp en plaquetas
- b5) Expansores de volumen
- b6) Otras sustancias y fármacos

RESUMEN

Las trombocitopenias y las trombocitopatías constituyen entidades clínicas de ocurrencia frecuente y que pueden obedecer a defectos de tipo hereditario o adquirido. Las trombocitopenias de origen hereditario se presentan como trombocitopenias aisladas en el período de recién nacido, habitualmente con alteraciones del tamaño de las plaquetas (macro o micro-trombocitopenias). Entre las trombocitopenias adquiridas se pueden distinguir aquellas por disminución de la producción de plaquetas como resultado de la supresión de la megacariopoyesis por drogas o alcohol. Las trombocitopenias producidas por un acortamiento de la supervivencia plaquetaria pueden ser el resultado de la acción de autoanticuerpos (púrpura trombocitopénica inmunológica primaria o secundaria) o aloanticuerpos (púrpura aloinmune neonatal y púrpura postransfusional). Existe un número importante de trombocitopenias por aumento de la destrucción no inmune de plaquetas; en estos casos, generalmente la trombocitopenia es una manifestación más de entidades clínicas complejas y heterogéneas (ej. Púrpura trombótica trombocitopénica, eclampsia). Más raramente la disminución del recuento de plaquetas se debe a aumento del secuestro esplénico o a pérdida aguda de sangre sin reemplazo de plaquetas.

Los defectos funcionales de las plaquetas también pueden ser hereditarios o adquiridos. Entre los primeros, los más prevalentes son los defectos de agregación/secreción, probablemente debidos a fallas en la transducción de señales. Las disfunciones más graves, que tradicionalmente sirven de modelos para la enseñanza de la fisiología y fisiopatología plaquetarias, como el Síndrome de Bernard-Soulier y la Enfermedad de Glanzmann son de ocurrencia excepcional. Los defectos funcionales adquiridos de las plaquetas son extremadamente frecuentes, y entre ellos, los secundarios a la ingestión de drogas como la aspirina y los antiinflamatorios no esteroideos llevan la delantera. Además, varias enfermedades sistémicas (ej., insuficiencias renal y hepática, leucemias, mielomas, síndromes mieloproliferativos y otras) se acompañan de disfunciones plaquetarias que a menudo plantean problemas clínicos serios.

1. INTRODUCCIÓN

Las disminuciones del número de plaquetas (trombocitopenias) y las alteraciones de su función (trombocitopatías) son condiciones clínicas frecuentes que se pueden originar por defectos de tipo hereditario o presentarse en forma adquirida. Especialmente entre las condiciones adquiridas, el desorden puede afectar aisladamente a las plaquetas o acompañar las manifestaciones clínicas de otras patologías. Este capítulo contiene una clasificación general de las trombocitopenias y de las anomalías funcionales hereditarias y adquiridas de las plaquetas, con un análisis de la patogenia, fisiopatología y clínica de los defectos más relevantes.

2. TROMBOCITOPENIAS

2.1. Trombocitopenias hereditarias

2.1.1. Generalidades

Las trombocitopenias hereditarias representan

un muy pequeño porcentaje de las trombocitopenias que se pueden observar en la práctica clínica. Incluso en niños, cuando se excluyen las infecciones y las trombocitopenias asociadas a quimioterapia y solamente se consideran las trombocitopenias aisladas, sobre el 90% de los casos corresponderá a trombocitopenias de origen inmune primarias o secundarias. Sólo recientemente el desarrollo en la identificación de defectos moleculares, ha permitido definir mejor los casos de trombocitopenias no inmunes de origen hereditario.

Desde el punto de vista de su clasificación, las trombocitopenias hereditarias se han dividido clásicamente según el tamaño de las plaquetas y sus características en el frote de sangre periférica, elementos que se consideran importantes en el diagnóstico de las trombocitopenias hereditarias. Sin embargo, también contribuyen a la sospecha diagnóstica, la historia familiar, la no respuesta al tratamiento de trombocitopenia inmune (PTI) y defectos asociados (tabla 21-1).

Tabla 21-1. Elementos que permiten sospechar la existencia de una trombocitopenia hereditaria

- Historia familiar de trombocitopenia
- Ausencia de respuesta a tratamiento de trombocitopenia autoinmune, incluyendo esplenectomía
- Frotis de sangre periférica: tamaño anormal, ausencia de gránulos alfa (plaquetas grises), cuerpos de Döhle
- Sangrado desproporcionado al recuento de plaquetas
- Comienzo en etapa de recién nacido
- Defectos asociados: ausencia de radio, retardo mental, falla renal, sordera, cataratas o desarrollo de leucemia.
- Trombocitopenia estable a través de los años

Historia familiar. Aunque es un elemento inespecífico, la presencia de una historia familiar de trombocitopenia sugiere fuertemente la existencia de una trombocitopenia hereditaria, especialmente si han sido afectados más de dos miembros del grupo familiar estrechamente relacionados. Aunque muchos tipos de trombocitopenias hereditarias se transmiten en forma autosómica dominante, existen varias que se heredan ligadas al sexo o en forma autosómica recesiva, lo que significa que el niño afectado puede representar al propósito o caso índice.

Ausencia de respuesta al tratamiento de PTI. Después de la historia familiar, el elemento clínico más importante para sospechar una trombocitopenia hereditaria es la falta de respuesta a tratamiento específico de trombocitopenia inmune. Los criterios para definir refractariedad al tratamiento no se encuentran bien definidos, aunque se acepta que un aumento del recuento de plaquetas superior a 30.000/ μl sobre el basal, con alguno de los tratamientos empleados, constituye una respuesta adecuada.

Formas asociadas. Se ha descrito una serie de manifestaciones clínicas que en pacientes con trombocitopenia persistente, permiten sospechar la existencia de una trombocitopenia hereditaria. Estas formas clínicas que pueden estar presentes en el paciente o en miembros de su familia, incluyen: ausencia de radio, sordera a tonos altos, falla renal, úvula bifida, arco aórtico a derecha, infecciones frecuentes, eccema e historia familiar de leucemia.

Examen del frote de sangre periférica. A pesar de la disponibilidad y superioridad en muchos aspectos de los contadores hematológicos, la

inspección visual del frote de sangre continúa siendo fundamental en la evaluación del tamaño de las plaquetas. La existencia de plaquetas gigantes sugiere un síndrome de Bernard-Soulier o defectos tipo anomalía de May-Hegglin. La presencia de cuerpos tipo Döhle también sugiere anomalía de May-Hegglin. Plaquetas de muy pequeño tamaño son propias del síndrome de Wiskott-Aldrich.

2.1.2. Trombocitopenias amegacariocíticas

Las trombocitopenias amegacariocíticas congénitas (TAMC) se presentan típicamente como una trombocitopenia muy profunda que aparece durante los primeros días de vida hasta el primer mes. Este cuadro se confunde frecuentemente con el púrpura trombocitopénico autoinmune neonatal, pero en este caso el recién nacido no responde a las transfusiones de plaquetas si éstas son no compatibles y se demuestran anticuerpos antiplaquetarios específicos. El diagnóstico se establece con el estudio de médula ósea, que demuestra ausencia de megacariocitos. Es frecuente la asociación a alteraciones ortopédicas o neurológicas. La complicación más grave de este cuadro es la hemorragia intracraneana, que se puede presentar hasta en un 25% de los casos. Una proporción similar de casos progresa a una aplasia medular dentro de los primeros 5 años de vida. El defecto que origina este cuadro se encuentra en la mayoría de los casos en una mutación en el receptor de trombopoyetina, c-mpl, que se traduce en una ausencia de proliferación de los megacariocitos.

2.1.3. Trombocitopenia y radio ausente

El diagnóstico clínico de esta condición se basa en la existencia de una trombocitopenia

neonatal grave acompañada de las formas físicas características. Estas formas no sólo se limitan a la ausencia de radio sino que también puede observarse otras alteraciones ortopédicas a nivel del cúbito, húmero y tibia. Los pacientes con trombocitopenia y radio ausente presentan episodios hemorrágicos graves que incluyen hemorragia intracraneana y sangrado gastrointestinal. A diferencia de las TAMC el recuento de plaquetas tiende a mejorar con el tiempo, llegando incluso a normalizarse alrededor del año de vida. Sin embargo, no es infrecuente la persistencia de una trombocitopenia leve que se mantiene e incluso se puede agravar en la edad adulta.

2.1.4. Síndrome de Wiskott-Aldrich y trombocitopenia ligada a X

El síndrome de Wiskott-Adrich (SWA) y la trombocitopenia ligada a X (TLX) se caracterizan por presentar plaquetas de muy pequeño tamaño. El SWA también incluye una alteración grave del sistema inmune que es responsable de las infecciones recurrentes, alergias, enfermedades autoinmunes y neoplasias linfoproliferativas. Los pacientes con TLX presentan sólo síntomas mínimos de inmunodeficiencia. El SWA es una enfermedad poco frecuente con una incidencia aproximada de un caso por cada 250.000 personas en la población Europea. La frecuencia de TLX es desconocida.

Patogenia. El SWA y la TLX son causadas por mutaciones en un gen localizado en el brazo corto del cromosoma X, que codifica para una proteína de 502 aminoácidos (WASp). Hasta ahora han sido identificadas sobre 100 mutaciones diferentes, la mayoría del tipo sustitución nucleotídica. No se ha encontrado una correlación genotipo-fenotipo, aunque mutaciones sin sentido y que alteran el marco de lectura se asocian a formas con inmunodeficiencia más grave. La proteína WASp es una proteína intracelular rica en prolina expresada exclusivamente en células de linaje hematopoyético. Pertenece a una familia de proteínas involucradas en transducción de señales desde receptores a la actina. En ausencia de WASp existe un defecto en todos los procesos que se relacionan directamente con reorganización de la arquitectura del citoesqueleto, especialmente movilidad celular y fagocitosis. La disminución progresiva en el número y función de las células T es el fenómeno más importante en la alteración del sistema inmune observada en el SWA, aunque también

se han descrito anomalías a nivel de los macrófagos y células dendríticas.

Cuadro clínico. Los pacientes con TLX presentan desde el nacimiento tendencia al sangrado anormal, mientras que en los pacientes con SWA a esto se suma la inmunodeficiencia, que se agrava durante la infancia. Sin embargo, el grado de inmunodeficiencia puede ser muy variable, incluso en miembros afectados dentro de la misma familia. La tendencia hemorrágica puede ir desde púrpura cutáneo leve a episodios hemorrágicos graves con hemorragia intracraneana o gastrointestinal. La disfunción inmune se manifiesta por aumento de la susceptibilidad a las infecciones, eccema, fenómenos autoinmunes, vasculitis, enfermedades inflamatorias del tubo digestivo y aumento en la incidencia de síndromes linfoproliferativos. La supervivencia media de los pacientes con SWA es de alrededor de 15 años. Las causas de muerte son las infecciones, hemorragias y las neoplasias.

Diagnóstico. La alteración de laboratorio más constante es la trombocitopenia, con plaquetas de muy pequeño tamaño (VPM <5fl). Los estudios funcionales plaquetarios habitualmente sólo demuestran una disminución leve a moderada del "pool" de depósito. Es habitual que la tendencia hemorrágica sea mayor a la esperada para el recuento de plaquetas de los pacientes. Durante la infancia y edad adulta se observa una disminución progresiva del número de linfocitos T, defectos de proliferación y alteración para inducir producción de anticuerpos.

2.1.5. Síndrome velocardiofacial

Otra forma de trombocitopenia con similitud a la TLX, pero con plaquetas de tamaño aumentado, es el síndrome velocardiofacial (SVCF), también conocido como síndrome de DiGeorge. El SVCF se asocia a mutaciones o deleciones en el cromosoma 1q22 y 10p4. El SVCF se caracteriza por la existencia de paladar hendido, malformaciones cardíacas, facies típica y retardo mental. En la mayoría de los pacientes las hemorragias están ausentes o son muy leves y los estudios de laboratorio de la función plaquetaria son normales. Debido a que las deleciones de 1q22 incluyen el gen de la GPIb α , los pacientes con SVCF son heterocigotos para el síndrome de Bernard-Soulier. Algunos pacientes exhiben un defecto de aglutinación con ristocetina y presentan episodios

hemorrágicos graves. Es importante señalar que en el SVCF puede existir también una trombocitopenia de origen inmune que responderá a tratamiento específico.

2.1.6. Enfermedades relacionadas a MYH9

Las formas más frecuentes de trombocitopenias hereditarias se caracterizan por presentar plaquetas de tamaño aumentado (macrotrombocitopenia), entre las cuales las más comunes pertenecen a un grupo denominado enfermedades relacionadas a MYH9. Entre éstas, se distinguen la anomalía de May-Hegglin y los síndromes de Sebastian, Fetchner y Epstein, enfermedades de transmisión autosómica dominante y causadas por mutaciones de MYH9, gen que codifica para la cadena pesada de la miosina no muscular IIA (NMMHC-IIA). Desde que se clonó el gen, se han descrito más de 20 mutaciones en 65 familias no relacionadas estudiadas a nivel mundial. Desde el período de recién nacido todos los individuos afectados presentan macrotrombocitopenia y cuerpos de inclusión en los leucocitos. Durante la infancia y algunos de ellos en la edad adulta, presentan sordera neurosensorial, cataratas y glomerulonefritis. Desde el punto de vista clínico y de laboratorio los diferentes síndromes que comprenden este grupo son muy difíciles de separar y actualmente se acepta que ellos no representan entidades diferentes, sino más bien esta sería una enfermedad única con un espectro clínico heterogéneo.

Patogenia. La miosina no muscular IIA es una enzima hexamérica compuesta de dos cadenas pesadas y cuatro cadenas livianas. La dimerización de las cadenas pesadas lleva a la formación de una estructura polar con dos regiones bien definidas: en el extremo terminal N, una estructura globular con sitios de unión para ATP y actina involucrados en actividad motora y en el extremo terminal C, formación de una hélice alfa con funciones reguladoras. Las mutaciones de MYH9 que afectan el dominio motor se asocian más frecuentemente a compromiso renal grave mientras que alteraciones en el extremo C se observan en familias sin daño renal. Sin embargo, la misma mutación se ha encontrado en pacientes con diferentes manifestaciones clínicas, sugiriendo que el fenotipo resulta de una interacción compleja entre el MYH9 afectado y genes modificadores.

La trombocitopenia es el resultado de

trombopoyesis inefectiva, ya que el número de megacariocitos y la supervivencia plaquetaria son normales y la esplenectomía no mejora el recuento de plaquetas. La tendencia al sangrado en estos pacientes parece ser mayor que lo esperado para el recuento de plaquetas, sugiriendo un defecto funcional asociado. La agregación y secreción plaquetarias son habitualmente normales, pero con alteraciones en el cambio de forma, proceso que requiere de un funcionamiento adecuado de NMMHC-IIA.

Las inclusiones leucocitarias se observan en alrededor del 25-75% de los neutrófilos, siendo mucho más raras en los eosinófilos o monocitos. Estas inclusiones fusiformes de 2-7µm de diámetro se ubican en la periferia de la célula y se tiñen de azul con May-Grünwald-Giemsa; debido a su semejanza, se les ha denominado cuerpos de "Döhle-simil".

Estas inclusiones están formadas por ribosomas y microfilamentos de 7-10 nm de diámetro.

Aún se desconoce la patogenia de la insuficiencia renal en este grupo enfermedades, en pacientes con daño renal se ha encontrado que la NMMHC-IIA se encuentra anormalmente distribuida tanto en las células mesangiales como tubulares y los podocitos muestran fusiones segmentarias y focales.

Manifestaciones clínicas. En orden de frecuencia, las manifestaciones clínicas de las enfermedades relacionadas a MYH9 son la diátesis hemorrágica, la sordera a tonos altos, compromiso renal y cataratas. Los sangrados son habitualmente leves, aunque excepcionalmente pueden presentar hemorragias graves. Generalmente las manifestaciones hemorrágicas aparecen durante la infancia y se mantienen invariables durante toda la vida; las equimosis, epistaxis y menorragias son los síntomas más frecuentes. Las otras manifestaciones asociadas se pueden presentar en la infancia o en la edad adulta.

Diagnóstico. La única característica de laboratorio constante en las enfermedades relacionadas a MYH9 es la macrotrombocitopenia. En el frote de sangre periférica lo habitual es que entre un 5-50% de las plaquetas pueden presentar un tamaño mayor al de los eritrocitos. La mayoría de los pacientes cursan con trombocitopenia leve a moderada, pero algunos pueden presentar un recuento de plaquetas normal. Los contadores

hematológicos tienden a subestimar el recuento y tamaño de las plaquetas, por lo que se recomienda realizar un examen microscópico de la sangre periférica. Esto también permitirá observar los cuerpos de Döhle-símiles.

2.2. TROMBOCITOPENIAS ADQUIRIDAS

2.2.1. Trombocitopenias por disminución de la producción

La trombocitopenia adquirida por disminución de la producción se observa en forma frecuente y predecible en la aplasia medular, infiltración maligna de la médula ósea, quimioterapia y

radiación. Asimismo, la trombocitopenia es parte de la pancitopenia observada en deficiencias nutricionales de folato, vitamina B₁₂ y, ocasionalmente, hierro. Estas condiciones se discuten en otros capítulos de este texto. Analizamos aquí aquellos cuadros en que la trombocitopenia resulta de una reducción selectiva o ausencia de megacariocitos a nivel de la médula ósea, con presencia normal de las otras series hematopoyéticas. Esta condición que se denomina aplasia o hipoplasia megacariocítica pura adquirida, puede ser secundaria a una variedad de etiologías entre las que destacan drogas, infecciones y alteraciones inmunológicas (tabla 21-2).

Tabla 21-2. Clasificación de las trombocitopenias adquiridas

<p>Por disminución de la producción de plaquetas Hipoplasia/aplasia megacariocítica Infecciones virales Drogas y alcohol</p> <p>Por aumento de la destrucción de plaquetas Mecanismos inmunológicos Trombocitopenias autoinmunes Trombocitopenia inmune primaria Púrpura trombocitopénica inmune Aguda Crónica Trombocitopenias inmunes secundarias Enfermedades autoinmunes Generalizadas (Ej. Lupus Eritematoso Sistémico) Órgano específicas (Ej. Tiroiditis) Enfermedades linfoproliferativas Leucemia linfática crónica Linfomas Mieloma múltiple Tumores sólidos Infección por HIV Post-trasplante de médula ósea Infecciones virales Drogas (Sales de oro, quinidina, heparina) Trombocitopenias aloinmunes Púrpura aloinmune neonatal Púrpura post-transfusional</p> <p>Mecanismos no inmunológicos Púrpura trombótica trombocitopénica Síndrome hemolítico urémico Trombocitopenia incidental del embarazo Trombocitopenia asociada a infecciones</p> <p>Por secuestro esplénico de plaquetas (hiperesplenismo)</p> <p>Por pérdidas y dilución durante la transfusión masiva de sangre</p>

a) Hipoplasia megacariocítica inducida por drogas

Algunas drogas tienen un efecto sobre los megacariocitos que es relativamente específico, ya sea como respuesta idiosincrásica o dependiente de la dosis. Las drogas que con mayor frecuencia se asocian a reducción aislada de los megacariocitos son la clorotiazida, alcohol y estrógenos. En individuos susceptibles, la clorotiazida puede inducir una trombocitopenia leve o moderada que se recupera espontáneamente en alrededor de 2 semanas después de retirar la droga. La ingestión de grandes cantidades de alcohol puede causar una supresión selectiva de la producción de plaquetas, con trombocitopenia leve a moderada, que se puede agravar por la presencia simultánea de esplenomegalia, desnutrición o insuficiencia hepática. El uso prolongado de dietilestilbestrol u otros preparados de estrógenos se asocia ocasionalmente a trombocitopenia en individuos susceptibles, la cual puede tardar hasta dos meses en recuperarse después de la suspensión de la hormona.

b) Hipoplasia megacariocítica asociada a infección viral

Varios tipos de infecciones virales son capaces de afectar selectivamente la trombopoyesis. Destaca la infección por virus del sarampión, varicela, citomegalovirus, mononucleosis infecciosa y dengue. Ocasionalmente el virus de la hepatitis B puede producir una trombocitopenia amegacariocítica aislada. Desde el punto de vista morfológico la trombocitopenia asociada a infección viral se caracteriza por vacuolización de los megacariocitos, inclusiones y degeneración nuclear. En algunas infecciones virales (rubéola, varicela) la trombocitopenia puede ser agravada por la destrucción periférica de las plaquetas por acción de complejos inmunes.

2.2.2. Trombocitopenias por aumento de la destrucción

La remoción acelerada de las plaquetas desde la circulación obedece a dos grandes mecanismos: inmunológico, en el cual la destrucción plaquetaria es mediada por anticuerpos y/o complejos inmunes, y mecanismo no inmunológico o por aumento de consumo (tabla 21-2).

a) Trombocitopenias inmunes

Las plaquetas pueden ser retiradas prematuramente de la circulación por mecanismos inmunes en los que pueden participar aloanticuerpos, autoanticuerpos, anticuerpos dependientes de droga y posiblemente complejos inmunes. El denominador común de todos estos procesos es una retirada acelerada de las plaquetas, con acortamiento de la supervivencia, lo que se traduce en una disminución del número de plaquetas circulantes. En la tabla 21-3 se clasifican los diferentes tipos de trombocitopenias inmunes según la naturaleza del anticuerpo responsable.

a1) Trombocitopenias autoinmunes primarias

El púrpura trombocitopénico inmune primario (PTI) es una de las causas más frecuentes de trombocitopenia aislada encontrada en la práctica médica. La enfermedad es causada por autoanticuerpos que se unen a estructuras de la membrana plaquetaria, acortando su supervivencia. La presentación clínica es muy variable, desde casos agudos muy sintomáticos, a hallazgos fortuitos de trombocitopenia asintomática. Debido a sus diferencias clínicas, terapéuticas y posiblemente fisiopatológicas, se discutirá en forma separada el PTI crónico del adulto y el PTI agudo, cuadro que se presenta fundamentalmente en niños.

Púrpura trombocitopénico inmunológico agudo

El PTI agudo es una enfermedad de los niños, habitualmente autolimitada, que se presenta comúnmente con una historia corta de sangrado mucocutáneo en niños de 2 a 10 años de edad, de cualquier sexo. La incidencia es de alrededor de 1 caso por 100.000 niños. Es muy frecuente el antecedente de una infección viral reciente o vacunación. En el momento de la presentación la trombocitopenia es generalmente grave y sintomática, con recuentos de plaquetas menores a 20.000/ μ l. El examen físico muestra petequias, equimosis y signos de sangrado mucoso. Ocasionalmente se puede presentar sangrado gastrointestinal o genitourinario (<2% de los casos). En la etapa aguda existe riesgo de hemorragia intracraneana, aunque éste es bajo (<1%). La evolución característica de la PTI aguda en la infancia es hacia la remisión espontánea la que se alcanza en un promedio

de 1 a 2 meses en el 80% de los casos. El diagnóstico de PTI agudo del niño está basado principalmente en la historia, examen físico, recuento sanguíneo completo y frotis de sangre periférica para excluir otras causas de trombocitopenia aguda. Pruebas adicionales son generalmente innecesarias y no se debieran utilizar en forma rutinaria para hacer el diagnóstico. El estudio de la médula ósea se debería reservar para establecer el diagnóstico en pacientes con trombocitopenia persistente o resistentes al tratamiento.

Patogenia. La estrecha relación entre el desarrollo de PTI agudo e infección viral ha llevado a proponer una serie de mecanismos que tienen relación con este tipo de infecciones, para explicar la destrucción de las plaquetas: (a) interferencia del virus con la maduración de los megacariocitos, (b) reactividad cruzada de anticuerpos anti-virales con las plaquetas, (c) unión de complejos inmunes virus-antivirus a la superficie plaquetaria y (d) producción de un autoanticuerpo verdadero. De estos mecanismos, el que ha encontrado mayor evidencia experimental es aquel relacionado a la producción de autoanticuerpos antiplaquetarios verdaderos. De hecho, se ha demostrado producción de IgG por parte de linfocitos esplénicos de niños con PTI agudo, la que se une en forma específica a estructuras de la membrana de las plaquetas. Por otra parte, en el suero de niños portadores de PTI agudo, se han descrito anticuerpos que reconocen la GPV de la membrana plaquetaria.

Tratamiento. La mayoría de los niños portadores de PTI agudo no requiere tratamiento específico; de hecho, alrededor del 80% de ellos evoluciona a la remisión completa sin necesidad de esteroides o esplenectomía, dentro de los seis meses de iniciado el cuadro. Pacientes con recuentos de plaquetas $>20.000/\mu\text{l}$ no se deberían hospitalizar si están asintomáticos o presentan sólo púrpura leve. Tratamiento específico estaría indicado en pacientes que tienen <20.000 plaquetas/ μl o en aquéllos con recuentos <50.000 pero con sangrado mucocutáneo significativo. En estos casos el uso de corticosteroides ha mostrado ser de algún

beneficio. Habitualmente se utiliza 1-2 mg/kg/día o 60 mg/m²/día de prednisona oral por 21 días, aunque también un esquema que usa 4 mg/kg/día de prednisona oral por 7 días ha mostrado un beneficio similar. En varios estudios que han utilizado dosis muy altas de corticosteroides (10 a 50 mg/kg/día de metilprednisolona por 7 días), se ha observado recuperación del recuento de plaquetas similar al obtenido con el uso de inmunoglobulina intravenosa (IgIV). Existe evidencia que con el uso de IgIV se produce una recuperación del recuento de plaquetas más rápida que con corticosteroides o sin tratamiento. Se recomienda tratar con IgIV a todos los niños portadores de PTI agudo que independiente del recuento de plaquetas presenten hemorragias graves con riesgo vital o a aquéllos que se presentan con <10.000 plaquetas/ μl . La dosis recomendada es de 1 g/kg por un día o 2 g/kg administrada en 2-5 días. Se ha demostrado que la globulina anti-Rh(D) intravenosa aumenta el recuento de plaquetas en forma significativa en el PTI agudo del niño; sin embargo, la velocidad de recuperación pareciera ser menor que la obtenida con el uso de IgIV. La dosis utilizada varía entre 25 y 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por 2-5 días. Numerosos estudios muestran a la esplenectomía como una terapia efectiva en el PTI agudo, aunque no existe evidencia que permita definir las indicaciones apropiadas, el momento de realizarla y sus riesgos potenciales. Se ha sugerido que la esplenectomía estaría indicada cuando la trombocitopenia persiste por más de 12 meses después del diagnóstico, con síntomas de sangrado y recuento de plaquetas $<10.000/\mu\text{l}$, asumiendo falla o respuesta transitoria al uso de IgIV o anti-Rh(D).

Púrpura trombocitopénico inmunológico crónico

El PTI crónico se caracteriza clínicamente por la aparición de hemorragias mucocutáneas de comienzo gradual, frecuentemente precedido por una historia larga de equimosis espontáneas, epistaxis y menorragia. Entre otras diferencias con el PTI agudo, el PTI crónico es más habitual en adultos, con mayor frecuencia de presentación en mujeres (tabla 21-3).

Tabla 21-3. Diferencias entre PTI agudo y crónico

Características	PTI aguda	PTI crónica
Edad de comienzo	2 – 9 años	20 – 40 años
Mujeres:hombres	1 : 1	3 : 1
Antecedente de infección	Presente	Ausente
Recuento de plaquetas	< 20.000/ μ l	20.000 – 100.000/ μ l
Inicio de síntomas	Abrupto	Gradual
Duración	2 – 6 semanas	Años
Remisión espontánea	> 80% de los casos	Infrecuente

Etiología y patogenia. Desde la demostración por Harrington que la infusión de plasma de pacientes con PTI inducía trombocitopenia en voluntarios, numerosas observaciones han confirmado el concepto que la destrucción acelerada de plaquetas en el PTI crónico obedece a la acción de autoanticuerpos que reconocen estructuras de la membrana plaquetaria. La trombocitopenia sería el resultado de un aumento en la destrucción extravascular de las plaquetas cubiertas con anticuerpos a nivel del sistema fagocítico mononuclear (SFM). Sin embargo, estudios cinéticos realizados en pacientes con PTI crónico, han demostrado también una respuesta inapropiada de la médula ósea, con grados variables de disminución de la producción de plaquetas, lo que contribuiría al desarrollo de trombocitopenia. Estudios inmunohematológicos muestran en forma consistente que sobre el 90% de los casos de PTI crónico presentan anticuerpos antiplaquetarios de clase IgG, aislados o en combinación con IgM o IgA. Utilizando técnicas con captura de antígenos (ver capítulo 31) se ha encontrado que la mayoría de los anticuerpos están dirigidos primariamente contra las glicoproteínas (GP) IIb-IIIa, Ib-IX y menos frecuentemente contra la GPIa-IIa y GPIV. A pesar de que estos autoanticuerpos parecen estar involucrados en la patogenia del PTI crónico, aún es motivo de controversia la utilidad de su búsqueda para el diagnóstico clínico y tratamiento de los pacientes. Sin embargo, debido a que las GP mayores de las plaquetas son importantes receptores funcionales, es posible observar ocasionalmente un defecto de función de las plaquetas asociado a la presencia de estos autoanticuerpos. Este fenómeno se ha demostrado en pacientes en los cuales a pesar de obtener un aumento en el número de plaquetas circulantes, persisten los síntomas de sangrado. En estos casos, se ha

postulado que la unión del anticuerpo en la cercanía de los sitios activos de las GPs, interferiría con la unión de los ligandos, lo que se traduciría en alteración de la respuesta de las plaquetas al daño vascular.

Diagnóstico. Los elementos fundamentales en los que se basa el diagnóstico del PTI crónico en el adulto son la historia, el examen físico y el recuento sanguíneo completo con examen microscópico de la sangre periférica. La historia clínica tiene como objetivos determinar el tipo y gravedad del sangrado mucocutáneo, así como descartar el uso de drogas que potencialmente pueden producir trombocitopenia o agravar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (ej. aspirina). El examen físico está dirigido a evaluar manifestaciones de sangrado, su gravedad y a excluir otras causas de trombocitopenia. Un recuento sanguíneo completo y una cuidadosa observación del frotis de sangre periférica son esenciales en el diagnóstico del PTI. Es importante en la evaluación de un recuento de plaquetas anormalmente bajo, descartar la seudotrombocitopenia, que en la mayoría de los casos resulta de la aglutinación *in vitro* de las plaquetas en presencia de EDTA. No se considera necesario el uso de otras pruebas de laboratorio si, la historia, examen físico y recuento sanguíneo, son compatibles con el diagnóstico de PTI. Si se encuentra elementos atípicos, podría estar indicada la realización de pruebas adicionales de laboratorio. Entre otros, se considera apropiado descartar la infección por virus de la inmunodeficiencia humana en pacientes con factores de riesgo. El examen de la médula ósea se debería efectuar como parte de la evaluación en pacientes sobre los 60 años y en aquéllos candidatos a esplenectomía. El estudio de anticuerpos unidos a las plaquetas (IgG asociada a plaquetas, PAIgG), anticuerpos libres en el suero y especificidad antigénica de

los anticuerpos (ver capítulo 31), no se ha demostrado de utilidad en la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de PTI.

Tratamiento. En pacientes con recuentos de plaquetas superiores a 50.000/ μ l, asintomáticos o con púrpura leve no es necesario iniciar tratamiento específico y se debería mantenerlos sólo en observación. En el resto de los casos se debería iniciar tratamiento, para lo cual se dispone de varias opciones:

- **Glucocorticoides.** El uso de corticosteroides constituye el tratamiento estándar inicial en los adultos portadores de PTI. Se recomienda iniciar el tratamiento con prednisona 1 mg/kg/día. Con este régimen 70 a 90% de los casos responde con aumento del recuento de plaquetas y atenuación de los síntomas de sangrado. El efecto de los corticosteroides se evidencia alrededor de los 7 días y es máximo a las 2-3 semanas. A largo plazo, no más del 15% de los pacientes tratados con corticoides experimentará remisión permanente.

Esplenectomía. Esta forma de tratamiento estaría indicada en aquellos casos que no responden a corticosteroides o requieren dosis muy altas para mantenerse en remisión. Alrededor de 70% de los casos tendrá alguna forma de respuesta inmediata a la esplenectomía; en la mayoría de los casos normalizando el recuento de plaquetas. A largo plazo alrededor de dos tercios de los pacientes esplenectomizados permanecerán en remisión, la mitad de ellos con recuentos de plaquetas >100.000/ μ l.

- **Inmunoglobulina G intravenosa.** En el PTI del adulto la IgGIV se utiliza fundamentalmente cuando se requiere aumentar transitoriamente el recuento de plaquetas, específicamente en aquellos pacientes con <50.000 plaquetas/ μ l y hemorragias con riesgo vital. La dosis recomendada es de 0,5-1 g/kg administrada en 2 a 5 días.
- **Inmunoglobulina anti-Rh(D).** La infusión de inmunoglobulina anti-Rh(D) (anti-D) en pacientes adultos no esplenectomizados portadores de PTI crónico produce un aumento transitorio del recuento de plaquetas que dura típicamente 2-3 semanas; en individuos esplenectomizados la respuesta es menos consistente. El efecto adverso más importante es la hemólisis con

prueba de Coombs directa positiva, y caída leve y transitoria de la hemoglobina.

- **Otros tratamientos.** En pacientes que ya han sido esplenectomizados y refractarios al tratamiento con corticosteroides existen numerosas opciones terapéuticas; sin embargo, no hay estudios controlados que permitan determinar su efectividad y tasa de efectos adversos. El tratamiento con inmunosupresores se ha demostrado eficaz en algunos casos. Azatioprina y ciclofosfamida como agentes únicos o en combinación con prednisona, pueden producir incrementos en el recuento de plaquetas, aunque se requiere de varios meses de tratamiento. Danazol, un andrógeno modificado que carece de efectos masculinizantes, se ha usado como sustituto de los corticosteroides. En dosis de 400 a 800 mg por día induce respuestas parciales en un 10 - 80% de los casos publicados, pero su empleo se asocia a toxicidad hepática.

a2) Trombocitopenias inmunes secundarias

La trombocitopenia inmune puede aparecer como complicación de una gran variedad de enfermedades sistémicas, siendo habitualmente indistinguible del PTI crónico. La asociación con lupus eritematoso sistémico (LES) es muy frecuente, presentándose hasta en un tercio de los casos. El PTI crónico se puede asociar a anemia hemolítica autoinmune (síndrome de Evans) o combinarse con autoanticuerpos que reaccionan con factores de la coagulación y neutrófilos. Otras enfermedades autoinmunes asociadas a PTI crónico son la enfermedad de Graves, la tiroiditis de Hashimoto, miastenia gravis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y cirrosis biliar. El PTI crónico también se ha asociado a enfermedades linfoproliferativas como linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström y leucemia linfática crónica. Enfermedades infecciosas que se asocian a la aparición de PTI crónico incluyen citomegalovirus, mononucleosis infecciosa, hepatitis B, *Mycoplasma pneumoniae*, leptospirosis, tuberculosis y toxoplasmosis. En pacientes portadores de infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) hasta 40% de los casos puede desarrollar un cuadro de PTI crónico, que a veces es el signo de presentación de la infección. En su patogenia juegan un papel muy importante la presencia de complejos

inmunes que contienen componentes de la membrana plaquetaria y anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra una región específica de la GPIIb/IIIa.

Trombocitopenia inmune asociada al uso de drogas

La aparición de trombocitopenia aguda grave en relación al uso de drogas es una complicación

reconocida desde hace más de 100 años. Numerosas drogas son capaces de inducir trombocitopenia mediante un mecanismo inmune. En la tabla 21-4 se muestran aquellas drogas con más de cinco referencias independientes de asociación a trombocitopenia y en las cuales se ha demostrado su efecto por pruebas *in vitro* o por reexposición a la droga.

Tabla 21-4. Drogas involucradas en trombocitopenia inmune

Droga	Reexposición	Anticuerpo dependiente de droga <i>in vitro</i>
Acetaminofeno	+	+
Acido valproico	+	
Aspirina	+	+
Carbamazepina		+
Cefalotina	+	+
Clorotiazida		+
Clortalidona		+
Difenilhidantoína		+
Digoxina	+	+
Furosemida		+
Heparina	+	+
Meticilina	+	+
Metildopa	+	+
Quinidina	+	+
Quinina	+	+
Ranitidina	+	+
Rifampicina	+	+
Sales de oro	+	+
Sulfonamidas	+	+
Vancomicina		+

Criterios importantes que permiten determinar la existencia de una trombocitopenia inducida por droga incluyen: (a) la terapia con la droga sospechosa precede a la trombocitopenia; (b) la recuperación de la trombocitopenia es completa y mantenida después de suspender la droga; (c) la droga era la única utilizada al inicio de la trombocitopenia; (d) se excluyen otras causas de trombocitopenia; y (e) la reexposición a la droga sospechosa se asocia con recurrencia del cuadro. A estos criterios se puede agregar la demostración en el laboratorio de un anticuerpo que reacciona contra las plaquetas en presencia de la droga.

Patogenia. En la mayoría de los casos los

anticuerpos inducidos por drogas se unen a las plaquetas específicamente a través de su región Fab y no en la forma de complejos inmunes. Las glicoproteínas de la membrana plaquetaria IIb-IIIa y Ib-IX constituyen los blancos antigénicos más frecuentes. Se ha propuesto que la respuesta inmune se iniciaría por unión de la droga a los componentes de la membrana induciendo un cambio estructural o formando un complejo droga-proteína (neoantígeno). Otras drogas inducen trombocitopenia por formación de autoanticuerpos verdaderos, que no requieren la droga para reaccionar con las plaquetas como es el caso de la metildopa y sales de oro. Un número reducido de drogas, entre las que se incluye la penicilina, se unen a

la membrana plaquetaria induciendo la formación de anticuerpos dependientes de hapteno.

Trombocitopenia inducida por heparina (TIH)

Aunque en estricto sentido esta trombocitopenia es el resultado del uso de una droga, su patogenia única, cuadro clínico y frecuencia de presentación, hacen necesario considerarla en forma separada.

La administración de heparina endovenosa o subcutánea es una causa reconocida de trombocitopenia. La frecuencia de esta complicación varía de 1-5% en diferentes estudios. En la TIH se han descrito dos formas: (a) tipo I, por acción directa de la heparina sobre las plaquetas, que no está mediada inmunológicamente y que es habitualmente leve, y (b) tipo II, o inmune, por acción de un autoanticuerpo antiplaquetario dependiente de heparina. Lo más importante de este cuadro es que los pacientes que presentan una trombocitopenia profunda asociada al uso de heparina, se complican paradójicamente de fenómenos de trombosis arterial y, menos frecuentemente, venosa.

Patogenia. La TIH tipo II se asocia a la presencia de anticuerpos que están dirigidos contra el complejo formado por la heparina y el factor plaquetario 4 (PF4), proteína básica que se encuentra normalmente en los gránulos alfa de las plaquetas. Los complejos inmunes formados entre el PF4, la heparina y el anticuerpo, son reconocidos por el receptor FcγIIa de las plaquetas, lo que induce su activación, liberación del contenido de sus gránulos y agregación. Simultáneamente, los heparinoides presentes sobre la superficie de la célula endotelial unen PF4 y se forma el complejo con el anticuerpo, lo que resulta en daño de la célula endotelial que se podría transformar así en una superficie protrombótica.

Estudio de laboratorio. El anticuerpo dependiente de heparina se puede demostrar mediante técnicas inmunológicas (ELISA) o

funcionales. El ensayo de ELISA más ampliamente utilizado se basa en la capacidad del anticuerpo de unirse al complejo PF4-heparina fijado a una fase sólida. Los ensayos funcionales dependen de la propiedad que tienen los anticuerpos dependientes de heparina de activar las plaquetas. Con este fin se ha utilizado la agregación plaquetaria en presencia del anticuerpo y heparina o la liberación de 5-HT marcada con ¹⁴C en las mismas condiciones.

Tratamiento. En la mayoría de los pacientes que presentan una TIH la suspensión de droga es seguida por una rápida recuperación del recuento de plaquetas. En aquellos casos en que no se puede prescindir de tratamiento anticoagulante, se ha obtenido buenos resultados con la utilización de análogos de heparina sin reactividad cruzada con el anticuerpo (Danaparoid). En estos casos también se ha usado inhibidores directos de trombina tales como lepirudina y argatroban.

a3) Trombocitopenias aloinmunes

Las trombocitopenias aloinmunes resultan de la acción de aloanticuerpos que reconocen antígenos específicos sobre la membrana de las plaquetas, dando origen a dos entidades clínicas bien definidas: púrpura aloinmune neonatal (PAIN) y púrpura post-transfusional (PPT).

Los antígenos plaquetarios, de acuerdo a su origen y distribución se pueden clasificar en dos grupos: (a) aloantígenos compartidos con otras células sanguíneas (ej., antígenos de los sistemas ABH, Lewis, P, I/i) y con células de otros tejidos (moléculas clase I del sistema HLA) y (b) los aloantígenos plaquetarios específicos.

Los aloantígenos plaquetarios específicos se generan por sustituciones aminoacídicas únicas de las glicoproteínas mayores de la membrana de las plaquetas. Estas sustituciones son reconocidas por aloanticuerpos antiplaquetarios. Los aloantígenos plaquetarios específicos, su localización, base molecular y frecuencia de expresión se muestran en la tabla 21-5.

Tabla 21-5. Características de los aloantígenos plaquetarios específicos

Sistema	Alelos	Sinónimos	Localización	Base molecular	Frecuencia fenotípica(%)*
HPA-1	HPA-1a	PI ^{A1} , Zw ^a	GPIIIa	Leu ₃₃ → Pro ₃₃	97.9
	HPA-1b	PI ^{A2} , Zw ^b			28.8
HPA-2	HPA-2a	Ko ^b , Sib ^b	GPIb	Thre ₁₄₅ → Met ₁₄₅	99.3
	HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a			14.6
HPA-3	HPA-3a	Lek ^a , Bak ^a	GPIIb	Ile ₈₄₃ → Ser ₈₄₃	80.9
	HPA-3b	Lek ^b , Bak ^b			69.8
HPA-4	HPA-4a	Pen ^a , Yuk ^b	GPIIIa	Arg ₁₄₃ → Glu ₁₄₃	>99.9
	HPA-4b	Pen ^b , Yuk ^a			<0.1
HPA-5	HPA-5a	Br ^b	GPIa	Gln ₅₀₅ → Lys ₅₀₅	99.0
	HPA-5b	Br ^a			19.7
HPA-6w	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	Arg ₄₈₉ → Glu ₄₈₉	2.4
HPA-7w	HPA-7bw	Mo	GPIIIa	Pro ₄₀₇ → Ala ₄₀₇	0.2
HPA-8w	HPA-8bw	Sr ^a	GPIIIa	Arg ₆₃₆ → Glu ₆₃₆	<0.01
HPA-9w	HPA-9bw	Max ^a	GPIIb	Val ₈₃₇ → Met ₈₃₇	0.6
“HPA-10w”	HPA-10bw	La ^a	GPIIIa	Arg ₆₂ → Glu ₆₂	<1.6
		Gro ^a	GPIIIa	Arg ₆₃₃ → His ₆₃₃	<0.25
		Iy ^a	GIIb	Gly ₁₅ → Gln ₁₅	0.4
		Sit ^a	GPIa	Thre ₇₉₉ → Met ₇₉₉	0.25

Púrpura aloinmune neonatal

El PAIN es una incompatibilidad feto-materna causada por aloinmunización de la madre a antígenos plaquetarios fetales. Su incidencia es de 1:2.000 a 1:3.000 embarazos y a diferencia de la enfermedad hemolítica del recién nacido, puede ocurrir hasta en un 30% de los casos durante el primer embarazo. El PAIN se presenta típicamente como una trombocitopenia aislada en un recién nacido (RN) aparentemente sano. En aquellos RN con trombocitopenia más grave se puede encontrar sangrado cutáneo (petequias y equimosis) y sangrado mucoso que se manifiesta en las primeras horas de vida. En la mayoría de los casos, el PAIN es una enfermedad benigna autolimitada, que remite espontáneamente entre 2 y 15 días; sin embargo, en casos graves puede observarse hemorragia visceral e intracranéana. Esta última complicación se puede presentar en forma antenatal o perinatal en un 10 a 20% de los pacientes con PAIN, lo que puede provocar secuelas neurológicas e incluso la muerte.

Patogenia. El PAIN es causado por la transferencia placentaria de aloanticuerpos

desde la madre al feto debido a sensibilización a antígenos plaquetarios fetales durante el embarazo. Sobre el 50% de los casos de PAIN en poblaciones caucásicas resulta de una incompatibilidad dentro del sistema HPA-1 (PI^A); la incompatibilidad que compromete el sistema HPA-5 (Br) es la segunda causa más frecuente en dichas poblaciones. Se ha descrito casos de PAIN por incompatibilidad materno fetal contra cualquiera de los otros aloantígenos plaquetarios descritos.

Estudio de laboratorio. Utilizando técnicas serológicas modernas (ver capítulo 31), es posible demostrar en el suero materno anticuerpos que reaccionan con las plaquetas paternas en prácticamente todos los casos de PAIN. La tipificación antigénica de las plaquetas maternas y paternas es también útil en el estudio del PAIN, especialmente en aquellos casos en que no se encuentra anticuerpos en el suero de la madre.

Tratamiento. En la mayoría de los casos, el PAIN es clínicamente leve y no se necesita un tratamiento específico. La recuperación del recuento de plaquetas ocurre en 1 a 2 semanas,

aunque excepcionalmente ésta puede durar meses. La transfusión de plaquetas es el tratamiento de elección en los casos graves sintomáticos. Se debe transfundir idealmente plaquetas compatibles con el aloanticuerpo materno; en este caso la mejor alternativa es utilizar plaquetas de la madre, lavadas para eliminar el plasma que contiene el anticuerpo e irradiadas para evitar la enfermedad injerto versus huésped transfusional. El uso de IgGIV en dosis de 400µg/kg/día por 5 días produce un acortamiento del período de trombocitopenia, aunque su efecto no se observa antes de las 24 horas.

En los embarazos siguientes, si el padre es homocigoto para el antígeno se asume que el feto será afectado; si es heterocigoto la presencia del antígeno en las plaquetas fetales se puede determinar mediante técnicas de biología molecular utilizando amniocitos. En las mujeres en riesgo se puede conocer el recuento de plaquetas fetales mediante punción percutánea del cordón umbilical, tan precozmente como a las 20 semanas de embarazo. Si se demuestra trombocitopenia, la alternativa de tratamiento más aceptada en este momento es el uso en la madre de IgGIV, en dosis de 1g/kg/semana, sola o asociada a prednisona.

Púrpura post-transfusional

El PPT se caracteriza por aparición de trombocitopenia aguda grave, aproximadamente 5-10 días después de una transfusión sanguínea. En el 90% de los casos se trata de mujeres multíparas que reciben su primera transfusión. Su incidencia se desconoce, aunque se han descrito no más de 200 casos. La transfusión que desencadena esta condición puede ser de cualquier hemocomponente y habitualmente se acompaña de una reacción transfusional febril. En el suero del paciente se encuentra siempre un potente aloanticuerpo antiplaquetario, en el 90% de los casos con especificidad anti-HPA-1a. La patogenia de esta condición es desconocida pero se ha propuesto tres teorías para explicar la destrucción de las plaquetas: (a) adsorción de antígeno “soluble” presente en el producto sanguíneo a las plaquetas del receptor; (b) unión de complejo inmune compuesto por aloantígeno/aloanticuerpo, y (c) producción de autoanticuerpos producidos en paralelo con la respuesta aloinmune. El diagnóstico se basa en la demostración del aloanticuerpo antiplaquetario en pacientes con cuadro clínico compatible. La evolución del PPT

es hacia la remisión espontánea en el curso de 1 a 6 semanas, excepto en aquellos casos en que la trombocitopenia causa algún episodio de hemorragia fatal. En pacientes con trombocitopenia grave y hemorragias con riesgo vital el uso de plasmaféresis se acompaña de rápida recuperación del recuento de plaquetas y regresión de la sintomatología. También se ha obtenido buenos resultados con el uso de IgGIV 0.4g/kg/día por 5 días. La transfusión de plaquetas es habitualmente de muy limitada efectividad.

b) Trombocitopenias no inmunes

b1) Púrpura trombótico trombocitopénico/síndrome hemolítico urémico

El púrpura trombótico trombocitopénico (PTT) y síndrome hemolítico urémico (SHU) son dos enfermedades multisistémicas que se caracterizan por la existencia de trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, alteraciones neurológicas, insuficiencia renal y fiebre, secundarias a trombosis de la microvasculatura arterial. Clínicamente, la diferenciación entre estos dos síndromes se sustenta en el mayor compromiso neurológico en el PTT y predominio de la disfunción renal en el SHU; sin embargo, la superposición entre los dos cuadros es amplia y su diferenciación es muchas veces arbitraria.

El PTT es una enfermedad de comienzo brusco con una pentada clásica que comprende trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, fiebre, compromiso neurológico e insuficiencia renal. Ya que es necesario iniciar precozmente el tratamiento, los criterios de diagnóstico se han reducido y actualmente se presume la existencia de un PTT frente a cualquier anemia hemolítica microangiopática asociada a trombocitopenia, no explicada por otras causas.

El SHU es clásicamente una enfermedad renal caracterizada por una microangiopatía renal trombótica, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. La *Escherichia coli* O157:H7 es un agente etiológico importante en el SHU en niños y ocasionalmente en los adultos. Los niños que presentan un SHU asociado a diarrea epidémica generalmente no requieren de plasmaféresis y evolucionan hacia la recuperación espontánea. Otras condiciones asociadas a PTT/SHU se muestran en la tabla 21-6.

Tabla 21.6. Asociaciones clínicas y etiología en púrpura trombótica trombocitopénica y síndrome hemolítico urémico

Idiopática
Familiar
Inducida por drogas
Quinidina, ticlopidina, clopidogrel, mitomicina C, cisplatino, gemcitabina,
Embarazo y puerperio
Diarrea infecciosa
Infección por E coli 0157:H7
Trasplante de médula ósea
Enfermedades malignas y autoinmunes

Patogenia. El daño endotelial sistémico es un elemento común en la patogenia del PTT y SHU. El daño endotelial se acompaña de liberación de multímeros del factor von Willebrand (FVW) de tamaño inusualmente grande. La presencia de estos multímeros ha sido descrita en el plasma de pacientes que presentaban PTT recurrente, durante la etapa de remisión clínica. Una proteasa plasmática que escinde el FVW es la responsable de disminuir el tamaño de los multímeros en el plasma normal. Deficiencia de esta proteasa se ha encontrado tanto en pacientes que exhiben la forma recurrente familiar como esporádica de la enfermedad. En estos últimos la deficiencia de la proteasa está asociada a la presencia de autoanticuerpos específicos. De esta forma, la evidencia disponible sugiere que la deficiencia constitucional o adquirida de la proteasa que escinde al FVW, juega un papel fundamental en la patogenia del PTT. Es necesario señalar que se ha descrito deficiencia de esta proteasa en otras condiciones clínicas diferentes de PTT/SHU tales como uremia, insuficiencia hepática, LES y post-operatorio, aunque excepcionalmente llega a valores menores al 10% de actividad de la enzima.

Diagnóstico. Los criterios primarios sobre los que se basa el diagnóstico de esta condición son la anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. La importancia diagnóstica de la presencia de glóbulos rojos fragmentados (esquistocitos) en la sangre periférica, obliga a una revisión cuidadosa del frotis de sangre en todos los casos sospechosos. El aumento de dehidrogenasa láctica (LDH) suele ser importante reflejando tanto la hemólisis como el daño tisular. A pesar de la extensa agregación de las plaquetas en la microvasculatura, no se evidencia consumo de factores de coagulación ni generación de trombina; pruebas tales como tiempo de protrombina, tiempo de

tromboplastina parcial activado, concentración de fibrinógeno y niveles de dímero D son habitualmente normales. La medición de la actividad de la proteasa que escinde al FVW es muy compleja desde el punto de vista técnico y generalmente disponible sólo en laboratorios especializados. Técnicas de desarrollo reciente, que utilizan la capacidad del FVW de unirse al colágeno en directa relación a la presencia de multímeros de alto peso molecular, han facilitado el diagnóstico clínico. Sin embargo, será necesario determinar su especificidad y sensibilidad en gran número de pacientes, para definir su real utilidad en el diagnóstico y manejo del PTT/SHU.

Tratamiento. La plasmaféresis es el elemento más importante en el tratamiento de PTT/SHU y no existe evidencia actual que otros tratamientos adicionales cambien la evolución de los pacientes. La plasmaféresis se debe realizar diariamente removiendo al menos un volumen plasmático, el que se reemplaza con plasma fresco congelado o sobrenadante de crioprecipitado. El beneficio teórico del uso de sobrenadante de crioprecipitado se basa en su menor contenido de FVW y que estudios retrospectivos sugieren un mayor beneficio. La duración del tratamiento depende de la respuesta, constituyendo el recuento de plaquetas uno de los parámetros más importantes a evaluar. La persistencia de la trombocitopenia o su profundización es indicación de intensificar la terapia, lo que habitualmente significa aumentar el volumen de recambio a 1.5 volúmenes y eventualmente la adición de glucocorticoides vía oral (prednisona 1 mg/kg/día) o parenteral (metilprednisonona 125 mg dos veces al día). Típicamente los pacientes que responden al tratamiento lo hacen dentro de la primera semana, sin embargo,

existen casos que requieren un tiempo mucho mayor. Una vez que se alcanza la remisión, la intensidad y frecuencia de la plasmaféresis se debe reducir gradualmente hasta suspenderla por completo.

b2) Trombocitopenia del embarazo

Estudios recientes han demostrado que durante un embarazo no complicado existe una disminución del recuento de plaquetas de alrededor de 10% con respecto a los valores basales, lo cual se hace más evidente durante el tercer trimestre. En aproximadamente un 8-10% de las embarazadas la caída del recuento de plaquetas es mayor, constituyendo una trombocitopenia moderada asintomática, que se ha denominado trombocitopenia incidental del embarazo. Este cuadro se caracteriza por una trombocitopenia leve o moderada, no complicada por hemorragia, que típicamente se detecta en el tercer trimestre o inmediatamente previo al parto. La condición, también conocida como trombocitopenia asociada a embarazo o trombocitopenia gestacional, es responsable de alrededor de 75% de los casos de trombocitopenia que ocurren durante el embarazo. La trombocitopenia incidental del embarazo es un diagnóstico de exclusión en mujeres sanas con recuentos de plaquetas que raramente son inferiores a 70.000/ μ l; de hecho, el 90% de los casos presentan más de 100.000 plaquetas/ μ l. La causa de esta trombocitopenia es desconocida, pero se ha sugerido que podría corresponder a una exacerbación de un proceso fisiológico de remoción de plaquetas durante el embarazo. El tratamiento de esta condición debe ser conservador ya que no existe riesgo de sangrado en las madres y no se ha descrito casos de trombocitopenia fetal o del recién nacido.

b3) Preeclampsia/eclampsia

La trombocitopenia ocurre en tasas de 15-20% en casos de preeclampsia y sobre 40% en pacientes con eclampsia. En la gran mayoría de los casos ésta es leve o moderada, aunque existen casos que presentan trombocitopenia grave. Un subgrupo de pacientes puede presentar hemólisis microangiopática, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia (síndrome de HELLP), cuadro que representa una forma grave de preeclampsia, con mortalidad materna que varía entre 1-3% de los casos.

La patogenia de la trombocitopenia en la

preeclampsia es motivo de controversia, aunque se ha sugerido como principal mecanismo el aumento en la destrucción de las plaquetas. En algunos pacientes se demuestra aumento en la generación de trombina, lo que podría contribuir a la trombocitopenia por activación y consumo. El tratamiento primario de la preeclampsia y síndrome HELLP es la inducción del parto, lo cual mejora la trombocitopenia en el curso de los días siguientes.

b4) Trombocitopenia asociada a infección

La trombocitopenia se puede presentar como una complicación de infecciones bacterianas, virales, por hongos o protozoos. En la mayoría de los casos de trombocitopenia asociada a infección se encuentra acortamiento de la supervivencia de las plaquetas e hiperplasia megacariocítica. En un subgrupo de pacientes con infecciones graves, la coagulación intravascular diseminada (CID) con generación de trombina y consumo de plaquetas, puede ser el mecanismo predominante de la trombocitopenia. El aumento de PAIgG en una proporción de los pacientes con septicemia ha llevado a sugerir una naturaleza inmune en estos casos. En pacientes con infección por VIH/SIDA, la trombocitopenia resulta de una combinación de destrucción inmunológica y compromiso de la médula ósea (ver punto 2.2.2, a2). Otros mecanismos involucrados en la trombocitopenia de las infecciones comprenden activación de las plaquetas inducida por mediadores de la inflamación o productos bacterianos, daño endotelial, vasculitis difusa y supresión medular como ocurre en infecciones virales. El reconocimiento precoz y tratamiento adecuado de la infección son las medidas más importantes en el manejo de la trombocitopenia asociada a infección. La recuperación del recuento de plaquetas es habitualmente paralelo a la resolución del cuadro infeccioso. Las transfusiones de plaquetas no son necesarias a menos que el recuento de plaquetas sea menor de 20.000/ μ l o existan condiciones asociadas que puedan determinar un sangrado grave.

b5) Trombocitopenia asociada a exposición a superficies no biológicas

La introducción de superficies extrañas en la circulación se asocia a consumo selectivo de plaquetas. En el caso de cirugía con circulación extracorpórea (CEC), existe un amplio espectro de alteraciones hemostáticas, entre las cuales destaca la trombocitopenia y la disfunción

plaquetaria transitoria (ver punto 3). En la CEC, el recuento de plaquetas habitualmente disminuye en un 30-50% debido fundamentalmente a hemodilución, secuestro, destrucción en el oxigenador y aumento de la fibrinólisis. El tiempo de sangría (TS) se encuentra con frecuencia desproporcionadamente largo en relación al recuento de plaquetas. La hemorragia en estos pacientes se controla adecuadamente con la transfusión de plaquetas. Aun cuando en pacientes portadores de válvulas cardíacas protésicas existe un acortamiento de la supervivencia de las plaquetas, la trombocitopenia es muy infrecuente y cuando ésta ocurre, es leve. La inserción de catéteres, especialmente en pacientes pediátricos se ha asociado infrecuentemente a trombocitopenia por aumento del consumo de plaquetas.

2.2.3. Trombocitopenia por secuestro esplénico

La esplenomegalia de cualquier etiología se puede acompañar de trombocitopenia de grado variable, aunque la hemorragia espontánea en esta situación es una complicación extraordinariamente infrecuente. Los megacariocitos en la médula ósea se encuentran habitualmente normales o levemente aumentados en número. Es frecuente la asociación con neutropenia y anemia leve. En sujetos normales alrededor del 30% de la masa de plaquetas se encuentra en el bazo; en pacientes con esplenomegalia el secuestro esplénico puede ser mayor al 80% de las plaquetas, lo que determina una disminución del número de plaquetas circulantes. La esplenectomía estaría indicada sólo en aquellos casos en que la magnitud del secuestro se traduzca en citopenias sintomáticas (ej. hemorragias o infecciones).

2.2.4. Trombocitopenia dilucional

En pacientes que reciben transfusión masiva de sangre se observa frecuentemente trombocitopenia como resultado del efecto directo de la hemodilución; la disminución del recuento de plaquetas en estos casos muy rara vez alcanza niveles por debajo de las 50.000

plaquetas/ μ l. Por otra parte, durante la transfusión masiva de sangre se ha descrito también la existencia de disfunción plaquetaria y alteraciones de la hemostasia secundaria, propios de la terapia de reemplazo. La trombocitopenia puede además agravarse por aumento del consumo de plaquetas si el paciente desarrolla una CID. La transfusión de plaquetas estaría indicada sólo si la trombocitopenia está contribuyendo en forma significativa al defecto hemostático.

3. TROMBOCITOPATÍAS

3.1. Trombocitopatías hereditarias

Las plaquetas desempeñan un papel principal en la hemostasia, y también en la trombosis (ver capítulo 19). Se adhieren fácilmente al subendotelio expuesto en las zonas de lesión, se activan, induciéndose los procesos de agregación y secreción. Las plaquetas adheridas/agregadas favorecen la activación local de la coagulación, desencadenando la formación de un trombo de células sanguíneas y fibrina que sella el vaso de forma estable. En condiciones patológicas, un exceso de adhesividad y reactividad plaquetaria puede favorecer el desarrollo de trombosis.

La relevancia fisiológica de la función plaquetaria se manifiesta en que tanto la reducción significativa del número de plaquetas circulantes como las alteraciones que afectan su función pueden traducirse en hemorragias, las cuales pueden ser de gran severidad y comprometer la vida de los individuos afectados.

Se revisará sucintamente las disfunciones plaquetarias, sus bases moleculares y los aspectos clínicos de las alteraciones cualitativas hereditarias de las plaquetas más frecuentes. Aunque cualquier alteración de las plaquetas puede comprometer la globalidad de su función, por razones expositivas éstas han sido ordenadas según la función principalmente afectada por el defecto hereditario: defectos de adhesión, defectos de agregación, defectos de secreción, defectos de transmisión de señales de activación, defectos de la actividad procoagulante, y otros defectos (tabla 21-7).

Tabla 21-7. Clasificación de las Trombocitopatías congénitas

<p>Alteraciones en la capacidad de adhesión</p> <ul style="list-style-type: none">• Síndrome de Bernard-Soulier (SBS): Defecto en GPIb-IX-V• Enfermedad de pseudo von Willebrand : Defecto en GPIb-IX-V• Deficiencia en la interacción con colágeno: Defecto en GPIa-IIa o GPVI
<p>Defectos de la agregación plaquetaria</p> <ul style="list-style-type: none">• Tromboastenia de Glanzmann: Defecto en GPIIb-IIIa
<p>Deficiencias de los gránulos plaquetarios y/o secreción</p> <ul style="list-style-type: none">• Deficiencia de los gránulos (“pool” de almacenamiento):<ul style="list-style-type: none">• α: Síndrome de plaqueta gris• δ• α y δ• Síndrome de Quebec
<p>Alteraciones en la transmisión de señales de activación</p> <ul style="list-style-type: none">• Deficiencias de receptores de agonistas• Defectos en proteínas G• Defectos en enzimas efectoras (fosfolipasas, nucleótido ciclasas)• Defectos de la movilización de segundos mensajeros (IP₃, calcio, etc.)• Defectos específicos en la vía metabólica del ácido araquidónico
<p>Defectos de la actividad procoagulante de las plaquetas</p> <ul style="list-style-type: none">• Síndrome de Scott; Síndrome de Stormorken; SBS
<p>Otros defectos</p> <ul style="list-style-type: none">• Síndrome de Wiskott-Aldrich• Síndrome de Down, macrotrombocitopenias constitucionales

3.1.1. Defectos hereditarios de la adhesión plaquetaria

En situaciones fisiológicas las plaquetas circulan libremente en la sangre sin adherirse a las células endoteliales, pero en respuesta al daño vascular, las plaquetas se adhieren a elementos de la matriz subendotelial expuesta. Esta adhesión plaquetaria, primer eslabón en la cadena de la respuesta hemostática, depende principalmente de la interacción del receptor plaquetario Ib-IX-V con el factor von Willebrand (FVW) del subendotelio, y a ella contribuye también la adhesión al colágeno mediada por el complejo glicoproteico Ia-IIa y/o otros receptores del colágeno. Defectos en alguno de estos receptores, principalmente del complejo Ib-IX-V, se traducen en alteración de la adhesión plaquetaria.

a) Patología del complejo glicoproteico Ib-IX-V: Síndrome de Bernard-Soulier y pseudo-von Willebrand.

El receptor Ib-IX-V es un macrocomplejo

formado por las GPs Ib α (143 kDa), Ib β (22 kDa), IX (20 kDa), y V (83 kDa), asociadas en relación estequiométrica 2 Ib α : 2 Ib β : 2 IX: 1 V. Estas GPs pertenecen a la familia de proteínas con dominios ricos en leucina, y son fruto de la expresión de genes localizados en los cromosomas 17p12 (GPIb α), 22q11.2 (GPIb β), 3q29 (GPV), y 3q21 (GPV). La expresión del receptor en la membrana plaquetaria, de unas 25.000 copias por plaqueta, está sujeta a un estricto control fisiológico. Así, la expresión de Ib α , Ib β , y IX es conjunta, mientras que la GPV puede expresarse individualmente pero en menor proporción que cuando están presentes el resto de las cadenas. Una descripción detallada de las características estructurales y funcionales de este complejo está fuera del objetivo de este capítulo.

El complejo Ib-IX-V cumple dos funciones esenciales para la adecuada participación de las plaquetas en la hemostasia. La primera es facilitar la adhesión inicial de las plaquetas a las zonas de lesión vascular actuando como el receptor principal del FVW unido al colágeno

expuesto en el subendotelio. La segunda es actuar como receptor de alta afinidad para la trombina, potente agonista plaquetario, facilitando la activación local de las plaquetas ante bajas concentraciones de este agonista. La importancia de estas funciones se refleja claramente en los dos tipos de trastornos hemorrágicos asociados a deficiencias hereditarias de este complejo, el síndrome de Bernard-Soulier (SBS), y la enfermedad de pseudo-von Willebrand.

a1) Síndrome de Bernard-Soulier (SBS)

Este síndrome, identificado por primera vez por Bernard y Soulier en 1948, es una diátesis hemorrágica congénita caracterizada por la presencia de trombocitopenia, macroplaquetas, tiempo de sangría prolongado, y retracción del coágulo normal.

Patogenia. La mayor alteración funcional de las plaquetas SBS es su nula o escasa capacidad de adhesión al subendotelio vascular, por la ausencia o disfunción del complejo Ib-IX-V. La deficiencia de este receptor condiciona otras características fenotípicas de las plaquetas SBS: su incapacidad para aglutinar normalmente en presencia de FVV normal e inductores como la ristocetina o la botrocetina, y una reactividad disminuida frente a bajas dosis de trombina, que es indicativa del papel que juega el complejo Ib-IX-V como receptor plaquetario para este agonista. Por otra parte, la actividad coagulante de las plaquetas SBS puede ser normal, pero también puede encontrarse aumentada o disminuida. Las alteraciones de la capacidad procoagulante pueden estar relacionadas con el hallazgo de una organización anormal de los fosfolípidos de la membrana de las plaquetas SBS.

La transmisión genética del SBS es habitualmente autosómica recesiva, y con frecuencia existe consanguinidad entre los individuos afectados. Considerando el número de casos identificados en distintos países del mundo, se estima que la prevalencia del SBS es aproximadamente de 1 caso por cada millón de personas. Generalmente, sólo los sujetos homocigotos manifiestan signos de la enfermedad, mientras que los heterocigotos son asintomáticos.

Desde el punto de vista molecular, el SBS es una patología muy heterogénea, que puede ser causada por distintas deleciones, inserciones, y mutaciones puntuales en los genes que

codifican las proteínas que integran el complejo. Hasta la fecha, todas las alteraciones moleculares en pacientes con SBS han sido localizadas en los genes de las GPIb α , Ib β , y IX, y ninguna en la GPV. Curiosamente, casi la mitad de estas alteraciones genéticas afectan a las regiones ricas en leucina o las secuencias que las flanquean, enfatizando la importancia de estas regiones para la expresión y funcionalidad del receptor Ib-IX-V. La tabla 21-8 resume las principales alteraciones genéticas identificadas hasta ahora en sujetos con SBS. Existen bases de datos accesibles por Internet donde obtener información actualizada sobre las alteraciones moleculares en el SBS (<http://www.bernard-soulier.org/>). Es importante resaltar que la identificación de estas alteraciones moleculares, y su reproducción en modelos celulares experimentales contribuye enormemente a comprender mejor la fisiopatología del SBS, los mecanismos que regulan la biosíntesis y expresión del complejo Ib-IX-V, y la interrelación entre la estructura del complejo y su función.

Clínica. La sintomatología característica del SBS se centra en episodios de hemorragia, fundamentalmente de localización cutáneo-mucosa, que se presentan desde la infancia. Los más comunes son epistaxis (70%), equimosis espontáneas (58%), metrorragias (44%), gingivorragias (42%), y sangrados gastrointestinales (22%). La intensidad de estos procesos de sangrado es variable, pudiendo aumentar o disminuir con la edad. El riesgo de sangrado frente a cirugía, extracciones dentarias, o traumáticos es muy alto.

Laboratorio. El diagnóstico de laboratorio del SBS se establece con un tiempo de sangría prolongado, trombocitopenia moderada a severa, y la presencia de macroplaquetas, algunas incluso del tamaño de los linfocitos. La clave del diagnóstico del SBS es la deficiente aglutinación plaquetaria inducida con agentes como el antibiótico ristocetina o el veneno botrocetina, proceso que requiere una adecuada interacción entre el FVV y el complejo GPIb-IX-V. Por el contrario, la agregación plaquetaria inducida por otros agentes (ADP, adrenalina o colágeno) es normal o mínimamente alterada. El análisis de la expresión de GPs de membrana (mediante ensayos de unión con anticuerpos específicos marcados radiactivamente, citometría de flujo, técnicas electroforéticas, u otros métodos) lleva a confirmar la disminución o ausencia de los elementos constituyentes del complejo Ib-IX-V.

Tabla 21-8. Alteraciones moleculares identificadas en pacientes con Síndrome de Bernard-Soulier o Enfermedad de pseudo-von Willebrand

	Genotipo	Mutación	Fenotipo	Alteración proteica
GPIbα	Homocigosis	103A \rightarrow del	Delección	Lys19 \rightarrow Arg codón 21 \rightarrow codón stop
	Heterocigosis Transm. dominante	259C \rightarrow T	Mutación puntual	Leu57 \rightarrow Phe GPIb α muy sensible a proteasas
	Doble heterocigosis	T283 \rightarrow C	Mutación puntual	Cys65 \rightarrow Arg Proteína que no liga FVW
	Homocigosis	T317 \rightarrow del	Delección	Leu76 \rightarrow Arg Codón 125 \rightarrow stop
	Homocigosis Doble heterocigosis	476T \rightarrow C	Mutación puntual	Leu129 \rightarrow Pro129 Unión deficiente de FVW
	Homocigosis Doble heterocigosis	C557 \rightarrow T	Mutación puntual	Ala156 \rightarrow Val Variante Bolzano, unión anormal de FVW, normal de trombina
	Doble heterocigosis	A595-A630 \rightarrow del	Delección múltiple	Glu181 \rightarrow Lys Proteína no funcional
	Homocigosis	C625-C627 \rightarrow del	Delección	Leu179 \rightarrow del Variante Nancy I, pérdida de función.
	Homocigosis	715T \rightarrow A	Mutación puntual	Cys209 \rightarrow Ser209 GPIb α no se une a GPIb β
	Doble heterocigosis	805A \rightarrow G	Mutación puntual	Met239 \rightarrow Val Mayor afinidad por FVW Enfermedad pseudo-von Willebrand
	Homocigosis	T972-G975 \rightarrow del	Delección	Thr294 \rightarrow stop
	Doble heterocigosis	G1119 \rightarrow A	Mutación sin sentido	Trp343 \rightarrow stop
	Doble heterocigosis	T1418 \rightarrow ins	Inserción	Cambio de fase, terminación prematura
	Homocigosis	C1421 \rightarrow A	Mutación sin sentido	Ser444 \rightarrow stop
	Homocigosis Doble heterocigosis	A1438 \rightarrow del	Delección	Cambio de fase, Terminación prematura
	Homocigosis Doble heterocigosis	A1565-T1566 \rightarrow del	Delección	Cambio de fase en Tyr492, terminación prematura, síntesis de porción citosólica de GPIb
	Homocigosis	G1584 \rightarrow A	Mutación sin sentido	Trp498 \rightarrow stop
GPIbβ	Doble heterocigosis	C133 \rightarrow G	Mutación puntual	Cambio del sitio de unión de GAA en el promotor
	Homocigosis	G159 \rightarrow A	Mutación puntual	Trp21 \rightarrow stop
	Doble heterocigosis	C336 \rightarrow del	Delección	Terminación prematura Delección de un alelo
	Doble heterocigosis	A360 \rightarrow G	Mutación puntual	Tyr88 \rightarrow Cys, GPIb β no asociada a GPIb α .
	Doble heterocigosis	G419 \rightarrow C	Mutación puntual	Ala108 \rightarrow Pro GPIb β no asociada a GPIb α
GPIX	Homocigosis	T37 \rightarrow G	Mutación puntual	Cys8 \rightarrow Arg
	Doble heterocigosis	A77 \rightarrow G	Mutación puntual	Asp21 \rightarrow Gly
	Homocigosis Heterocigosis	A143 \rightarrow G	Mutación puntual	Asn45 \rightarrow Ser
	Homocigosis	T179 \rightarrow C	Mutación puntual	Phe55 \rightarrow ser
	Homocigosis	G233 \rightarrow A	Mutación puntual	Cys73 \rightarrow Tyr
	Homocigosis	G305 \rightarrow A	Mutación puntual	Cys97 \rightarrow Tyr
	Homocigosis	G393 \rightarrow A	Mutación sin sentido	Trp126 \rightarrow stop

Pruebas complementarias para el diagnóstico de laboratorio del SBS son una menor interacción *ex vivo* de las plaquetas con superficies recubiertas de FVW, o la ausencia de agregación plaquetaria ante la exposición a altas velocidades de turbulencia (alto “shear rate”).

Tratamiento. La terapéutica de los pacientes SBS se fundamenta en primer lugar en medidas educativas de conducta, a fin de evitar situaciones de riesgo traumático. Así, la higiene dental y la vigilancia odontológica para evitar intervenciones dentales, son recomendaciones primarias. La anemia, generalmente leve a moderada, puede tratarse con aporte farmacológico de hierro. El uso de fármacos antifibrinolíticos o de desmopresina (DDAVP) puede ser útil en algunos individuos SBS, pero no hay certeza de su eficacia generalizada en todos los pacientes. Recientemente también se ha sugerido la utilidad potencial de la infusión de factor VIIa para detener el sangrado nasal en enfermos SBS, aunque este tratamiento es aún experimental. La transfusión de concentrados plaquetarios es hoy día la terapia estándar para prevenir o tratar las hemorragias, a pesar del riesgo implícito de isoimmunización y transmisión de enfermedades. Por último, en mujeres se ha sugerido que los anticonceptivos orales pueden ser beneficiosos para el control de las menorragias.

a2) Síndrome de pseudo-von Willebrand

La enfermedad de pseudo-von Willebrand, o enfermedad de von Willebrand plaquetaria, tiene una gran similitud fenotípica con la enfermedad de von Willebrand tipo IIB, pero su diferencia radica en que la causa del pseudo-von Willebrand no es un defecto hereditario en la síntesis y/o función del FVW, sino en la expresión en la superficie de las plaquetas de un complejo Ib-IX-V con una extraordinaria capacidad de unión al FVW plasmático. Se manifiesta por una hiperagregabilidad plaquetaria a dosis bajas de ristocetina o botrocetina, (también presente en la enfermedad de von Willebrand tipo IIB). Esta hiperreactividad conduce a la agregación plaquetaria espontánea y aclaramiento de las plaquetas y del FVW del plasma. Consecuencia de ello, es una trombocitopenia habitualmente leve, un tiempo de sangría moderadamente prolongado, y niveles disminuidos de FVW con una desproporcionada reducción de las formas de alto peso molecular. Asimismo, las plaquetas de pacientes con pseudo-von Willebrand

muestran una pobre capacidad de adhesión a superficies subendoteliales bajo condiciones de circulación a alta velocidad de turbulencia.

Recientemente, se han identificado dos mutaciones puntuales en varias familias afectadas de pseudo-von Willebrand. Estas mutaciones se localizan en el dominio funcional aminoterminal del gen que codifica la GPIIb α . Son los cambios Gly/Val en el aminoácido 233, y Met/Val en residuo 239. El hecho de que estos residuos se localizan en el bucle de la Ib α que separa la región de dominios ricos en leucina de la secuencia de tirosinas sulfatadas implicada en la unión del FVW, hace pensar que tales residuos son cruciales para la adecuada orientación espacial del dominio funcional de la GPIIb α . De hecho, estudios de modelado molecular sugieren que la sustitución Met239Val produce un cambio conformacional relevante en la GPIIb α .

Los pacientes con pseudo-von Willebrand manifiestan sangrado mucocutáneo leve a moderado. Su manejo terapéutico en lo referente a las medidas educativas genéricas es similar al usado en pacientes con SBS. En función de la intensidad hemorrágica, y de la severidad de la trombocitopenia, se ha de considerar como opción la transfusión de plaquetas. En la prevención y resolución de eventos hemorrágicos, se ha de tener presente que el uso de agentes que aumenten la concentración plasmática de FVW (por ejemplo con concentrados comerciales de FVIII/FVW, o la administración de desmopresina) tiene el riesgo potencial de agravar la trombocitopenia, por la mayor velocidad de aclaramiento de las plaquetas con FVW unido. En algunos pacientes se ha usado con éxito la infusión de dosis bajas de crioprecipitado, sin causar trombocitopenia.

b) Patología de los receptores plaquetarios del colágeno: complejo glicoproteico Ia-IIa, GPVI, GPIV.

El colágeno subendotelial también es importante en el proceso de adhesión plaquetaria, especialmente en sitios con flujos sanguíneos de baja velocidad de turbulencia (“low shear rate”). El colágeno no sólo favorece la adhesión inicial de las plaquetas a esta estructura, sino también es un importante agonista que potencia y contribuye a la subsiguiente activación y agregación de las plaquetas, favoreciendo la formación del trombo hemostático. En la actualidad, las glicoproteínas plaquetarias reconocidas como

los principales receptores del colágeno del subendotelio son el complejo GPIa-IIa, y la GPVI. No obstante, se ha sugerido que otras proteínas como el complejo GPIb-IX-V o la GPIV puedan participar, directa o indirectamente, en esta función.

b1) Patología del complejo GPIa-IIA

El receptor GPIa-IIa es un heterodímero formado por la asociación no covalente de las integrinas adhesivas Ia ($\alpha 2$) y IIa ($\beta 1$). Este complejo se corresponde con el heterodímero VLA-2 de los linfocitos. Los genes que codifican estas GPs han sido secuenciados y, como los de otros receptores plaquetarios (Ib-IX-V o GPIIb-IIIa), son genes altamente polimórficos. La deficiencia de GPIa-IIa se asocia a hemorragias mucocutáneas de moderada intensidad. Un polimorfismo silente 807C/T en el gen de la GPIa, ligado al sistema antigénico HPA 5a/b, parece determinar por un mecanismo no aclarado el grado de expresión del complejo Ia-IIa en la superficie plaquetaria. Varios estudios han analizado el papel de este polimorfismo en la incidencia de enfermedad cardiovascular obteniendo resultados no concluyentes. También se ha descrito la aparente influencia del polimorfismo en la susceptibilidad al sangrado de pacientes con bajos niveles de FVW plasmático o plaquetario, y en la variable adhesión plaquetaria al colágeno que muestran individuos sanos.

Como otras integrinas, el complejo GPIa-IIa parece experimentar una transformación conformacional para aumentar la interacción con su ligando. Así en recientes estudios usando fragmentos solubles de colágeno se ha mostrado que la unión de colágeno a GPIa-IIa aumenta tras la activación de las plaquetas por distintos agonistas. El mecanismo subyacente al cambio conformacional que sufre la GPIa-IIa tras la activación de las plaquetas es aún oscuro, pero parece implicar a otros receptores como GPVI, el otro receptor del colágeno, o los receptores de ADP. Asimismo, parece que los dominios intracitoplasmáticos ricos en cisteína de la cadena IIa tienen un papel principal en la activación conformacional de este receptor de colágeno.

Se han descrito dos casos de trastornos hemorrágicos asociados a deficiencia de GPIa-IIa en mujeres en las que curiosamente se observó la recuperación de la reactividad plaquetaria al colágeno al alcanzar la menopausia, lo que sugiere cierta dependencia

hormonal de la expresión de este receptor. El hecho de que se haya demostrado una amplia variabilidad de expresión de GPIa-IIa en sujetos normales en asociación con el polimorfismo silente 807 C/T, cuestiona si los casos descritos como deficiencias congénitas de este receptor lo son realmente o representan los extremos de menor expresión dentro de la normalidad.

b2) Patología de la GPVI

La GPVI es la otra glicoproteína con una función claramente demostrada de receptor plaquetario para el colágeno. GPVI es una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuya estructura recuerda a la de la GPIIb α al poseer los dominios globulares de unión al ligando el extremo amino terminal, bien separados de la superficie plaquetaria por un fragmento mucínico muy glicosilado y rico en serina y treonina que asemeja al macroglicopéptido de GPIIb α . La GPVI se asocia en su porción transmembrana con la cadena gamma del receptor Fc, formando un complejo funcional que permite la transmisión de señales de activación por colágeno de forma bidireccional. En esa transmisión de señales juega también un papel relevante la interacción de la porción citosólica de GPVI con las fosforilasas de la familia src como Fyn y Lyn. Este mecanismo de transmisión vía GPVI/Fc γ se asemeja al usado por los receptores inmunes, particularmente los receptores de células T. Se han identificado ciertos agonistas como CRP ("collagen related peptide") o la toxina convulxina, que parecen transmitir señales de activación de forma específica a través de GPVI. La estructura genómica de GPVI consta de ocho exones que codifican una proteína de 339 aminoácidos, 62 kDa tras la glicosilación, restringida a los megacariocitos y las plaquetas.

Además de los dos receptores mencionados arriba, distintas evidencias sugieren que otras proteínas pueden también tener algún papel en la interacción de las plaquetas con el colágeno. Tal es el caso del complejo GPIb-IX-V que, sobre todo bajo condiciones de flujo de alta velocidad de turbulencia, parece mediar en la unión de las plaquetas a las fibras de colágeno usando al FVW como proteína puente. Así se ha visto que ciertos anticuerpos contra GPIIb α inhiben la activación por colágeno. Asimismo, recientes estudios sugieren que la GPV tendría un papel importante en este proceso, ya que las plaquetas de ratones deficientes en GPV muestran una reactividad disminuida a

colágeno.

En la población japonesa se ha identificado los únicos casos de pacientes con trastornos hemorrágicos moderados con afectación del receptor GPVI. Uno de ellos se describe como un trastorno hemorrágico adquirido debido a la presencia de autoanticuerpos contra esta proteína. En los otros tres casos, la deficiente adhesión y agregación plaquetaria a colágeno parece causada por la ausencia congénita, menos del 10%, de GPVI en las plaquetas. Hasta la fecha no se han identificado las alteraciones moleculares subyacentes en los casos descritos de deficiencias de la GPVI.

b3) Patología de la GPIV. La GPIV, también llamada GPIII o CD36 (88 kDa), es una proteína plaquetaria implicada en la unión a la trombospondina y en la interacción de las plaquetas con los monocitos. Existe controversia acerca de si esta proteína actúa también como receptor de colágeno. Los primeros estudios *in vitro* sugirieron su participación en la adhesión de las plaquetas a superficies recubiertas de colágeno, y en la transmisión de señales de activación por este agonista. Sin embargo, la prevalencia de individuos con niveles bajos de CD36 es alta, aproximadamente el 3% en las poblaciones japonesa y africana, y un 0.3% de los caucásicos, y estos sujetos agregan normalmente a colágeno y no manifiestan episodios de sangrado.

Por último, se ha sugerido la participación en la interacción colágeno-plaqueta de otras proteínas como CD31, y la potencial existencia de receptores específicos para los subtipos de colágenos I y III.

Globalmente, la información actualmente disponible pone de manifiesto que distintas proteínas actúan sinérgicamente en la interacción plaqueta-colágeno. Las principales son GPIa-IIa y GPVI que funcionan coordinadamente bajo un modelo de “dos etapas-dos sitios”. Según este modelo, las plaquetas se adhieren inicialmente al colágeno a través de GPIa-IIa, y/o indirectamente a través de FVW-GPIb-IX-V. Esta interacción ocasiona la transmisión de señales de activación que provoca un cambio conformacional del complejo GPIa-IIa para alcanzar su estado de alta afinidad por el colágeno, y un enlentecimiento de la plaqueta que se desplaza sobre el subendotelio expuesto. La GPVI, receptor de menor afinidad para el colágeno, no sólo consolida la unión al colágeno, sino que

también transmite señales de activación que propician la activación plaquetaria generalizada, la secreción y la agregación.

La importancia fisiológica y la trascendencia clínica de los receptores de colágeno han sido puestas de manifiesto no sólo por los avances derivados de estudios *in vitro*, sino también por la identificación de unos pocos pacientes con trastornos hemorrágicos asociados con niveles reducidos de estos receptores, o con la existencia de anticuerpos contra ellos. El primer caso se identificó en la década de los ochenta, y hasta la fecha solo se han descrito no más de 10 sujetos con aparente alteración de los receptores de colágeno, GPIa-IIa o GPVI. Esto representa una incidencia muy baja en comparación con la de otras deficiencias de receptores adhesivos plaquetarios como GPIb-IX-V (SBS) o GPIIb-IIIa (Tromboastenia de Glanzmann). Muy probablemente, la redundancia de receptores para el colágeno es la razón subyacente tanto a la escasez de pacientes identificados con deficiencia específica de la adhesividad y reactividad plaquetaria al colágeno, como del hecho de que los pacientes descritos con déficit singular de la-IIa o de CD36 muestren un fenotipo de sangrado moderado o nulo, que no requiere en general tratamiento alguno.

La escasez de pacientes con patología en estos receptores del colágeno, GPs la-IIa o VI, los que además presentan un fenotipo de sangrado muy moderado, no debe interpretarse como una evidencia de una participación poco relevante en la función hemostática de las plaquetas, al igual que la ausencia de sangrado espontáneo tras tratamiento con aspirina o clopidogrel no es argumento contra el establecido potencial antitrombótico de estos fármacos. Sin duda, el desarrollo de modelos animales con deficiencias combinadas de los distintos receptores de colágeno ayudará a clarificar su función. Asimismo, nuevos estudios clínico epidemiológicos permitirán clarificar su papel como factor de riesgo trombótico o hemorrágico, al menos bajo determinadas condiciones fenotípicas, y su posible valor como blanco de nuevos fármacos antitrombóticos.

3.1.2. Defectos hereditarios de la agregación plaquetaria: Tromboastenia de Glanzmann

Para una hemostasia eficaz, las plaquetas inicialmente adheridas a la zona de la lesión tienen que activarse y unirse a las plaquetas vecinas formando agregados de creciente

tamaño hasta la formación, con la incorporación de una red de fibrina, del trombo estable que sella la fisura. Este proceso de agregación está mediado principalmente por la formación de puentes de fibrinógeno entre complejos IIb-IIIa de plaquetas vecinas.

El complejo IIb-IIIa es un heterodímero dependiente de la presencia de calcio formado por las integrinas IIb (136 kDa) y IIIa (110 kDa), asociadas de forma no covalente. Este receptor es el más abundante en las plaquetas, 50.000 copias en la superficie de las plaquetas no activadas y una cantidad similar en el interior (sistema canalicular y gránulos alfa). Los genes de GPIIb (17 Kb, 30 exones) y de GPIIIa (46 Kb, 15 exones) están localizados en la región q21-23 del cromosoma 17, y muy próximos entre sí lo que explica su expresión coordinada durante la megacariocitopoyesis.

El complejo IIb-IIIa actúa como el principal receptor plaquetario del fibrinógeno, aunque también es capaz de unirse a otras proteínas adhesivas como el FVW, la fibronectina, o la vitronectina. La unión a estos últimos ligandos se produce a nivel de una secuencia característica Arg-Gly-Asp (RGD). Estos sitios de unión RGD son crípticos en circunstancias normales, pero resultan expuestos durante el proceso de la activación plaquetaria. Actualmente se conoce muy bien que la unión de fibrinógeno al complejo IIb-IIIa inicia el tráfico de señales de activación primero desde fuera hacia dentro de la plaqueta, y luego desde dentro hacia fuera, procesos que favorecen y potencian la activación y la agregación con otras plaquetas. En ese proceso bidireccional de transmisión de señales participan numerosas proteínas especializadas. Las anomalías congénitas del complejo IIb-IIIa son responsables del trastorno hemorrágico identificado por Glanzmann en 1918, y conocido en su honor como Tromboastenia de Glanzmann (TG).

Patogenia. La patología molecular del complejo IIb-IIIa que da lugar a la TG ha sido caracterizada en más de 60 pacientes de distintos lugares de mundo, y puede consultarse de forma actualizada en una base de datos de acceso libre en internet (Glanzmann Thromboastenia Database WWW URL <http://med.mssm.edu/glanzmannndb>). Las tablas 21-9 y 21-10 resumen la patología molecular (delecciones, inserciones, inversiones, y mutaciones puntuales con y sin sentido) de los genes de las GP IIb y IIIa identificadas hasta ahora en pacientes con TG.

Conviene destacar que las alteraciones moleculares responsables de los distintos tipos de TG, son modelos idóneos para el estudio profundo de la biosíntesis del complejo IIb-IIIa, la dependencia estructural de su funcionalidad, y los mecanismos reguladores de la interacción plaqueta-plaqueta. Por otra parte, la identificación precisa de las alteraciones subyacentes en los pacientes con TG abre la puerta a la posibilidad en un futuro de tratamiento y curación de estos enfermos mediante una terapia génica adecuada.

La TG es una enfermedad heterogénea, a semejanza del SBS. Históricamente se han definido dos tipos de TG. El tipo I se caracteriza por la ausencia total (<5%) de GPIIb-IIIa en la membrana plaquetaria, la carencia de fibrinógeno acumulado en los gránulos plaquetarios, y la falta de retracción del coágulo. Por el contrario, en la TG tipo II las plaquetas tienen un 10-20% de GPIIb-IIIa residual, cierta cantidad de fibrinógeno granular (30-60% del contenido normal), y ocurre la retracción del coágulo aunque está disminuida. Esta clasificación de la TG es útil para describir a los pacientes tromboasténicos clásicos, y tratar de asociar su sintomatología con las alteraciones moleculares subyacentes, pero no implica la existencia de categorías distintas de la enfermedad. Además, en la última década se han identificado sujetos con fenotipo de TG, pero con un nivel de expresión de GPIIb-IIIa normal o casi normal. Éstas serían variantes de la TG, en las que la deficiencia de GPIIb-IIIa es cualitativa y no cuantitativa.

La TG se transmite, al igual que el SBS, de manera autosómica recesiva. Su prevalencia en la población general es 1-2 casos por millón de habitantes, pero es mucho más frecuente en comunidades con alto grado de consanguinidad. En general, la enfermedad se manifiesta con relevancia clínica exclusivamente en sujetos homocigotos, mientras que los sujetos heterocigotos son asintomáticos, incluso cuando tienen sólo el 50% de moléculas de complejo IIb-IIIa.

Laboratorio. Los principales hallazgos de laboratorio en los pacientes con TG son un tiempo de hemorragia prolongado, un recuento y morfología plaquetaria normales, ausencia o disminución de la retracción del coágulo, y ausencia de agregación en respuesta a múltiples agonistas plaquetarios (ADP, colágeno, ácido araquidónico y trombina). La aglutinación con ristocetina es normal en su primera fase, pero

Tabla 21-9. Pacientes con Tromboastemia de Glanzmann y mutaciones en GPIIb

Genotipo	Exon	Mutación	Fenotipo	Alteración proteica
Heterocigoto Doble	30	3077G→A	Mutación puntual	Arg1026Gln(Arg995Gln)
				Sin transcripción
Homocigoto	4	IVS3(-3)-418del	Delección en lectura	Ala(106)-Gln(111)del
Heterocigoto Doble	18	1787T→C	Mutación puntual	Ile596Thr(I565Thr)
	29	IVS29(+2)T→C	Delección en lectura	Val(951)-Lys(989)del
Heterocigoto Doble	4	480C→G	Delección en lectura	Ser(129)-Ser(161)del
	17	1750C→T	Mutación sin sentido	Arg584X(Arg553X)
Heterocigoto Doble	17	1750C→T	Mutación sin sentido	Arg584X(Arg553X)
			Desconocido	
Heterocigoto Doble	4	527C→T	Mutación puntual	Pro176Leu(Pro145Leu)
	16	IVS15(-1)del	Desconocido	
Heterocigoto Doble	14	1413C→G	Mutación sin sentido	Tyr471X(Tyr440X)
	29	3015insG	Inserción fuera de lectura	Cambio de fase de lectura
Homocigoto	12	1063G→A	Mutación puntual	Glu355Lys(Glu324Lys)
Homocigoto	8	818G→A	Mutación puntual	Gly273Asp(Gly242Asp)
Heterocigoto Doble	17	1750C→T	Mutación sin sentido	Arg584X(Arg553X)
			Desconocido	
Heterocigoto Doble	17	1750C→T	Mutación sin sentido	Arg584X(Arg553X)
			Desconocido	
Homocigoto	5	620C→T	Mutación puntual	Thr207Ile(Thr176Ile)
Homocigoto	15	IVS15(+1)G→A	Delección fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	20	IVS19(-2)A→G	Delección fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	25	2473-2478del/ins	Delección/Inserción, en lectura	Leu(786)-(795)del ins
Heterocigoto Doble	4	526C→G	Mutación puntual	Pro176Ala(Pro145Ala)
	28	2929C→T	Mutación sin sentido	Arg977X(Arg946X)
Heterocigoto Doble	11	959T→C	Mutación puntual	Phe320Ser(Phe289S)
			Desconocido	Sin transcripción
Heterocigoto Doble	12	1063G→A	Mutación puntual	Glu355Lys(Glu324Lys)
			Desconocido	Sin transcripción
Heterocigoto Doble	23	2333A→C	Mutación puntual	Gln778Pro(Gln747Pro)
			Desconocido	Sin transcripción
Heterocigoto Doble	23	2333A→C	Mutación puntual	Gln778Pro(Gln747Pro)
			Desconocido	Sin transcripción
Homocigoto	12	1073G→A	Mutación puntual	Arg358His(Arg327His)
Homocigoto	5	575-580ins	Inserción en lectura	Arg192Thr193 (Arg161Thr162)
Homocigoto	1	IVS1-9del4.5kb	Delección fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	13	1346G→A	Mutación puntual	Gly449Asp(Gly418Asp)
Homocigoto	6	641T→C	Mutación puntual	Leu214Pro(Leu183Pro)
Heterocigoto Doble	13	1366-1371del	Delección en lectura	Val(425)Asp(426)del
			Desconocido	
Heterocigoto Doble	29	IVS29(+2)T→C	Delección en lectura	Val(951)-Lys(989)del
	30	3094TGins	Inserción fuera de lectura	Cambio de fase de lectura
Heterocigoto Doble	17	1750C→T	Mutación sin sentido	Arg584X(Arg553X)
			Desconocido	
Heterocigoto Doble	18	IVS17(-1)G→A	Delección en lectura	Asp(585)-Gln(626)del
	23	2333A→C	Mutación puntual	Gln778Pro(Gln747Pro)
Homocigoto	23	2333A→C	Mutación puntual	Gln778Pro(Gln747Pro)
Homocigoto	4	526C→T	Mutación puntual	Pro176Ala(Pro145Ala)
Homocigoto	12	1073G→A	Mutación puntual	ARG358H(ARG327H)
Heterocigoto Doble	28	2941C→T	Mutación sin sentido	Gln(950X) Pro(917-950)del
			Desconocido	
Heterocigoto Doble	17	1750C→T	Mutación sin sentido	Arg584X(Arg553X)
	26	IVS25(-3)C→G	Delección en lectura	Val868-Val909del
Homocigoto	26	2609C→A	Mutación sin sentido	Ser901X(S870X)
Heterocigoto Doble	5	IVS5(+2)C→A	Inserción fuera de lectura	Terminación prematura
	21	2113T→C	Mutación puntual	Cys705Arg(Cys674Arg)
Homocigoto	2	288delC	Delección fuera de lectura	Terminación prematura
Heterocigoto Doble	12	1063G→A	Mutación puntual	Glu355Lys(Glu324Lys)
	18	1787T→C	Mutación puntual	Ile596Thr(Ile565Thr)

Tabla 21-10. Pacientes con Tromboastenia de Glanzmann y mutaciones en GPIIIa

Genotipo	Exon	Mutación	Fenotipo	Alteración proteica
Homocigoto	2	IVS2(+1)G→T	Delección fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	4	563C→T	Mutación puntual	Ser188Leu(Ser162Leu)
Homocigoto	9	IVS9ins3-4kb	Inserción fuera de lectura	Sin transcripción
Homocigoto	5	718C→T	Mutación puntual	Arg240WTrp(Arg214Trp)
Homocigoto	4	433G→T	Mutación puntual	Asp145Tyr(Asp119Tyr)
Homocigoto	9	1199G→A	Mutación puntual	Cys400Tyr(Cys374Tyr)
Homocigoto	5	719G→A	Mutación puntual	Arg240Gln(Arg214 Gln)
Homocigoto	3	262C→T	Mutación sin sentido	Arg88X(Arg62X)
Heterocigoto Doble	1	IVS1-5Aluinv15kb + IVS1del11kb	Inversión/Delección	Sin transcripción
	5	IVS5(+1)G→A	Delección/Inserción fuera de lectura	Terminación prematura
Heterocigoto Doble	6	917A→C	Mutación puntual	His306Pro(His280Pro)
	11	1757G→T	Mutación puntual	Cys586Phe(Cys560Phe)
Homocigoto	8	1053-1058del	Delección/Inserción, en lectura	351-353del Met351ins
Homocigoto	11	1702T→C	Mutación puntual	Cys568Arg(Cys542Arg)
Homocigoto	13	2031-2041del	Delección fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	9	IVS9Alu-2163 o 2166del11.2kb	Delección fuera de lectura	Terminación prematura
Heterocigoto Doble	6	847delGC	Delección fuera de lectura	Terminación prematura
	6	863T→C	Mutación puntual	Leu288Pro(Leu262Pro)
Homocigoto	4	428T→G	Mutación puntual	Leu143Trp(Leu117Trp)
Homocigoto	11	1758 T→C	Mutación puntual	Cys586Arg (Cys560Arg)
Homocigoto	4	433G→A	Mutación puntual	Asp145Asn(Asp119Asn)
Homocigoto	6	917A→C	Mutación puntual	Hys306Pro(Hys280Pro)
Heterocigoto Doble	15	2332T→C	Mutación puntual	Ser778Pro(Ser752Pro)
		Desconocido	Desconocido	
Heterocigoto Doble	11	1791delT	Delección fuera de lectura	Sin transcripción
	15	2248C→T	Mutación sin sentido	Arg750X(Arg724X)
Homocigoto	9	1260G-A+1143C A	Delección/Inserción, en lectura	Lys(350)- Ser(396)del/Val(350)Ser(351)ins
Homocigoto	5	725G→A	Mutación puntual	Arg242Gln(Arg216Gln)
Homocigoto	12	1924G→T	Mutación sin sentido	Gln642X(Gln616X)
Homocigoto	5	718C→T	Mutación puntual	Arg240Trp(Arg214Trp)
Heterocigoto Doble	6	917A→C	Mutación puntual	Hys306Pro(Hys280Pro)
	11	1813G→A	Mutación puntual	Gly605Ser(Gly579Ser)

la segunda onda puede estar disminuida si se usan dosis bajas, u ocurrir en ciclos reversibles si se usan dosis muy altas. A diferencia del SBS, las plaquetas tromboasténicas se unen normalmente a fibras de colágeno, y al tejido subendotelial expuesto, aunque la agregación subsiguiente está severamente reducida al no producirse el adecuado proceso de activación mediado por el complejo IIb-IIIa. La actividad procoagulante de estas plaquetas se describió como reducida en los primeros estudios, pero posteriormente se ha mostrado como normal en distintos pacientes. Asimismo, en algunos pacientes se ha descrito un defecto en la formación de micropartículas y en la generación de trombina. Por último, el nivel de expresión de GPIIb-IIIa, que puede cuantificarse por numerosas técnicas, oscila entre menos del 5%

en las formas clásicas hasta más del 50% en las variantes.

Clínica. La naturaleza del sangrado en la TG incluye casi siempre púrpura, menorragia especialmente en la menarquia, epistaxis y sangrado gingival. Con menor frecuencia se produce también hematuria y sangrado gastrointestinal, y son raros los casos de hemartrosis o hematomas en vísceras. El sangrado por traumas o quirúrgico puede ser severo, frecuente por ejemplo en las extracciones dentales sin previa profilaxis. El embarazo y sobre todo el parto y el puerperio, son también situaciones de alto riesgo hemorrágico para estos pacientes. La severidad de las hemorragias en la TG es impredecible, pues varía considerablemente entre los

pacientes, incluso entre familiares directos, y tiende a disminuir con la edad. No obstante se puede clasificar la TG como una enfermedad hemorrágica severa, pues la mayoría de los pacientes afectados que sangran requieren soporte transfusional.

Tratamiento. El manejo clínico de los enfermos con TG guarda semejanza con el de pacientes SBS, y debe incluir en primer lugar medidas educativas de comportamiento genérico (higiene bucal, revisión médica rutinaria, etc.). Se debe proveer soporte transfusional previo a la realización de procedimientos invasivos, incluso en pacientes sin historia previa de sangrado severo. La alta probabilidad de recibir transfusiones también hace recomendable la administración precoz de vacunas contra la hepatitis. Asimismo, se recomienda el uso de productos filtrados para disminuir el riesgo de aloinmunización y transmisión de CMV, y si es posible de plaquetas HLA compatibles. Además del riesgo de inmunización HLA, similar a la de otros sujetos, en los pacientes con TG existe el riesgo adicional de isoimmunización y generación de anticuerpos contra el complejo IIb-IIIa, que hagan ineficaces las plaquetas transfundidas. Ante un cuadro hemorrágico agudo en un paciente TG con un alto título de anticuerpo anti-GPIIb-IIIa, puede plantearse la conveniencia de realizar un recambio plasmático.

En algunos enfermos el uso de agentes antifibrinolíticos, ácidos e-aminocaproico o tranexámico, puede ser útil para la profilaxis del sangrado en situaciones como las extracciones dentarias, pero su eficacia generalizada no está demostrada. Igualmente se ha sugerido la utilidad de agentes tópicos (celulosa empapada en ácido tranexámico, trombina local, microfibras de colágeno) para el control del sangrado mucoso activo en la TG. Recientemente, se han tratado algunos pacientes tromboasténicos con rFVIIa, con resultados hemostáticos favorables. No obstante, y de forma similar al SBS, este tratamiento es todavía experimental, y se ha descrito un caso de tromboembolismo asociado a la terapéutica con este fármaco. Por último, dos pacientes con TG han sido sometidos a trasplante de médula ósea con resultados satisfactorios. Combinado con la terapia de transferencia génica, el trasplante de progenitores hematopoyéticos podría ser una opción interesante para los pacientes con las formas más graves de TG en un futuro próximo.

3.1.3. Defectos congénitos de la secreción plaquetaria: Anormalidades granulares.

Tras la adhesión al subendotelio, las plaquetas sufren un cambio estructural y morfológico, desarrollando pseudópodos, e inician una reacción de liberación por la cual los productos contenidos en los gránulos α (factor 4 plaquetario, β -tromboglobulina, trombospondina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, fibrinógeno, FVW) y de los gránulos δ (ADP, ATP, calcio, serotonina) son liberados al exterior. La exteriorización del contenido de los gránulos tiene lugar a través de una reacción de exocitosis, por la que las membranas de los organelos se fusionan con los del sistema canalicular abierto tras el aumento en la concentración de calcio citoplasmático. El proceso de liberación amplifica la activación, que como consecuencia conlleva la agregación plaquetaria. Las alteraciones congénitas en el almacenamiento plaquetario comprenden un grupo heterogéneo de trastornos en que puede existir una deficiencia de gránulos o de su contenido. Básicamente, se clasifican como defectos los que afectan a los gránulos densos (deficiencia de almacenamiento de gránulos δ), a los gránulos α (deficiencia de almacenamiento de gránulos α o síndrome de las plaquetas grises), o tanto a gránulos densos como α (deficiencia de gránulos δ y α). En conjunto, estas alteraciones cursan con una diátesis hemorrágica moderada, que se caracteriza por tendencia al sangrado mucocutáneo espontáneo, tras intervenciones quirúrgicas o en el postparto. El tiempo de sangría por lo general está aumentado, y sobre todo, se incrementa de forma marcada tras la ingesta de aspirina. Generalmente se observa ausencia de la segunda onda de agregación tras activación con ADP o epinefrina, y una disminución de la agregación al colágeno o trombina.

a) Síndrome de las plaquetas grises

El síndrome de plaquetas grises se caracteriza por una ausencia de gránulos α reconocibles morfológicamente en las plaquetas y en los megacariocitos de los individuos afectados, mientras que los gránulos δ y lisosomas están presentes en cantidades normales. Como consecuencia, las plaquetas muestran una deficiencia severa, aunque no una ausencia completa de proteínas sintetizadas en el megacariocito y contenidas en los gránulos α . Sin embargo, la glicoproteína plaquetaria característica de la membrana de este tipo de

gránulos, la selectina P (GMP-140), sí está presente y se externaliza en cantidades normales tras activación con trombina, indicativo de que en realidad, estas plaquetas sí contienen las membranas de dichos gránulos. El defecto en este síndrome parece residir en la incapacidad para el almacenamiento en los gránulos α de las proteínas endógenas sintetizadas por megacariocitos. Así, la liberación al estroma medular del factor de crecimiento derivado de plaquetas puede explicar la fibrosis medular observada en estos casos, y este defecto en el almacenamiento también puede ser responsable de concentraciones plasmáticas elevadas de factor 4 plaquetario y de β -tromboglobulina.

Clínicamente se caracteriza por manifestaciones mucocutáneas hemorrágicas moderadas, y fundamentalmente con sangrado postquirúrgico o postraumático, aunque también puede ser asintomática. Es también típica una macrotrombocitopenia moderada, con cifras que pueden variar en un mismo individuo a lo largo de su vida (25 a 150 x 10⁹/litro). El frotis de sangre periférica muestra plaquetas grandes, pálidas, con formas ovales. El aspirado medular muestra un número aparentemente normal de megacariocitos, con un incremento en la trama reticulínica, fundamentalmente alrededor de éstos. Los estudios de agregación plaquetaria son variables: generalmente se observan defectos en la agregación a trombina y colágeno, mientras que con ADP o epinefrina tienden a estar menos alteradas. Sin embargo, también se han descrito agregaciones normales a todos los agonistas. Los estudios inmunológicos o la electroforesis en gel de poliacrilamida demuestran la deficiencia en las proteínas α granulares como fibrinógeno, FVW, trombospondina, factor 4 plaquetario, factor de crecimiento derivado de plaquetas y β -tromboglobulina en lisados de plaquetas o en el sobrenadante tras su activación. La microscopía electrónica demuestra una ausencia selectiva de gránulos α , con un número normal de gránulos densos.

Se desconoce el modo exacto de transmisión genética de esta patología, debido al escaso número de individuos descritos, aunque la presencia de la enfermedad en dos hermanos -varón y mujer- sugiere que se trata de una herencia autosómica. La anomalía molecular específica responsable de este cuadro no ha sido todavía descrita.

Las medidas generales para el tratamiento de

esta enfermedad son similares a las de la TG. La respuesta a la desmopresina es variable, pero parece mejorar en parte la función hemostática, y los pacientes también se pueden beneficiar de la terapia antifibrinolítica. El tratamiento de los episodios hemorrágicos severos requiere la transfusión de concentrados de plaquetas.

b) Deficiencia en el almacenamiento de gránulos δ

La deficiencia en gránulos δ puede ser un trastorno plaquetario hereditario aislado, o un componente de enfermedades hereditarias multisistémicas. Dentro de estas últimas se reconoce el síndrome de Hermansky-Pudlak (albinismo oculocutáneo, acúmulo excesivo de material de tipo ceroides en células del sistema mononuclear-fagocítico, fibrosis pulmonar variable, enfermedad inflamatoria intestinal, y diátesis hemorrágica), el síndrome de Chediak-Higashi (albinismo oculocutáneo parcial, gránulos lisosomales gigantes e infecciones piógenas frecuentes), y el síndrome de Wiskott-Aldrich. Otras enfermedades que se han asociado a deficiencia de gránulos densos son el síndrome de Ehler-Danlos, la osteogénesis imperfecta y la trombocitopenia con ausencia de radio, aunque esta relación está menos establecida.

En la deficiencia de gránulos δ , el contenido granular de ADP, ATP, serotonina, calcio y pirofosfato están disminuidos. La relación ATP/ADP, medida en lisados plaquetarios está aumentada, lo que traduce niveles normales de ATP en otros compartimientos generados para el metabolismo plaquetario. La disminución de ADP, y posiblemente de serotonina, secretados por las plaquetas, contribuye en la alteración funcional y en la propagación del tapón hemostático.

La etiología de la deficiencia primaria de almacenamiento de gránulos δ es desconocida, pero podría haber un defecto intrínseco en los precursores hematopoyéticos. En el síndrome de Hermansky-Pudlak parece haber una deficiencia completa en la formación de gránulos δ , de acuerdo a los hallazgos de la microscopía electrónica de plaquetas y de megacariocitos, y a la ausencia de CD63 o granulofisina (proteína de la membrana de gránulos densos, de lisosomas y de melanosomas). En el resto de las formas de deficiencia de gránulos δ las membranas de los gránulos densos sí parecen formarse, pero no se rellenan de forma adecuada. Por ello, los

defectos en la secreción de diferentes substancias contenidas en estos gránulos también son variables, y generalmente la de nucleótidos cíclicos es la más afectada.

La deficiencia de gránulos δ se caracteriza por una diátesis hemorrágica moderada, con sangrado mucocutáneo, como epistaxis, petequias, menorragia, y sangrado postquirúrgico o postparto. Los pacientes con deficiencias de gránulos δ como parte del síndrome de Hermansky-Pudlak suelen tener hemorragias más severas e incluso pueden ser letales. Aunque los recuentos de plaquetas pueden estar discretamente disminuidos, por lo general son normales. Los estudios de agregación son variables, habiéndose descrito un número de pacientes con deficiencias de gránulos δ y normalidad en estos análisis. Generalmente, la segunda onda de agregación con ADP y epinefrina suele estar ausente, y la respuesta a bajas dosis de colágeno suele ser deficiente. La valoración de la respuesta a dosis elevadas de trombina (máxima liberación) ayuda a distinguir las alteraciones de la liberación (agregaciones normales) de las deficiencias en los gránulos (agregaciones reducidas). El luminómetro o el lumiagregómetro permiten comprobar una reducción en la liberación de ATP mediante análisis de la luminiscencia. La mepacrina, debido a su alta afinidad por el ATP se localiza en los gránulos densos, y la reducción de la fluorescencia emitida medida mediante microscopía o citometría ayuda al diagnóstico. El análisis bioquímico de diferentes sustancias intragranulares, como el ATP, ADP, calcio o serotonina está reducido, mientras que la relación ATP: ADP está aumentada. La ^{14}C -serotonina es captada en plaquetas deficientes en gránulos δ , pero puesto que no puede ser incorporada en estos organelos, se cataboliza rápidamente. En estudios de secreción plaquetaria usando ^{14}C -serotonina, se observa característicamente un porcentaje de incorporación menor al normal en estos pacientes. Aunque en las plaquetas carentes en gránulos densos una proporción importante de la serotonina es catabolizada, en pacientes con síndrome de Hermansky-Pudlak la pérdida del marcador radioactivo es todavía más acusada. La reducción o la ausencia de gránulos densos pueden ser confirmadas por microscopía electrónica de plaquetas fijadas en presencia de calcio.

En ausencia de otras anomalías congénitas o de una deficiencia asociada de gránulos α , la

deficiencia de gránulos δ se transmite como rasgo autosómico dominante. Las otras formas de deficiencias de gránulos δ con alteraciones constitucionales (síndromes de Hermansky-Pudlak, Chediak Higashi y la trombocitopenia con ausencia de radio) tienen una herencia autosómica recesiva, excepto el síndrome de Wiskott Aldrich, que lo hace como rasgo ligado al cromosoma X.

El síndrome de Hermansky-Pudlak tiene una base molecular heterogénea, con la participación de diferentes genes. Hasta la fecha se ha identificado tres genes responsables de la enfermedad denominados HPS1, HPS2, y HPS3. El primero, HPS1, se localiza en el cromosoma 10q23.1, tiene 20 exones, y codifica una proteína de 700 aminoácidos cuya función es todavía poco clara pero que parece estar implicada en la organelogénesis. En población de Puerto Rico se ha reportado numerosos casos de este síndrome, y en esta población la alteración genética más frecuente es una duplicación de 16 pares de bases en el exón 15. El gen HPS2, también llamado AP3BA, codifica la subunidad B3A del complejo adaptador AP3, que juega un papel clave en la formación de vesículas y el almacenamiento de proteínas, a partir de estructuras membranosas como el aparato de Golgi. Por último, se ha comunicado que alteraciones moleculares en el gen HPS3, cromosoma 3q24, se asocian al fenotipo de HPS. La función de la proteína codificada por HPS3, 1000aa 114kDa, es aún desconocida. Información más detallada sobre las características de estos genes y las mutaciones identificadas en ellos se puede obtener en Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim>; códigos de entrada 604982, 603401, 606118).

Las medidas generales para el tratamiento de esta enfermedad son similares a las indicadas en deficiencias de gránulos α . La transfusión de plaquetas es el tratamiento más efectivo en episodios de sangrado de pacientes con deficiencias de gránulos δ , pero debido a su carácter moderado, a veces éstas no son necesarias. Los crioprecipitados pueden corregir el tiempo de sangría en estos pacientes, pero el mecanismo de este beneficio es aún desconocido. Lo mismo ocurre con la desmopresina, que también puede ser de utilidad en un número de pacientes con este defecto.

c) Deficiencia combinada de gránulos α y δ

La deficiencia combinada de gránulos α y δ se caracteriza por una reducción parcial y variable en el número de estos gránulos, y una expresión clínica heterogénea. Por lo general, la reducción en gránulos δ es mayor que la de α . A diferencia del síndrome de las plaquetas grises, en la que la selectina P está presente en cantidades normales, el contenido en esta glicoproteína en las plaquetas de pacientes con deficiencias combinadas está reducido, lo que facilita el diagnóstico. Otros hallazgos de laboratorio, sus manifestaciones clínicas y el tratamiento no difieren a los señalados en deficiencias aisladas de gránulos α ó δ . En casos esporádicos se ha descrito asociación con neoplasias hematológicas, lo que ha sugerido que en este cuadro pudiera haber un protooncogen que regulara la maduración de megacariocitos y de neutrófilos. La presentación familiar de estos cuadros sugiere una herencia autosómica.

d) Alteración plaquetaria tipo Quebec

Este es un raro trastorno autosómico dominante que se caracteriza por cifras normales o disminuidas de plaquetas, sangrado mucocutáneo que puede ser severo y muy tardío tras un traumatismo, y que generalmente no responde adecuadamente a transfusiones de plaquetas. Se asocia a un aumento de expresión y almacenamiento de uroquinasa en megacariocitos y plaquetas, generación de plasmína intraplaquetaria, degradación de las proteínas de los gránulos alfa (entre ellos el factor V plaquetario), uroquinasa plasmática normal o aumentada, aumento de productos de degradación del fibrinógeno sin aumento del Dímero D, y ausencia de agregación plaquetaria con epinefrina. Refrenda este mecanismo patogénico el hecho que la terapia con inhibidores de la fibrinólisis (ej., ácido tranexámico) es el único tratamiento efectivo conocido en este síndrome.

3.1.4. Defectos hereditarios en los mecanismos implicados en la transmisión de señales de activación plaquetaria

En muchos pacientes la función de las plaquetas está alterada, con fallos en la agregación y/o la secreción, a pesar de la ausencia de alteraciones congénitas de los gránulos plaquetarios o de los receptores adhesivos. En estos casos, es posible que la patología subyacente sea un defecto hereditario de la activación plaquetaria. Este proceso es un complejo fenómeno que

incluye la unión de agonistas a sus receptores específicos, la transmisión de señales de activación generalmente por acoplamiento del receptor con proteínas G, la activación de enzimas efectoras como nucleótido ciclasas o fosfolipasas, la generación o movilización de segundos mensajeros (nucleótidos cíclicos, inositoles fosfato, calcio, etc.). Subsiguientemente, se produce la cascada de cambios bioquímicos (fosforilación de proteínas, activación de receptores, secreción etc.) y estructurales (cambio de forma, reorganización del citoesqueleto, emisión de pseudópodos) que caracterizan el estado de plaqueta activada. Reconocida la transcendencia fisiológica del proceso de la activación plaquetaria e identificados sus elementos clave, resulta claro que la deficiencia hereditaria de alguno de estos elementos puede reflejarse en un funcionamiento anormal de las plaquetas.

Dada la variedad de elementos potencialmente afectados, los pacientes con deficiencias de la activación plaquetaria constituyen un conjunto muy heterogéneo, que agrupamos más para simplificar la clasificación global de las trombocitopatías, que por verdadera similitud de las alteraciones específicas subyacentes. A pesar de dicha heterogeneidad, estos pacientes se asemejan fenotípicamente, cursando con diátesis hemorrágicas muy moderadas, similares por ejemplo a las de sujetos tratados con aspirina, y de localización cutáneo-mucosa. En general, no requieren tratamiento, y son suficientes medidas educativas de prevención de riesgo. Ante situaciones de riesgo hemorrágico previsible (exodoncia, intervenciones quirúrgicas), puede plantearse el uso preventivo de desmopresina o antifibrinolíticos, pero en ocasiones las hemorragias son más graves y es necesaria la transfusión de componentes sanguíneos. Considerando el carácter generalmente moderado del trastorno hemorrágico asociado a esta patología, que normalmente no requerirá atención médica, no es de extrañar que una alta proporción de los individuos afectados no sean diagnosticados, y por ello su incidencia es desconocida. No obstante, la mayoría de las disfunciones plaquetarias diagnosticadas en el laboratorio corresponden a esta categoría, con una incidencia global bastante mayor que el de otras trombocitopatías más clásicas como el SBS o la TG.

En ausencia de pruebas más específicas para la caracterización del defecto subyacente, los hallazgos típicos en pacientes con patología de

la activación son cifras normales de plaquetas, pruebas de coagulación y nivel de FVW normal, y un tiempo de sangría normal o alargado. El cambio de forma y la aglutinación inducida por ristocetina no suelen estar afectados, mientras que la agregación plaquetaria con dosis moderadas o bajas de la mayoría de agonistas muestra generalmente disminución del porcentaje máximo de agregación y/o ausencia de la segunda onda de agregación. A dosis altas de agonistas el patrón de agregabilidad puede normalizarse. En algunos casos se ha conseguido caracterizar de forma precisa la alteración molecular responsable de la alteración funcional de la activación plaquetaria, y estos casos son descritos con más detalle en el siguiente punto (b de 3.1.4).

a) Defectos en los receptores para agonistas

Las plaquetas cuentan con una batería de receptores para múltiples agonistas no adhesivos muy amplia y diversa. La mayoría de ellos, pero no todos, son proteínas pertenecientes a la familia de receptores formados por una única cadena polipeptídica con siete dominios transmembrana, y cuyas porciones intracitosólicas se acoplan a proteínas G que median la transmisión de las señales de activación de las enzimas efectoras. En este grupo se encuadran como principales los receptores para ADP, epinefrina, trombina, factor activador de plaquetas o PAF, vasopresina, serotonina, y tromboxano A₂. Además, para algunos de estos agonistas existen varios subtipos de receptores, y como es obvio todos ellos son blanco potencial de alteraciones moleculares que se traducen en defectos funcionales de la activación.

Las plaquetas disponen de al menos tres subtipos de receptores purinérgicos de ADP: (a) P2Y₁, ligado a la subunidad G_q, cuya activación se asocia a aumentos de IP₃ y DAG, y salida de calcio desde el retículo endoplásmico; (b) P2Y₁₂ (también llamado P2TAC, P2cyc o P2Yadp), ligado a la proteína G_i, asociada a disminución de la adenilato ciclasa y consecuente disminución del AMPc intracelular, lo que desencadena la agregación macroscópica y la estabilización de los agregados; y (c) P2X₁, un receptor que actúa como canal de calcio, activado por ATP externo, y cuyo papel fisiológico aún está insuficientemente aclarado, aunque parece regular positivamente la respuesta de las plaquetas al colágeno. Se han identificado dos pacientes no relacionados, con una aparente

deficiencia congénita de la agregación inducida por ADP. En ambos casos, los estudios con análogos de ADP, mostraron una reducción significativa en el número de sitios de unión. También se constató un patrón anormal de fosforilación inducida por ADP, y la incapacidad de este agonista para inhibir la generación de AMPc en plaquetas estimuladas con prostaglandina E₁. Este patrón clínico-funcional es comparable al de sujetos o animales tratados con tienopiridinas, y es sugerente de una deficiencia de los receptores P2Y₁₂. De hecho, en uno de estos enfermos se ha identificado la presencia en heterocigosis de una delección de dos nucleótidos en el gen del receptor P2Y₁₂, que causa la aparición de un codón "stop" prematuro y la síntesis de una proteína carente de 28 residuos en el extremo amino terminal. Esta alteración se transmite de forma autosómica recesiva, y su presencia en otros pacientes con afectación de las respuestas al ADP está por demostrarse. No obstante, en algunos pacientes con secreción plaquetaria alterada, pero gránulos y formación de TXA₂ normales, se sospecha la presencia en heterocigosis de ésta u otra alteración molecular del receptor P2Y₁₂. Respecto de los otros receptores de ADP, se ha comunicado un paciente con una aparente deficiencia congénita del receptor P2Y₁, todavía no confirmada ni caracterizada. También se ha descrito un paciente con un trastorno hemorrágico severo asociado a un defecto hereditario recesivo, consistente en la delección de una leucina en el segundo dominio transmembrana del receptor P2X₁.

Las plaquetas poseen receptores α_2 -adrenérgicos implicados en la inhibición de la adenilato ciclasa mediante acoplamiento a través de la proteína G_i. La interacción de la epinefrina con su receptor también promueve la agregación inducida por otros agonistas débiles como el ADP, poniendo de manifiesto la importancia fisiológica del sinergismo entre distintos agonistas plaquetarios. Se han descrito tres casos de defectos congénitos de la secreción y /o la agregación inducida por epinefrina, asociados a una disminución significativa de los receptores α_2 -adrenérgicos. En estos casos, la clínica hemorrágica es discreta, y la alteración molecular subyacente no es conocida.

En contraposición con estas trombocitopatías de deficiencia funcional de los receptores de ADP o epinefrina, se ha descrito un trastorno denominado síndrome de las plaquetas

viscosas, caracterizado por una hiperagregación de las plaquetas al estimularlas con estos agonistas. Clínicamente, los pacientes con este síndrome sufren trombosis coronarias o en el sistema nervioso central, frecuentemente asociadas a situaciones de estrés emocional. La base molecular de este exceso de función aún se desconoce.

Una de las consecuencias genéricas de la activación de las plaquetas es la generación de tromboxano A₂, que actúa potenciando la respuesta inicial en la misma y en otras plaquetas. El receptor de TXA₂, del que existen en las plaquetas dos isoformas α y β -diferenciadas sólo en el extremo carboxilo terminal y en su capacidad de activar la adenilato ciclasa, es una proteína con siete dominios transmembrana que activa el ciclo de los fosfoinosítoles por acoplamiento a la proteína G α_q . En la población japonesa se han identificado familias con trastornos hemorrágicos moderados de transmisión dominante, que presentan una mutación puntual (Arg/Leu 60) en el gen que codifica el receptor plaquetario de TXA₂. Esta mutación, localizada en la porción citoplasmática del receptor, parece afectar su capacidad para transmitir señales de activación tras la unión del ligando.

El PAF es un éter fosfolipídico de propiedades antiinflamatorias producido por las plaquetas, leucocitos y otras células. El PAF es un potente agonista capaz de inducir secreción y agregación plaquetaria de forma dosis dependiente. Sus respuestas están mediadas por un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G, que inducen la inhibición de la adenilato ciclasa y a la activación de la fosfolipasa C. Indirectamente, también activa la fosfolipasa A₂ provocando la liberación de ácido araquidónico de la membrana plaquetaria. En 1984 se comunicó anecdóticamente un caso de aparente deficiencia específica de la respuesta plaquetaria a PAF sin detallar el tipo de anomalía, pero no hay constancia en la literatura de otros pacientes con alteraciones similares.

Para terminar esta sección es obligado hacer mención sucinta a la trombina, el más potente activador de las plaquetas capaz de inducir respuestas de activación a concentración subnanomolar en cuestión de segundos. Se ha demostrado que el complejo Ib-IX-V actúa como receptor plaquetario para la trombina, lo que podría explicar la menor reactividad de las

plaquetas SBS a este agonista. Además de este complejo, las plaquetas humanas poseen otros receptores de trombina (PAR1 y PAR 4, "Protease Activator Receptors") pertenecientes a la familia de receptores de siete dominios transmembrana que se activan por proteólisis, y transmiten las señales de activación mediante acoplamiento a distintas proteínas G. Estos receptores son activados por un novedoso mecanismo de proteólisis de una porción del dominio extracelular de la molécula, que genera un nuevo extremo N-terminal, que actúa como un ligando o agonista intramolecular para el propio receptor. El hexapéptido SFLLRN-NH₂ incluido en el nuevo extremo amino terminal se denomina péptido activador del receptor de trombina (TRAP, "Thrombin Receptor Activating Peptide"). Hasta la fecha, no se han descrito patologías plaquetarias relacionadas con alteraciones específicas en estos receptores.

b) Defectos en otros elementos intraplaquetarios implicados en la activación: proteínas G, enzimas efectoras, segundos mensajeros, fosforilación de proteínas

Las proteínas G son un grupo heterogéneo de proteínas heterotriméricas, $\alpha\beta\gamma$, que actúan como nexo de unión entre receptores de membrana y las enzimas efectoras intracelulares. Los receptores activos promueven el intercambio del GDP unido a la subunidad G α no activa por GTP, y la disociación de G α de las subunidades G $\beta\gamma$, lo que provoca su activación. Posteriormente, la actividad de GTPasa de G α y la participación de proteínas reguladoras extrínsecas, favorece la hidrólisis del GTP a GDP y la subsiguiente desactivación de G α y su reasociación con G $\beta\gamma$ hasta el siguiente ciclo de activación del receptor. Debido a su papel modulador en el proceso de la activación, las proteínas G son una importante causa potencial de defectos constitucionales de la función plaquetaria. Este es el caso de una paciente con trastorno hemorrágico leve, caracterizado por alteraciones en la agregación, la secreción, la liberación de ácido araquidónico, y la movilización del calcio en respuesta a diversos agonistas. En esta paciente, se ha demostrado la asociación de estas alteraciones con una deficiencia cuantitativa hereditaria, (menos del 50%) de la proteína G α_q . Los niveles de otras proteínas G (G α_i , G α_{12} , G α_{13}) son normales en esta paciente, resaltando la especificidad de la anomalía. Un fenotipo similar de función plaquetaria ha sido encontrado en ratones deficientes de G α_q .

Los sistemas enzimáticos efectores (fosfolipasas, nucleótido ciclasas), son otro importante eslabón en la cadena reguladora de la activación plaquetaria, al ser los generadores de los segundos mensajeros que promueven o inhiben ese proceso de activación. La fosfolipasa C, particularmente la isoforma B, es responsable de la rápida hidrólisis de fosfoinosítoles que ocurre durante la activación inducida por la unión de muchos ligandos a sus receptores. Como consecuencia, se genera diacilglicerol (DAG), e inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3), y se moviliza el calcio de los depósitos intracelulares. Existe en la literatura mención a varios pacientes con defectos de agregación y secreción asociados con una aparente deficiencia en la movilización del calcio intraplaquetario tras la activación con varios agonistas. Estudios específicos en dos de estos pacientes mostraron un defecto en la síntesis de DAG e IP_3 y en la fosforilación de la pleckstrina tras la activación con agonistas. Por el contrario se podía inducir activación directa de la PKC con DiC8, y la subsiguiente secreción y fosforilación de proteínas. En uno de los pacientes se ha demostrado que una disminución selectiva de la fosfolipasa C- β 2 es muy probablemente la causa de la alteración funcional. En línea con este hallazgo, recientes estudios han demostrado que los neutrófilos de ratones deficientes en fosfolipasa C- β 2 manifiestan una disminuida capacidad de movilización de calcio.

En los últimos años, varios autores han identificado pacientes con fenotipo de sangrado moderado y un patrón de agregación y secreción plaquetaria alteradas, en los que se sospecha una alteración en las vías de hidrólisis de los fosfoinosítoles y/o de la fosforilación de proteínas tras la activación con agonistas. En algunos de estos pacientes se ha demostrado con ensayos específicos una disminución significativa de la capacidad de síntesis de IP_3 , de la movilización de calcio, o de la fosforilación de proteínas como pleckstrina. Sin embargo, la localización precisa de la alteración en la cascada de componentes de la transmisión de señales de activación está por establecerse.

La activación del complejo GPIIb-IIIa, necesaria para la unión de fibrinógeno y la posterior agregación plaquetaria es un proceso que conlleva la transmisión de señales de activación de dentro hacia fuera. Los elementos implicados en este proceso no han sido esclarecidos completamente, aunque hay evidencias de una participación muy relevante de la activación de

la PKC y la fosforilación de la pleckstrina. Fallos en la transmisión de las señales conducentes a la activación del complejo IIb-IIIa parecen ser la causa de los fenotipos hemorrágicos y de función plaquetaria parecidos a la TG que muestran algunos pacientes con niveles normales de complejos IIb-IIIa no mutados. Se sospecha actualmente que este tipo de defecto a nivel de la activación del complejo IIb-IIIa, cuya localización precisa no se ha identificado y puede ser heterogénea, puede ser el mecanismo común de los fallos de agregación, esencialmente en la primera onda, que muestran muchos pacientes.

c) Defectos en el metabolismo del ácido araquidónico y/o en la producción de tromboxano A_2 .

La liberación de ácido araquidónico desde los fosfolípidos de la membrana y su oxigenación a tromboxano A_2 , es uno de los procesos clave de la activación plaquetaria. El tromboxano A_2 liberado es un potente agonista que incrementa la activación a través de su unión a un receptor propio de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G. La mayoría del tromboxano A_2 se genera por acción secuencial de las enzimas fosfolipasa A_2 , prostaglandina H sintetasa (ciclooxigenasa-1 o COX-1), y tromboxano sintetasa. La alteración hereditaria de cualquiera de estos sistemas enzimáticos puede dar lugar a una disminuida capacidad de síntesis de tromboxano A_2 , y consiguientemente a una disfunción plaquetaria similar a la causada por el tratamiento con aspirina, que acetila en forma irreversible la COX-1. El patrón general de agregación muestra una disminución de la respuesta al ADP, colágeno o epinefrina, con una llamativa pérdida de la segunda onda de agregación.

Se han descrito varios pacientes con anomalías en la fosfolipasa A_2 , que muestran este patrón de agregación anormal, pero con agregación normal en respuesta a ácido araquidónico. La identidad de este fallo no se ha aclarado en todos los casos y puede ser heterogénea. En otros casos con patrones de respuestas similares, no se confirma anomalías intrínsecas de esta enzima, y el fallo parece secundario a la movilización de calcio alterada tras activación por agonistas, con una deficiente activación de la fosfolipasa A_2 . Deficiencias cuantitativas o cualitativas de ciclooxigenasa o de tromboxano sintetasa, han sido identificadas en varios pacientes. En estos casos la respuesta de agregación al ácido araquidónico es muy

deficiente. A falta de otras técnicas más específicas de identificación de estas enzimas, ambas trombocitopatías pueden distinguirse por la respuesta de agregación a la prostaglandina H₂, que es normal en el caso del déficit de ciclooxigenasa y anormal si la deficiencia es de la enzima tromboxano sintetasa. Una respuesta normal a los análogos sintéticos del tromboxano A₂, ayuda a discernir estos cuadros de las patologías que afectan al receptor del tromboxano o a su mecanismo de transmisión de señales.

3.1.5. Alteraciones congénitas de la actividad procoagulante de las plaquetas

Cuando las plaquetas se activan se produce la externalización de fosfolípidos de carga negativa, en especial la fosfatidilserina. Este proceso contribuye en la función hemostática, ya que estos fosfolípidos de carga negativa soportan el ensamblaje de los complejos procoagulantes tenasa (VIIIa-IXa), que activa el factor X, y protrombinasa (Va-Xa), que activa el factor II. La consecuencia final es la generación local de trombina, y subsiguientemente de la fibrina que estabiliza el trombo sobre la zona de lesión vascular. Clásicamente, la contribución de las plaquetas al proceso de la coagulación se ha definido como actividad factor 3 plaquetario. Se ha identificado una patología congénita denominada Síndrome de Scott, causada por una deficiencia congénita autosómica recesiva, en alguna de las enzimas responsables de la externalización de fosfatidilserina, como la fosfatidiltranslocasa. En los pacientes afectados de este síndrome, la capacidad de ensamblaje del complejo protrombinasa, y con ello de formar trombos estables está disminuida, lo que favorece una sintomatología hemorrágica que incluye el sangrado excesivo tras extracciones dentarias, traumatismos, o cirugía, epistaxis y hematomas. La presencia de un tiempo de sangría normal, un tiempo de protrombina en suero anormal, y la ausencia de un patrón de sangrado mayoritariamente mucocutáneo, permiten diferenciar los defectos congénitos de la actividad procoagulante de otros desórdenes plaquetarios cualitativos. El tratamiento de los pacientes con este tipo de patología se ha basado mayoritariamente en la transfusión de plaquetas o sangre total. Un paciente ha sido tratado de manera eficaz con concentrados de complejo protrombínico, sin embargo estos fármacos pueden inducir trombosis por lo que su utilización, si procede, se ha de restringir a episodios de sangrado severo.

Además del síndrome de Scott, se han descrito otras condiciones clínicas asociadas a una anormal actividad procoagulante de las plaquetas. Tal es el caso del síndrome de Stormorken, caracterizado por la sobreexpresión de actividad procoagulante en las plaquetas incluso en ausencia de agentes estimuladores, por lo que se conoce también como anomalía inversa al síndrome de Scott. Este fenómeno se refleja también en la detección, mediante citometría de flujo, de una unión aumentada de anexina V a las plaquetas no estimuladas, y en la presencia en el plasma rico en plaquetas de los pacientes afectados de una concentración anormalmente alta de microvesículas. Paradójicamente, la existencia en estos enfermos de unas plaquetas en permanente estado procoagulante no se traduce en una predisposición a la trombosis, sino que se manifiesta clínicamente con tendencia moderada al sangrado. Este fenotipo clínico concuerda con la observación en cámara de perfusión sobre colágeno, flujo a 650-2600 s⁻¹, de una menor capacidad de formación de trombos a pesar de una adhesión plaquetaria normal. A diferencia del síndrome de Scott, la alteración de Stormorken parece ser multifactorial, e incluye, además de la alteración de la capacidad procoagulante, otras anomalías como asplenia, supervivencia plaquetaria reducida, miosis, dislexia, fatiga muscular, e histiocitosis.

3.1.6. Otras trombocitopatías

Además de las alteraciones mencionadas arriba, se han identificado pacientes que manifiestan anormalidades de la función plaquetaria de difícil inclusión en los grupos anteriores, y que en ocasiones parecen también ligadas a desórdenes sistémicos.

Este es el caso del síndrome de Wiskott-Aldrich, mencionado brevemente en la sección de déficit de gránulos densos. Se trata de un trastorno hereditario raro, 4 casos por millón, ligado al cromosoma X que afecta a las plaquetas y además a los linfocitos T. Clínicamente se caracteriza por la presencia de trombocitopenia, inmunodeficiencia, y eczema. Son frecuentes en estos enfermos las infecciones de repetición, las hemorragias, aparición de un linfoma, y complicaciones autoinmunes. La severidad de la enfermedad es variable incluso entre individuos de una misma familia, pero se puede clasificar como un trastorno severo. Las plaquetas, de pequeño tamaño, muestran varias anormalidades, la más llamativa un déficit

severo del “pool” de nucleótidos de adenina, que impide el normal “feedback” positivo durante la activación y la agregación plaquetaria. También se ha descrito un defecto en el metabolismo energético de las plaquetas. El tiempo de sangría suele ser prolongado, más allá de lo esperable considerando la intensidad de la trombocitopenia. La esplenectomía suele corregir, al menos temporalmente, la trombocitopenia y el defecto en el tamaño plaquetario, y tiene un efecto positivo sobre la función plaquetaria. Siendo una opción válida de tratamiento sobre todo en aquellos pacientes con sangrado intenso, se ha de considerar el mayor riesgo de infecciones postquirúrgicas en estos enfermos. El sangrado activo se trata con transfusiones de plaquetas irradiadas, y preferiblemente de donantes CMV negativos. Finalmente, el trasplante de médula ósea antes del inicio de una inmunodeficiencia intensa, puede curar el trastorno y es recomendable si se dispone de un donante histocompatible. En pacientes jóvenes puede ser válido el trasplante de donantes compatibles no relacionados y/o de células de cordón umbilical. En algunos pacientes la alteración molecular responsable de esta enfermedad se ha localizado en el gen que codifica la llamada proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich, una molécula que actúa como regulador clave del ensamblaje del citoesqueleto plaquetario, donde interacciona con otras proteínas específicas de la transmisión de señales de activación como la GTPasa Cdc42 o proteínas adaptadoras de la familia Src como p47nck. Otros enfermos con el síndrome de Wiskott-Aldrich no muestran mutaciones en el gen de esa proteína, lo que indica la implicación de otros genes en la patogénesis de la enfermedad. En algunos pacientes, se han detectado alteraciones a nivel de la glicoproteínas adhesivas de la membrana plaquetaria como CD43 o sialoforina, GPIb, GP Ia, GPIIb-IIIa, o GPIV. Información detallada y actual sobre las alteraciones moleculares hasta ahora identificadas como causantes de este síndrome se puede obtener en Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

[query.fcgi?CMD=search&DB=omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim); código de entrada 301000).

Además del síndrome de Wiskott-Aldrich, se han descrito alteraciones de la estructura y/o función de las plaquetas en asociación con otros desórdenes sistémicos como el síndrome de Down, y algunas macrotrombocitopenias constitucionales. Estas últimas son un conjunto de síndromes, de herencia autosómica dominante, que cursan con trombocitopenia, plaquetas de gran tamaño, escasa diátesis hemorrágica y ausencia de alteraciones valorables en los estudios funcionales. La reciente identificación de una misma anomalía genética en las macrotrombocitopenias asociadas a inclusiones ribosómicas en los leucocitos y/o a síndromes Alport-like (nefropatía e hipoacusia), indica que forman un grupo de síndromes relacionados (síndrome de May-Hegglin, síndrome de Sebastian, síndrome de Epstein y síndrome de Fechtner). La detección de macrotrombocitopenia en pacientes con microdelección del cromosoma 22q11 y síndrome velocardiofacial determina un segundo grupo de macrotrombocitopenias. Finalmente, quedarían las macrotrombocitopenias no asociadas a inclusiones leucocitarias ni a otras anomalías, de etiopatogenia desconocida. En estos casos, no se han identificado aún los mecanismos aberrantes responsables de las anomalías plaquetarias.

3.2. Trombocitopatías adquiridas

La anomalía funcional plaquetaria ocurre en numerosas condiciones clínicas adquiridas. Destacamos aquí las patologías más frecuentes de este tipo, y que son clínicamente relevantes, pues muchas alteraciones funcionales no tienen una correlación clínica evidente o demostrada y se expresan sólo como hallazgos de laboratorio. La tabla 21-11 muestra una clasificación general de los defectos plaquetarios adquiridos.

Tabla 21-11. Anomalías funcionales adquiridas de las plaquetas

<p>Asociadas a enfermedades sistémicas</p> <p>Uremia Insuficiencia hepática Anticuerpos antiplaquetarios Cirugía con circulación extracorpórea Leucemias y mielodisplasias Disproteinemias</p> <p>Por drogas, alimentos, especies y vitaminas</p>

3.2.1. Asociadas a enfermedades sistémicas

a1) Trombocitopatía urémica

La insuficiencia renal crónica (IRC) evoluciona con una alteración compleja de la hemostasia, en que clínicamente coexisten los riesgos de hemorragia y trombosis. Ya en 1827 Richard Bright destacaba la alta frecuencia de hemorragia purpúrica en pacientes con IRC. De hecho, la progresión natural de la enfermedad lleva a la hemorragia, determinante mayor de mortalidad hasta el advenimiento de la hemodiálisis. En 1974, a pocos años de introducirse ese tratamiento dialítico, Lindner y colaboradores, advertían respecto al acelerado desarrollo de arteriosclerosis y de su complicación trombótica como causa de muerte en sus pacientes. Este viraje en el enfoque del problema hemostático se confirma al constatar la menor frecuencia de publicaciones recientes sobre la patogenia de la hemorragia en IRC en comparación con el creciente interés en aclarar los mecanismos de la aterosclerosis y trombosis asociada al síndrome urémico, principal causa de muerte en pacientes en diálisis crónica.

Patogenia

El agravamiento metabólico producido durante el curso natural de la IRC no modificada por la diálisis conduce en forma inexorable a la hemorragia. Existe un defecto de hemostasia primaria, comprometiendo los fenómenos dependientes de la interacción plaqueta-endotelio y que clínicamente se manifiesta por hemorragias cutáneas y mucosas. La tabla 21-12 resume las alteraciones descritas en los distintos componentes del sistema de hemostasia primaria que explican la tendencia hemorrágica. Dejando de lado algunas discrepancias entre las diversas publicaciones, la observación de la tabla indica que existiría anomalía en casi todas las etapas del proceso de hemostasia primaria. De hecho, en los últimos 25 años se ha podido anticipar que cada nuevo avance en el conocimiento de los mecanismos de disfunción plaquetaria, de alteraciones del FVW y de la patología vascular iba seguido de cerca por la descripción de similar alteración en los pacientes con IRC.

Tabla 21-12 Patogenia del defecto hemorrágico en la uremia

Alteraciones de la función plaquetaria
- Defecto de agregación de las plaquetas
- Defecto de secreción de las plaquetas
- Aumento de actividad de adenilil ciclasa, de cAMP y cGMP plaquetarios
- Disminución de ADP, ATP y 5-HT granulares
- Defecto en la liberación de calcio intraplaquetario
- Defecto en metabolismo del araquidonato, con síntesis disminuida de TxA ₂
- Defecto de glicoproteínas Ib y IIb-IIIa de membrana plaquetaria
Disminución de la concentración de plaquetas o de la masa plaquetaria total
Defectos cualitativos y/o cuantitativos del factor von Willebrand
Alteración de la relación plaquetas-pared vascular
- Defecto de adhesividad plaquetaria al subendotelio
- Aumento de la producción de prostaciclina
- Aumento de la producción de óxido nítrico, inducido por ácido guanidinosuccínico
Activación sistémica de la coagulación
Activación de la fibrinólisis sistémica
Contribución de la anemia

La mayoría de los estudios sobre el defecto hemostático en la uremia ha abordado aisladamente la patogenia de la hemorragia y la aterotrombosis, asumiendo implícitamente que son procesos independientes. Sin embargo, está bien documentado que la IRC cursa con un proceso inflamatorio sistémico, con aumento de citoquinas inflamatorias, reacción de fase aguda, disfunción endotelial y activación del sistema de la coagulación y de la fibrinólisis, todos procesos presentes desde fases tempranas de la enfermedad. El conjunto de estos procesos determina un perfil de laboratorio muy similar al de la CID crónica, subclínica, en que la progresión de estos procesos y el balance entre ellos puede determinar la tendencia clínica: hemorragia o trombosis. Estos procesos ocurren durante el curso natural de la enfermedad, en ausencia de tratamiento dialítico.

El defecto de hemostasia primaria se pesquisa por prolongación del TS presente en más de 50% de los pacientes con IRC (creatinina sérica promedio de 11 mg/dL) antes de ingresar a programas de hemodiálisis. Siendo el único método disponible para detectar fallas de hemostasia primaria *in vivo*, el TS se ha usado como indicador de riesgo de hemorragia. Sin embargo, la información disponible es aún insuficiente para afirmar que dicha prueba sea un buen predictor de hemorragia. De hecho, la hemorragia clínica es infrecuente en pacientes con IRC en etapa pre-dialítica, aún con TS anormalmente prolongado. Sin embargo, los pacientes pueden presentar hemorragias graves, particularmente en relación a cirugía, trauma o lesiones anatómicas del tubo digestivo. La diálisis, extracorpórea o peritoneal, compensa metabólicamente a los pacientes, impidiendo que la incidencia de hemorragias aumente notoriamente con la progresión de la enfermedad. Al contrario, como se indicó antes, la IRC en sus etapas avanzadas en diálisis se asocia más a complicaciones aterotrombóticas.

La tabla 21-12 muestra que las anomalías propuestas para explicar el porqué del alargamiento del TS son multifactoriales. El TS se correlaciona en forma directa con creatinina sérica, disfunción plaquetaria, reducción del ATP intraplaquetario e intensidad de la anemia. Entre éstos, sin embargo, los únicos determinantes independientes del TS son la creatinina sérica y el defecto funcional plaquetario. Es poco probable que cada uno de los defectos enumerados en la tabla tenga una patogenia independiente del resto y sí es factible que la mayoría de ellos estén encadenados en una

cascada patogénica jerarquizada, con factores causales anteriores, capaces de desencadenar el desequilibrio hemostático. Tradicionalmente se ha atribuido el defecto hemostático a una alteración funcional plaquetaria, y se han comunicado alteraciones de adhesión, agregación, secreción y actividad procoagulante plaquetarias. Sustancias ajenas a las plaquetas, presentes en el plasma urémico (“toxinas urémicas”), parecen ser relevantes en la patogenia de estos defectos. Ello explicaría que la transfusión de plaquetas sea generalmente inefectiva en el manejo de la hemorragia y en la corrección del TS en la uremia. Entre las posibles toxinas urémicas, el ácido guanidinosuccínico, se ha descrito recientemente como inductor de la síntesis de NO por plaquetas y endotelio, lo que podría explicar disminución de la respuesta plaquetaria a agonistas, el defecto de adhesión y la prolongación del TS. En esta línea, se ha observado que el TS se acorta con la administración de monometil-L-arginina, inhibidor de la producción de óxido nítrico (NO), en voluntarios sanos. Por otro lado, la activación de la coagulación (con aumento de la generación intravascular de trombina) y de la fibrinólisis (con aumento de la producción de plasmina), relacionadas al proceso inflamatorio urémico, podrían dar cuenta de los defectos granulares y de glicoproteínas de membrana, que contribuyen en la disfunción plaquetaria.

Los pacientes con IRC, ya antes de ingresar a programas de diálisis, tienen aumento de proteínas de fase aguda en el plasma, por ej., fibrinógeno, proteína C reactiva, α -1 antitripsina. Asimismo, la concentración de FVW, proteína sensible a la inflamación, está generalmente aumentada en el plasma; este aumento se acompaña de una actividad comúnmente normal de su función, medida como cofactor ristocetina. La distribución multimérica del FVW es también normal. La disociación entre concentración antigénica y función del FVW, con aumento del primero, compensaría la relativa deficiencia funcional, por lo que se estima que las alteraciones del FVW no tienen participación mayor en la patogenia del defecto de adhesividad plaquetaria.

La anemia de la IRC se relaciona a la prolongación del TS y, en estudios *ex vivo*, con el defecto de adhesividad plaquetaria. La corrección de la anemia mejora parcialmente el defecto de hemostasia primaria. Este mecanismo no es exclusivo de la IRC y se presenta en anemias de otras etiologías, pero debe tenerse en cuenta en

el tratamiento y prevención de hemorragias en los pacientes urémicos.

El consumo de drogas que inhiben la función plaquetaria potencia el defecto de hemostasia primaria aumentando el riesgo de hemorragia. Algunos pacientes presentan, además, trombocitopenia; ésta, que habitualmente es leve, puede orientar respecto a la etiología de la IRC, pero si el conteo es superior a 100.000 plaquetas/ μ L, el hallazgo tiene baja incidencia en la manifestación hemorrágica.

Tratamiento

Diversas terapias se han propuesto para prevenir o tratar la hemorragia urémica (tabla 21-13). El ingreso de los pacientes a programas de diálisis detiene la progresión del deterioro metabólico y disminuye notoriamente la incidencia de hemorragias en relación a la era pre-dialítica. No existe consenso respecto al mecanismo de esta mejoría, y específicamente hay controversia si la diálisis mejora o empeora la función plaquetaria *ex vivo*.

Tabla 21-13. Tratamiento del defecto hemorrágico en la uremia

Hemodiálisis o peritoneodiálisis Corrección de la anemia: transfusión de eritrocitos o administración de eritropoyetina Transfusión de crioprecipitados Desmopresina Estrógenos conjugados Inhibidores de NO sintetasa Ácido tranexámico

La corrección del hematocrito a niveles sobre 30%, por transfusión de eritrocitos o por tratamiento con eritropoyetina recombinante, acorta el TS y parece disminuir las hemorragias en la IRC. Algunos autores reportan también una mejoría de la adhesión y agregación plaquetarias inducidas por eritropoyetina, independiente del alza de hematocrito.

La transfusión de crioprecipitados se usó inicialmente en forma empírica, observándose un acortamiento transitorio del TS que facilita la realización de procedimientos quirúrgicos o invasivos en pacientes con IRC. Su mecanismo de acción permanece aún desconocido, aunque se asoció al aumento en el plasma de la concentración de componentes del complejo FVW/FVIII. El uso de crioprecipitados se ha discontinuado por los riesgos inherentes a su transfusión, por el desconocimiento de su mecanismo de acción y porque su eficacia no ha sido confirmada. En la actualidad su uso se ha reemplazado por la 1-deamino-8-D-arginina vasopresina (desmopresina), un análogo de la hormona antidiurética sin efecto vasopresor, y que constituye uno de los pilares en el tratamiento o prevención de la hemorragia urémica. En dosis de 0.3 mg/kg, diluido en 50-100 mL de solución salina y con infusión endovenosa lenta (30-45 minutos), acorta el TS en una proporción variable de pacientes

urémicos (hasta 75%). El efecto sobre el TS es transitorio, (alrededor de 4 horas), asociado a aumento de FVIII:c, FVW:Ag y FVW:RCo y aparición en la circulación de multímeros de alto peso molecular. Por otro lado, en pacientes urémicos con niveles muy elevados de componentes del complejo FVW/FVIII, algunos investigadores no han observado acortamiento del TS después de la administración de desmopresina. Mecanismos distintos a cambios cualitativos o cuantitativos del complejo FVW/FVIII pueden estar involucrados en el efecto benéfico de la desmopresina, ya que, como se discutió antes, no existe evidencia aún de que alteraciones de este complejo participen en la patogenia de la hemorragia urémica. Los efectos adversos asociados a la administración de esta droga incluyen taquicardia, enrojecimiento facial, retención de agua e hiponatremia, aunque estos últimos dos efectos no se presentan en pacientes con deterioro grave de la función renal.

El uso de estrógenos conjugados, en dosis de 0.6 mg/kg/día durante 5 días induce un acortamiento del TS, detectable entre los días 5 y 7 y que se prolonga hasta 2 semanas. Esta terapia no es efectiva si se requiere una inmediata mejoría del TS, pero es la única que produce un acortamiento prolongado del TS cuando se busca un efecto hemostático duradero. El mecanismo

de acción de los estrógenos se explicaría por su capacidad de reducir la expresión de NO sintetasas y, consecuentemente, limitar la síntesis de NO endotelial y plaquetario en la uremia, mecanismo postulado para explicar la anormalidad del TS. En efecto, se ha comunicado que la inhibición de la síntesis de NO en voluntarios sanos mediante administración experimental de monometil-L-arginina acorta el TS, pero esta aproximación terapéutica no ha sido probada en pacientes con IRC.

El ácido tranexámico, en dosis orales de 20-25 mg/kg/día durante 6 días acorta el TS en 67% de los pacientes con IRC avanzada antes de ingresar a programas de diálisis. Este efecto ya se evidencia en algunos enfermos después de 1-2 días de tratamiento. El ácido tranexámico mejora también la agregación y secreción plaquetarias *ex vivo*. Esta sustancia desplaza al plasminógeno de la superficie de la fibrina, pues ocupa los sitios de unión a lisina del plasminógeno, inhibiendo su unión a residuos de lisina en la malla de fibrina. En la IRC, el efecto del ácido tranexámico sobre las variables de hemostasia primaria parece mediado por inhibición de la actividad, no de la generación, de plasmina, pues se asocia a normalización de los niveles plasmáticos de productos de degradación de fibrinógeno/fibrina, pero sin reducción de los complejos plasmina-antiplasmina en la circulación. Simultáneamente, se observa una caída de la concentración de plasminógeno, probablemente por depuración acelerada de los complejos plasminógeno-ácido tranexámico. Estas observaciones sugieren que la fibrinolisis juega un papel importante en la patogenia del defecto de hemostasia primaria en la uremia.

a2) Anomalía funcional de las plaquetas en insuficiencia hepática

Patogenia

El riesgo de sangrado en pacientes con insuficiencia hepática crónica es alto. Además de la hipertensión portal (várices esofágicas, hemorroides, gastritis), que precipitan la hemorragia, con frecuencia se observa esplenomegalia con hiperesplenismo y leve trombocitopenia, activación intravascular de los sistemas de la coagulación y fibrinolisis, disfibrinogenemia y coagulación intravascular diseminada subclínica. Alrededor de 40% de los pacientes con cirrosis hepática presentan TS prolongado, relacionado a la gravedad del daño hepático, medido por aumento de bilirrubina

sérica. Esta alteración de hemostasia primaria debiera ser considerada durante la evaluación de pacientes para procedimientos invasivos o cirugía. La prolongación del TS podría explicarse por defectos de adhesión y de agregación plaquetaria, también descritos en cirrosis hepática de diversas patogenias. El defecto funcional se ha confirmado usando un analizador de función plaquetaria desarrollado recientemente (PFA-100), y que detecta bien el efecto de la anemia en la disfunción hemostática.

Se han propuesto varias causas para explicar los defectos plaquetarios. La situación de proteólisis aumentada, a través de plasmina, trombina u otras proteasas, podría inducir una activación intravascular de las plaquetas. En efecto, a plasmina y otras proteasas se les ha atribuido la reducción de actividad cofactor ristocetina del FVW circulante en esta enfermedad. Disminución del contenido de ácido araquidónico en la membrana, aumento de productos de degradación de fibrinógeno-fibrina y síntesis de fibrinógeno cualitativamente anormal podrían contribuir también al defecto de agregación plaquetaria descrito. En estos enfermos se ha comunicado que 64% de pacientes con enfermedad hepática crónica de diferentes etiologías presentan autoanticuerpos plaquetarios, dirigidos contra glicoproteínas Ib, IIb-IIIa o ambas, hallazgo que no está relacionado al recuento de plaquetas en sangre o a la etiología de enfermedad hepática. Estas observaciones podrían contribuir al defecto de agregación y reducción cuantitativa de GPIb en la cirrosis hepática. La progresión de esta enfermedad se asocia con aumento de la producción de óxido nítrico. Este aumento se ha demostrado específicamente en neutrófilos y monocitos de pacientes cirróticos, que al ser coincubados con plaquetas inducen un mayor aumento de cGMP y mayor inhibición de la agregación que la observada con neutrófilos y monocitos obtenidos de sujetos control.

Tratamiento

Para manejar el riesgo hemorrágico en pacientes con cirrosis se ha empleado desmopresina, que administrada en forma intravenosa o subcutánea acorta el TS. No se ha demostrado que la transfusión de concentrados plaquetarios sea de utilidad para acortar el TS o mejorar la función plaquetaria en esta enfermedad. Incluso, la recuperación post-transfusional de plaquetas en pacientes con hiperesplenismo está disminuida en proporción inversa al tamaño del bazo.

a3) Alteraciones plaquetarias inducidas por la cirugía con circulación extracorpórea

Patogenia

La CEC se complica de hemorragias en 5-10% de los pacientes, frecuencia bastante mayor que la cirugía común. Aunque en más de 50% de los casos esta complicación es de causa quirúrgica, el resto responde a una alteración del sistema hemostático. Descontando el hecho de que una proporción de pacientes llega a la cirugía usando drogas antiplaquetarias, la patogenia del trastorno hemostático es multifactorial: heparinización del paciente, disminución de la concentración de plaquetas y factores de la coagulación por hemodilución y consumo, activación de la fibrinólisis, contacto de la sangre con superficies no biológicas, hipotermia, traumatismo celular, interfase gas-sangre, perturbaciones reológicas. Sin embargo, la más significativa de las alteraciones es la disfunción plaquetaria asociada a la CEC, un factor causal mayor de hemorragia, y presente tanto con el uso de oxigenadores de burbuja como de membrana. Los potenciales factores adversos presentes durante la CEC que explicarían las alteraciones cuantitativas y funcionales de las plaquetas actúan a través de activación plaquetaria, fragmentación celular y daño de membrana: (a) La activación plaquetaria puede ser causada por varios factores: adhesión y agregación de las plaquetas a fibrinógeno adsorbido en superficies del circuito extracorpóreo, trauma mecánico, exposición de las plaquetas a trazas de trombina, plasmina, ADP o proteasas derivadas de activación del complemento, hipotermia o, en el caso de los oxigenadores de burbuja, a la interfase aire-sangre; (b) La fragmentación celular, inducida por el traumatismo físico, la activación de las plaquetas o la activación del complemento, produce micropartículas plaquetarias que circulan y exponen fosfolípidos procoagulantes; (c) El daño de membrana se expresa en reducción del número de receptores de fibrinógeno, de GPIIb, o de receptores α_2 adrenérgicos. Todas estas noxas se traducen en prolongación del TS, reducción de la agregación y secreción plaquetarias *ex vivo*, reducción de la aglutinación plaquetaria con ristocetina, deficiencia del compartimiento de depósito por liberación de contenidos de gránulos densos y alfa y aparición de micropartículas plaquetarias en la circulación.

En general, la intensidad de las alteraciones plaquetarias está relacionada a la duración de

la CEC y ellas revierten espontáneamente varias horas después de terminada la cirugía. Dicha reversibilidad es un factor importante a considerar cuando se evalúa reintervenciones quirúrgicas en pacientes con hemorragias a través de drenajes, pues el tiempo juega a favor de la resolución espontánea de la complicación.

Tratamiento

No está demostrado que la realización de TS preoperatorio identifique a los pacientes con tendencia a sangrar más durante la cirugía con CEC y sin historia clínica previa de hemorragias anormales. La transfusión profiláctica de plaquetas para prevenir una excesiva hemorragia quirúrgica no es una buena indicación en el paciente habitual, pero la transfusión debe estar fácilmente accesible en enfermos con reintervenciones o con cirugías prolongadas. La complicación hemorrágica se controla habitualmente bien mediante la transfusión de plaquetas. Estos pacientes también pueden responder a la infusión de DDAVP. Si la hemorragia no es controlada con estas medidas, generalmente se considera la reexploración quirúrgica para identificar el sitio dominante de la hemorragia.

En los últimos años se ha propiciado el uso de aprotinina, un péptido inhibidor de serín-proteasas, para reducir el sangrado intra y postoperatorio y limitar el empleo de transfusiones en pacientes sometidos a cirugía con CEC. El efecto de la aprotinina sería mediado por su acción anticoagulante, antifibrinolítica y, posiblemente, antiinflamatoria. No existe evidencia suficiente aún para afirmar que la droga reduce la activación plaquetaria inducida por plasmina y otras proteasas. La dosificación usual de aprotinina (280 mg en 20 minutos inmediatamente antes de la cirugía, 280 mg en la solución de cebado del circuito e infusión continua de 70 mg/hora durante la operación), se ha demostrado que reduce significativamente el sangrado en estos pacientes. El uso repetido de aprotinina puede complicarse con reacciones anafilácticas al péptido. Estudios recientes revelan que el ácido tranexámico, en dosis de 1g intravenoso en 20 minutos antes de la incisión quirúrgica, 500 mg en la solución de cebado e infusión continua de 400 mg/hora durante la operación, tiene un efecto similar a la aprotinina en el control del sangrado en pacientes con cirugía con CEC electiva. El costo del ácido tranexámico es significativamente menor que el de aprotinina, un aspecto muy importante a considerar cuando se decide la

terapia en estos pacientes.

Se están introduciendo al uso clínico circuitos extracorpóreos recubiertos de heparina para limitar la activación de la coagulación y de las plaquetas. Los primeros resultados son satisfactorios en cuanto reducen la activación plaquetaria *in vivo* y la pérdida de sangre postoperatoria.

a4) Disfunción plaquetaria en leucemias, mielodisplasias y disproteinemias

Patogenia

Variadas alteraciones morfológicas y funcionales de las plaquetas se han descrito en enfermedades mieloproliferativas crónicas: alteraciones de forma y tamaño, alteraciones de agregación y secreción en respuesta a agonistas habituales (ADP, epinefrina, colágeno), defecto de actividad procoagulante. Estas anomalías pueden originarse a nivel de receptores para algunos agonistas en la membrana plaquetaria, en la liberación y metabolización del ácido araquidónico, en la transducción de estímulos o en deficiencia de contenidos granulares. Alrededor de 30% de los pacientes pueden presentar hemorragias mucocutáneas en algún momento de su evolución. Paradójicamente, en este grupo de enfermedades, una proporción de enfermos puede también complicarse con trombosis arterial o venosa. No existe factores que anticipen el riesgo de hemorragia o trombosis en estos pacientes y las pruebas de laboratorio comúnmente usadas (TS, conteo de plaquetas, agregación y secreción plaquetaria *in vitro*), no sirven para predecir el riesgo de una u otra complicación.

Alteraciones similares a las anteriores se han descrito en leucemias agudas, síndromes mielodispásticos y leucemia por células peludas. Sin embargo, es la trombopenia habitual de estas enfermedades la que condiciona mayormente el riesgo de hemorragia.

Anomalías de la función plaquetaria se observan también en pacientes con mieloma múltiple IgA, IgG, macroglobulinemia de Waldenström y, ocasionalmente en gammapatía monoclonal benigna. El TS puede estar prolongado así como puede observarse alteraciones de agregación y secreción plaquetarias, retracción del coágulo

y limitación de la actividad procoagulante de las plaquetas. Los defectos plaquetarios son causados por la proteína monoclonal y están directamente relacionados a la concentración de la paraproteína, que puede adsorberse a la membrana plaquetaria. En efecto, la anomalía puede corregirse al normalizar la concentración de la proteína o puede reproducirse al incubar plaquetas normales con el plasma disproteínico.

Debe tenerse claro que estas afecciones se asocian a otras causas de hemorragia, como síndrome de hiperviscosidad, trombocitopenia por compromiso medular, amiloidosis con deficiencia adquirida de factor X, activación de la fibrinólisis y alteraciones en la polimerización de la fibrina. En la mayoría de los casos, una o más de estas anomalías explican la hemorragia.

Tratamiento

La prevención y manejo de hemorragias están orientados al control de la enfermedad basal. Como las alteraciones son intrínsecas a las plaquetas, la transfusión de plaquetas es la terapia de elección, aunque de efecto transitorio.

3.2.2. Disfunciones plaquetarias inducidas por drogas y alimentos

El uso de drogas es la causa más frecuente de disfunción plaquetaria adquirida, y la lista de drogas reportadas con efecto antiplaquetario supera las 100. La importancia clínica de este efecto es variada: sólo para escasas drogas que prolongan el TS existe evidencia inequívoca de asociación causal a hemorragias; otras se asocian a prolongación del TS, pero no se ha demostrado que su empleo cause sangrado patológico; en fin, otras pueden solamente afectar la función de las plaquetas *ex vivo* o *in vitro*. En relación a drogas involucradas en hemorragias, su efecto antiplaquetario no es habitualmente suficiente por sí para causar una hemorragia en individuos sanos, pero su combinación con otras condiciones que afectan la hemostasia (por ej., cirugía, infecciones, enfermedad de von Willebrand subyacente, tratamiento anticoagulante), exacerbaban el riesgo de sangrado patológico. Un listado con drogas asociadas a disfunción plaquetaria se presenta en la tabla 21-14.

Tabla 21-14. Drogas y otras sustancias que inhiben la función plaquetaria

Antiinflamatorios no esteroidales Aspirina Indometacina, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, fenilbutazona, otros
Sustancias desarrolladas primariamente como drogas antiplaquetarias Inhibidores del receptor de ADP: ticlopidina, clopidogrel Antagonistas de GPIIb-IIIa: anticuerpos monoclonales (abciximab), péptidos cíclicos (epitifibatide), peptidomiméticos (tirofiban, lamifiban)
Antibióticos β-lactámicos: penicilinas, cefalosporinas. Otros: nitrofurantoínas, miconazole
Drogas que afectan la hemostasia: anticoagulantes, fibrinolíticos, antifibrinolíticos. Heparina Estreptoquinasa, activador tisular del plasminógeno, uroquinasa Otros: sulfato de protamina, ácido e-aminocaproico
Drogas que aumentan el cAMP y cGMP plaquetarios Dipiridamole, prostaciclina y análogos Nitroglicerina y similares, nitroprusiato
Otras drogas usadas en enfermedades cardiovasculares Diltiazem, nifedipino, nimodipino, verapamil, quinidina
Expandidores de volumen Dextrano, hidroxietil-almidón
Drogas psicotrópicas Amitriptilina, imipramina, nortriptalina, clorpromazina, flufenazina, prometazina, trifluoperazina, haloperidol
Anestésicos Locales: procaína, tetracaína, cocaína, butacaína, dibucaína, otras... Generales: halotano
Drogas oncológicas Daunorrubicina, mitramicina, BCNU, quimioterapia combinada, vincristina, otros
Antihistamínicos Clorfeniramina, difenilhidramina, otros.
Medios de contraste Iopamidol, iotalamato, ioxalato, diatrizoato
Etanol
Alimentos, especias y vitaminas Ácidos grasos omega-3, extracto de cebolla, ajoene, cúrcuma, comino, vitaminas E y C, otros.

(Tabla adaptada de George J.N. y Shattil S.J., *N Engl J Med* 1991; 324: 27-39).

Algunas drogas han sido específicamente diseñadas para interferir la función plaquetaria y ser usadas en la prevención o tratamiento de trombosis arteriales. Entre ellas, ticlopidina y clopidogrel, (dirigidas contra el receptor P2Y12 del ADP en plaquetas), y antagonistas del complejo glicoproteico IIb-IIIa (anticuerpos monoclonales, péptidos cíclicos y peptidomiméticos). Otros analgésicos antiinflamatorios, como la aspirina y el grupo de los antiinflamatorios no esteroideos, no diseñados originalmente como antitrombóticos, inhiben también la función plaquetaria. Aunque esta alteración se puede asociar a prolongación

del TS, prueba que mide hemostasia primaria *in vivo*, una minoría de los pacientes presenta síntomas hemorrágicos derivados de su empleo.

b1) Aspirina y antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

La aspirina (ácido acetilsalicílico) es la droga que acumula la evidencia más convincente de que su acción antiplaquetaria tiene relación con sangrado anormal. La aspirina acetila irreversiblemente la serina en posición 529 de la ciclooxigenasa plaquetaria, cerca del sitio catalítico de la enzima. El grupo acetilo obstruye

el canal hidrofóbico de la enzima por donde el ácido araquidónico accede a su sitio activo, bloqueando así su metabolización a endoperóxidos cíclicos PGG₂ y PGH₂, y por ende, la síntesis de tromboxano A₂. Esta inhibición ocurre por toda la vida de la plaqueta en la circulación. Por su parte, los antiinflamatorios no esteroideos, como el ibuprofeno, inhiben en forma competitiva, reversible, el sitio catalítico de la ciclooxigenasa, bloqueando la síntesis de tromboxano por algunas horas, mientras dura el efecto de la dosis administrada.

La aspirina y AINEs prolongan el TS y bloquean la agregación y secreción plaquetarias, sin afectar la adhesividad. En individuos sanos la prolongación del TS causada por aspirina en dosis única tan baja como 80 mg/kg es modesta (1.2 a 2 veces el tiempo pre-droga). La prolongación del TS es significativamente mayor en individuos con defectos hemostáticos preexistentes, hereditarios o adquiridos, por ej., en individuos con hemofilia o enfermedad de von Willebrand o en pacientes urémicos. La anomalía en la agregación plaquetaria inducida por aspirina puede durar hasta una semana, hasta que una suficiente proporción de plaquetas no afectadas reemplaza en la circulación a las inhibidas por la droga. Idéntico efecto produce la aspirina sobre la ciclooxigenasa endotelial; sin embargo, éste es de corta duración, presumiblemente por la capacidad de la célula endotelial de resintetizar ciclooxigenasa. En contraste con la aspirina, la prolongación del TS inducida por la mayoría de los AINEs es de corta duración, usualmente, 4-8 horas.

El significado clínico de la ingestión de aspirina sobre la hemostasia de individuos aparentemente sanos es poco claro. Si bien aumenta la frecuencia e intensidad de equimosis, epistaxis y pérdida de sangre por el tubo digestivo, estas manifestaciones son habitualmente de poca relevancia clínica. La gastritis hemorrágica ocasionalmente se asocia al uso de aspirina. Algunos estudios revelan aumento del sangrado quirúrgico, especialmente en cirugía con CEC, en pacientes bajo efecto de aspirina, pero otros no confirman estos hallazgos; en todo caso, ellos no se acompañan de mayor morbilidad perioperatoria. Se recomienda, sin embargo, evitar el uso de aspirina en cirugías en que aún sangrados de baja magnitud son riesgosos, por ejemplo, neurocirugía, cirugía ocular. Debe tenerse en cuenta, además, que el etanol u otras drogas

con efecto antiplaquetario pueden potenciar la inhibición inducida por aspirina.

b2) Antibióticos β-lactámicos

Varios antibióticos que comparten un anillo β-lactámico prolongan el TS y alteran la agregación plaquetaria y la aglutinación inducida por ristocetina. Dicho efecto está relacionado a la dosis, aparentemente es reversible, y es muy frecuente en el ambiente clínico hospitalario. El efecto aparece 1-3 días después del inicio de la terapia y se observa especialmente en pacientes que reciben altas dosis de estos antibióticos. Sin embargo, el contexto clínico en que se observa el defecto, (enfermos graves y con otras alteraciones hemostáticas), impide atribuir las eventuales hemorragias a la disfunción plaquetaria.

b3) Heparina y fibrinolíticos

La heparina no sólo inhibe la generación y acción de trombina, sino también afecta la función plaquetaria. Esta acción parece estar mediada por la menor disponibilidad de trombina, por interacción de la heparina con receptores plaquetarios y por reducción de las funciones plaquetarias dependientes de FVW, posiblemente por unión de heparina a dominios específicos del FVW. Sin embargo, no existe evidencia directa que culpe a las plaquetas de contribuir a las hemorragias causadas por la terapia con heparina.

El uso en dosis farmacológicas de estreptoquinasa, activador tisular del plasminógeno (t-PA) y de uroquinasa se asocia a hemorragia. En su patogenia se reconoce efecto combinado de la hiperfibrinólisis y de lesiones de vasos sanguíneos. La generación intravascular de plasmina altera la función plaquetaria por varios mecanismos, observándose tanto efectos de activación *in vivo*, como inhibición de la función plaquetaria: ésta puede explicarse por refractariedad posterior a su activación, por inhibición de la agregación inducida por las altas concentraciones de productos de degradación de fibrinógeno/fibrina, por degradación de GPIIb y posiblemente de GPIIb-IIIa, y por desagregación de plaquetas mediada por efecto de plasmina sobre el fibrinógeno que está cohesionando las plaquetas en un agregado. En todo caso, no existe evidencia sólida que implique a estos defectos plaquetarios en la patogenia de las hemorragias observadas

durante el tratamiento trombolítico. Sin embargo, además de la suspensión de las drogas fibrinolíticas y de la reposición de fibrinógeno, empíricamente se transfunde plaquetas para mejorar la hemostasia primaria en estos pacientes.

b4) Drogas que aumentan la concentración de cAMP y cGMP en plaquetas

El aumento de cAMP en las plaquetas prolonga el TS e inhibe la activación plaquetaria. Dicho aumento es inducido por drogas que estimulan la adenilil ciclasa (infusión de PGE1, prostaciclina y análogos estables) así como por drogas que inhiben la fosfodiesterasa plaquetaria (dipiridamol, cafeína, teofilina). Sin embargo, no existe evidencia inequívoca que el empleo de estas sustancias se complique de hemorragias.

La inhalación de NO y drogas que aumentan el cGMP en las plaquetas, como nitroprusiato, producen inhibición de la agregación/secreción plaquetarias y prolongan el TS; sin embargo, la traducción clínica de estas observaciones no se conoce.

b5) Expansores de volumen

El dextrano 40 o 70 kDa infundido se adsorbe a la superficie de las plaquetas y puede interferir la agregación, secreción y actividad procoagulante plaquetarias por varias horas. Dichos efectos se acompañan en una proporción de pacientes con prolongación del TS. Por estas razones se ha usado el dextrano en la profilaxis de trombosis perioperatoria. No se ha reportado sangrado excesivo con su empleo, excepto si se asocia a heparina. También, altas dosis de hidroxietil almidón (> 20 ml/kg) pueden predisponer a sangrado anormal, especialmente si se asocia a heparina en dosis profiláctica.

b6) Otras sustancias y fármacos

Como se enumera en la tabla 21-14, numerosas otras drogas, alimentos o condimentos se han relacionado con inhibición de la función plaquetaria. La traducción clínica de estos efectos es infrecuente, de poca relevancia, y su comunicación en la literatura es mayoritariamente anecdótica. La irrelevancia clínica de estos efectos se ejemplifica con el uso de inhibidores de la recaptura de serotonina en el tratamiento de la enfermedad depresiva; consistentemente inducen una reducción del contenido de serotonina intraplaquetaria, lo que se puede reflejar en un falso defecto de la

secreción plaquetaria *ex vivo* cuando la prueba se realiza mediante marcaje de plaquetas con serotonina radioactiva; sin embargo, estas drogas no afectan el TS y la agregación plaquetaria es normal. Asimismo, existe abundante literatura que relaciona el efecto de los ácidos grasos omega-3 con la reducción de agregación/secreción plaquetarias y prolongación del TS. En este caso los ácidos omega -3, entre ellos el eicosapentaenoico, desplazan parcialmente al ácido araquidónico en los fosfolípidos de membrana, disminuyendo la producción de tromboxano A₂; simultáneamente, la metabolización de eicosapentaenoico concluye en la generación de tromboxano A₃, sin la capacidad agonista de las plaquetas y actividad vasoconstrictora que tiene el tromboxano A₂. Sin embargo, la ingestión de ácidos grasos omega-3 o de peces ricos en estas sustancias, no se asocia con sangrado anormal. Extractos de cebolla, ajoene, que corresponde a un compuesto obtenido del ajo, cúrcuma y otros condimentos y alimentos también son inhibidores de la función plaquetaria, sin mayor relevancia en sangrado anormal.

LECTURAS SUGERIDAS

Trombocitopenias

a) Hereditarias

Balduini, C.L., Iolascon, A., Savoia, A. "Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy". *Haematologica*; 87: 860-880, 2002.

Bussel, J.B. "Congenital hereditary familial thrombocytopenias" In: **Hematology**, Broudy, V.C., Berliner, N., Larson, R.A., Leung, L.L. (eds.) American Society of Hematology, Washington DC. 2004, pp. 390-397.

b) Adquiridas

Aster, R.H. "Platelet-specific alloantigen systems: History, clinical significance and molecular biology" In: **Alloimmunity**, Nance S.T., (Ed). American Associations of Blood Banks, 1993.

Blake, J.C., Sprengers, D., Grech, P., McCormick, P.A., McIntyre, N., Burroughs, A.K. "Bleeding time in patients with hepatic cirrhosis". *BMJ*; 301: 12-15, 1990.

Blanchette, V.S., Johnson, J., Rand, M. "The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia". *Baillière's Clinical Haematology*; 13: 365-390, 2000.

Burgess, J.K. "Molecular mechanisms of drug-induced thrombocytopenia". *Curr Opin Hematol*; 8: 294-298, 2001.

Burrows, R.F. "Platelet disorders in pregnancy". *Curr Opin Obstet Gynecol*; 13: 115-119, 2001.

Bussel, J., Cines, D. "Immune thrombocytopenic purpura, neonatal alloimmune thrombocytopenia, and post-transfusion purpura" In: **Hematology. Basic Principles and Practice**. Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J. and Silberstein, L.E. (Eds.) Churchill Livingstone, New York. 1995, pp. 1849-1870.

George, J.N., Raskob, G.E., Shah, S.R., Rizvi, M.A., Hamilton, S.A., Osborne, S., et al. "Drug-induced thrombocytopenia: a systematic review of published case reports". *Ann Intern Med*; 129: 886-890, 1998.

George, J.N., Woolf, S.H., Raskob, G.E., Wasser, J.S., Aledort, L.M., Ballem, P.J., et al. "Idiopathic thrombocytopenic purpura: A practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology". *Blood*; 88: 3-40, 1996.

George, J.N. "Thrombocytopenia due to diminished or defective platelet production" In: **Hematology**; Nueva York. McGraw-Hill, Inc., 1995, pp. 1281-1289.

Greinacher, A. "Heparin-induced thrombocytopenia—pathogenesis and treatment". *Thromb Haemost*; 82 Suppl 1:148-56, 1999.

Lucas, G.F., Metcalfe, P. "Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms". *Transfus Med* 2000 Sep;10(3):157-174.

Mannucci, P.M., Canciani, M.T., Forza, I., Lussana, F., Lattuada, A., Rossi, E. "Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor". *Blood*; 98: 2730-2735, 2001.

Moake, J.L., Chow, T.W. "Thrombotic thrombocytopenic purpura: understanding a disease no longer rare". *Am J Med Sci*; 316: 105-119, 1998.

Murphy, M.F., Metcalfe, P., Waters, A.H. "Incidence and mechanism of neutropenia and thrombocytopenia in patients with human immunodeficiency virus infection". *Br J Haematol*; 66: 337-340, 1987.

Pereira, J., Accatino, L., Alfaro, J., Brahm, J., Hidalgo, P., Mezzano, D. "Platelet autoantibodies in patients with chronic liver disease". *Am J Hematol*; 50: 173-178, 1995.

Pereira, J. "Polymorphisms of platelet membrane glycoproteins: molecular biology, clinical associations and frequency of expression in Chilean and indigenous populations". *Haemostasis*; 28: 189-195, 1998.

Porcelijn, L., von dem Borne, A.E. "Immune-mediated thrombocytopenias: basic and immunological aspects". *Baillière's Clinical Haematology*; 11: 331-341, 1998.

Silver, R.M., Branch, W., Scott, J.R. "Maternal thrombocytopenia in pregnancy: time for a reassessment" *Am J Obstet Gynecol*; 173: 479-482, 1995.

Sutor, A.H., Gaedicke, G. "Acute autoimmune thrombocytopenia". *Baillière's Clinical Haematology*; 11: 381-389, 1998.

Tsai, H.M., Lian, E.C.Y. "Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura". *N Engl J Med*; 339: 1585-1594, 1998.

Trombocitopatías

a) Hereditarias

Ashby, B, Colman, R.W., Daniel, J.L., Kunapuli, S.P., Smith, J.B. "Platelet stimulatory and inhibitory receptors". In: **Hemostasis and Thrombosis. Basic principles & clinical practice**, 4ª edición, Filadelfia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp. 505-20.

Calvete, J.J. "Platelet integrin GP IIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins". *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:29-38

Clemetson, K.J., Clemetson, J.M. "Platelet collagen receptors". *Tromb Haemost* 2001; 86: 189-97.

- Coller, B.S., French, D.L. "Hereditary qualitative platelet disorders". In: **Williams Hematology 6^a** Edición, Nueva York, McGraw-Hill, 2001, pp. 1551-79.
- Coughlin, S.R. "Protease-activated receptors in vascular biology". *Thromb Haemost* 2001; 86:298-307.
- French, D.L. "The molecular genetics of Glanzmann's thromboasthenia". *Platelets* 1998; 9:5-20.
- Funk, C.D. "Platelet eicosanoids" In: **Hemostasis and Thrombosis. Basic principles & clinical practice**, 4^a ed., Filadelfia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp. 533-9.
- Gatchet, G. "ADP receptors of platelets and their activation". *Thromb Haemost* 2001; 86:222-32.
- Hayward, C.P.M. "Inherited platelet disorders". *Curr Opin Hematol* 2003; 10:362-368.
- Huizing, M., Anikster, Y., Gahl, W.A. "Hermansky-Pudlak syndrome and Chediak-Higashi syndrome: Disorders of vesicle formation and trafficking". *Thromb Haemost* 2001;86:233-45.
- Kroll, M.H., Hellum, J.D., McIntire, L.V., Schafer, A.I., Moake, J.L. "Platelets and shear stress". *Blood* 1996; 88:1525-1541.
- López, J.A., Andrews, R.K., Afshar-Kharghan, V., Berndt, M.C. "Bernard-Soulier syndrome". *Blood* 1998; 91:4397-4418.
- Miller, J.L., Castella, A. "Platelet-type von-Willebrand disease" *Tromb Haemost* 1996; 75:865-9.
- Nurden, A.T. "Inherited abnormalities of platelets". *Thromb Haemost* 1999; 82(2): 468-80.
- Rao, A.K., Gabbeta, J. Congenital disorders of platelet signal transduction". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:285-9.
- Rao, A.K. "Congenital disorders of platelet function: disorders of signal transduction and secretion". *Am J Med Sci* 1998; 316:69-76.
- Rivera, J., Lozano, M.L., Corral, J., Gonzalez-Conejero, R., Martinez, C., Vicente, V. "The platelet GPIb-IX-V complex: Physiological role". *J Physiol Biochem* 2000; 56:355-366.
- Solum, N.O. "Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2841-6.
- Rivera Pozo, J., Lozano Almela, M.L., Vicente García, V. "Trombopatías Congénitas. Bases Moleculares y Aspectos Clínicos" En: **Hematología**, García-Conde, J., San Miguel, J., Sierra, J., Urbano-Espizua, A., Vicente, V., Vives, J.L., Corrons, eds., ARÁN Eds, Madrid, Capit. 3.3, 2003, pp. 353-367.
- Watson, S.P, Asazuma, N., Atkinson, B., Berlanga, O., Best, D., Bobe, R., et al. "The role of ITAM and ITIM coupled receptors in platelet activation by collagen". *Tromb Haemost* 2001; 86: 276-88.
- b) Adquiridas**
- Casati, V., Guzzon, D., Oppizzi, M., Bellotti, F., Franco, A., Gerli, C., et al. "Tranexamic acid compared with high-dose aprotinin in primary elective heart operations: effects on perioperative bleeding and allogeneic transfusions". *J Thorac Cardiovasc Surg*; 120: 520-527, 2000.
- Cases, A., Escolar, G., Reverter, J.C., Ordinas, A., López-Pedret, J., Revert, L., et al. "Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients". *Kidney Int*; 42: 668-672, 1992.
- Cattaneo, M., Tenconi, P.M., Alberca, I., Vicente, V., Mannucci, P.M. "Subcutaneous desmopressin (DDAVP) shortens the prolonged bleeding time in patients with liver cirrhosis". *Thromb Haemost*; 64: 358-360, 1990.
- Davi, G., Ferro, D., Basili, S., Iuliano, L., Camastra, C., Giammarresi, C., et al. "Increased thromboxane metabolites excretion in liver cirrhosis". *Thromb Haemost*;79: 747-751, 1998.
- Escolar, G., Cases, A., Monteagudo, J., Garrido, M., López, J., Ordinas, A., et al. "Uremic plasma after infusión of desmopressin (DDAVP) improves the interaction of normal platelets with vessel subendothelium". *J Lab Clin Lab*; 114: 36-42, 1989.

Escolar, G., Cases, A., Vinas, M., Pino, M., Callas, J., Cirera, I., *et al.* "Evaluation of acquired platelet dysfunctions in uremic and cirrhotic patients using the platelet function analyzer (PFA-100): influence of hematocrit elevation". *Haematologica*; 84: 614-619, 1999.

Federici, A.B., Berkowitz, S.D., Lattuada, A., Mannucci, P.M. "Degradation of von Willebrand factor in patients with acquired clinical conditions in which there is heightened proteolysis". *Blood*; 81: 720-725, 1993.

George, J.N., Shattil, S.J. "The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function". *N Engl J Med* 324; 27-39, 1991.

Lackner, H. "Hemostatic abnormalities associated with dysproteinemias". *Semin Hematol*; 10: 125-133, 1973.

Laffi, G., Foschi, M., Masini, E., Simoni, A., Mugnai, L., La Villa, G., *et al.* "Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation". *Hepatology*; 22: 1666-1673, 1995.

Liu, Y.K., Kosfeld, R.E., Marcum, S.G. "Treatment of uraemic bleeding with conjugated oestrogen". *Lancet*; ii: 887-890, 1984.

Mannucci, P.M., Remuzzi, G., Pusineri, F., Lombardi, R., Valsecchi, C., Mecca, G., *et al.* "Deamino-8-D-arginine vasopressin shortens the bleeding time in uremia". *N Engl J Med*; 308: 8-12, 1983.

Mezzano, D., Aranda, E., Urzúa, J., Lema, G., Habash, J., Irarrázabal, M.J., *et al.* "Changes in platelet β -thromboglobulin, fibrinogen, albumin, 5-hydroxytryptamine, ATP, and ADP during and after surgery with extracorporeal circulation in man". *Am J Hematol*; 22: 133-142, 1986.

Mezzano, D., Panes, O., Pais, E., Tagle, R., González, F., Mezzano, S., *et al.* "Tranexamic acid inhibits fibrinolysis, shortens the bleeding time and improves platelet function in patients with chronic renal failure". *Thromb Haemostas*; 82:1250-1254, 1999.

Mezzano, D., Tagle, R., Panes, O., Pérez, M., Downey, P., Muñoz, B., *et al.* "Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis". *Thromb Hemostas* 76: 312-321, 1996.

Muñoz, J.J., Birkmeyer, N.J., Birkmeyer, J.D., O'Connor, G.T., Dacey, L.J. "Is epsilon-aminocaproic acid as effective as aprotinin in reducing bleeding with cardiac surgery?: a metanalysis". *Circulation*; 99: 81-89, 1999.

Noris, M., Remuzzi, G. "Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies?" *Blood*; 94: 2569-2574, 1999.

Ordinas, A., Escolar, G., Cirera, I., Vinas, M., Cobo, F., Bosch, J., *et al.* "Existence of a platelet-adhesion defect in patients with cirrhosis independent of hematocrit: studies under flow conditions". *Hepatology*; 24: 1137-1142, 1996.

Remuzzi, G. "Bleeding in renal failure". *Lancet* i: 1205-1208, 1988.

Sánchez-Roig, M.J., Rivera, J., Moraleta, J.M., Vicente, V. "Quantitative defect of glycoprotein Ib in severe cirrhotic patients". *Am J Hematol*; 45: 10-15, 1994.

Schafer, A.I. "Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders". *Blood*; 64: 1-12, 1984.

Vicente, V., Alberca, I., Macias, J.F., López Borrasca, A. "DDAVP in uremia". *Nephron*; 36: 145-146, 1984.

Woodman, R.C., Harker, L.A. "Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass". *Blood* 1990; 76: 1680-1697.

HEMOFILIAS, ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND Y OTRAS ALTERACIONES HEREDITARIAS DE LA COAGULACIÓN

Mario Donoso S., Iván Palomo G., Carmen Gloria Artigas A. y Jaime Pereira G.

1. Introducción

2. Hemofilia

- 2.1. Hemofilia clásica o tipo A
- 2.2. Hemofilia tipo B
- 2.3. Diagnóstico
- 2.4. Cuadro clínico y conducta
 - 2.4.1. Conceptos generales
 - 2.4.2. Sangrado en sitios especiales
 - 2.4.3. Rehabilitación
 - 2.4.4. Procedimientos diagnósticos y terapéuticos
 - 2.4.5. Inhibidores
- 2.5. Terapia de reemplazo
 - 2.5.1. Tipos de terapia de reemplazo
 - 2.5.2. Cálculo de dosis del factor a administrar
 - 2.5.3. Forma de administrar el factor deficitario
- 2.6. Terapia génica
- 2.7. Terapia asociada

3. Enfermedad de von Willebrand

- 3.1. Factor von Willebrand
 - 3.1.1. Estructura
 - 3.1.2. Biosíntesis y secreción
 - 3.1.3. Función
 - 3.1.4. Regulación de los niveles sanguíneos

3.2. Clasificación y patología molecular de la enfermedad de von Willebrand

- 3.2.1. EvW tipo 1
- 3.2.2. EvW tipo 2
- 3.2.3. EvW tipo 3

3.3. Clínica

3.4. Diagnóstico

- 3.4.1. Pruebas de «screening»
- 3.4.2. Pruebas específicas
- 3.4.3. Pruebas para diagnóstico de subtipos

3.5. Tratamiento

4. Otras alteraciones hereditarias de la coagulación

4.1. Alteraciones de fibrinógeno

- 4.1.1. Afibrinogenemia
- 4.1.2. Disfibrinogenemia

4.2. Déficit de factor XIII

4.3. Déficit de protrombina

4.4. Déficit de factor V

4.5. Déficit de factor VII

4.6. Déficit de factor X

4.7. Déficit de factor XI

4.8. Déficit de factor XII

4.9. Déficit de precalicreína

4.10. Déficit de kininógeno de alto peso molecular (HMWK)

4.11. Deficiencia de α_2 antiplasmina

RESUMEN

En este capítulo se describen los aspectos más relevantes de las enfermedades hemorrágicas hereditarias de la coagulación.

Las hemofilias se clasifican en tipo A y B, según se trate de una deficiencia del factor VIII ó IX, respectivamente. Ambas alteraciones son hereditarias y están ligadas al cromosoma X, por lo cual la mayor frecuencia se presenta en varones. Generalmente los niños heredan un gen mutado (X_H) de su madre portadora (X_H/X), pero cerca del 30% de los casos sufren una mutación espontánea, sin historia familiar de hemofilia. El diagnóstico se establece con pruebas de coagulación para determinar la concentración plasmática del factor VIII y IX. Las Hemofilias dependiendo de la deficiencia del factor involucrado, se clasifican en leves, moderadas o graves.

La Enfermedad de von Willebrand (EvW) es considerada el trastorno más frecuente de la hemostasia, caracterizada por un defecto cuantitativo y/o funcional del factor von Willebrand (FVW). El FVW es una glicoproteína adhesiva de alto peso molecular sintetizada por las células endoteliales y los megacariocitos; juega un rol fundamental en la hemostasia primaria y tiene la capacidad de unirse y transportar al FVIII coagulante (FVIII:C). Dependiendo de la deficiencia, la EvW se ha clasificado en tres tipos principales. La EvW tipo 1 se caracteriza por alteraciones cuantitativas parciales del FVW; la EvW tipo 2 corresponde a alteraciones cualitativas o disfuncionalidad del FVW y de acuerdo al fenotipo de la enfermedad la EvW tipo 2 se divide en cuatro variantes 2A, 2B, 2M y 2N; la EvW tipo 3 se refiere a la deficiencia total o presencia de trazas de FVW, siendo la forma grave de la enfermedad. El diagnóstico de la EvW depende de varias pruebas de laboratorio.

Aunque con menos frecuencia que el déficit del FVW y los factores VIII y IX, también se puede presentar déficit o alteraciones funcionales de otros factores: fibrinógeno, factor XIII, protrombina, factor V, factor VII, factor X, factor XI, factor XII, precalicreína y kininógeno de alto peso molecular.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hemorrágicas son una importante causa de consulta médica, y su diagnóstico, si bien puede ser sugerente desde el punto de vista clínico, requiere de la participación del laboratorio.

Las hemofilias han sido consideradas graves trastornos de la coagulación sanguínea. La hemofilia A se caracteriza por una deficiencia del factor VIII y la hemofilia B por la deficiencia del factor IX, siendo más frecuente la primera. La EvW se caracteriza por disminución de la cantidad o alteración de la función del FVW y es mucho más frecuente que la hemofilia A.

Otros factores de la coagulación, aunque con menos frecuencia que la EvW y las hemofilias, también se pueden ver afectados, en cantidad y/o función; a modo de ejemplo: fibrinógeno, protrombina, factor VII, factor X y factor XI.

2. HEMOFILIA

La hemofilia es una patología de la cual todos han escuchado algo, con diversos enfoques y

niveles de conocimiento, casi siempre asociados a una gran cantidad de mitos que no corresponden ni superan, la realidad de sus características. Es una enfermedad hemorrágica congénita que cursa con deficiencia de los factores de la coagulación VIII o IX. Estas deficiencias están ligadas al cromosoma X, de rasgos recesivos, con manifestaciones clínicas de riesgo hemorrágico y daños articulares, y que se transmiten por las mujeres y son padecidas por los hombres. Estas deficiencias se deben a distintos tipos de mutaciones ya sean puntuales, deleciones, inserciones, inversiones o grandes reorganizaciones en los genes que codifican estas proteínas.

Todos los episodios de sangrado en los pacientes con hemofilia se expresan como emergencia médica.

La gran carga de enfermedad que genera la hemofilia la transforma en una patología indicadora de la capacidad y calidad de gestión para implementar el diagnóstico y seguimiento de las discrasias trombo-hemorrágicas y de la medicina transfusional de un país.

2. 1. Hemofilia clásica o tipo A

La hemofilia A es producida por el déficit cuantitativo del factor VIII coagulante; es congénita, hereditaria, ligada al sexo y con una tasa de mutación en la cual cerca de un 40% de los casos no tiene antecedentes familiares conocidos (mutaciones *de novo*). Su frecuencia, válida para todas las poblaciones humanas, se estima entre 15-20/10.000 varones.

Gen y FVIII

El gen del factor VIII está localizado en la región distal del brazo largo del cromosoma X a nivel de la banda Xq28. Tiene una longitud de 186 kb y presenta 25 intrones y 26 exones. El gen codifica un mRNA de 9 kb, que traduce una proteína de 2351 aminoácidos (Aa), que incluyen un péptido señal de 19 Aa y una proteína madura de 2332 Aa. La estructura primaria del FVIII muestra 3 tipos distintos de dominios incluyendo una región triplicada de aproximadamente 330 Aa (dominios A), una región única de 980 Aa (dominio B) y una región carboxi-terminal duplicada de 150 Aa (dominios C), las que están en el siguientes orden: NH₂.A1-A2-B-A3-C1-C2.COOH (ver capítulo 20).

Alteraciones genéticas

Las alteraciones genéticas descritas en hemofilia A incluyen sustituciones nucleotídicas puntuales, deleciones, inserciones, duplicaciones e inversiones:

Sustituciones nucleotídicas puntuales. Constituyen en conjunto, el tipo de mutación más frecuente en la hemofilia A. Las mutaciones “nonsense” (aparición de un codón “stop” produciendo la interrupción temprana de la síntesis del FVIII) corresponden a pacientes con hemofilia A severa; en cambio las mutaciones puntuales encontradas en hemofilia A moderada o leve del tipo “missense” (aparición de un codón correspondiente a un Aa distinto). Este último tipo de mutaciones también se encontró en pacientes con el fenotipo severo. El fenotipo clínico de la hemofilia A en distintos pacientes con la misma mutación puntual, no siempre resulta igual.

Deleciones. Las deleciones observadas van desde 1 a 210 kb. El 95% de las deleciones se asocia con el fenotipo severo. Los pacientes con hemofilia A severa causada por deleciones, presentan cinco veces más riesgo de desarrollar

inhibidor que aquellos con otro tipo de mutación.

Inserciones. Se han descrito pocos casos de inactivación insercional del gen del FVIII y todos ellos conducen a hemofilia A severa. Dos de ellos involucran la inserción, en el exón 14, de secuencias ajenas al gen del FVIII como es el elemento L1 (secuencias repetitivas humanas que representan retro-transposones no virales).

Duplicaciones. Las duplicaciones son inusuales. La duplicación de 23 kb del intrón 22 insertado entre los exones 23 y 24.

Inversiones. Una disrupción del gen del FVIII, debida a una inversión que separa a los exones 1-22 de los exones 23-26, aproximadamente en 500 Kb, es infrecuente. Esta inversión es el resultado de una recombinación homóloga intracromosómica, debida a la presencia de secuencias repetidas denominadas F8A, que transcriben en forma opuesta y que están presentes en el brazo Xq, fuera y dentro del intrón 22 del gen del FVIII.

Laboratorio y tratamiento: aspectos generales. El diagnóstico de laboratorio se basa en la cuantificación del factor VIII fracción coagulante. El tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) oscila desde normal hasta muy prolongado. El tiempo de sangría (método de Ivy) y recuento plaquetario pueden ser normales (ver punto 4 y capítulo 31).

Los recursos terapéuticos biológicos que se utilizan son los crioprecipitados. Son una buena alternativa en ausencia de concentrados liofilizados que son la mejor opción por la elevada seguridad biológica, facilidad de transporte y administración, previa capacitación del enfermo y su entorno (ver punto 7).

2.2. Hemofilia tipo B

La hemofilia B, producida por el déficit cuantitativo del factor IX, es congénita, hereditaria, ligada al sexo y con una frecuencia aproximada de 1,5/100.000 habitantes.

Gen y FIX

El gen del factor IX está localizado en la región distal del brazo largo del cromosoma X a nivel de la banda Xq27.1-27.2. Éste tiene una longitud de 34 kb, contiene 7 intrones y 8 exones que codifican una proteína madura de 415 aminoácidos. La estructura comienza con

el amino terminal Tyr; los primeros 46 residuos son producidos por el segundo y tercer exón, y comprenden la región Gla; los residuos 47 a 127 representan las dos regiones homólogas al factor de crecimiento epidérmico (EGF); los aminoácidos 128 a 195 son codificados por el exón 6; los finales 220 residuos son codificados por los 2 últimos exones y contienen los componentes del sitio activo, el carboxilo terminal o Aa 415 Thr.

Alteraciones genéticas

Más de 2.100 mutaciones están registradas en una base de datos internacional (www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html). Muchos pacientes con hemofilia B tienen mutaciones puntuales; la naturaleza de las mutaciones determina los niveles de actividad del FIX. Más de un tercio de las mutaciones afecta a residuos de arginina, donde se produce una mutación de tipo "nonsense", resultando una molécula disfuncional.

Un primer grupo de mutaciones consiste en grandes deleciones y reordenamiento causando deficiencia severa de FIX. Estos pacientes son propensos a desarrollar reacciones anafilácticas graves cuando comienzan con la terapia de reemplazo; estas reacciones se asocian con el desarrollo de inhibidores del FIX.

El segundo grupo consiste en el fenotipo Leyden que es causado por varias mutaciones diferentes en la región promotora del gen FIX. En estos pacientes los niveles de FIX son menores del 1% en la infancia, pero en la pubertad ellos aumentan gradualmente los niveles del factor y alcanzan niveles hasta 70%; en estos pacientes, el gen del FIX solo llega a ser transcripcionalmente activo después de la pubertad bajo la influencia de la testosterona.

El tercer grupo involucra mutaciones "missense" en la secuencia del propéptido del FIX, resultando en una marcada disminución de la afinidad del factor anormal por la carboxilasa dependiente de vitamina K. Estos pacientes tienen niveles normales del FIX, pero debido a la marcada sensibilidad a antagonistas de la vitamina K, luego de la administración de anticoagulantes orales, desarrollan una severa reducción de FIX, que incrementa el riesgo de sangrado. Dos diferentes mutaciones del tipo "missense" en la alanina -10 han sido descritas: alanina por valina y alanina por treonina. La alanina -10 del dominio del pro-péptido, está en una posición esencial para el enlace de la

carboxilasa que modifica los residuos del ácido glutámico en el dominio GLA.

Laboratorio y tratamiento: aspectos generales. El diagnóstico de laboratorio se basa en la cuantificación del factor IX. El TTPA se puede presentar desde normal hasta muy prolongado (ver punto 4 y capítulo 31). El tiempo de sangría y recuento plaquetario pueden ser normales.

Los recursos terapéuticos biológicos que se utilizan son el plasma fresco y los concentrados liofilizados; estos últimos, al igual que en la hemofilia A, son la mejor opción por la elevada seguridad biológica, facilidad de transporte y administración, previa capacitación del enfermo y su entorno (ver punto 7).

2.3. Diagnóstico

El diagnóstico de hemofilia debe estar basado en una cuidadosa y exhaustiva anamnesis pasiva y activa. El antecedente clínico prima sobre los resultados de exámenes básicos de laboratorio de coagulación. Sólo la cuantificación del factor deficiente y los estudios complementarios, como función plaquetaria y otros, permiten establecer un adecuado diagnóstico diferencial con otros síndromes hemorrágicos.

Los elementos anamnésicos a considerar son los siguientes:

a) Todo sangrado desproporcionado a la causa que lo originó, amerita investigación acuciosa. Debe tenerse presente que los sangrados espontáneos no existen; al trauma subliminal no se le adjudica adecuadamente su real valor. Por lo anterior, las actividades de la vida diaria son un trauma permanente, incluido el estrés patológico en el ámbito psíquico o social, que juega un importante rol predisponente o agravante.

b) Hay que considerar cuidadosamente la presencia de equimosis, hematomas, hemartrosis, epistaxis, alveorragias post-extracción dentaria, hematuria, sangrado quirúrgico inmediato o tardío de cualquier magnitud, sin relación a la complejidad del cuadro clínico o la técnica utilizada. El sangrado exagerado en las mujeres de la familia, objetivado su historia gineco-obstétrica, como menstruaciones, abortos, partos, cesáreas o la magnitud del sangrado en las primeras relaciones sexuales tienen gran valor predictivo.

La tabla 22-1 muestra una clasificación clínica de los pacientes con hemofilia.

Tabla 22-1. Clasificación clínica de las personas con hemofilia A o B

	Hemofilia severa	Hemofilia moderada	Hemofilia leve
Concentración plasmática del factor	Generalmente 1%	Generalmente entre el 1-5%	Generalmente 5%
Causas de sangrados	Hemorragias espontáneas	Pueden sangrar por lesiones insignificantes	Pueden sangrar con lesiones importantes, y cirugía.
Frecuencia de sangrados	1 a 2 veces por semana	Aproximadamente 1 vez al mes	Podrían nunca tener un problema hemorrágico
Desarrollo de hemartrosis	Todos los pacientes	Podría presentar	Raramente

El TTPA puede ser normal y si es anormal, sugiere hemofilia tipo A o tipo B, condición frustra, mujeres portadoras de hemofilia u otras coagulopatías adquiridas o congénitas, se utiliza para monitorear tratamiento con heparina de alto peso molecular o detectar presencia de inhibidores. El tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de sangría (método de Ivy) generalmente son normales. Ante sospecha clínica estos resultados justifican cuantificar los factores VIII y IX. Otros exámenes de sangre pueden estar acorde con la condición general o específica de salud del paciente.

Las radiografías articulares pueden mostrar desde normalidad a severas alteraciones de partes blandas y duras. Sólo imageneología de muy alta resolución puede mostrar alteraciones en etapas incipientes. No es aconsejable hacerlas en forma seriada si no hay una relación causa / efecto directa en lo terapéutico inmediato. La tomografía axial computarizada tiene gran valor diagnóstico. La resonancia nuclear magnética puede detectar precozmente pseudotumores hemofílicos y hematomas de escaso volumen especialmente en el sistema nervioso central. Las ecotomografías sólo son útiles en control evolutivo de hematomas conocidos u ocultos de mayor volumen.

El diagnóstico diferencial, puede plantear dificultades. En estos casos es necesario considerar la coexistencia de otras patologías congénitas y adquiridas, especialmente aquellas relacionadas con enfermedades transmitidas por sangre o derivados.

2.4. Cuadro clínico y conducta

2.4.1. Conceptos generales

Dada la especial carga psicológica y social que denota el sangrado -en cualquiera circunstancia- se recomienda desde el primer momento, tranquilizar al enfermo y su familia, escuchándole con la mayor atención su opinión en la etiología de la hemorragia y en la orientación terapéutica, pero al mismo tiempo, estar muy atento a la posibilidad de que el enfermo baje el perfil de gravedad de la situación debido a la angustia, negación o ambas que sobre el problema de base (hemofilia) o sobreagregado (hemorragia, complicaciones o secuelas).

El primer episodio bien tratado condiciona la evolución y el pronóstico posterior y se evitan complicaciones y secuelas permanentes, por lo que ante la duda siempre debe aplicarse terapia de remplazo (TR) y/o terapia asociada (TA), frío y/o compresión local antes de iniciar cualquier procedimiento diagnóstico.

No deben aplicarse inyectables intramusculares y siempre, y tan pronto como se pueda, se deben extraer todos los coágulos con posterior aseo quirúrgico y aplicación de TR y TA con el objeto de no aumentar las superficies sangrantes y, por tanto consumo de factores. Con el mismo propósito, en cirugía se debe evitar al máximo la electrocoagulación dando máxima preferencia a la sutura anatómica y la derivación a centro especializado. La obtención de muestras para

exámenes complementarios sólo se hará luego de iniciar la TR y TA.

2.4.2. Sangrado en sitios especiales

Sistema nervioso central. En pacientes hemofílicos toda cefalea es un proceso expansivo intracraneano hemorrágico, hasta demostrar lo contrario. Los sangrados intracraneanos son responsables hasta del 70% de las muertes de estos pacientes dentro de las primeras 72 horas por ausencia de un adecuado y oportuno diagnóstico y/o ausencia de tratamiento en calidad y cantidad. En el sistema nervioso periférico la gravedad se expresa por la compresión de estructuras nobles.

Cuello, garganta, tórax, aparato digestivo y abdomen. En estas localizaciones todas las hemorragias tienen extremo potencial de gravedad por compresión de estructuras nobles o capacidad de hemorragia exsanguinizante en corto tiempo. El abdomen *per se* presenta grandes dificultades de diagnóstico diferencial porque presentan clínica y exámenes complementarios similares con la patología abdominal habitual. Por ejemplo, la hemorragia que afecta al músculo psoas ilíaco y las estructuras nerviosas que lo atraviesan complican el diagnóstico diferencial con apendicitis aguda, hemartrosis coxofemoral, hemorragia renal o de la vía urinaria.

Hemartrosis. Las hemartrosis son la primera causa de consulta, conlleva dolor exquisito, progresivo e invalidante. Es la causa de graves deformaciones músculo-esqueléticas y consiguiente severo daño e impacto sicosocial. Es imprescindible tener presente que sólo basta la declaración del enfermo que siente dolor o de hemorragia, situación conocida como "aura" para que exista una hemartrosis incipiente que debe ser tratada inmediatamente instaurando TR y TA. Además es característica la ausencia de la causa / efecto con la magnitud del trauma al cual se le podría adjudicar la etiología del episodio hemorrágico.

El uso de vendas en las rodillas es aceptable sólo si se aplican con criterio de prevención en la formación de várices; el ejercicio permanente y sistemático, y estimulado por el entorno (familia y equipo de salud) fortalece los músculos lo que genera, articulaciones protegidas, secreción de endorfinas, mejoría de la autoestima psicológica y física, autonomía y autovalencia.

Hematomas. Los hematomas constituyen una

emergencia médica y son la segunda causa de consulta. Los hematomas simples como las equimosis, habitualmente sólo requieren compresión y frío local. Los hematomas complicados generan un tercer espacio por hemorragia persistente de instalación subrepticia o veloz y que comprometen estructuras nobles y afectan en forma severa y permanente, la función, estructura o ambas.

Hematuria. Por su aparición espectacular y preocupante, la hematuria necesita que previamente se tranquilice al enfermo y a su familia. En el 90% de los casos es un proceso benigno autolimitado y raramente pone en peligro la vida del enfermo, excepto que existan fenómenos asociados. Los tres primeros días se manejan sólo con reposo en cama e ingestión de líquidos en cantidad suficiente para obtener diuresis de 3.000 ml/día. Si la hematuria continúa, a lo anterior se agrega prednisona en dosis de 1 mg/kg/día en dos dosis y si aún persiste se debe agregar TR en dosis de ataque, habitualmente única de un 40%. Si continúa se utiliza TR 30% en tres dosis diaria hasta mejoría. No se debe usar antifibrinolíticos, hasta verificar que el sangrado sea urinario bajo.

Sangrado ginecológico y obstétrico. Las mujeres portadoras de hemofilia o con factores VIII o IX subnormales o con Enfermedad de von Willebrand, pueden presentar copiosos y prolongados flujos rojos. Son características las menometrorragias y sangrado mayor que lo normal en los partos. Otro dato que no se menciona en la literatura es el sangrado -como una regla- posterior a la ruptura del himen en la primera relación sexual, dato que habitualmente no se investiga y que otorga antecedente hemorrágico importante.

2.4.3. Rehabilitación

La rehabilitación músculo-esquelética, como secuela de criterios obsoletos, de limitar o simplemente prohibir los ejercicios físicos o como complicación de hemartrosis se combate eficientemente con la estimulación de ejercicios isométricos en forma permanente para fortalecer la musculatura y la administración profiláctica de TR en niños y adolescentes o de demanda muy precoz en adultos.

2.4.4. Procedimientos diagnósticos y terapéuticos

Los procedimientos diagnósticos o terapéuticos cruentos -incluye punciones diagnósticas o

terapéuticas- deben realizarse con idéntica conducta a la tomada en cirugía. Otros procedimientos diagnósticos invasivos o terapéuticos no cruentos como endoscopías digestivas, urinarias, operatoria odontológica o vacunas pueden realizarse con el mayor de los cuidados y así evitar el uso de TR pero con TA. Cirugías, tratamientos odontológicos (con la excepción de operatoria sin anestesia) u otros procedimientos cruentos incluidas las punciones, deben considerarse como una cirugía mayor, por lo que deben instaurarse TR y TA.

2.4.5. Inhibidores

Los inhibidores o anticuerpos anti-FVIII o -FIX son un importante problema médico y económico; se observan en aproximadamente un 5-20% de los enfermos con hemofilia, siendo más frecuentes en hemofilia tipo A (98%) y menos en hemofilia tipo B (2%). Estudios prospectivos de incidencia en pacientes previamente tratados muestran 8 casos nuevos por 1.000 pacientes/año.

Los epítomos que reconocen los inhibidores del FVIII están concentrados en los dominios A2, A3 y C2. Los inhibidores son más frecuentes en los primeros años de la vida y aparecen pocos días después de la exposición al factor (aproximadamente a los 9 días). Su mayor incidencia se relaciona con el uso de factores recombinantes (m/m 25%) y hay brotes transitorios con determinados procesos de fabricación de los concentrados.

Se sospecha su aparición cuando hay persistencia del sangrado pese a que la TR ha sido instaurada previo cálculo de la necesidad del factor deficiente. Además se observa alteración progresiva del TTPA o del TP, o disminución hasta la desaparición del factor plasmático deficiente (FVIII o FIX) (unidades Bethesta). Su presencia puede confirmarse con las pruebas habituales de laboratorio diluyendo plasma del enfermo con plasma normal (test de Bethesda). En niños menores de 10 años se recomienda determinarlos cada 3-6 meses o cuando hay menos de 100 días entre episodios, anualmente o antes de intervenciones quirúrgicas electivas. Se clasifican como bajos respondedores a los de bajo título (< 10 UB) y como altos respondedores a los con título alto (> 10 UB).

El manejo clínico de los inhibidores, utilizando estrategias de bajo perfil económico, consiste

en: (a) aumentar la dosis de factor hasta tener un valor terapéutico de factor circulante, (b) administrar corticoides en dosis >1 y < 2 mg/kg/peso, por todo el tiempo que sea necesario, (c) indicar infusión continua de liofilizados en las dosis convencionales, (d) realizar plasmaféresis con reposición de plasma normal, (e) indicar infusión de factores por largo tiempo e (f) utilizar inmunosupresores como ciclofosfamida hasta desaparición del inhibidor. Otras alternativas muy efectivas pero, de muy alto costo económico, es el uso de factores recombinantes de alta pureza o de origen no humano (porcino) en dosis de 50-150 UI/kg, poco eficaz si hay > 5 UB, presenta reacciones transfusionales (2-3%), trombocitopenia transitoria (30-60 minutos), respuesta anamnésica al humano 56%, al porcino 69% (disponibilidad limitada) y factor VII activado.

2.5. Terapia de reemplazo

2.5.1. Tipos de terapia de reemplazo

La terapia de reemplazo incluye: concentrado de FVIII, crioprecipitado, concentrado de FIX y plasma fresco congelado.

El concentrado de FVIII es un preparado comercial liofilizado del factor. Estos productos se pueden clasificar en tres categorías: (a) productos recombinantes, como por ejemplo Kogenate, Bioclata y Helixate, (b) productos purificados de anticuerpos monoclonales, que incluyen AHF-M de la Cruz Roja, Hemofil M, y Monoclata P; y (c) productos de factor VIII intermedios y de alta pureza, que incluyen Humate P y Alphanate (ambos se pueden usar en el tratamiento de la EvW), Koate HP y Profilata SD. Los concentrados de FVIII derivados de plasma se elaboran a partir de lotes de plasma provenientes de muchos donantes (máximo 60,000 donantes). Los concentrados de FVIII fabricados actualmente no se estabilizan con albúmina. El FVW no está presente en concentrados de FVIII recombinantes o purificados por inmuno-afinidad.

Los concentrados liofilizados de FIX preparados a partir de plasmas y tratados al calor, se distribuyen bajo una variedad de marcas. Desde comienzo de los noventa se han introducido nuevos productos con inactivación viral. Estos productos se clasifican en dos categorías: (a) productos puros de FIX que incluyen Alphanine SD y Mononine; y (b) concentrados de complejo de FIX, que incluyen Konyne 80 y Bebulin. Los

concentrados de FIX recombinantes, estabilizados con azúcares, también se encuentran disponibles.

2.5.2. Cálculo de dosis del factor a administrar

En la TR, que corresponde a la reposición temporal del factor deficiente en calidad y cantidad, la magnitud y el tiempo de administración está en relación con la gravedad

- Peso del enfermo = 50 kg
- Porcentaje de aumento deseado = 40%
- Número de unidades a administrar = $50 \times 40 = 2.000$ unidades de factor
 - Para hemofilia tipo A, el resultado se divide por dos = 1.000 U.I. F VIII
 - Para hemofilia tipo B, el resultado no se divide = 2.000 U.I. F IX

El criterio para definir el aumento deseado del factor varía según el tipo de hemorragia que se esté resolviendo y la secuencia de administración es según el tipo de hemofilia y el tipo de hemorragia. Si se usa crioprecipitado, el resultado se divide por 100, obteniéndose el número de bolsas de crioprecipitados que se solicitará. Si se usa plasma, el número de unidades calculadas, es el mismo volumen de plasma a administrar. Si se usan concentrados liofilizados, se elige siempre la aproximación mayor. Si se trata de enfermo pediátrico o de poco peso y, hay otro(s) enfermo(s), es posible utilizar un vial en tantas dosis como sea práctico y necesario repartir.

Las reacciones transfusionales son las de un producto sanguíneo y se tratan como tales.

2.5.3. Forma de administrar el factor deficitario

Dosis de ataque. Es la cantidad de TR que inicia el tratamiento la que puede ser única si su administración es oportuna en tiempo y en cantidad suficiente. Es determinante en forma radical y definitiva en la evolución futura del enfermo.

Dosis de mantención. Corresponde a la dosis posterior a la de ataque y es variable según las características clínicas. En los casos quirúrgicos comienza a la salida de pabellón.

El intervalo de administración de la terapia de remplazo es la secuencia en el tiempo con que debe administrarse la TR en su dosis de mantención; en hemofilia tipo A, cada 8 horas y en hemofilia tipo B, cada 12 horas.

El tiempo mínimo de administración de la

del cuadro hemorrágico.

La cantidad de unidades a administrar es un cálculo sencillo que necesita conocer el tipo de hemofilia, el porcentaje en que se desea aumentar la cantidad de factor *in situ*, el peso del enfermo, la presentación y la potencia del producto a administrar. A continuación un ejemplo de cómo hacer el cálculo de la cantidad de factor necesaria:

terapia de remplazo de mantención es el tiempo durante el cual es administrada la TR de mantención y que transforma al enfermo en sujeto apto para diagnóstico o tratamiento cruento. Este período cubre desde el comienzo de los primeros signos, síntomas o ambos, hasta el alta médica cuyo criterio es la completa mejoría física y funcional. Esta actividad reviste enorme importancia en la prevención de complicaciones y secuelas (artrosis, pseudotumores, etc.). El alta médica se otorga entre los 2 días para algunas causas médicas y 15 días para el resto de las médicas y quirúrgicas; en este último caso los puntos se retiran el día 15 o más. Este período incluye la fibrinólisis primaria que es responsable de los sangrados tardíos y que con cierta frecuencia aparecen desvinculados con el diagnóstico o la técnica empleada.

2.6. Terapia génica

Están en investigación varios métodos para la transferencia de genes de los factores VIII y IX. Ninguna ha sobresalido como superior, pero sí se ha logrado un avance considerable en expresión del factor después de la transferencia *in vivo* de vectores en modelos animales, lo que ha llevado a la consideración del desarrollo de pruebas clínicas para ambos factores. En la última década, varios laboratorios han hecho importantes contribuciones en este campo. Durante los primeros ensayos, se insertó DNA complementario (cDNA) del factor VIII o IX en células desarrolladas en cultivos. Luego, las células modificadas se retornaron al animal donante. Desafortunadamente, las células modificadas expresaron mejor los factores de la coagulación en el cultivo (*ex vivo*) que en el animal (*in vivo*). Esto condujo a ensayos para

transferir el cDNA insertándolo en vectores que luego fueron administrados directamente a los animales, ya fuera por vía intravenosa o intramuscular. Hubo algún éxito en la expresión de cantidades subterapéuticas de proteína expresada a largo plazo con ambos métodos o aún cantidades normales que circularon transitoriamente durante algunos meses. No obstante, sólo recientemente los vectores mejorados han proporcionado resultados suficientemente alentadores para realizar pruebas clínicas en seres humanos.

2.7. Terapia asociada

La TA es la administración de fármacos que estimulan, favorecen o preservan el coágulo por un tiempo mayor que el fisiológico con el objeto de disminuir la cantidad y tiempo de administración de la TR. Para ello se utilizan antifibrinolíticos, inhibidor de proteasas, desmopresina, analgésicos y anestésicos.

Antifibrinolíticos. Permiten asegurar la estabilidad del coágulo reduciendo al mínimo el sangrado tardío. Al mismo tiempo poseen acción analgésica y antiinflamatoria. El ácido tranexámico se administra por vía oral (cada 8 horas) o intravenosa (continua) en dosis de 30 a 50 mg/kg/día, tópica o en colutorios en concentración de 1.000 mg/l, por un mínimo de 10 días. Está indicado en todos los procesos hemorrágicos con excepción absoluta en la hematuria con etiología desconocida o alta y en hipersensibilidad al fármaco.

Inhibidor de proteasas. Se utiliza en dosis preoperatoria de 500.000 U en bolo. Intraoperatorio 250.000 U cada hora de operación, por vía intravenosa.

Desmopresina. La desmopresina es un análogo sintético de la vasopresina natural, 1-diamino-8-D-arginina vasopresina (DDAVP). Libera rápidamente FVIII, FVW y activador del plasminógeno desde sus lugares de almacenamiento. Se usa en dosis 0,3–0,4 µg/kg, puff nasal, en hemofilia tipo A variedad leve, moderada y algunos tipos de EvW por dos días seguidos y repetir al 5° día.

Coágulo de fibrina en aerosol. Se utiliza sobre heridas quirúrgicas limpias previo lavado con antifibrinolíticos.

Prednisona o equivalente. Se usa como analgésico, antiinflamatorio, antipirético e inmunosupresor en dosis de 0,1 a 1,0 mg/kg/

día en forma puntual o continua, por vía oral o intravenosa (equivalente).

Analgésia. El dolor en hemofilia es un signo capital desde el comienzo de la expresión clínica, por tanto, cohibirlo en forma oportuna y eficaz, es prioritario. El uso de opiáceos debe ser absolutamente puntual y muy justificado, otros analgésicos/antiinflamatorios no tienen contraindicación absoluta, con excepción del ácido acetilsalicílico.

Anestésicos. Tanto en su vía de administración y su elección, sólo están condicionadas por las necesidades específicas. Cuando ellas incluyan punciones en sitios de alto riesgo (subclavia, peridural, etc.) deben cumplirse previamente las indicaciones de haber iniciado con anterioridad la TR y la TA.

3. ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

La enfermedad de von Willebrand (EvW) fue reportada por primera vez en 1926 por Erik von Willebrand en una familia de Finlandia, quien la describió como un trastorno hemorragiparo diferente a la hemofilia, al que denominó pseudohemofilia. El doctor von Willebrand observó que la enfermedad se presentaba en ambos sexos y en varios miembros de la familia, cuyo síntoma característico era la epistaxis (sangrado nasal), y que los hallazgos de laboratorio más importantes eran la prolongación del tiempo de sangría y la normalidad del recuento de plaquetas.

En la década de los sesenta se demostró que la enfermedad se explicaba por la deficiencia de un nuevo factor plasmático distinto al factor VIII coagulante (FVIII), que se denominó factor von Willebrand (FVW). La deficiencia de este factor se asociaba a bajos niveles de FVIII, indicando la estrecha relación entre ambas proteínas plasmáticas. En la década de los ochenta, mediante la clonación del gen del FVW, se lograron establecer las bases moleculares que producen la enfermedad.

La EvW se considera el síndrome hemorragiparo hereditario más frecuente de la población. Se ha observado que afecta a las diferentes etnias de modo similar. Debido al modo de herencia autosómico, hombres y mujeres estarían afectados en igual proporción, sin embargo, la menstruación, el embarazo y el parto producen una frecuencia mayor de EvW sintomática en la mujer; algunos estudios indican que el 60% de

los pacientes con EvW son mujeres. La prevalencia de la EvW es del orden del 1% sin diferencias entre etnias. Las pruebas de “screening” poblacionales no sólo detectan pacientes sintomáticos, sino que también asintomáticos o levemente sintomáticos con bajos niveles de FVW.

3.1. Factor von Willebrand

3.1.1. Estructura

La EvW es causada por la deficiencia o anomalía del FVW. El gen que codifica el FVW

se localiza en el cromosoma 12 (p13.2) y posee 52 exones. El producto primario del gen del FVW está formado por 2.813 aminoácidos (un péptido señal de 22 aminoácidos, un propéptido de 741 aminoácidos y la molécula madura de FVW de 2.050 aminoácidos). El peso molecular del FVW maduro es 270 kDa. En la figura 22-1 se representan los dominios A, C y D que conforman un monómero de FVW. La unidad madura de FVW presenta 12 N-glicosilaciones y 10 O-glicosilaciones, que representan aproximadamente el 19% de su peso molecular.

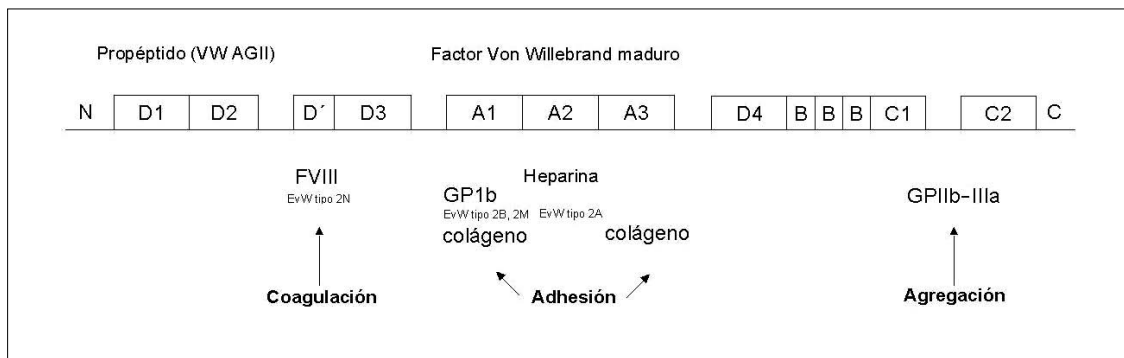


Figura 22-1. Estructura del FVW. Se indican los dominios estructurales y los sitios de unión para diferentes moléculas.

3.1.2. Biosíntesis y secreción

El FVW es sintetizado en los megacariocitos y en células endoteliales. Luego de la eliminación del péptido señal en el retículo endoplásmico (RE), el proFVW forma dímeros mediante la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína ubicados en el extremo C-terminal (dominio CK). Posteriormente los dímeros de proFVW son transportados al aparato de Golgi donde polimerizan con otros dímeros mediante la formación de puentes disulfuro a través de sus extremos N-terminales (dominios D3). Mientras que el 99% de los propéptidos son eliminados, continúa la glicosilación iniciada en el RE y se adiciona sulfato inorgánico en algunas N-glicosilaciones. Finalmente los multímeros son almacenados en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas.

3.1.3. Función

El FVW participa en la adhesión de las plaquetas a las zonas de daño vascular y en el transporte y estabilización del FVIII.

El FVW se une al tejido conectivo subendotelial (principalmente colágenos) a través del dominio A3 y a través del dominio A1 a la glicoproteína Ib (GPIb) del complejo Ib/IX/V de las plaquetas, formando un puente entre las dos moléculas, participando así en la adhesión plaquetaria. Por otra parte el FVW, por medio de la secuencia RGD (Arginina, ácido glutámico y ácido aspártico) del dominio C2 se une al complejo glicoproteico IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) de las plaquetas activadas, contribuyendo a la agregación plaquetaria, que por su parte recluta más plaquetas para la formación del tapón hemostático. Ambas interacciones del FVW son expresadas en los multímeros de alto peso molecular. Sólo los multímeros de FVW de gran tamaño son hemostáticamente activos.

El FVW es el transportador específico del FVIII en el plasma. Se une al FVIII de modo no covalente a través del dominio D'. Cada monómero de FVW posee un dominio D' para el FVIII, no obstante in vivo, sólo el 1-2% de los monómeros de FVW están ocupados con FVIII. Esto explica que los multímeros de alto peso molecular no ejercen una función esencial para

el transporte del FVIII. El complejo formado FVIII/FVW, permite que el FVW proteja al FVIII de la inactivación por la proteína C activada, FIX activado y FX activado en el plasma, prolongue su vida media en circulación, y lo transporte por un lado hasta el sitio de injuria vascular para la formación plaquetario y fibrina y por otro lado hasta el lugar donde se llevará a cabo su catabolismo. Debido a esto, niveles bajos de FVW se asocian a una disminución de FVIII. La vida media del FVIII asociado a FVW es de 12-20 horas, mientras que libre puede reducirse hasta 2 horas.

3.1.4. Regulación de los niveles sanguíneos

La concentración normal de FVW en el plasma fluctúa entre 4 a 24 pg/mL (10 pg = a 1 UI). Los niveles de FVW están relacionados con los grupos sanguíneos ABO y Lewis, la raza y la edad. La concentración plasmática de FVW es 25% menos en individuos de grupo O, que en personas que tienen grupos A, B y AB. Los individuos del grupo O que además son Le(a,b+) y por lo tanto, secretores (Se/se o Se/Se) poseen niveles de FVW 11% menores que las personas grupo O, no secretoras. El genotipo del locus secretor es determinante de los niveles plasmáticos de FVW. Los individuos homocigotos para el gen Se funcional (Se/Se) tienen niveles de FVW plasmático más altos que los heterocigotos (Se/se).

Por otra parte, la concentración de FVW aumenta con el envejecimiento, embarazo y en respuesta a varios estímulos: estrés adrenérgico (ejercicio, trauma, cirugía), vasopresina, hormona del crecimiento y estrógenos. Probablemente estos estímulos actúan sobre las células endoteliales induciendo la liberación de FVW almacenado en los cuerpos de Weibel-Palade.

El aclaramiento del FVW de la circulación ocurre en dos fases. La fase inicial es rápida con una vida media de 4.5 horas, seguido por una etapa más lenta con un tiempo medio de desaparición de 20 horas. Sólo los multímeros intracelulares almacenados en los cuerpos de Weibel-Palade o en los gránulos alfa de las plaquetas, están compuestos por subunidades intactas, mientras que los que están en circulación contienen fragmentos de subunidades. El principal mecanismo que reduce el tamaño de los multímeros de FVW involucra una proteólisis específica, lo que explica el amplio espectro de tamaños de multímeros en circulación, desde dímeros de 500 kDa hasta multímeros de 20.000 kDa. La enzima ADAMTS-13, una

metaloproteinasa disminuye el peso molecular de los multímeros de FVW causando un corte entre los aminoácidos Tyr842 y Met843.

3.2. Clasificación y patología molecular de la enfermedad de von Willebrand

La EvW es causada por un defecto cuantitativo o cualitativo del FVW (Tabla 22-1). Dependiendo de la deficiencia, la EvW se ha clasificado en tres tipos principales. La EvW tipo 1 se caracteriza por alteraciones cuantitativas parciales del FVW; la EvW tipo 2 incluye casos que presentan anomalías cualitativas de la estructura y función del FVW, la EvW tipo 2 se divide en cuatro variantes 2A, 2B, 2M y 2N, de acuerdo al fenotipo de la enfermedad y la EvW tipo 3 se refiere a la deficiencia total o presencia de trazas de FVW.

A continuación se describen las principales características de los tipos y subtipos de EvW.

3.2.1. EvW tipo 1

La EvW tipo 1 se caracteriza por presentar una deficiencia parcial del FVW. Los niveles plasmáticos del FVW presentan una reducción del 15 al 50%, pero no existe anomalía en su función. La distribución de los multímeros en el plasma es normal. Se han descrito subgrupos de la EvW tipo 1 de acuerdo a los niveles plasmáticos relativos de FVW, lo que indica que existen distintos mecanismos fisiopatológicos. Generalmente el fenotipo se hereda de modo autosómico dominante. Algunos individuos heterocigotos son portadores asintomáticos. Las alteraciones genéticas descritas consisten principalmente en pequeñas deleciones, cambios en el marco de lectura y mutaciones sin sentido. Ocasionalmente, la EvW tipo 1 se hereda como una característica dominante con alta penetrancia y niveles marcadamente disminuidos de FVW; este fenotipo puede ser causado por dominancia negativa: mutaciones sin sentido en un alelo impiden el transporte intracelular y la secreción del producto del gen normal.

3.2.2. EvW tipo 2

a) EvW tipo 2A

Cualquier mecanismo que reduzca la concentración de los multímeros de alto peso molecular del FVW puede afectar su actividad hemostática. En la EvW tipo 2A la adhesión

plaquetaria dependiente del FVW está alterada por ausencia de multímeros de alto y mediano peso molecular. En la mayoría de los casos se hereda de modo autosómico dominante, aunque también existen variantes recesivas.

Se han descrito al menos 24 mutaciones sin sentido (20 en el dominio A2 y 4 en el dominio A1), producidas por dos mecanismos posibles: - Mutaciones del grupo 1, alteran el transporte intracelular del FVW e impiden el ensamblaje, almacenamiento y secreción de los multímeros de alto peso molecular, - Mutaciones del grupo 2, provocan en los multímeros una mayor susceptibilidad a la proteólisis *in vivo*, son más sensibles a la ADAMTS-13. Ambos grupos de mutaciones causan ausencia de los multímeros de alto peso molecular del FVW.

Algunas mutaciones sin sentido en el dominio CK del extremo C-terminal impiden la formación del puente disulfuro necesario para formar los dímeros. Otras mutaciones sin sentido, pequeñas deleciones e inserciones en el dominio D2 se caracterizan por disminución de los multímeros de alto peso molecular y aumento de los dímeros de FVW.

b) EvW tipo 2B

La EvW tipo 2B se caracteriza por un aumento de la afinidad del FVW mutante por la GPIIb/IIIa de las plaquetas. Al parecer esto produce la unión de los multímeros de alto peso molecular a la superficie plaquetaria *in vivo*, seguido por el aclaramiento de ambos, produciendo trombocitopenia leve. Generalmente los multímeros de alto peso molecular no se detectan en el plasma y los multímeros restantes no son hemostáticamente activos. En la mayoría de los casos la herencia es de tipo autosómico dominante. Se han descrito 18 mutaciones, la mayoría sin sentido y afectan al dominio A1 donde se encuentra el sitio de unión a la GPIIb/IIIa.

c) EvW tipo 2M

La EvW tipo 2M (M = Multímero) se caracteriza por una disminución de la afinidad del FVW a las plaquetas, con una normal distribución de los multímeros del FVW en el plasma. Se hereda de modo autosómico dominante. Se han descrito 17 mutaciones y todas afectan al dominio A1 disminuyendo la afinidad por la GPIIb/IIIa.

d) EvW tipo 2N

La FVW tipo 2N (N = Normandía) posee niveles

normales de FVW, con una distribución normal de los multímeros en el plasma, como también las funciones de adhesión a las plaquetas son normales. Se han descrito 15 mutaciones sin sentido en los dominios D' y D3. Estas mutaciones del FVW provocan un defecto en la unión al FVIII, disminuyendo la vida media de este último; esto explica que la concentración de FVIII se reduzca en al menos un 25% de lo normal, asemejándose a la hemofilia A leve, excepto por su patrón de herencia autosómica.

Los pacientes que presentan este subtipo de EvW son homocigotos para este tipo de alelo, por lo tanto la herencia es autosómica recesiva. La herencia conjunta de un alelo mutado de EvW tipo 2N con un alelo mutado del tipo 1 (heterocigoto compuesto) puede dar origen a un fenotipo variable de la EvW tipo 1.

3.2.3. EvW tipo 3

La EvW tipo 3 es la forma menos frecuente y la más severa de todas. Los pacientes presentan un déficit completo o casi total del FVW. Debido a la ausencia de FVW para transportar y estabilizar al FVIII, los afectados presentan alteración de la hemostasia primaria y de la coagulación sanguínea. El FVIII es usualmente inferior al 10% de lo normal y excepcionalmente menos del 1%.

Las mutaciones más comunes consisten en deleciones totales o parciales del gen, mutaciones sin sentido y mutaciones del "splicing" o de cambio de marco de lectura que impiden la síntesis del FVW. Se hereda de modo autosómico y se presenta sólo en pacientes homocigotos para los dos alelos mutantes. Los heterocigotos para dos alelos mutantes distintos (heterocigotos compuestos) generalmente son asintomáticos y poseen niveles de FVW normales o levemente disminuidos.

La homocigosidad para deleciones génicas, se asocia a la aparición de aloanticuerpos anti-FVW, los cuales pueden hacer inefectiva la terapia de reemplazo o pueden desencadenar reacciones anafilácticas en estos pacientes.

Dentro de los diferentes tipos de EvW, el tipo 1 es el más frecuente (el 60-80 % de los casos). El tipo 2 representa el 7-30% de los pacientes y el tipo 3 el 5-20% de los casos. La distribución para el subtipo 2A es 30%, 2B 28%, 2M 8% y 2N 34%.

En la tabla 22-2 se muestra la clasificación revisada de la EvW.

Tabla 22-2. Clasificación revisada de la enfermedad de von Willebrand

Tipo	Características
1	Deficiencia cuantitativa parcial de FVW
2A	Variante cualitativa con disminución de la función plaquetaria y pérdida de multímeros de alto peso molecular
2M	Variante cualitativa con disminución de la función plaquetaria y conservación de los multímeros de alto peso molecular
2B	Variante cualitativa con aumento de la afinidad del FVW por la GPIb
2N	Variante cualitativa con defecto de unión del FVIII al FVW
3	Ausencia total del FVW detectable y marcada disminución del FVIII

3.3. Clínica

Los síntomas más comunes en la EvW son las hemorragias mucocutáneas, siendo más frecuentes la epistaxis y la menorragia, reflejando el defecto característico en la adhesión plaquetaria. Otros síntomas hemorrágicos también frecuentes son equimosis, hemorragia luego de pequeños cortes o heridas leves y sangrado gingival. La hemorragia posterior a extracciones dentales es común. La expresión clínica de la EvW es usualmente leve en el tipo 1 y aumenta en los tipos 2 y 3. Sin embargo, la severidad de las manifestaciones hemorrágicas puede variar, incluso dentro de la misma familia, y a través del tiempo en un mismo individuo. Esto puede deberse a la variable penetrancia y expresividad de la enfermedad.

Debido a que el FVIII está levemente disminuido en la EvW tipo 1, defectos severos de la coagulación son infrecuentes y son principalmente post-trauma. Contrariamente, los tipo 2N y 3 pueden presentar niveles suficientemente bajos de FVIII como para desarrollar hemorragias articulares o de tejidos blandos, semejantes a los observados en pacientes con hemofilia.

Se ha descrito que la EvW tiene una frecuencia de 13% en mujeres que sufren de menorragia. El embarazo, generalmente es bien tolerado, en la mayoría de las pacientes (excepto tipo 3) los niveles de FVW y FVIII circulantes aumentan, aunque pueden ocurrir algunas complicaciones hemorrágicas. El riesgo de hemorragia durante el parto no aumenta en estas pacientes, debido

a los niveles aumentados de FVW y FVIII plasmáticos. Después del parto estos niveles bajan rápidamente, por lo que el riesgo de hemorragia postparto aumenta y las pacientes deberían ser monitorizadas por al menos una semana después. Las mujeres embarazadas con el tipo 2B pueden presentar complicaciones durante el parto. El aumento de FVW mutado en el plasma promueve la aparición de trombocitopenia prolongada.

El desarrollo de aloanticuerpos anti FVW es poco común. Todos los casos descritos han ocurrido en pacientes con EVW tipo 3 con cantidades no detectables de FVW.

3.4. Diagnóstico

La EvW debería sospecharse en cualquier paciente que presente hemorragia mucocutánea con recuento de plaquetas normal. El espectro de la gravedad de la EvW es amplio, variando entre escasos y dudosos síntomas hemorrágicos hasta episodios que pueden amenazar la vida. Esto no sólo se debe a lo heterogéneo de los defectos del gen, sino también a la influencia ejercida por otros genes (genes del sistema ABO, sistema secretor). Además, de las condiciones fisiológicas y patológicas pueden influir en los niveles de FVW. Por lo tanto, el diagnóstico de la EvW depende de varias pruebas de laboratorio y puede requerir análisis repetidos de los pacientes como de los familiares.

Las pruebas de laboratorio usadas para diagnosticar la EvW (ver capítulo 31) se agrupan en pruebas de "screening", las cuales permiten

evaluar inicialmente a un paciente con síndrome hemorráptico y pruebas específicas necesarias para realizar el diagnóstico de EvW.

3.4.1. Pruebas de “screening”

Tiempo de sangría (TS). Esta prueba puede reflejar las alteraciones cuantitativas o cualitativas de las plaquetas y del FVW, así como alteraciones de la pared de los vasos sanguíneos. El TS en la EvW grave (tipo 3 y algunos subtipos 2) está siempre prolongado. En las formas leves de la enfermedad generalmente está normal o levemente alterado. Debido a la baja sensibilidad, especificidad y escasa reproducibilidad, la utilidad clínica de esta prueba es limitada.

Métodos con alta fuerza de cizalla. El equipo “Platelet Function Analyser”, PFA-100 desarrolla un modelo que simula la hemostasia primaria, proporcionando todas las condiciones que ocurren *in vivo* cuando se realiza un TS. Este método utiliza un sistema con alta fuerza de roce similar a la encontrada en las arteriolas. La sensibilidad y especificidad del PFA-100 es mayor a la observada en el TS, por lo que superaría las debilidades de éste; sin embargo, aún existen limitaciones para detectar casos con EvW leve y distinguirlos de personas normales con niveles bajos de FVW:Ag.

Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA). Esta prueba puede estar prolongada en pacientes con EvW. Sin embargo, pacientes con formas leves de la enfermedad usualmente tienen valores normales o cerca de lo normal, por lo que el TTPA no es una prueba sensible para la EvW. Un resultado normal de TTPA y/o de TS no descartan el diagnóstico de EvW.

3.4.2. Pruebas específicas

Factor von Willebrand antigénico (FVW:Ag). La concentración plasmática de FVW está disminuida en personas con defectos cuantitativos (EvW tipo 1 y 3), mientras que pueden ser normales en las variantes de la EvW tipo 2.

Actividad del FVW como cofactor de la ristocetina (FVW:RCo). Esta prueba estudia la capacidad de unión del FVW con la GPIIb α . Debido a que los grandes multímeros del FVW son necesarios para la aglutinación inducida por ristocetina, la razón FVW:Ag/FVW:RCo en el tipo 2A (ausencia de multímeros de alto peso molecular) está francamente disminuida

respecto a individuos normales. El tipo 2M (interacción alterada de los multímeros con la GPIIb α) también presenta disminución de dicha razón. Los individuos portadores de EvW tipos 1, 2N y 3 se caracterizan por tener normal la razón antes mencionada.

Actividad coagulante del FVIII (FVIII:C). Debido a que la secreción del FVIII, así como su vida media dependen del FVW, generalmente los valores de FVIII:C son paralelos al FVW:Ag. Esta prueba es fundamental para la detección de pacientes del tipo 2N.

3.4.3. Pruebas para diagnóstico de subtipos

Estas pruebas no son necesarias para hacer el diagnóstico de EvW, pero sí para realizar el diagnóstico diferencial entre los diferentes subtipos.

Agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA). Depende de la concentración de FVW y de su afinidad por la GPIIb α . La prueba es indetectable en pacientes con EvW tipo 3, pero puede ser normal en pacientes tipo 1. En pacientes 2A y 2M el resultado de la prueba es muy bajo o ausente. La prueba RIPA es muy útil para detectar pacientes con EvW tipo 2B, ya que presentan agregación plaquetaria a bajas concentraciones de ristocetina (0,6 mg/mL), lo cual no ocurre en plasma rico en plaquetas de individuos normales.

Análisis multimérico del FVW plasmático. Los multímeros de alto y mediano peso molecular están ausentes en la EvW tipo 2A y los de alto peso molecular usualmente ausentes en el tipo 2B.

Capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB). La unión del FVW al colágeno fijo en microplaca depende sólo de los multímeros de alto peso molecular. La razón FVW:Ag/FVW:CB permite distinguir entre EvW tipo 1 o tipo 2.

Capacidad de unión del FVW al FVIII. Esta prueba distingue la EvW tipo 2N, ya que en este subtipo el FVW presenta disminución en su capacidad de unión al FVIII.

Consecuencias diagnósticas

En algunas ocasiones el diagnóstico de EvW presenta dificultades; los motivos pueden ser debido a que la EvW no presenta síntomas específicos y el fenotipo de los transmisores heterocigotos puede no ser igual. El diagnóstico

se basa en la historia clínica y en pruebas de laboratorio. Su diagnóstico considera tres criterios: (a) es una patología hereditaria, (b) el síndrome hemorrágico mucocutáneo es de tipo mucocutáneo y (c) se debe a una alteración del FVW (cuantitativa o cualitativa).

Al interpretar los resultados de las pruebas de laboratorio que evalúan el FVW (FVW:Ag, FVW:RCo) se debe tener en consideración que el FVW es una proteína de fase aguda; aumenta su concentración plasmática en varias condiciones, tanto fisiológicas (ejercicio, embarazo) como patológicas. El hecho que el rango de referencia normal sea amplio y que además se vea influido por otros factores (grupo ABO, edad, y otros), complica la interpretación de los resultados de laboratorio. Por ello el diagnóstico de la EvW tipo 1, en especial sus formas más leves, es el que presenta mayor dificultad.

Los síntomas de EvW no son específicos y otras condiciones fisiopatológicas pueden cursar con síndrome hemorrágico mucocutáneo, como el síndrome de Bernard Soulier y el uso de fármacos antiplaquetarios. Otras condiciones difíciles de distinguir son la pseudo-EvW o EvW tipo plaquetario y la EvW adquirida. Ambas cursan con bajo nivel de FVW:Ag y distribución irregular de los multímeros de FVW plasmático.

La pseudo-EvW es muy similar a la EvW tipo 2B, pero en el primer caso la alteración está en las plaquetas; la GPIIb/IIIa presenta una afinidad aumentada por el FVW. Esta alteración puede ser distinguida de la EvW tipo 2B agregando crioprecipitado al plasma rico en plaquetas del paciente en la prueba RIPA; en la pseudo-EvW, el crioprecipitado induce agregación plaquetaria, mientras que ello no ocurre en el tipo 2B.

La EvW adquirida se refiere a una condición donde se asocia hemorragia espontánea, disminución de los niveles plasmáticos de FVW y TS prolongado; se presenta generalmente en adultos y sin historia familiar de EvW. La mayoría de los casos se asocian a enfermedades autoinmunes o síndromes linfoproliferativos, lo que sugiere una causa inmunológica. Algunos pacientes no presentan esas enfermedades subyacentes y sólo cerca del 50% de los afectados posee autoanticuerpos anti-FVW. La distribución de los multímeros de FVW en el plasma puede ser normal o pueden estar ausentes los multímeros de alto peso molecular; en este caso puede ser difícil de distinguir de la EvW tipo 2A.

3.5. Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad de Von Willebrand tiene el propósito de normalizar el tiempo de sangría, y el trastorno de coagulación sanguínea. Para conseguir esto, tanto el FVW:Ag y el FVIII:C deben aumentar en el plasma. El manejo de la enfermedad dependerá del tipo de EvW de que se trate; algunos elementos generales son los siguientes:

a) Inducción de la liberación de FVW desde las reservas tisulares usando DDAVP.

b) Tratamiento de reemplazo. Estos incluyen crioprecipitados y concentrados de factores liofilizados; dos marcas actualmente disponibles son Humate-P y Alphanate SD. Desarrollo de anticuerpos inhibidores luego del TR. En algunos pacientes el TR puede inducir la formación de inhibidores que pueden complicar el tratamiento de los episodios hemorrágicos cuando los títulos de los anticuerpos inhibidores son muy altos.

c) Antifibrinolíticos. Son medicinas que ayudan a impedir que un coágulo de disuelva. Son útiles en EvW. Se usan después de epistaxis y sangrados orales, entre otros. Son antifibrinolíticos el ácidoaminocaproico y ácido tranexánico.

4. ALTERACIONES HEREDITARIAS DE LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN

Aunque con menos frecuencia que el déficit del Factor von Willebrand, y los factores VIII y IX, también se puede presentar déficit o alteración funcional de los siguientes factores: fibrinógeno, factor XIII, protrombina, factor V, factor VII, factor X, factor XI, factor XII, precalicreína y kininógeno de alto peso molecular. Estas alteraciones son descritas brevemente a continuación.

4.1. Alteraciones del fibrinógeno

Las alteraciones del fibrinógeno pueden ser cuantitativas o cualitativas. Las primeras incluyen ausencia de fibrinógeno (afibrinogenemia) o disminución de su concentración plasmática (hipofibrinogenemia). Las alteraciones cualitativas se refiere a alteraciones funcionales del fibrinógeno (disfibrinogenemia). La estructura molecular del fibrinógeno fue descrita en el capítulo 20.

4.1.1. Afibrinogenemia

Los desórdenes congénitos del fibrinógeno se

deben a alteraciones en el cromosoma 4 (q26-q28) donde se localiza el gen. Los heterocigotos presentan hipofibrinogenemia y los homocigotos afibrinogenemia. El diagnóstico se realiza precozmente cuando se presenta sangrado prolongado en el muñón umbilical. Las manifestaciones clínicas incluyen hemorragia gastrointestinal y de mucosas. También se ha observado un incremento en la incidencia de abortos durante el primer trimestre de gestación y hemorragia postparto. Además, en un 20% de pacientes con afibrinogenemia se observa hemartrosis, pero no con la intensidad que se presenta en los pacientes con hemofilia.

Los pacientes con afibrinogenemia, hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia, presentan prolongación del TP, TTPA y TT.

4.1.2. Disfibrinogenemia

A partir de 1965, se han descrito alrededor de 200 familias que representan disfibrinogenemia. La forma hereditaria es causada por mutaciones en los genes que codifican para las cadenas A α , B β ó γ del fibrinógeno. Las disfibrinogenemias son denominadas según la ciudad de origen de los pacientes, o la ciudad del hospital donde el paciente fue estudiado. Si hay más de una disfibrinogenemia diferente de la misma ciudad se agrega un número romano después del nombre de la ciudad. El término hipodisfibrinogenemia es usado cuando la disfibrinogenemia heredada se asocia con disminución de fibrinógeno en el plasma. Aproximadamente se han informado 240 alteraciones en el gen fibrinógeno.

Las alteraciones de la molécula del fibrinógeno se expresan en la mayoría de los pasos de formación y estabilización de fibrina. El defecto más común es la alteración en la polimerización de fibrina. En algunos pacientes el coágulo de fibrina es resistente a la fibrinólisis, por lo que en ellos se presenta tendencia a la trombosis. El modelo de herencia es casi siempre autosómico dominante. Un poco más de la mitad de los pacientes no presenta sangrado o trombosis, mientras que el 25% presenta sangrados y 20% trombosis. La trombosis resulta de una falla en la fibrina para unir plasminógeno o t-PA. Las manifestaciones de sangrado incluyen epistaxis, equimosis, menorragia, hematomas, hemartrosis, sangrado postoperatorio y sangrado postparto. La mayoría de los episodios de sangrado son leves o moderados. Las manifestaciones trombóticas incluyen trombosis venosa profunda,

tromboflebitis, embolia pulmonar y trombosis arterial.

Entre las pruebas de "screening", el TP es más sensible que el PTT para pesquisar disfibrinogenemia con tendencia al sangrado. La concentración de fibrinógeno plasmático puede ser baja o normal.

La disfibrinogenemia adquirida se puede presentar en pacientes con enfermedad hepática grave o también puede estar asociada a neoplasias y en enfermedades autoinmunes.

Como prueba de confirmación, junto al TT se debe cuantificar el fibrinógeno como antígeno (ELISA u otro método).

Las hemorragias pueden ser manejadas con transfusiones de plasma y crioprecipitado. Fármacos fibrinolíticos son usados en pacientes con tendencia a la trombosis.

4.2. Déficit de factor XIII

A partir de 1944 en que se describió el déficit del factor estabilizador de fibrina (factor XIII) se han descrito más de 200 casos. Este déficit es un trastorno raro (1:2.000.000), transmitido como un rasgo autosómico recesivo.

El factor XIII está presente en plasma y plaquetas; aproximadamente 50% de su actividad está en las plaquetas. Está formado por 2 sub-unidades distintas, A y B (ver capítulo 20). La subunidad A es sintetizada en los megacariocitos, monocitos y macrófagos, y su gen se encuentra en el cromosoma 6p24-25. La subunidad B no catalítica estabiliza la subunidad A y es sintetizada por los hepatocitos; es codificada en el cromosoma 1q31-32.

La actividad catalítica responsable de la formación de enlaces covalentes en la fibrina es la subunidad A en el plasma. Existen 3 formas distintas de deficiencia de factor XIII, basado en si la subunidad A y subunidad B están presentes o ausentes: (a) deficiencia tipo I: la concentración ambas subunidades está disminuida, (b) deficiencia tipo II: la subunidad A ausente y la subunidad B presente, y (c) deficiencia tipo III: existe deficiencia selectiva de la subunidad B.

Como esta deficiencia es autosómica recesiva, solo los homocigotos son clínicamente sintomáticos. Los homocigotos que han sido descritos en literatura con frecuencia son niños

de enlaces consanguíneos.

Se han descrito mutaciones y deleciones en los genes que codifican para ambas subunidades, aunque con mayor frecuencia en el gen que codifica para la subunidad A.

Generalmente los pacientes presentan niveles plasmáticos de factor XIII <1%. El estado homocigoto se caracteriza por sangrado grave del cordón umbilical, hemorragia intracraneal, cicatrización anormal y abortos espontáneos recurrentes.

Se ha descrito déficit adquirido de factor XIII asociado al desarrollo de anticuerpos anti-factor XIII, en pacientes en los que se han indicado ciertos medicamentos (dilatin, isoniazidas, penicilina), y en pacientes con gammapatía monoclonal, con púrpura de Henoch-Schölein, enfermedad hepática, enfermedad de Chron y colitis ulcerativa.

La sensibilidad del coágulo de fibrina en urea 5M es la prueba de laboratorio más usada; los coágulos formados en ausencia de factor XIII se disuelven rápidamente en urea; (normal: alrededor de 24 horas). Sin embargo, el ensayo más sensible es medir la estabilidad de la unión covalente del coágulo de fibrina. También se utilizan pruebas de base inmunológica como ELISAs específicos para cada subunidad del factor XIII.

Como tratamiento, en estos pacientes se utiliza terapia de reemplazo (plasma fresco o crioprecipitado).

4.3. Déficit de protrombina

El primer caso de hipoprotrombinemia fue descrito en 1969. Se han descrito alrededor de 100 casos de hipoprotrombinemia hereditaria; se trata de un desorden autosómico recesivo. El gen que codifica para protrombina se localiza en el cromosoma 11.

Clínicamente se manifiesta como síndrome hemorragiparo; la hemorragia espontánea es infrecuente y el sangrado post-traumático es común. El sangrado por el muñón del cordón umbilical es frecuente en los recién nacidos afectados. También se ha descrito hemartrosis, epistaxis, menstruación aumentada y sangrado postparto.

Se han descrito 2 variantes de hipoprotrombinemia: disprotrombinemia, e

hipoprotrombinemia propiamente tal; esta última parece ser más común.

En los casos de disprotrombinemia heterocigota se encuentra protrombina normal y anormal en el plasma (protrombina de Cardeza y Papua); la protrombina Barcelona, cuyos portadores son homocigotos, se caracteriza por la sustitución de cisteína por arginina en el residuo 273.

El "screening" de hemostasia se caracteriza por TS normal, TTPA y TP prolongado, y TT normal. El diagnóstico requiere estudio del factor II por pruebas de coagulación (estudio funcional) y con pruebas de base inmunológica (ej. ELISA).

Como tratamiento se utiliza plasma fresco congelado. Se agrega vitamina K en caso que el problema de la deficiencia sea esta vitamina.

4.4. Déficit de factor V

La deficiencia hereditaria de factor V es una enfermedad infrecuente, con una incidencia de 1 en 1 millón de personas. Se ha descrito en varias partes del mundo y es transmitida como un rasgo autosómico recesivo. Se manifiesta clínicamente sólo en pacientes homocigotos.

La deficiencia de factor V se expresa como un síndrome hemorragiparo. Los trastornos hemorrágicos incluyen: (a) Déficit verdadero de factor V en homocigotos y heterocigotos; y (b) carencia de factor V y factor VIII combinado.

El factor V Quebec ha sido descrito como un desorden de sangrado de herencia autosómica dominante y presenta sangrados graves después de traumatismos. Al parecer forma parte de un trastorno en que las diferentes proteínas de los gránulos alfa de las plaquetas sufren degradación.

Otras mutaciones asociadas a deficiencia de factor V, son las siguientes: (a) Y1702C, causa frecuente de deficiencia de FV en la población italiana, (b) factor V Stanford, mutación que causa la pérdida de un sitio de activación por trombina (R1545V) y la terminación prematura de traducción en el aminoácido 1560, y (c) factor V New Brunswick, cuya mutación en Ala221Val interfiere con la estabilidad del factor V a 37°C.

Los pacientes experimentan epistaxis espontánea, menorragia, y excesivo sangrado después de extracciones dentales o de procedimientos quirúrgicos.

Los pacientes presentan TS normal, TTPA y PT levemente prolongado, y TT normal.

4.5. Déficit de factor VII

Se han descrito menos de 200 casos con deficiencia de factor VII aunque se estima una frecuencia en la población de alrededor de 1:500.000. La condición es heredada como un rasgo autosómico recesivo. Producen deficiencias marcadas en homocigotos y moderadas, usualmente sin manifestaciones clínicas, en heterocigotos.

El factor VII es sintetizado principalmente en el hígado y circula en el plasma en una concentración de aproximadamente 0.5 g/mL. El gen que lo codifica está localizado en el cromosoma 13 (13q34); consiste en 9 exones. Codifica una proteína madura de 406 aminoácidos, que tiene un dominio terminal (Gla) modificado por carboxilación de residuos de ácido glutámico, dos dominios con homología al factor de crecimiento epidérmico (EGF1 y 2), y un C-terminal con dominio serino-proteasa.

La ausencia total de factor VII en el plasma, por lo general es incompatible con la vida, y los individuos mueren un poco después del nacimiento debido a hemorragia grave. Se han descrito varios polimorfismos en el gen factor VII y algunos han mostrado relación con niveles plasmáticos factor VII. Se han descrito alteraciones cualitativas y cuantitativas del factor VII.

Entre las manifestaciones clínicas se incluyen: epistaxis espontánea, hematomas subcutáneos, hemorragias genitourinarias y gastrointestinales, y hemartrosis. Hemorragia en el sistema nervioso se puede presentar en el periodo neonatal.

Estos pacientes presentan TS normal, TTPA normal, TP prolongado y TT normal. Su deficiencia se confirma con pruebas factor específico.

El déficit adquirido de factor VII (déficit de vitamina K, enfermedad hepática, terapia con anticoagulantes orales) debe ser considerado antes de hacer diagnóstico de deficiencia hereditaria.

En el tratamiento de estos pacientes se utiliza plasma fresco congelado o complejo protrombina.

4.6. Déficit de factor X

La incidencia de esta enfermedad es de 1/500.000 personas. Se hereda como rasgo

autosómico recesivo incompleto y las alteraciones genéticas y manifestaciones clínicas son semejantes a las del déficit de factor VII.

El gen que codifica el factor X, al igual que para el factor VII, se encuentra en el brazo largo de cromosoma 13. El gen consiste en ocho exones, cada uno codifica un dominio específico funcional dentro de la proteína. Tanto la estructura génica como la secuencia aminoacídica muestran la homología con otros factores de coagulación dependientes de vitamina K.

Los pacientes con esta deficiencia presentan sangrado nasal, hemartrosis, hematomas y sangrado de mucosas.

En el laboratorio se observa prolongación del PT y TTPA. El TT es normal y el TS se presenta prolongado en algunos pacientes.

El tratamiento utilizado es el reemplazo del factor X con plasma fresco congelado o con concentrados de complejo de protrombina.

4.7. Déficit de factor XI

El déficit de factor XI se transmite como rasgo autosómico recesivo incompleto. La incidencia se estima en 1 en 1 millón de personas. Una mayor frecuencia este desorden se observa en personas de descendencia judía, con una frecuencia estimada de 5-11% en los judíos Ashkenazi.

Esta enfermedad se manifiesta en homocigotos o dobles heterocigotos con síntomas hemorrágicos moderados, generalmente secundarios a traumatismos y heridas.

Se han descrito 3 tipos de mutaciones: (a) mutación tipo I, resulta en una interrupción del "splicing"; (b) mutación tipo II, resulta en un codon "stop" y en la obtención de una molécula no funcional y (c) mutación tipo III, resulta en una substitución de aminoácidos y obtención de una molécula disfuncional.

Los pacientes con mutación del tipo II presentan una gran tendencia al sangrado. Las mutaciones tipo II y III son comunes en judíos Ashkenazi. En general todas las mutaciones del factor XI resultan en una disminución de la proteína proporcional a la actividad coagulante de factor XI. La mayoría de las mutaciones se encuentran en los exones 9 y 10.

La deficiencia del factor XI produce manifestaciones hemorrágicas, después de intervenciones quirúrgicas o traumatismos; el sangrado espontáneo es muy raro. Son infrecuentes la hemartrosis, el sangrado retroperitoneal y craneal. Otras manifestaciones hemorrágicas espontáneas como menorragia, gingivorragia o epistaxis, pueden presentarse ocasionalmente.

El diagnóstico de la deficiencia del factor XI se puede realizar en tres situaciones: (a) a partir del estudio clínico de pacientes con tendencia hemorrágica, (b) en la evaluación de un TTPA prolongado, y (c) en el estudio familiar de un paciente con diagnóstico de déficit de factor XI. Pruebas de factor específico se deben utilizar en el diagnóstico.

El tratamiento incluye transfusión de plasma fresco congelado, concentrado de factor XI sometido a procesos de inactivación viral, fármacos antifibrinolíticos y desmopresina.

4.8. Déficit de factor XII

La deficiencia de factor XII es heredada como un rasgo autosómico recesivo. Esta deficiencia ha sido identificada en 1.5 - 3% de los donantes de sangre. Generalmente no se asocia con manifestaciones hemorrágicas.

En el laboratorio se caracteriza por TTPA prolongado. Se requiere de pruebas factor específico para el diagnóstico.

4.9. Déficit de precalicreína

La deficiencia de precalicreína, aparentemente, es heredada como un rasgo autosómico recesivo, sin embargo la información genética es insuficiente. La mayor parte de pacientes son negros y la incidencia de consanguinidad es importante. Los heterocigotos con aproximadamente el 50% del nivel plasmático normal pueden ser pesquisados. En la mayoría de los casos se ha observado ausencia de precalicreína.

Se ha pesquisado alteraciones en la fibrinólisis, quimiotaxis, respuesta inflamatoria. La importancia clínica del déficit de precalicreína es desconocida.

El déficit de precalicreína se expresa en una moderada prolongación del TTPA. El TP y TS son normales. El tiempo de lisis euglobulina se

presenta prolongado. La alteración se caracteriza por una activación anormalmente lenta de la fase de contacto.

4.10. Déficit de kininógeno de alto peso molecular (HMWK)

Esta deficiencia se hereda como un rasgo autonómico recesivo. Estudios inmunológicos revelan la ausencia de kininógeno en los homocigotos, y 50% del nivel normal en los heterocigotos. Este defecto no se asocia con sangrado excesivo ni con trombosis.

En el laboratorio se manifiesta con prolongación del TTPA. El tiempo de lisis de euglobina está prolongado.

4.11. Deficiencia de α_2 antiplasmina

Sangrado importante incluyendo hemartrosis, fue asociado con deficiencia de α_2 antiplasmina. Esta alteración se hereda como rasgo autonómico recesivo, en el cual los heterocigotos tienen deficiencias detectables de esta antiproteasa, pero solo la mitad sangra.

El sangrado presumiblemente es el resultado de lisis prematura del tapón hemostático causando una regularidad en la actividad de plasmina.

LECTURAS SUGERIDAS

Hemofilias

Antonarakis, S.E., Rossiter, J.P., Young, M., Horst, J., De Moerloose, P., Sommer, S.S., *et al.* "Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study". *Blood*, 86:2206-12, 1995.

Donoso, M., Gray, A.M., Morales, M., Vildósola, J. "Normas de Manejo Clínico de las Hemofilias", Resolución Exenta N° 1848, 09/09/1998 del Ministerio de Salud.

Goodeve, A.C., Peake, I.R. "Factor VIII inhibitors in mild and moderate severity haemophilia". *Tromb Hemost.* 29:23-30, 2003.

Jenkis, P.V., Collins, P.W., Goldmar, E. *et al.* "Analysis of intron 22 inversions of the factor VIII gene in severe hemophilia A: Implications for genetic counseling". *Blood*, 84:2197-201, 1994.

Jiménez V., Villar A., Quintana, M., Gaco, J., Hernández F. "Estandarización de la titulación de FVIII:C" *Haematologica* (ed. Esp.), 87, supl. 1, 2002.

Kasper, C.K. **Trastornos hereditarios de los factores de coagulación plasmáticos y su manejo**. World Federation of Hemophilia, 2004.

Leissinger, CA. "Prevention of Bleeds in Hemophilia Patients with inhibitors: Emerging data and Clinical Direction". *American journal of hematology*, 77:187-193, 2004.

Liras, A. "Detección y estudio de portadoras de hemofilia" (en línea) Disponible en <http://www.biología.org>.

Lusher, J.M. "Inhibitor development in prospective clinical trials with recombinant factor VIII preparations in previously untreated patients". *Vox Sang*; 77 (suppl 1): 19, 1999.

Green, M., Giannelli, F., Sommer, S.S., Poon, M-C., Ludwig, M., Schwaab, R., Reitsma, P.H., Goossens, M., Yoshioka, A., Figueiredo, M.S., Tagariello, G., Brownlee, G.G.. The Haemophilia B. Mutation Database (en línea). Disponible en: <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>.

Rossiter, J.P., Young, M., Kimberland, M.L. *et al.* "Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells". *Hum Mol Genet*, 3:1035-9, 1994.

Thompson, A.R. "Progress towards gene therapy for the hemophilias", *Tromb Haemost.*, 74:45-51, 1995.

Tuddenham, E.G.D., Cooper, D.N., Gitschier, J. *et al.* "Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene". *Nucleic Acids Res*, 19:4821-33, 1991.

Walsh, C.E. **Gene transfer for the hemophilias**. American Society of Hematology, 559-563, 2003.

Enfermedad de von Willebrand

Batlle, J., López, M.F. "Enfermedad de von Willebrand (EvW): un concepto en constante evolución". *Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia* 1999; 90(12): 27-44.

Budde, U., Drewke, E., Mainusch, K., Schneppenheim, R. "Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease". *Semin Thromb Hemost* 2002; 28(2): 173-189.

Casaña, P., Espinós, C. "Caracterización de bases moleculares en hemofilia y enfermedad de von Willebrand". *Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia* 1999; 90(12): 73-102.

Castaman, G., Federici, A., Rodeghiero, F., Mannucci, P.M. "von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment". *Haematologica* 2003; 88: 94-108.

Federici, A., Mannucci, P.M. "Advances in the genetic and treatment of von Willebrand disease". *Curr Opin Pediatr* 2002; 14(1): 23-33.

Federici, A. "Mild forms of von Willebrand disease: diagnosis and management". *Curr Hematol Rep* 2003; 2: 373-380.

Ginsburg D. "Molecular genetics of von Willebrand disease". *Thromb Haemost* 1999; 82(2): 585-591.

Ginsburg, D., Wagner, D. "Structure, biology, and genetic of von willebrand factor" En: **Hematology: Basic Principles and Practice**, Hoffinan (ed.). Third edition. Editorial Churchill Livingstone 2000. pp 1937 - 1943.

Kumar, S., Pruthi, R.K., Nichols, W. "Acquired von Willebrand disease". *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 181-187.

Mathew, P., Greist, A., Maahs, J.A., Lichtenberg, E.C, Shapi, R.O. "Type 2B vWD: the varied clinical manifestations in two kindreds". *Haemophilia* 2003; 9: 137-144.

O'Donnell, J., Boulton, F., Manning, R., Laffan, M. "Genotype at the Secretor blood group locus is a determinant of plasma von Willebrand factor level". *Br J Haematol* 2002; 116: 350-356.

Rodeghiero, F. "Von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine". *Haemophilia* 2002; 8: 292-300.

Ruan, C. "Molecular diagnosis of von Willebrand disease". *Int J Hematol* 2002; 76: 145-148.

Ruggeri, Z. "Von Willebrand factor". *Curr Opin Hematol* 2003; 10(2): 142-149.

Sadler, E. "Von Willebrand disease" In: **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. Editorial McGraw-Hill 2001-2003.

Sadler, J.E., Manucci, P.M., Bemtorp, E., Bochkov, N., Boulyjenkov, V., Ginsburg, D., Meyer, D., Peake, I., Rodeghiero, F., Srivastava, A. "Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease". *Thromb Haemost* 2000; 84: 160-174.

Sadler, J.E. "von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease". *Blood* 2003; 101:2089-93.

White, G., Montgomery, R. "Clinical aspect of and therapy for von Willebrand disease". In: **Hematology: Basic Principles and Practice**, Hoffinan (ed.). Third edition. Editorial Churchill Livingstone 2000. pp 1946-1955.

Otras alteraciones hereditarias de la coagulación

Al-Sharif, F.Z., Aljurf, M.D., Al-Momen, A.M., Ajlan, A.M., Musa, M.O., Al-Nounou, R.M., Al-Mohareb, F.I., Alomar, H.M., Zaidi, Z.Z., Al-Zahrani, H.A. "Clinical and laboratory features of congenital factor XIII deficiency". *Saudi Med J.*; 23(5):552-4, 2002.

García, J.R., Sánchez, M., Fernández, P.D., López, F., Moreno, F. "Estudio familiar de déficit de factor XI. Tratamiento profiláctico prequirúrgico con desmopresina y antifibrinolíticos". *Anales de Pediatría*. 57 (04); 373 – 3, 2002.

Girolami, A., Simioni, P., Scarano, L., Girolami, B., Marchiori, A. "Hemorrhagic and thrombotic disorders due to factor V deficiencies and abnormalities: an updated classification". *Blood Rev. Mar*;12(1):45-51, 1998.

Kravtsov, D.V, Wu, W., Meijers, J.C, Sun, M.F, Blinder, M.A., Dang, T.P, Wang, H., Gailani, D. "Dominant factor XI deficiency caused by mutations in the factor XI catalytic domain". *Blood*:10-3530, 2003.

McVey, J.H., Boswell, E., Mumford, A.D., Kembal-Cook, G., Tuddenham, E.G. "Factor VII deficiency and the FVII mutation database". *Hum Mutat.*;17(1):3-17, 2001.

Pinotti M., Monti, M., Baroni, M., Marchetti, G., Bernardi, F. "Molecular characterization of factor X deficiency associated with borderline plasma factor X level", *Haematologica*; 89:501-502, 2004.

Sollo, D.G, Saleem, A. "Prekallikrein (Fletcher factor) deficiency". *Ann Clin Lab Sci*; 15(4):279-85, 1985.

Tamary, H., Fromovich-Amit, Y., Shalmon, L., Zaizov1, R., Yaniv, I., Klar, A. "Molecular characterization of four novel mutations causing factor VII", *Hematology Journal* 1, 382-38, 2000.

Van Wijk, R., Nieuwenhuis, K., Van den Berg, M., Huizinga E.G., Van der Meijden, BB., Kraaijenhagen, RJ. and Van Solinge, WW. "Five novel mutations in the gene for human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency". *Blood*, 98, (2): 358-367, 2001.

ALTERACIONES HEMORRAGÍPARAS ADQUIRIDAS DE LA COAGULACIÓN

Patricia Fardella B. e Iván Palomo G.

- 1. Introducción**
- 2. Coagulación intravascular diseminada**
 - 2.1. Tipos de CID
 - 2.2. Etiologías
 - 2.3. Elementos que gatillan la CID
 - 2.4. Eventos fisiopatológicos
 - 2.5. Características clínicas
 - 2.6. Laboratorio
 - 2.7. Criterios diagnósticos
 - 2.8. Tratamiento
- 3. Deficiencia de vitamina K**
 - 3.1. Causas de deficiencia de vitamina K
 - 3.2. Diagnóstico
 - 3.3. Tratamiento
- 3. Alteraciones hemostáticas en enfermedades hepáticas**
 - 4.1. Enfermedades hepáticas y fisiopatología de la hemostasia
 - 4.1.1. Hepatitis aguda
 - 4.1.2. Enfermedad hepática crónica
 - 4.1.3. Colestasia
 - 4.1.4. Enfermedad hepática neoplásica
 - 4.1.5. Cirugías
 - 4.1.6. Trasplante hepático
 - 4.2. Laboratorio
 - 4.3. Tratamiento
- 5. Inhibidores adquiridos de la coagulación**
 - 5.1. Inhibidores de factor VIII
 - 5.1.1. Clasificación
 - 5.1.2. Características
 - 5.1.3. Detección
 - 5.1.4. Tratamiento
 - 5.2. Inhibidores de factor IX
 - 5.3. Inhibidores de factor XI
 - 5.4. Inhibidores de factor V

Resumen

Los trastornos hemorrágicos adquiridos de la coagulación son varios y pueden estar asociados a enfermedades sistémicas o a la presencia de anticuerpos que inhiben a los factores de coagulación.

En este capítulo se describirán los fundamentos fisiopatológicos, características clínicas, hallazgos de laboratorio y aspectos básicos del tratamiento de los trastornos más importantes de este tipo: coagulación intravascular diseminada (CID), deficiencia de vitamina K, alteraciones hemostáticas en enfermedades hepáticas, e inhibidores adquiridos de la coagulación.

Para entender este capítulo se requiere conocimiento previo de los sistemas de la coagulación y sistemas fibrinolítico (capítulo 20), algunos aspectos de hemostasia primaria (capítulo 19) y pruebas de laboratorio de hemostasia (capítulo 31).

1. INTRODUCCIÓN

Los desórdenes adquiridos de la coagulación corresponden a diferentes tipos de trastornos de la hemostasia, los cuales pueden estar asociados a enfermedades sistémicas o la presencia de anticuerpos que actúan como inhibidores de los factores de coagulación. Sin embargo, considerando su relevancia clínica y la gravedad que, en general, ellos involucran, los grandes síndromes adquiridos más importantes son la coagulación intravascular diseminada (CID) y los trastornos producidos en la enfermedad hepática.

La CID es un término utilizado para describir un síndrome de activación anormal de la coagulación que resulta en generación exagerada de trombina, lo cual condiciona un consumo de las proteínas anticoagulantes naturales, de los factores de coagulación y activación de la fibrinólisis. Todo lo anterior tiene como traducción clínica un síndrome hemorrágico y de trombosis de la microcirculación que va a perpetuar el daño orgánico que pasa a ser múltiple y puede ocasionar la muerte.

La enfermedad hepática también condiciona alteraciones múltiples de la coagulación, considerando que el hígado es uno de los principales órganos que intervienen en la síntesis y degradación de proteínas. En presencia de daño hepático se afectan tanto la hemostasia primaria, secundaria, anticoagulantes naturales y fibrinólisis, como consecuencia de deficiencias de múltiples factores de la coagulación (Factores vitamina K

dependientes, además de factor V y fibrinógeno), α_2 antiplasmina, plasminógeno, proteína C (PC) y proteína S (PS).

La deficiencia de vitamina K, en general, se observa en pacientes que se encuentran en tratamiento anticoagulante oral con fármacos que inhiben su acción, en trastornos nutricionales como son una dieta deficitaria, situación que se presenta en alcohólicos o pacientes hospitalizados y en trastornos de la absorción ocasionados por enfermedades intestinales o por uso de fármacos.

Los inhibidores específicos de la coagulación son menos conocidos por tener una menor frecuencia en clínica, sin embargo cuando ellos están presentes pueden ocasionar cuadros hemorrágicos graves.

En este capítulo se abordarán los aspectos fundamentales de la fisiopatología y clínica de cada una de estas entidades.

2. COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA

La CID es un desorden complejo de la coagulación con una fisiopatología que es variable y dependiente en gran medida del evento que lo gatilla; todo ello condiciona una gran variabilidad en los elementos fisiopatológicos, de laboratorio y manifestaciones clínicas que hacen de este cuadro una situación difícil para el clínico. Sin embargo, se puede decir que la CID es una alteración trombohemorrágica sistémica que

se presenta en algunas situaciones clínicas bien definidas y que se acompaña de alteraciones de laboratorio que indican activación de procoagulantes, activación fibrinolítica, consumo de inhibidores de la coagulación y evidencias bioquímicas de daño o falla orgánica.

A pesar de que las manifestaciones hemorrágicas son más evidentes, razón por la que muchos autores la consideran como un síndrome hemorrágico sistémico; la trombosis microvascular y a veces de grandes vasos, es una de las responsables de perpetuar el daño orgánico múltiple que acompaña a esta condición y que finalmente puede llevar a la muerte del paciente.

En las décadas pasadas, a la CID se la denominó *coagulopatía de consumo*, sin embargo este término no es adecuado porque muchos elementos no son “consumidos” sino que biodegradados por el sistema fibrinolítico. Posteriormente se usó el término *síndrome de defibrinación* el cual tampoco es apropiado, llegando finalmente a la denominación de CID que es el que se usa actualmente.

2.1. Tipos de CID

a) CID aguda descompensada. Es el cuadro más conocido, grave y que en muchos casos lleva a la muerte del paciente. Se producen hemorragias y trombosis de la microcirculación y los exámenes de laboratorio muestran alteraciones evidentes.

b) CID crónica compensada. Son cuadros de larga data, asociados a una condición crónica como enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, renales, vasculares, desórdenes hematológicos, neoplasias, daño hepático crónico, eclampsia, etc. En general son asintomáticos y se descubren al realizar las pruebas de coagulación, las que están alteradas en grado moderado.

c) Fibrinólisis primaria. Corresponde a estados en los cuales los hallazgos de laboratorio y las complicaciones clínicas, son dominados por los efectos de la fibrinólisis y fibrinogenólisis. Es un trastorno infrecuente, provocado la mayoría de las veces por intervenciones quirúrgicas en tejidos ricos en activadores del plasminógeno, como la próstata y los órganos pélvicos. Como no existe acción de la trombina las manifestaciones clínicas son de tipo hemorrágico. Hay degradación generalizada de fibrinógeno por lo que no hay aumento de los

productos de degradación de la fibrina (PDF) específicos de la fibrina (dímero D), pero sí de los productos de degradación del fibrinógeno. El control de la fibrinólisis está además limitado por las bajas concentraciones plasmáticas de alfa₂-antiplasmina, y cuando este inhibidor está disminuido, el efecto sistémico de la plasmina es mayor. Una diferencia fundamental respecto los cuadros de CID, la cual involucra aumento de trombina como elemento principal. La característica de laboratorio más importante es el tiempo de lisis de euglobulinas, que mide la actividad fibrinolítica en el plasma, el cual está acortado, situación que no se observa en la CID.

2.2. Etiologías

La CID se ha asociado a múltiples entidades clínicas bien definidas, las que se mencionan a continuación:

a) Septicemias. La sepsis bacteriana se asocia a menudo con CID y puede ser causada por gérmenes Gram negativos (endotoxina 1) o por Gram positivos (mucopolisacáridos). El mecanismo de producción es la activación directa de ambas vías de la coagulación (intrínseca y extrínseca; ver capítulo 20) por componentes de membrana específicos del microorganismo, endotoxinas o mucopolisacáridos, con activación de plaquetas, monocitos/macrófagos y polimorfonucleares, que a su vez liberan material procoagulante de diversa índole, los que tienden a perpetuar las condiciones necesarias para la generación de trombina. Las endotoxinas activan el Factor XII y Factor XI, lo cual junto a la activación plaquetaria y de monocitos, pueden activar cada uno por sí mismo la coagulación. Las endotoxinas también pueden liberar citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleukina 1 (IL-1) y activar el sistema del complemento; lo cual produce destrucción endotelial y perpetúa el daño multiorgánico.

b) Trauma severo. El gatillamiento es por combinación de mecanismos, que incluyen liberación de grasas y fosfolípidos desde el tejido a la circulación, hemólisis y daño endotelial.

c) Accidentes obstétricos. Dentro de este grupo encontramos la embolia de líquido amniótico, desprendimiento placentario, feto muerto retenido, eclampsia y aborto. Son cuadros agudos y graves que comprometen la vida de la madre y el feto. La causa de la activación sistémica de la coagulación es la liberación de tejidos que expresan factor tisular

y fosfolípidos aniónicos. A continuación se señalan algunas de las características de cada una de estas situaciones:

- **Embolía de líquido amniótico.** Éste parece ser el más agudo y catastrófico de todos los accidentes obstétricos, ya que el líquido amniótico es un potente activador de coagulación. El paso de líquido amniótico a la circulación produce falla respiratoria aguda, colapso circulatorio, “shock” y CID.
- **Desprendimiento placentario.** En este caso pasan a la circulación enzimas o tejidos, incluyendo material tipo tromboplastina que serían los responsables de activar la coagulación. El grado de separación placentaria se correlaciona con la extensión de la CID.
- **Síndrome de feto retenido.** Se observa presencia de CID en el 50% de los casos después de las 5 semanas de producida la muerte, debido al paso de tejido fetal necrótico a la circulación materna. Inicialmente se presenta con características de CID crónica compensada la que en un momento no determinado se transforma en un cuadro agudo. El tratamiento es simple cuando se trata de un feto único, y consiste en extraer el feto de la cavidad uterina, sin embargo cuando hay muerte de un feto en presencia de un embarazo múltiple el manejo de este cuadro es complejo. En la eclampsia, en general se presenta un cuadro de CID órgano específico, a nivel de placenta y riñón, que en 10 a 15% puede transformarse en CID aguda.
- **Abortos provocados.** Se puede observar CID compensada o aguda cuando en la maniobra abortiva se han utilizado sustancias hipertónicas o cuando ha evolucionado como un aborto séptico.

d) Neoplasias. La CID es una complicación hemostática bien conocida en los tumores sólidos. En algunos casos el cuadro es de tipo crónico y presenta sólo alteraciones de laboratorio, pero en algunos pacientes puede ser un cuadro agudo. Se observa más frecuentemente en pacientes con neoplasias avanzadas, cáncer de mama y cuando existe presencia de necrosis en el tumor. El mecanismo de activación no es claro, pero existen estudios que indican que el factor tisular expresado en la superficie de las células tumorales estaría involucrado. Además algunos reportes señalan una sobrevida menor en los pacientes que desarrollan CID, independiente del estadio tumoral.

e) Neoplasias hematológicas. Las neoplasias hematológicas también pueden asociarse a CID; las leucemias agudas y en especial la promielocítica o M3, mielomonocítica o M4 y monolítica o M5, pueden presentar esta complicación. También se ha observado en pacientes con metaplasia mieloide agnógena, policitemia vera y hemoglobinuria paroxística nocturna. Dentro de este grupo la más frecuente es la leucemia promielocítica en la cual la CID puede ser causa de muerte en las primeras etapas, ya que la quimioterapia puede desencadenar o agravar el cuadro hemorrágico el cual se asocia a hiperfibrinólisis.

f) Hemólisis intravascular. En este grupo se incluyen las reacciones hemolíticas transfusionales, transfusión masiva, anemias hemolíticas intravasculares graves (Ej. mordedura de araña), anemia hemolítica microangiopática (AHM). Además debe incluirse el Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), Síndrome hemolítico urémico (SHU) y AHM inducida por quimioterapia. La faceta común de la AHM es el daño endotelial, que causa adhesión y agregación de plaquetas y la formación de trombina en pacientes con PTT y SHU. La disminución adquirida de la proteasa que escinde los multímeros del Factor von Willebrand (FVW) lleva a la acumulación de multímeros de alto peso molecular que favorecen los fenómenos trombóticos a nivel de la microcirculación. La posibilidad de activar la coagulación es independiente de la magnitud del fenómeno hemolítico, pudiendo incluso desencadenarse con hemólisis de poca magnitud y el mecanismo sería la liberación de fosfolípidos de la membrana y de ADP de los glóbulos rojos.

g) Diferentes virus, incluyendo el virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV), se han asociado con CID, siendo más comunes los de la varicela, hepatitis y citomegalovirus. El mecanismo desencadenante no está clarificado, pero se postulan una reacción antígeno-anticuerpo asociada con activación de la vía intrínseca de la coagulación, una reacción anormal de las plaquetas, y/o una activación de la vía extrínseca por liberación de factor tisular por el endotelio dañado.

h) Quemaduras extensas. Las quemaduras pueden desarrollar fenómenos de CID; los mecanismos son múltiples e incluyen la destrucción de tejidos con paso de enzimas o material tisular a la circulación y la microhemólisis con liberación de fosfolípidos de

membrana y ADP desde los glóbulos rojos.

i) Elementos protésicos. Las válvulas de Le Veen o Denver para realizar “shunts” peritoneovenosos o pleurovenosos en terapias paliativas, puede desencadenar fenómenos de CID aguda. Lo mismo se ha observado con el uso de balones de contrapulsación aórtico, que pueden desencadenar fenómenos de CID crónica compensada o aguda. Estos elementos protésicos exponen la sangre a sustancias extrañas y pueden de esta forma activar la coagulación.

j) Trastornos vasculares. Las patologías vasculares también se asocian a CID. El síndrome de Kasabach-Merrit corresponde a la asociación de hemangiomas cavernosos y CID; alrededor de 25% de los pacientes con hemangiomas cavernosos gigantes presentan una CID crónica compensada, que puede evolucionar a un cuadro agudo por causas desencadenantes que no están bien establecidas. En pacientes que presentan telangectasia hemorrágica familiar también ocurre un fenómeno semejante, con una incidencia de CID crónica compensada de alrededor de 50%. También se ha observado en pacientes con enfermedad de pequeños vasos, como fenómenos vasoespásticos, angiopatía diabética grave y angiopatías asociadas a enfermedades autoinmunes.

2.3. Mecanismos que gatillan la CID

Los diferentes agentes etiológicos activan el sistema de la coagulación en diferentes puntos. La vía más importante de activación es la vía extrínseca por medio del factor tisular, el cual activa al factor X, para posteriormente generar trombina. Por mecanismos de retroalimentación la trombina activa los factores de la vía intrínseca, lo que contribuye a una mayor formación de trombina.

La vía intrínseca también puede ser activada en forma directa. La activación del factor XII determina la activación de la vía de las kininas a través de transformación de pre-kalikeína en kalikeína. La kalikeína transforma el plasminógeno en plasmina.

También debe destacarse la acción de citoquinas y de péptidos vasoactivos para iniciar y perpetuar la CID. El TNF, IL-1, IL-6 e interferón- γ (IFN- γ) participan en la activación de la coagulación. También se ha observado que TNF, IL-1, IL-6 y endotoxinas inhiben la actividad de la trombosmodulina endotelial y soluble; este

hecho determina una disminución de la actividad anticoagulante natural a través de la PC y PS, favoreciendo los fenómenos trombóticos (ver capítulo 20). Estos eventos producen mayor daño endotelial, creando un círculo vicioso que lleva a un mayor daño orgánico.

2.4. Eventos fisiopatológicos

Las alteraciones fisiopatológicas de la CID son complejas. Una vez que la coagulación ha sido activada por diferentes eventos (ver punto 2.2), la presencia de trombina y de plasmina en la circulación determinarán los fenómenos fisiopatológicos de este cuadro.

a) Generación de trombina. En modelos animales se encontró que la generación de trombina está exclusivamente mediada por la vía extrínseca involucrando al factor VIIa y factor tisular. La inhibición del factor VIIa o factor tisular suprimió totalmente la generación de trombina inducida por endotoxinas, mientras que la interferencia de la vía intrínseca de la coagulación no interfirió en la activación de la coagulación.

La trombina cumple diversas funciones en la hemostasia: transforma fibrinógeno en fibrina; activa a los factores XI, VIII y V; activa al Factor XIII, que es el encargado de estabilizar la fibrina; es un potente agonista plaquetario; se une a la trombosmodulina para activar PC; libera al inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI).

b) Inhibidores naturales de la coagulación. Los principales anticoagulantes fisiológicos parecen verse afectados. Los niveles plasmáticos de AT, III están marcadamente disminuidos como resultado de la coagulación, degradación por elastasa liberada por neutrófilos activados y síntesis alterada de AT, III. También se ha descrito alteraciones en el sistema de la PC.

c) Defectos del Sistema fibrinolítico. El sistema fibrinolítico es inhibido en el momento de máxima activación. La inhibición se asocia un aumento plasmático de los niveles del inhibidor del activador del fibrinógeno tipo 1 (PAI-1). Aunque hay actividad fibrinolítica en respuesta a la formación de fibrina, el nivel de actividad es insuficiente para contrarrestar el depósito de fibrina sistémico.

Al producirse un aumento de la actividad de la

trombina, ella rompe al fibrinógeno, liberando fibrinopéptidos A, B y fibrina. Esta fibrina soluble, va a ir a formar polímeros de fibrina que son estabilizados por la acción de factor XIII.

Por otra parte el aumento de la actividad de plasmina también actúa sobre el fibrinógeno, transformándolo en PDF. Estos PDF son de varios tipos, X, Y, D, E. Los FDP X e Y van a interferir en la polimerización normal de la fibrina y junto con los PDF D y E producen disfunción plaquetaria. Ambas situaciones contribuyen con el fenómeno hemorrágico. La plasmina además actúa sobre la fibrina, que cuando ha sido estabilizada por el factor XIII va a dar origen al dímero D que es un sensible marcador de trombosis. Finalmente la plasmina también es capaz de biodegradar los factores V, VIII, IX y XI. Todos estos productos pueden ser detectados en el laboratorio y contribuyen a realizar el diagnóstico de CID.

2.5. Características clínicas

Las manifestaciones clínicas están determinadas muchas veces por la condición desencadenante de la CID, en pacientes críticamente enfermos. Los signos más frecuentes son de tipo hemorrágico, destacando el púrpura y petequias; en los pacientes sometidos a cirugía o trauma, el sangrado de los sitios comprometidos y sitios de punción es otro hallazgo frecuente.

También puede manifestarse por trombosis de la microcirculación que afecta la función renal, pulmones (síndrome de distress respiratorio del adulto) y cerebro. Las lesiones necróticas de la piel pueden ser frecuentes y su manifestación más severa es la púrpura fulminante que se puede observar en la meningococcemia. La presencia de AHM también es una manifestación frecuente.

2.6. Características de laboratorio

El diagnóstico se basa en la detección de indicadores *in vivo* de activación de la coagulación en pacientes sin evidencias de formación localizada de trombos.

El tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) suelen estar prolongados. Hay biodegradación inducida por plasmina de varios factores (FV, FVIII, FIX y FXI). El tiempo de trombina (TT) generalmente está alargado por disminución del fibrinógeno y efecto de los productos de degradación del fibrinógeno (PDF).

El recuento de plaquetas suele estar disminuido en la CID, aunque con rangos muy variables, desde cifras tan bajas como 2.000-3.000/ μ L a 100.000/ μ L (normal: 150.000-400.000/ μ L). En la tabla 23-1 se muestra un cuadro diferencial entre CID descompensada, CID crónica y Fibrinólisis primaria.

Tabla 23-1. Diferencias entre CID aguda descompensada, CID crónica y Fibrinólisis primaria

	CID aguda descompensada	CID crónica	Fibrinólisis primaria
Recuento de plaquetas	↓	↓-N	N
Fibrinógeno	↓	↓-N-↑	↓
PDF	↑	↑	↑
Factor V	↓	↓-N	↓
Factor VIII	↓	↓-N-↑	N
Lisis de euglobulinas	Negativo	Negativo	Positivo
Test sulfato de protamina	Positivo	Positivo	Negativo

PDF: productos de degradación de la fibrina; ↓: disminuido; ↑: aumentado; N: normal

2.7. Criterios diagnósticos

En general la CID se encuentra en un contexto clínico bien definido, en un paciente grave, con

manifestaciones hemorrágicas y con menos frecuencia, evidencia de trombosis. Los criterios diagnósticos de laboratorio, se señalan a continuación:

- **Evidencias de activación procoagulante:** elevación del fragmento 1-2 de protrombina, elevación de fibrinopéptido A y B, y elevación del dímero D.
- **Evidencias de activación de la fibrinólisis:** elevación del dímero D, elevación de los PDF, y elevación de los niveles de plasmina.
- **Evidencias de consumo de inhibidores:** disminución de ATIII, disminución de α 2-antiplasmina, y disminución de PC y proteína S.
- **Evidencias de laboratorio de daño orgánico:** elevación de LDH, elevación de creatinina, disminución del pH, disminución de pO_2 .

2.8. Tratamiento

Los aspectos fundamentales del tratamiento de la CID son los siguientes:

a) Control de la causa. Es uno de los elementos más importantes ya que la exposición prolongada a agentes desencadenantes puede agravar la CID. La eliminación de la causa de la CID puede ser rápida en las pacientes obstétricas, a través de una cesárea o la evacuación uterina. En el paciente crítico cursando una sepsis grave, debe realizarse un rápido control de la infección y del compromiso hemodinámico a la que ella conduce. Las fracturas deben ser estabilizadas y los tejidos necróticos retirados.

b) Minimizar la lesión endotelial. Se debe detener el proceso inflamatorio local. El tratamiento del «shock» en la restauración de la microcirculación se refiere a corregir la actividad proteolítica local y de la liberación precoz de mediadores inflamatorios por medios farmacológicos.

c) Terapia de reemplazo. Está indicada sólo en pacientes que presentan sangrado. El consumo de factores de coagulación puede ser corregido con crioprecipitados, concentrados de plaquetas y plasma fresco congelado. Esta terapia puede reducir la tendencia al sangrado. La terapia con plasma fresco o crioprecipitados, aporta tanto factores procoagulantes como anticoagulantes naturales.

d) Inhibir las proteasas de la coagulación. La inhibición de la trombina es fundamental en el tratamiento de la CID. Una de las formas de inhibir las proteasas es con el uso de heparina, sin embargo ésta puede agravar seriamente la

hemorragia de muchos pacientes. La heparina en dosis bajas por vía subcutánea o en dosis terapéutica endovenosa es recomendada sólo en pacientes con CID compensada. En pacientes con feto muerto retenido en el contexto de un embarazo gemelar, puede ser de gran utilidad para evitar que una CID crónica se transforme en aguda, permitiendo así que el feto vivo llegue a una edad gestacional que le permita sobrevivir. En pacientes que sangran, la heparina no debiera ser usada, a excepción de casos críticos en que la reposición de los componentes de coagulación falla para detener una hemorragia masiva y no se dispone de otras terapias como ATIII, en estos casos puede usarse en infusión continua en dosis bajas. El uso de heparina no es recomendado en pacientes con CID y sepsis.

- **ATIII.** La ATIII es un potente anticoagulante natural que se une a los factores de coagulación activados. Además induce la liberación de prostaciclina desde la pared del vaso, la cual tiene un marcado efecto antiinflamatorio. La ATIII debe usarse como monoterapia y no asociada a heparina para no agravar los síntomas hemorrágicos. La dosis es 1.500 a 3.000 unidades/día por 2 días.

- **Inhibidores sintéticos de proteasas.** Se puede utilizar infusión continua de ofgabexate mesilate (FOY) o nafamostat mesilate (FUT). Estudios multicéntricos controlados muestran que son efectivos en mejorar la respuesta clínica, el recuento de plaquetas y el TP comparado con la ATIII.

- **Administración de otros anticoagulantes naturales.** Son más efectivos que la heparina ya que no exacerban la tendencia al sangrado.

- **PC activada.** puede inhibir la generación de trombina y acelerar la actividad fibrinolítica. La dosis es de 5.000 a 10.000 unidades por 2 días.

En el momento actual tanto la AT III como la PC activada recombinante humana serían las mejores alternativas de manejo para pacientes con CID aguda.

- **Inhibidor del Factor Tisular.** Es una intervención terapéutica lógica, ya que el factor tisular es uno de los principales implicados en la etiopatogenia. El inhibidor del factor tisular es un potente inhibidor de

la vía extrínseca de la coagulación; se une a factor Xa para inhibir el complejo factor VIIa-factor tisular. Existen estudios clínicos que están en marcha.

f) Antifibrinolíticos. Pueden ser utilizados en leucemia promielocítica aguda, ya que en ella se observa síndrome hemorrágico asociado a hiperfibrinólisis. Se utiliza ácido tranexámico por vía oral o endovenosa.

3. DEFICIENCIA DE VITAMINA K

La vitamina K fue descubierta en 1929 y ella juega un rol importante en la coagulación ya que interviene en la carboxilación de las proteínas de la coagulación como son los factores II, VII, IX y X, y las proteínas C y S que son anticoagulantes naturales.

La vitamina K produce carboxilación del ácido glutámico transformándolo en γ -carboxiglutamato, a través de una enzima carboxilasa que es vitamina K dependiente (ver capítulo 20). La vitamina K se transforma en epóxido-vitamina K, la cual a través de una epóxido reductasa vuelve a transformarse en vitamina K, para continuar el ciclo. La acción de la epóxido reductasa es bloqueada por la warfarina (anticoagulante oral) produciendo una acumulación de la forma epóxica.

Al alterarse la carboxilación del ácido glutámico se altera la carboxilación de las proteínas de la coagulación antes señaladas a su forma activa, ya que la carboxilación permite a los factores unirse al calcio; los productos descarboxilados son conocidos como PIVKA ("protein induced in vitamin K absence", proteínas inducidas en ausencia de vitamina K), los cuales tienen una actividad biológica muy reducida. La alteración de la carboxilación puede estar determinada por ausencia de la vitamina o por alteración de la función hepática.

Existen tres tipos de vitamina: K_1 o phyloquinona, que se encuentra en los vegetales verdes; K_2 o menaquinona producida por bacterias de la flora intestinal, es la principal forma de depósito hepático; y K_3 o menadiona vitamina K obtenida de la madre.

3.1. Causas de deficiencia de vitamina K

- Ingesta inadecuada: dieta pobre en pacientes con aporte parenteral prolongado sin aporte.

- Malabsorción: en ausencia de sales biliares por obstrucción de conductos biliares o por mala absorción intestinal secundaria a enfermedades inflamatorias del intestino.
- Alcoholismo
- Drogas: Cumarínicos (warfarina, acenocumarol, raticidas) Antibióticos, (cefalosporinas), salicilatos, megadosis de vitamina E, y anticonvulsivantes.

3.2. Diagnóstico

La tendencia al sangrado aparece cuando los niveles de factores de coagulación son $< 30 - 35\%$. En general se prolonga el TP, el cual evalúa prácticamente todos los factores vitamina K dependiente, excepto el factor IX. Cuando la deficiencia es más severa puede prolongarse el TTPA. El TT siempre es normal. Al realizar en el laboratorio estudios de mezcla de plasma del paciente más plasma normal en relación 1:1, estos tiempos se normalizan; ello indica que la prolongación del TP y eventualmente el TTPA se deben al déficit de factores de la coagulación y no a la presencia de inhibidores específicos de la coagulación.

Si el paciente ha recibido vitamina K recientemente, puede haber normalización del factor VII, pero los factores II y X aún estarán disminuidos.

3.3. Tratamiento

A los pacientes que presentan esta deficiencia se debe administrar 5 mg de esta vitamina por vía subcutánea por 3 días. La ausencia de respuesta indica que existe daño hepático.

4. ALTERACIONES HEMOSTÁTICAS EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS

El hígado es el principal sitio de síntesis de proteínas procoagulantes, fibrinolíticas e inhibitorias de la coagulación. Los trastornos de la hemostasia asociados a desórdenes hepáticos presentan dos mecanismos: disminución de la síntesis de proteínas de la coagulación, de la fibrinólisis e inhibitorias, y disminución del aclaramiento de los componentes hemostáticos activados.

Las enfermedades hepáticas tales como cirrosis y hepatitis, afectan la capacidad de síntesis del órgano. Los cambios hemostáticos son frecuentemente sutiles. La prolongación del TP

es considerado un signo de gravedad de la enfermedad y puede ser causado por disminución de la síntesis de los factores vitamina K dependientes, baja ingesta de la misma vitamina o mala absorción de ésta. Aumento de la actividad fibrinolítica y trombocitopenia también pueden presentarse en la enfermedad hepática.

4.1. Enfermedades hepáticas y fisiopatología de la hemostasia

4.1.1 Hepatitis aguda

En pacientes con hepatitis aguda, el síndrome hemorrágico es raro. La alteración de laboratorio más frecuente es trombocitopenia leve, clínicamente insignificante (100.000-150.000 plaquetas/ γ L). La patogénesis parece ser variada y compleja, incluyendo: (a) esplenomegalia, (b) disminución de la producción plaquetaria por infección viral de los megacariocitos, (c) interacción directa entre el virus y plaquetas en circulación produciendo fagocitosis, (d) activación de plaquetas y remoción prematura de éstas desde la circulación, y (e) destrucción plaquetaria mediada por complejos inmunes y anticuerpos. La trombocitopenia leve se resuelve rápidamente durante el estado de recuperación de la hepatitis. La trombocitopenia moderada es sugerente de un pronóstico desfavorable.

Las anomalías funcionales de las plaquetas son usualmente leves y de poca significancia clínica. El mecanismo por el cual estas alteraciones plaquetarias ocurren no está bien definido.

Las anomalías de los factores de la coagulación se reflejan en prolongación del TP (TP), asociado con la gravedad del daño celular y sin considerar la etiología específica de la enfermedad; el TP predice mejor que la bilirrubina, transaminasas o albúmina sérica el daño hepático. Una condición de producción deficiente puede ser relacionada con una deficiencia de la vitamina K. La síntesis de los factores vitamina K dependientes puede ser interrumpida debido a períodos prolongados de desnutrición o uso prolongado de antibióticos de amplio espectro. Los factores II (protrombina), VII y X se presentan más frecuente y marcadamente disminuidos que el factor IX y otros factores no dependientes de vitamina K.

Los factores V, XI y XIII son sintetizados por el hígado, pero no son vitamina K dependientes;

todos estos factores son deficientes en pacientes con enfermedad hepática grave. Los niveles plasmáticos de FXII, pre-kalicleína (PK), kininógeno de alto peso molecular (KHMW) también pueden estar disminuidos. El déficit de los factores del sistema de contacto no interviene en la patogénesis del síndrome hemorrágico.

El incremento del factor VIII es independiente del aumento del FVW, lo que se debe a la acción de dicho factor como reactante de fase aguda en respuesta a la inflamación. También existe evidencia que el FVIII puede presentar anomalías cualitativas pudiendo encontrarse un TTPA prolongado.

El fibrinógeno puede estar normal o aumentado (reactante de fase aguda). También se puede encontrar hipofibrinogenemia debido a disminución en la síntesis por el hepatocito, siendo un indicador desfavorable en el pronóstico de hepatitis aguda. Rara vez se encuentra una disfibrinogenemia en hepatitis aguda, siendo más común en hepatitis fulminante, en donde se observa prolongación del TT con niveles normales de fibrinógeno.

Los pacientes con hepatitis fulminante pueden desarrollar CID, en donde se observa una marcada hipofibrinogenemia en asociación con trombocitopenia, y altos niveles de PDF. El daño hepatocelular marcado, asociado a la infección viral puede gatillar la liberación de sustancias procoagulantes desde el hepatocito necrótico, expresión de factor tisular sobre células mononucleares sanguíneas o células endoteliales, liberación de mediadores inflamatorios (IL-2 o TNF) y acumulación de los factores de la coagulación activados por una disminución en el flujo del sistema portal. La CID puede verse favorecida por un descenso en el aclaramiento de los factores de la coagulación por el hígado y disminución de los niveles de las proteínas reguladoras de la coagulación, debida a una menor síntesis más que por consumo.

4.1.2. Enfermedad hepática crónica

En pacientes con hepatitis crónica o cirrosis se puede observar trastornos en la hemostasia primaria, secundaria, fibrinólisis y anticoagulantes naturales. Lo anterior conduce a manifestaciones especialmente de tipo hemorrágico, pero en algunos escasos pacientes podrían presentarse también fenómenos trombóticos. A continuación se observan las

alteraciones que se pueden observar en la hemostasia primaria y secundaria:

Alteraciones de la hemostasia primaria.

Consisten en trombocitopenia de grado variable que parece ser causada por un aumento del "pool" esplénico. En individuos normales éste corresponde a un tercio de la masa plaquetaria total, mientras que en la enfermedad hepática crónica con esplenomegalia congestiva puede alcanzar al 60-90% del total de las plaquetas del cuerpo. También se observa destrucción plaquetaria mediada por anticuerpos, acompañado de la incapacidad de la médula ósea para compensar con un aumento de la producción de plaquetas. Las anomalías en la función de éstas son atribuidas a presencia de PDF en el plasma que inhiben la agregación plaquetaria, disminución de nucleótidos adenina totales asociados con un aumento de ATP/ADP en el medio, aumento del colesterol en la membrana plasmática y disminución de los mecanismos de señal de transmembrana plaquetaria.

En pacientes alcohólicos, la trombocitopenia es causada además porque el alcohol disminuye la síntesis de plaquetas por los megacariocitos y existe déficit de folato.

Alteraciones de la hemostasia secundaria.

Estas alteraciones se deben a que la pérdida progresiva de los hepatocitos conduce a una disminución en los niveles plasmáticos de todos los factores de la coagulación por disminución en su síntesis (excepto el FVIII). La disminución de los factores vitamina K dependientes se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, sin embargo la disminución del FV predice mejor la extensión del daño hepático.

Los niveles de fibrinógeno se encuentran normales o aumentados, aunque en etapas avanzadas se puede observar una hipofibrinogenemia leve a moderada. Varios mecanismos pueden explicar esto: (a) disminución en la síntesis, (b) pérdida en los espacios extravasculares (edema, ascitis), (c) CID, generalmente crónica, y (d) aumento del catabolismo por plasmina. Un porcentaje alto de los pacientes presentan disfibrinogenemia, en donde el fibrinógeno tiene un excesivo contenido de ácido siálico (similar al fibrinógeno fetal); la disfibrinogenemia se detecta al laboratorio por un TT prolongado con fibrinógeno normal o sólo levemente disminuido y PDF normal o levemente aumentado.

La concentración de los factores del sistema de contacto y el FXIII, disminuyen los primeros por una baja en la síntesis y el segundo por consumo.

En estos pacientes se puede observar CID crónica; con acortamiento de la vida media del fibrinógeno, aumento del fibrinopéptido A, del complejo fibrinógeno/fibrina de alto peso molecular y aumento de dímero D lo anterior se puede explicar por un acelerado catabolismo del fibrinógeno y posiblemente de otros factores de la coagulación sensibles a la trombina. El posible mecanismo sería la liberación de sustancias procoagulantes al torrente sanguíneo desde los hepatocitos necróticos.

La disminución de los **anticoagulantes naturales** se traduce en disminución de ATIII, PC, PS y cofactor II-heparina y se correlaciona con la gravedad del daño hepático.

La presencia de **fibrinolisis** aumentada se observa en daño hepático terminal y se caracteriza por una disminución en el tiempo de lisis de euglobulinas, hipofibrinogenemia y aumento de los PDF séricos. Se debe a un aumento de los activadores del plasminógeno, especialmente activador tisular del plasminógeno (t-PA), y una disminución del aclaramiento hepático de los inhibidores de los activadores del plasminógeno, especialmente PAI-1; la α_2 -antiplasmina también disminuye. Todo esto contribuye a que ocurra: (a) disminución del plasminógeno, (b) aumento del fibrinopéptido B y de los PDF y (c) aumento del complejo plasmina/ α_2 -antiplasmina. La hiperfibrinolisis es una causa importante del síndrome hemorrágico en la enfermedad hepática avanzada.

La magnitud del sangramiento en la enfermedad hepática crónica se relaciona con la magnitud de la trombocitopenia, disminución de la función plaquetaria, de los factores de coagulación y la presencia o no de hiperfibrinolisis; todos ellos relacionados a la gravedad del daño hepático.

En algunos pacientes con daño hepático grave se puede observar fenómenos trombóticos como consecuencia de una disminución severa de las proteínas anticoagulantes naturales (ATIII, PC y S), cuyo manejo es muy difícil, ya que el riesgo hemorrágico de ellos prácticamente contraindica la anticoagulación.

4.1.3. Colestasia

Una obstrucción en el tracto biliar puede causar disminución en la absorción de la vitamina K₁ dependiente de sales biliares en el intestino delgado, produciéndose en estos pacientes una disminución de los factores VII, X, II y IX, mientras que otros factores pueden permanecer normales o aumentar como es el caso de los factores VIII, V y fibrinógeno, y los anticoagulantes naturales PC y ATIII.

4.1.4. Enfermedad hepática neoplásica

En neoplasia primaria avanzada y en presencia de metástasis hepática, las anomalías hemostáticas son similares a las encontradas en pacientes con enfermedad hepatocelular avanzada, con la diferencia que en las neoplasias el fibrinógeno y a veces el FV, están aumentados. Un TT prolongado es mucho más frecuente en pacientes con hepatocarcinoma que en pacientes con cirrosis hepática, probablemente porque en estos pacientes se ha descrito la presencia de disfibrinogenemia (fibrinógeno rico en ácido siálico); además tienen protrombina no carboxilada.

4.1.5. Cirugías

La cirugía en pacientes con enfermedad hepática avanzada y coagulopatía significativa está asociada con una gran incidencia de sangrado anormal y muerte. La cirugía mayor ("shunt" porto-sistémico, ortopédica) provoca la liberación de grandes cantidades de activador del plasminógeno desde los tejidos injuriados, lo cual puede sobrepasar transitoriamente los mecanismos de compensación en los pacientes con daño hepático, produciendo una hiperfibrinólisis primaria y sangrado severo. También tienen alto riesgo de sangrado las cirugías a la vesícula y del tracto biliar. En hepatectomía parcial por trauma hepático también puede presentarse un síndrome hemorragiparo.

Los pacientes a los que se les implanta un "shunt" peritoneo-venoso tienen alto riesgo de cursar con CID, debido al paso de células y sustancias procoagulantes desde el líquido ascítico a la circulación. Este cuadro puede ser limitado si antes de instalar el "shunt" se realiza drenaje del líquido ascítico o reduciendo el flujo del líquido dentro del conducto. En raras ocasiones el "shunt" debe retirarse por la CID.

4.1.6. Trasplante hepático

Alteraciones hemostáticas severas son comúnmente observadas en trasplantes hepáticos, siendo el período más crítico la breve fase anhepática que ocurre durante el procedimiento quirúrgico y las primeras horas después de la restauración de la circulación al injerto. Esto, debido a que la coagulopatía se cree es una consecuencia de la pérdida de la síntesis de los factores de la coagulación. No está claro si la liberación de sustancias tromboplásticas por daño endotelial y la pérdida del aclaramiento hepático de los factores de la coagulación activados durante un período de coagulación intravascular y consumo de factores juega un rol importante en la coagulopatía durante el período anhepático.

Se ha observado en algunos casos un aumento de la actividad fibrinolítica debida al aumento del activador tisular del plasminógeno (t-PA) plasmático y disminución del PAI-1 durante la fase anhepática y después de la recirculación.

También se puede observar una trombocitopenia marcada durante y después del trasplante lo que contribuye al sangrado perioperatorio.

Si el injerto es bien preservado, las alteraciones de la coagulación se resuelven rápidamente, pero si el hígado trasplantado es rechazado, los defectos hemostáticos persisten tendiendo a aumentar la complicación por activación de los sistemas de la coagulación y fibrinolítico.

4.2. Laboratorio

En pacientes con daño hepático crónico la evaluación de la hemostasia debe ser completa, no basta con realizar recuento de plaquetas, TP y TTPA, ya que éstos pueden cursar con CID crónica, hiperfibrinólisis primaria y disfibrinogenemia.

El recuento de plaquetas puede estar disminuido. El TP y TTPA están frecuentemente prolongados por la disminución de todos los factores de la coagulación (excepto FVIII). La administración de vitamina K muchas veces logra algún grado de corrección del TP; si no hay corrección la alteración se debe atribuir al daño hepático. Como los factores V y VII son sintetizados por el hígado, pero sólo el FVII es vitamina K dependiente, una disminución de

ambos es consistente con una enfermedad hepática, mientras que una reducción del sólo FVII es consistente con una deficiencia de vitamina K. En cirróticos el TP es mejor predictor, a largo plazo, de falla hepatocelular que los niveles séricos de albúmina, acetilcolinesterasa y colesterol.

El fibrinógeno en presencia de disfibrinogenemia puede encontrarse normal pero el TT estará prolongado. El tiempo de lisis en estos casos estará normal. En presencia de hiperfibrinolisis el paciente presenta niveles muy bajos de fibrinógeno, tiempo de lisis de euglobulinas acortado, indicando la actividad fibrinolítica sobre el fibrinógeno. El tiempo de trombina (TT) también estará prolongado.

La CID crónica es menos frecuente y habitualmente cursa con trombocitopenia leve o recuento normal de plaquetas, discreta prolongación del TP, TTPA y TT los tiempos y fibrinógeno normal o levemente disminuido. Los PDF están discretamente aumentados y el dímero D está elevado.

4.3. Tratamiento

La terapia debe ser enfocada al sitio, naturaleza y extensión del sangrado. Siempre es prudente la administración de vitamina K₁ (10-20 mg iv) y observar el efecto en el TP 6-8 horas después. El plasma fresco congelado contiene todos los factores e inhibidores de la coagulación presentes en la circulación sanguínea, por lo que teóricamente es el tratamiento más adecuado para corregir los múltiples defectos encontrados en enfermedades hepáticas. En la práctica este reemplazo es difícil por las grandes cantidades de plasma requeridos para corregir el TP cuando está prolongado (20-30 mL/Kg.).

La transfusión de concentrados plaquetarios puede ser útil en pacientes con trombocitopenia marcada y sangrado importante. El aumento del recuento plaquetario puede ser menor a lo esperado debido al secuestro esplénico de las plaquetas transfundidas. En la preparación de cirugías mayores, el recuento plaquetario debería mantenerse >100.000/ γ L.

Siempre es de utilidad el uso de antifibrinolíticos (ácido tranexámico), por vía oral o endovenosa, especialmente cuando el paciente tiene hiperfibrinolisis primaria.

En pacientes sometidos a trasplante hepático se ha demostrado útil para disminuir el sangrado en forma profiláctica tanto la aprotinina como el ácido tranexámico por vía endovenosa.

En casos de mayor gravedad se pueden usar los concentrados de complejos de protrombina, en donde la adición de pequeñas cantidades de plasma normal y heparina a los frascos de estos concentrados trombogénicos inactivan proteasas activadas y minimizan el riesgo trombotico de estos concentrados.

5. INHIBIDORES ADQUIRIDOS DE LA COAGULACIÓN

Los inhibidores adquiridos de la coagulación son anticuerpos circulantes que neutralizan en forma específica la actividad procoagulante de varios factores de coagulación produciendo sangramiento. Estos inhibidores son diferentes a los anticuerpos antifosfolípidos (anticoagulante lúpico), ya que éstos son inhibidores inespecíficos que se asocian a fenómenos tromboticos.

Los inhibidores específicos pueden ser de dos tipos: (a) Aloanticuerpos, asociados a trastornos congénitos de la coagulación; y (b) Autoanticuerpos, asociados a pacientes con y sin trastornos inmunes (postparto, ancianos, enfermedades autoinmunes). Los inhibidores de factor VIII son los más frecuentes.

5.1. Inhibidores de factor VIII

La incidencia de inhibidores en pacientes hemofílicos es de aproximadamente el 15%. Existe una predisposición genética a la formación de inhibidores, siendo más frecuente en: afroamericanos, hermanos de pacientes con inhibidor, disminución de HLA A1 y ausencia de HLA CW5.

Existe un grupo pequeño que tiene bajos títulos y en ellos el inhibidor puede desaparecer a pesar de continuar con el uso de factor VIII.

Sobre el 95% de inhibidores ocurren en pacientes portadores de hemofilia grave. También se puede observar en ancianos, postparto (3-12 meses) y en enfermedades autoinmunes; como se dijo previamente estos son autoanticuerpos.

5.1.1. Clasificación

Una forma de cuantificar los inhibidores es determinando las unidades Bethesda (UB) o bien las unidades Oxford (1 UB = 1.21 U Oxford). 1 UB de actividad de inhibidor es la que disminuye el TTPA en un 50% del basal.

La determinación de estas unidades permite clasificar a los pacientes en altos o bajos respondedores. Los respondedores de alto título presentan niveles > 10 U Bethesda y representan más del 60% de los pacientes. Por su parte los bajo respondedores presentan < 5 U Bethesda y corresponden a alrededor del 25% de los pacientes. El clasificar los pacientes en altos y bajos respondedores permite elegir la terapia a utilizar (ver punto 5.2.4).

La presencia de inhibidores es menos frecuente en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), asma, enfermedad intestinal inflamatoria, eritema multiforme, reacción a drogas como penicilina y pénfigo. También se puede observar presencia de inhibidores en portadores de gammapatías monoclonales, neoplasias y embarazo, sin embargo cerca de la mitad de los casos de inhibidores espontáneos se ve en pacientes sanos, especialmente en los primeros meses postparto y en ancianos. La frecuencia de sangrado es mayor y la mortalidad es alta, sin embargo, puede haber remisión espontánea.

5.1.2. Características

Los inhibidores son de origen oligoclonal. En general son de clase IgG y menos frecuentemente IgM.

El factor VIII es una proteína que contiene una cadena pesada y una liviana con diferentes dominios (A1-A2- B- A3- C1- C2) (ver capítulo 20). En general los anticuerpos están dirigidos contra los ubicados en las regiones A2 y C2.

La reacción entre el FVIII y los anticuerpos es tiempo dependiente, por lo que se describen dos tipos de reacciones:

- Reacción tipo 1: En exceso de anticuerpo, resulta una completa neutralización del factor VIII y es irreversible. Es frecuente en hemofílicos transfundidos. Aportando dosis altas de factor VIII se pueden conseguir niveles hemostáticos.
- Reacción tipo 2: Los anticuerpos son de baja afinidad por factor VIII; la reacción es reversible, por lo que generalmente

persisten niveles detectables de FVIII. Este tipo de reacción se ve en autoanticuerpos adquiridos en forma espontánea.

5.1.3. Detección

Se sospecha la presencia de inhibidores cuando en un paciente hemofílico el cuadro clínico se hace más severo, no responde bien a la terapia de reemplazo y requiere mayores dosis de terapia para estabilizarse.

En pacientes no hemofílicos se caracteriza por la aparición espontánea de cuadros hemorrágicos en presencia de un TTPA prolongado.

Cuando se sospecha un inhibidor, en presencia de TTPA prolongado, se debe realizar un estudio de mezcla en relación 1:1 (plasma normal: y plasma del paciente). Esto permite determinar si la prolongación del TTPA se debe a déficit de factores de la coagulación o a la presencia de un inhibidor. Cuando el TTPA no corrige al realizar la mezcla se está frente a la presencia de un inhibidor. Muchas veces estos inhibidores son de acción lenta, por lo que un estudio de mezcla puede corregir cuando el TTPA se hace de inmediato pero al incubar a 37°C por 2 horas se detecta el inhibidor.

5.1.4 Tratamiento

Para el tratamiento de la presencia de inhibidores de FVIII se utilizan dos estrategias: (a) Prevenir la formación de inhibidores por inducción de tolerancia; la que se puede lograr con exposiciones precoces y continuas a FVIII, y (b) Bloquear las células T que intervienen en la formación de inhibidor.

Para pacientes con sangrado con bajo nivel de inhibidor y bajo respondedor: se pueden usar dosis altas de FVIII. Si no responde o es alto respondedor con títulos altos se puede usar FVIII de porcino o productos "by-passing", tales como FEIBA, KONYNE-80 o rVIIa. Cuando se ha usado factor VIII de porcino también deben determinarse los títulos de inhibidores.

FEIBA. Este producto se trata de un complejo protrombínico; contiene factor VII principalmente en la forma activada, y factores II, IX y X en formas no activadas. El producto contiene casi igual actividad de factores del complejo protrombínico que de factor VIII "inhibitor by-passing". Además contiene 1-6 U/ml de FVIII coagulante antigénico. Está indicado para el control de sangrado

espontáneo y para cirugía en pacientes portadores de inhibidores de FVIII o FIX. También se ha usado en pacientes con inhibidores adquiridos de FVIII, XI y XII; hay un caso reportado donde fue efectivo en un paciente con inhibidor de factor von Willebrand. Pacientes con títulos de inhibidor < 5 pueden usar factor anti-hemofílico; pacientes con títulos de inhibidor entre 5-10 pueden usar ambos y pacientes con títulos > 10 deben usar productos "by-passing".

Se puede usar asociado a antifibrinolíticos, pero es preferible que éstos sean usados 12 horas después. La dosis habitual es de 75-100 U/Kg. cada 12 horas y la velocidad de infusión no debe ser superior 2 U/Kg./minuto.

Se debe monitorizar la aparición de signos de CID. Los pacientes con inhibidores adquiridos de FVIII, IX o XII, tienen tendencia a sangrar y a hacer fenómenos tromboticos. No hay experiencia en niños ni en embarazadas.

- **Complejo de Factor IX KONINE-80.** Este complejo contiene factor II, IX, X y bajos niveles de FVII. Niveles de 20% son requeridos para una hemostasia normal, niveles bajo 5% se asocian a hemorragia. El factor IX transfundido tiene una vida media de 24 horas.

Se debe monitorizar la aparición de CID o trombosis. Se sugiere usar heparina 2-5 IU/ml, sin embargo la trombosis puede ocurrir aún con el uso de heparina. La dosis recomendada en pacientes con inhibidor es de 75 IU/Kg. cada 12 horas.

Los pacientes con inhibidores autoinmunes se benefician con terapia inmunosupresora (ciclofosfamida, corticoides, azathioprina, ciclosporina, vincristina). Al inicio de la terapia se puede usar plasmaféresis para disminuir la concentración plasmática de los anticuerpos.

5.2. Inhibidores de factor IX

La incidencia inhibidores de factor IX es de 3%; se ven en deficiencias graves de factor IX. Son de clase IgG y su reacción con FIX es menos dependiente del tiempo. La terapia es igual que para inhibidores de factor VIII, con altos y bajos respondedores. Inhibidores espontáneos son muy raros, se tratan con inmunosupresores.

5.3. Inhibidores de factor XI

La presencia de inhibidores de factor XI en déficit hereditario es infrecuente. Son

anticuerpos de isotipo IgG y la reacción es tiempo dependiente. El tratamiento se realiza con plasma fresco, plasmaféresis y productos "by-passing" (complejo protrombínico y rVIIa)

Los anticuerpos espontáneos o autoanticuerpos son más frecuentes; son de clase IgG e IgM y se pueden encontrar en pacientes con enfermedades autoinmunes (LES, AR), pero raramente se manifiestan con hemorragia. En la mayoría de los casos no se necesita terapia.

5.4. Inhibidores de factor V

Los inhibidores de factor V son muy raros. Cuando se presentan pueden ser de isotipos IgG, IgM o IgA. La duración es menor de 10 semanas y si hay sangrado requieren de tratamiento con concentrados plaquetarios o productos "by-passing". El diagnóstico se hace cuando se presenta prolongación del TP y del TTPA y prolongados y tiempo de trombina normal.

LECTURAS SUGERIDAS

Advis, P. y García, H. "Coagulación Intravascular Diseminada" En: **Hematología; diagnóstico y terapéutica**, Osorio G. (ed.) Liendo, F., Anguita, T., Ríos, E., Gutiérrez, J. y Vargas, L. (coeds.) Editorial Mediterráneo. Capítulo 37, 1998, pp. 457-460.

Bick, R., "Disseminated intravascular coagulation. Current concepts of etiology, pathophysiology, diagnosis and treatment". *Hematol Oncol Clin N Am*, 2003;17:149-76

Dalmau, A., Sabate, A., Koo, M., Bartolome, C., Rafecas, A., Figueras, J., Jaurieta, E. "The prophylactic use of tranexamic acid and aprotinin in orthotopic liver transplantation: A comparative study". *Liver traspl* 2004;10:279-84.

Gando, S. "Disseminated intravascular coagulation in trauma patients". *Semin Thromb Hemost* 2001;27:585-92.

Gerlach, H., Slama, K.J., Bechstein, W.O., Lohmann, R., Hintz, G., Abraham, K., Neuhaus, P., Falke, K. "Retrospective statistical analysis of coagulation parameters after 250 liver transplantations". *Semin Thromb Hemost* 1993;19:223-32.

Grosset, A., Rodgers, G. "Acquired coagulation disorders" In **Wintrobe's Clinical Hematology**, Lee, R., Foerster, J., Paraskeras, F., Greer, J., Rodgers, G. (eds.), Editorial Lippincott Williams & Wilkins. Volumen 2. Capítulo 69, 1998, pp 1733-1780.

Guerrero, R., Ripoll, M., Velasco, F. "Coagulación Intravascular diseminada" (en línea). Disponible en: <http://www.uninet.edu/tratado/c0603i.html>

Hack, CE. "Fibrinolysis in disseminated intravascular coagulation". *Semin Thromb Hemost* 2001;27:633-8.

Hathaway, W.E., Goodnight, S.G. Jr. "Acquired Coagulation Factor Inhibitors" In **Disorders of Hemostasis and Thrombosis. A Clinical guide**. Editorial McGraw-Hill, INC. Capítulo 21, 1993, pp. 182-194.

Hathaway, W.E., Goodnight, S.G. Jr. "Disseminated Intravascular Coagulation" In **Disorders of Hemostasis and Thrombosis. A Clinical guide**. Editorial McGraw-Hill, INC. Capítulo 25, pp. 219-229

Hathaway, W.E., Goodnight, S.G. Jr. "Liver Diseases". In **Disorders of Hemostasis and Thrombosis. A Clinical guide**. Editorial McGraw-Hill, INC. Capítulo 24, 1993 pp. 211-218.

Hathaway, W.E., Goodnight, S.G. Jr. "Vitamin K Deficiency". In **Disorders of Hemostasis and Thrombosis. A Clinical guide**. Editorial McGraw-Hill, INC. Capítulo 23, 1993, pp. 203-210.

Heinrich, J. "Hemostatic abnormalities in liver diseases" En **Hemostasis and Thrombosis** Colman, R., Hirsh, J., Marder, V., Salzman E. (eds). Editorial Lippincott. Capítulo 45, 1993 pp. 906-920.

Kobayashi, T., Terao, T., Maki, M., Ikenoue, T. "Diagnosis and management of acute obstetrical DIC". *Semin Thromb Hemost* 2001;27:161-7.

Levi, M., De Jonge, E., Van der Poll, T., Ten Cate, H. "Advances in the understanding of the pathogenetic pathways of disseminated intravascular coagulation result in more insight in the clinical picture and better management strategies". *Semin Thromb Hemost* 2001;27:569-75.

Levi, M. "Pathogenesis and treatment of disseminated intravascular coagulation in septic patient". *J Crit Care* 2001;16:167-77.

Nielsen, JD. "The effect of antithrombin on the systemic inflammatory response in disseminated intravascular coagulation". *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9 Suppl 3: S11-5.

Oyarzún, E. (editor). Alto Riesgo Obstétrico (en línea). Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/departamentos/obstetricia/altoriesgo/CID.html>

Pereira, J. "Estructura, producción, cinética y función de las plaquetas". En **Fisiología de la Sangre**, Mezzano, D., Pereira, J. (eds.). Editorial Universidad Católica de Chile. Capítulo 9, 1993, pp. 155.

Sallah, S., Wan, J.Y., Nguyen, N.P., Hanrahan, L.R., Sigounas, G. "Disseminated intravascular coagulation in solid tumors: clinical and pathologic study". *Thromb Haemost* 2001;86:828-33.

Schmidt, M. "Hemorrhagic disorders of coagulation and fibrinolysis" En **Clinical hematology, principles, procedures, correlation**, Stiene-Martin, E., Lotspeich-Steininger, Ch., Koepke, J. (eds). Editorial Lippincott. Capítulo 52, 1998, pp. 661-674.

Ten Cate, H. "Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis". *Crit Care Med* 2000;28(9Suppl):S9-11.

TROMBOFILIAS

Jaime Pereira G., Guillermo Conte L. e Iván Palomo G.

1. Introducción

2. Trombofilias hereditarias

- 2.1. Deficiencia de antitrombina III
- 2.2. Deficiencia de proteína C
- 2.3. Deficiencia de proteína S
- 2.4. Factor V Leiden y resistencia a la proteína C activada
- 2.5. Mutación G20210A del gen de la protrombina
- 2.6. Disfibrinogenemias hereditarias
- 2.7. Deficiencia hereditaria de factor XII

3. Trombofilias adquiridas

- 3.1. Síndrome antifosfolípidos (SAF)
 - 3.1.1. Anticuerpos antifosfolípidos
 - 3.1.2. Antígenos
 - 3.1.3. Patogénesis
 - 3.1.4. Clínica
 - 3.1.5. Diagnóstico
 - 3.1.6. Tratamiento
- 3.2. Cáncer
 - 3.2.1. Moléculas procoagulantes
 - 3.2.2. Sistema fibrinolítico
 - 3.2.3. Citoquinas
 - 3.2.4. Interacciones celulares
- 3.3. Síndromes mieloproliferativos
- 3.4. Hemoglobinuria paroxística nocturna
- 3.5. Síndrome nefrótico

4. Trombofilias por mecanismo mixto

- 4.1. Hiperhomocisteinemia
 - 4.1.1. Patogenia
 - 4.1.2. Diagnóstico
- 4.2. Aumento de los niveles de factores de la coagulación

5. Estrategia diagnóstica

RESUMEN

La trombofilia se ha definido como una condición que predispone a la trombosis, como consecuencia de factores genéticos, adquiridos o ambos.

Entre los factores genéticos que predisponen a la trombosis se encuentran las deficiencias de proteínas anticoagulantes naturales tales como antitrombina III, proteína C y proteína S, y el aumento de función de algunos factores de la coagulación (factor V Leiden y protrombina G20210A). Todos estos defectos presentan una mayor tendencia a la trombosis venosa la cual es de grado variable dependiendo del tipo de deficiencia.

La trombofilia adquirida comprende una serie heterogénea de defectos que a pesar de su inequívoca asociación con un estado de hipercoagulabilidad, su patogenia es mayormente desconocida. Las trombofilias adquiridas de mayor relevancia clínica, ya sea por su gravedad o frecuencia incluyen el síndrome antifosfolípido, las enfermedades malignas, el síndrome nefrótico y enfermedades de la célula troncal hematopoyética.

Existen algunas condiciones clínicas que predisponen a la trombosis cuyo origen es por un mecanismo mixto no habiéndose aclarado el grado de contribución de factores genéticos o adquiridos. Dos ejemplos de estas condiciones lo representan la hiperhomocisteinemia y el aumento en la concentración de algunos factores de la coagulación.

La investigación de laboratorio de las trombofilias debe estar enfocada hacia aquellos pacientes en los cuales la probabilidad de obtener un resultado positivo es mayor o los hallazgos signifiquen un cambio en la conducta terapéutica.

1. INTRODUCCIÓN

El término trombofilia fue utilizado por primera vez por Egeberg en el año 1965 en la descripción de una familia con tendencia a la trombosis, en la que se demostró un déficit de antitrombina III. Posteriormente esta definición se ha ampliado, incluyendo a cualquier paciente que presente una tendencia anormal a desarrollar fenómenos trombóticos. El diagnóstico inicial de trombofilia se hace inicialmente sobre bases clínicas cuando el paciente presenta una o más de las características que se muestran en la tabla 24-1.

Entre los pacientes que se presentan

clínicamente como portadores de trombofilia se puede distinguir dos categorías: (a) aquellos portadores de condiciones protrombóticas heredables o trombofilia hereditaria, en los que esta condición es el resultado de un defecto específico a nivel de los mecanismos anticoagulantes naturales o de proteínas procoagulantes (tabla 24-2) y (b) los pacientes portadores de una serie heterogénea de condiciones clínicas que se asocian a un aumento del riesgo de desarrollar trombosis, lo que se conoce como trombofilia adquirida. En estos casos, la fisiopatología es compleja y generalmente obedece a una combinación de defectos del sistema hemostático.

Tabla 24-1. Características clínicas de las trombofilias

<ul style="list-style-type: none">• Historia familiar de trombosis• Trombosis en paciente joven• Trombosis recurrente• Trombosis venosa idiopática o secundaria a estímulo mínimo (por ej: embarazo)• Trombosis arterial y venosa• Resistencia a la heparina• Necrosis cutánea inducida por cumarínicos• <i>Púrpura fulminans</i> neonatal• Trombosis venosa en sitio inusual

Tabla 24-2. Causas de trombofilia

Trombofilias hereditarias	Trombofilias adquiridas
Factor V Leiden Mutación G20210A del gen de protrombina Deficiencia de antitrombina III Deficiencia de proteína C Deficiencia de proteína S Disfibrinogenemia Deficiencia de factor XII	Síndrome antifosfolípido Cáncer Síndromes mieloproliferativos Hemoglobinuria paroxística nocturna Síndrome nefrótico

2. TROMBOFILIAS HEREDITARIAS

La trombofilia hereditaria se podría definir como una tendencia al tromboembolismo venoso, determinada genéticamente. Los defectos dominantes o combinaciones de defectos leves, se pueden presentar a edades tempranas, en forma recurrente y con historia familiar. Rasgos leves pueden descubrirse sólo por estudio de laboratorio. Los defectos genéticos que predisponen a la trombosis no inducen un riesgo permanente o continuo, sino que bajan el umbral frente a las interacciones con el medio ambiente. El término trombofilia hereditaria reconoce la existencia de un defecto genético que predispone a la trombosis; sin embargo, debido a la naturaleza episódica de los eventos trombóticos, éste requiere interactuar con otro factor (genético o adquirido) para precipitar la enfermedad clínica.

A continuación se analizará las bases genéticas y la fisiopatología de los defectos más comunes y en los cuales se encuentra bien establecida su predisposición a la trombosis. Existen reportes de otras causas de trombofilia hereditaria tales como la disfibrinogenemia, alteraciones del sistema fibrinolítico, deficiencia de cofactor II de la heparina o trombomodulina, que son muy poco frecuentes o su asociación con trombosis no ha sido claramente definida. Para facilitar la comprensión de este capítulo es conveniente conocer en forma previa los aspectos consignados en el capítulo 20.

2.1. Deficiencia de antitrombina III

La deficiencia de antitrombina III (ATIII), el primer defecto de anticoagulante natural descrito, se demostró por primera vez en una familia con historia de trombosis venosa recurrente y niveles de ATIII entre 40-50%.

La herencia del defecto es del tipo autosómico dominante, por lo que afecta ambos sexos en igual proporción. En la población general la frecuencia de deficiencia sintomática de ATIII ha sido estimada entre 1:2000 a 1:5000. Sin embargo, la deficiencia asintomática puede ser tan frecuente como 1:600. En pacientes no seleccionados con historia de tromboembolismo venoso, la frecuencia es de 1,1%; en pacientes seleccionados es alrededor de 2%. La mayoría de los pacientes son heterocigotos con niveles de ATIII entre 40-70%.

Desde el punto de vista fenotípico se distinguen dos tipos de deficiencia de ATIII. En la deficiencia clásica o tipo I, que es el resultado de una síntesis disminuida de la proteína biológicamente normal, la actividad y el antígeno de ATIII se encuentran proporcionalmente reducidos en el plasma. En el tipo II, que se produce por defectos moleculares discretos, la actividad funcional se encuentra muy disminuida mientras que la determinación inmunológica (cantidad de la proteína) es normal.

En la mayoría de los casos de deficiencia de ATIII se han demostrado defectos a nivel del gen, los que se encuentran registrados en bases de datos de actualización periódica. Deleciones mayores del gen son relativamente poco frecuentes y no se encuentra en más del 10% de los casos de deficiencia tipo I. En este tipo, se han descrito más de 100 diferentes defectos a nivel del gen, correspondiendo la mayoría (> 80%), a mutaciones puntuales, también se han encontrado inserciones o deleciones cortas, que se traducen en término prematuro de la síntesis de ATIII o en moléculas inestables o no secretadas. La deficiencia tipo II es habitualmente causada por mutaciones puntuales que provocan sustituciones únicas de

aminoácidos que llevan a la síntesis de una proteína disfuncional. Las características fenotípicas de la proteína puede dar indicios sobre la región del gen que se encuentra comprometida. En este sentido, se pueden distinguir las mutaciones que afectan el sitio reactivo de la proteína de aquellas que comprometen el sitio de unión a heparina. Existen defectos genéticos con efectos pleiotrópicos, que generalmente se localizan cerca del extremo C-terminal de la proteína; esta región se ha demostrado fundamental para la estabilidad de la proteína y transmisión de cambios conformacionales. En los defectos tipo II, el riesgo de trombosis es diferente según sea el sitio comprometido de la molécula; individuos portadores heterocigotos de defectos a nivel del sitio de unión a heparina tiene un bajo riesgo de trombosis, a pesar de que en el ensayo funcional la capacidad de cofactor de la heparina de la ATIII está disminuida. En pacientes portadores de defectos a nivel del sitio activo, la tendencia a la trombosis es similar a la encontrada en los defectos de tipo I.

Aproximadamente 55% de los pacientes con deficiencia familiar de ATIII presentarán episodios de trombosis venosa a lo largo de su vida; cerca de la mitad de ellos hará su primer episodio antes de los 40 años. En alrededor del 40% de los casos la manifestación clínica inicial es espontánea, mientras que en el 60% restante está relacionada a embarazo, parto, uso de anticonceptivos orales, cirugía o trauma. Los sitios de presentación más frecuentes de la trombosis son las venas de las extremidades inferiores y mesentéricas. Cerca del 60% de los pacientes portadores de deficiencia de ATIII desarrolla tromboembolismo venoso recurrente y el 40% de los casos presenta signos clínicos de embolia pulmonar.

Una serie de condiciones clínicas se asocian a reducción de los niveles de ATIII en la sangre. La trombosis aguda y la Coagulación Intravascular Diseminada (CID) reducen significativamente los niveles de ATIII. Disminución de la concentración de ATIII se observa en la insuficiencia hepática, en el síndrome nefrótico y en usuarias de anticonceptivos orales; en el embarazo normal los valores de ATIII no cambian, pero sí están reducidos en la preeclampsia y eclampsia. El uso de heparina disminuye los niveles de ATIII en alrededor de un 20-30% del valor basal, por aumento de la excreción del inhibidor.

Debido a las numerosas condiciones que afectan los niveles de ATIII, el diagnóstico de la deficiencia hereditaria es difícil. Aunque un valor normal descarta razonablemente la deficiencia, niveles bajos deben ser evaluados en el contexto clínico del paciente y generalmente la determinación se debe repetir en condiciones basales.

2.2. Deficiencia de proteína C

En 1981 Griffin y colaboradores describieron varios individuos pertenecientes a la misma familia, que presentaban niveles de proteína C (PC) de aproximadamente 50% e historia de episodios de trombosis venosa recurrentes. La proteína C activada inactiva los factores V activado y VIII activado y además posee actividad profibrinolítica y antiinflamatoria (ver capítulo 20), lo que explica que su deficiencia se asocie a un aumento en el riesgo de presentar eventos trombóticos. La deficiencia de PC se hereda en forma autosómica dominante y su expresión clínica es similar al déficit de ATIII.

Aproximadamente el 70% de los portadores del defecto presentarán uno o más episodios de trombosis venosa. En cerca del 70% de los pacientes, el episodio inicial se presenta en forma espontánea y el 30% restante asociado a algún factor de riesgo transitorio. En alrededor de 50% de los casos el primer episodio de trombosis ocurre antes de los 50 años. Los sitios más comunes de presentación de la trombosis son las venas de las extremidades inferiores, ileofemorales y mesentéricas. Alrededor del 60% de los casos desarrolla tromboembolismo recurrente y un 40% presenta evidencias de embolia pulmonar. Una característica clínica especial de la deficiencia hereditaria de PC es la ocurrencia de trombosis venosa superficial y trombosis de venas cerebrales.

La necrosis cutánea inducida por cumarínicos se ha asociado a la presencia de deficiencia heterocigota de PC. Este síndrome se presenta típicamente durante los primeros días de uso de la terapia anticoagulante oral, habitualmente cuando se administra una dosis de carga. Las lesiones cutáneas aparecen inicialmente como máculas eritematosas en las extremidades y tronco, que posteriormente evolucionan a lesiones necróticas. La patogenia de esta manifestación se atribuye a un estado transitorio de hipercoagulabilidad dado por la rápida caída de la PC y factor VII y mantención de los niveles de los otros factores dependientes de vitamina

K para su síntesis.

Muy raramente, recién nacidos pueden desarrollar un cuadro de *púrpura fulminans* en asociación a niveles de PC menores de 1%, como resultado de un defecto homocigoto o doble heterocigoto en el gen de la PC.

Es importante señalar que en numerosas familias se han encontrado individuos heterocigotos con niveles bajos de PC, pero que no desarrollan trombosis. Lo mismo ocurre con los padres de recién nacidos homocigotos que debutan con un cuadro de *púrpura fulminans*, los que siendo heterocigotos obligados muy raramente presentan trombosis. Por otra parte, estudios de prevalencia en población normal han encontrado una frecuencia del defecto tan alta como 1:200 individuos sanos, de los cuales sólo unos pocos desarrollan cuadros de trombosis. Estas observaciones sugieren que otros factores no bien conocidos probablemente contribuyen a modular la expresión fenotípica de la deficiencia hereditaria de PC.

La frecuencia de deficiencia de PC en pacientes no seleccionados con trombosis venosa es de 3.2% y 4.0% en pacientes seleccionados (menores de 45 años y con historia familiar). En la población general la frecuencia del defecto varía considerablemente dependiendo de los estudios entre 1:200 a 1:700 individuos sanos.

La deficiencia de PC es un desorden heterogéneo y se presenta de dos formas desde el punto de vista fenotípico. La deficiencia tipo I en que la actividad y el nivel de antígeno de la proteína muestran una disminución concordante. El tipo II se caracteriza por una disminución de la actividad con antígeno normal, lo que traduce una molécula de PC anormal.

El gen que codifica para la PC se ha localizado en el cromosoma 2q13-q14, tiene un tamaño de alrededor de 11 kb y comprende 9 exones. La base de datos actualizada del gen contiene los registros de sobre 160 mutaciones diferentes que resultan en deficiencia tipo I o II. Sorprendentemente cerca del 60% de las mutaciones que causan un defecto tipo I son "missense" y alrededor de un tercio ocurre en dinucleótidos CpG. En este caso probablemente el cambio de aminoácido lleva a alteración en la interacción intramolecular con defectos de plegamiento y degradación intracelular acelerada. Las mutaciones "missense" en los defectos tipo II están localizados preferentemente en zonas relevantes para la

función de la proteína (propéptido de escisión, interacción con trombomodulina, sitio activo, sitio de unión a sustrato).

Los niveles de PC en adultos se distribuyen en forma logarítmica y el 95% de los valores varía entre 70% y 140%. Los niveles de PC en los recién nacidos son 20-40% el valor de los adultos y los recién nacidos de pretérmino tienen valores aún menores. Deficiencia adquirida de PC se observa en insuficiencia hepática, sepsis, CID, postoperatorio, quimioterapia en cáncer de mama, uso de L-asparaginasa. Una forma muy grave de deficiencia adquirida de PC se ve en pacientes con *púrpura fulminans* y CID en infecciones bacterianas o virales graves. En el embarazo normal los niveles de proteína C permanecen dentro de rangos normales. Los cumarínicos reducen la PC funcional y en menor grado la antigénica, por lo que el diagnóstico de deficiencia heterocigota en pacientes con tratamiento anticoagulante oral es particularmente difícil, sugiriéndose realizar las determinaciones al menos una semana después de suspendidos los cumarínicos.

2.3. Deficiencia de proteína S

En el año 1984 se describió por primera vez una familia en la que varios miembros presentaban niveles bajos de proteína S (PS) y una marcada historia de tromboembolismo venoso recurrente. La presentación clínica de los pacientes con deficiencia hereditaria de PS es similar a aquellos con deficiencia de ATIII o PC. Los individuos con deficiencia heterocigota de PS presentan habitualmente trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y en alrededor de 40% de los casos, tromboflebitis superficial. También se ha descrito trombosis de venas axilares, mesentéricas y cerebrales. La edad media de aparición del primer episodio de trombosis es 28 años, con un rango entre 15 y 68 años. Un 55% de los casos se presenta en forma espontánea y en el resto está asociada a un factor precipitante identificable. La deficiencia homocigota o heterocigota compuesta es muy infrecuente y generalmente se presenta como un cuadro de *púrpura fulminans* grave en el período neonatal.

La prevalencia de la deficiencia de PS en la población general es desconocida aunque se estima como muy baja. Un estudio mostró una prevalencia de deficiencia de PS en la población escocesa entre 0.03% y 0.13%. En trombosis venosa familiar, la prevalencia del defecto se

ha encontrado entre 2% y 10% de los pacientes, dependiendo del criterio de selección.

El riesgo de trombosis asociado a la deficiencia hereditaria de PS es un problema aún no resuelto. Se ha reportado que el riesgo a lo largo de la vida de presentar trombosis venosa en portadores heterocigotos es de 5 a 11 veces comparado con familiares no portadores. Sin embargo, en estudios casos-controles, basados en población, no se encontró un riesgo aumentado de trombosis entre los portadores de la deficiencia. Se ha sugerido que el riesgo de trombosis estaría asociado al defecto genético subyacente, variando entre distintas familias portadoras de diferentes tipos de mutaciones. Por otra parte, varios otros factores, hereditarios o adquiridos, pueden aumentar el riesgo de trombosis en los individuos portadores de deficiencia de PS. Entre estos se incluye, anticonceptivos orales, embarazo, parto y puerperio, factor V Leiden y protrombina G20210A.

El diagnóstico de la deficiencia hereditaria de PS es difícil debido a limitaciones técnicas y genéticas. La existencia en el plasma de la forma libre de la PS y del complejo PS-C4BP β + (ver capítulo 20) es una dificultad para las determinaciones antigénicas y funcionales. Además los niveles plasmáticos de PS están sujetos a variaciones por influencias biológicas, fisiológicas y patológicas. Los hombres tienen niveles más altos que las mujeres; en el embarazo y en usuarias de anticonceptivos orales los niveles de PS son significativamente menores; los recién nacidos presentan niveles bajos de PS total pero altos de PS libre.

La deficiencia de PS se ha clasificado desde el punto de vista fenotípico en tres tipos: (a) tipo I, en la cual existe una reducción concordante entre el nivel de PS total, PS libre y actividad, (b) tipo II, se refiere a un defecto funcional de la molécula, encontrándose en el laboratorio niveles normales de antígeno de PS libre y total, pero reducción de la actividad, y (c) un segundo defecto de tipo cuantitativo, tipo III, define un fenotipo en el que la PS libre está disminuida pero con niveles normales de PS total. Recientemente se ha propuesto que los tipos I y III se agrupen juntos como un defecto cuantitativo de la PS, ya que en ambos casos existe una disminución de la PS libre plasmática.

Las mutaciones en el gen de la PS responsables de la deficiencia hereditaria se encuentran registradas en bases de datos actualizadas. El

análisis genético molecular de las mutaciones en pacientes con deficiencia de PS se ve complicado por la existencia de un pseudogen con un 97% de homología con el gen verdadero. La última versión de la base de datos contiene 131 mutaciones deletéreas diferentes y 30 polimorfismos del gen. Alrededor del 95% de los casos presenta un defecto cuantitativo (tipo I o III) y el 55% un defecto cualitativo (tipo II). La mayoría de las lesiones genéticas que causan deficiencia tipo I son sustituciones nucleótidos únicos, inserciones o deleciones.

La deficiencia adquirida de PS se observa en el embarazo y con el uso de anticonceptivos orales. Reducción de los niveles de PS se encuentran también durante episodios tromboembólicos agudos y en la CID. La C4BP es una proteína de fase aguda lo que explicaría la disminución de la actividad de la PS en las condiciones anteriores y en otras patologías inflamatorias, probablemente por un aumento de la forma acomplejada, inactiva de la proteína.

2.4. Factor V Leiden y resistencia a la proteína C activada

En 1993 Dahlback describió una familia en la cual varios de su miembros presentaban resistencia a la acción de la proteína C activada (RPCA), fenómeno que se asociaba a un aumento en el riesgo de trombosis venosa. Posteriormente se demostró que este defecto era el resultado de una mutación puntual del Factor V de la coagulación (G1691A), que se traduce en el cambio de una arginina por una glutamina en el aminoácido 506 de la proteína (R506Q). Este cambio se traduce en una alteración en la inactivación del factor Va por la PC activada, ya que el primer sitio de corte de la enzima es precisamente a nivel de la arginina 506. Además se ha demostrado recientemente que el FV constituye un cofactor en la acción anticoagulante de la PC activada, función que también se encuentra comprometida en el FV Leiden. Este defecto molecular provoca que el FV Leiden se inactive 10 a 20 veces más lentamente que la forma nativa, llevando a una excesiva generación de trombina, lo que se traduce en un aumento en el riesgo de trombosis venosa de 6 a 8 veces el de la población general. Es importante señalar que un 5-10% de los individuos con RPCA no son portadores de la mutación R506Q. Además se ha demostrado recientemente que la RPCA por sí misma, independiente de la presencia de FV Leiden, constituye un factor de riesgo para trombosis venosa.

Numerosos estudios han demostrado que la presencia de RPCA o mutación R506Q del FV se asocia a un aumento del riesgo de trombosis. La prevalencia reportada para RPCA y/o FV Leiden en pacientes con trombosis varía ampliamente (4-64%) dependiendo de los criterios de selección y del origen étnico de las poblaciones estudiadas. Las prevalencias más altas se encuentran entre pacientes jóvenes altamente seleccionados con trombofilia no explicada. En pacientes consecutivos portadores de trombosis venosa profunda, la prevalencia de RPCA es de alrededor de un 20%. A pesar de las variaciones en la frecuencia del defecto, existe actualmente consenso que la RPCA es el factor de riesgo hereditario más común para trombosis venosa. El riesgo relativo de trombosis en los individuos afectados ha sido calculado en el rango de 30-140 veces en los homocigotos y 6 a 8 veces para los heterocigotos.

La prevalencia del FV Leiden en la población general es mayor entre Caucásicos, encontrándose los valores más altos en poblaciones del norte de Europa. Si se considera en conjunto el desequilibrio de ligamiento entre el FV Leiden y otros polimorfismos del FV, los patrones de distribución geográfica sugieren un efecto fundador, es decir, todos los individuos que portan la mutación R506Q comparten un ancestro común. La alta frecuencia de FV Leiden en algunas poblaciones sugieren que éste confería un efecto protector durante la evolución. Por ejemplo, la hipercoagulabilidad asociada a la presencia de R506Q pueden haber otorgado protección contra sangrado excesivo durante el parto. La cirugía, el uso de anticonceptivos orales y la naturaleza sedentaria de la vida moderna constituyen factores circunstanciales de riesgo a los cuales no se encontraban expuestos nuestros ancestros.

La trombosis venosa profunda es la manifestación clínica más común de la RPCA; la embolia pulmonar y la tromboflebitis superficial también se observa en forma ocasional. La embolia pulmonar parece ser menos frecuente entre portadores homocigotos de R506Q que en homocigotos o portadores heterocigotos de deficiencia de PC, PS o ATIII. La mayoría de los estudios de casos y controles no han podido demostrar una asociación clara entre RPCA y trombosis arterial, aunque ésta se ha descrito en algunos pacientes heterocigotos y homocigotos. La penetrancia de la trombosis en individuos portadores de RPCA es altamente variable, algunos jamás desarrollan trombosis mientras otros presentan episodios recurrentes a edad

temprana. A la edad de 50 años alrededor del 75% de los portadores heterocigotos permanecen libres de eventos trombóticos, cifra que se reduce a un 40% entre los homocigotos. La edad media de presentación del primer episodio de trombosis en individuos heterocigotos no seleccionados es de 43 años; en familias trombofílicas, la edad media de comienzo para portadores heterocigotos seleccionados es de 23 años. Estas cifras son comparables a las encontradas para pacientes portadores de deficiencia hereditaria de PC.

El riesgo de trombosis de los individuos no depende solamente de la presencia de la mutación R506Q, sino también de la coexistencia de otros factores de riesgo genéticos o adquiridos. Esto ha quedado demostrado en numerosos estudios en que se ha encontrado una alta incidencia de trombosis en individuos portadores de la mutación R506Q en combinación con hiperhomocisteinemia, deficiencias de PC, PS o ATIII. Factores de riesgo adquiridos que se asocian a trombosis en pacientes con RPCA son el uso de anticonceptivos orales, trauma y cirugía.

2.5. Mutación G20210A del gen de la protrombina

La mutación G20210A del gen de la protrombina fue descrita en el año 1996 por Poort y colaboradores, en un estudio que consideraba al gen de la protrombina como un candidato para trombosis en familias con historia de enfermedad tromboembólica. Esta mutación consiste en una transición G→A en la región 3' no traducida del gen que codifica para la protrombina. Estudios de haplotipo sugieren que esta mutación habría nacido como un fundador único 20.000 a 30.000 años atrás. La prevalencia en la población general tiene relación con el origen étnico de ésta, encontrándose en Europa en alrededor del 2% de la población (rango 0.7-4%). La prevalencia más alta se observa en la región sur de Europa (aproximadamente 3%) y la más baja en la región norte (1.7%). En Estados Unidos la prevalencia es de alrededor de 2% pero con amplia variación según la raza. Esta mutación es poco común en África, Asia y en nativos americanos.

Desde su primera descripción se encontró que los portadores heterocigotos del defecto presentaban niveles de protrombina significativamente más altos (130%; rango, 95-178%) comparados con los homocigotos para la forma 20210 GG (105%; rango, 55-156%). Los individuos portadores de la forma 20210

AA tienen niveles de factor II de alrededor de 170%. Debido a que el riesgo de trombosis venosa aumenta con los niveles de protrombina, se hipotetizó que la hiperprotrombinemia sería el mecanismo fisiopatológico de la propensión a la trombosis. Esta hipótesis se ha comprobado recientemente en un estudio en el que observó que en familias portadores del defecto el análisis de ligamiento demostró que la mutación G20210A influye simultáneamente sobre el nivel de protrombina y el riesgo de trombosis.

Desde el punto de vista molecular la mutación G→A causa una ganancia de función debido a un aumento en el reconocimiento del sitio de escisión a nivel de 3', con aumento del procesamiento del extremo 3' del gen. El resultado neto de este fenómeno es una acumulación de mRNA y aumento de la síntesis de protrombina.

Estudios *in vitro* han confirmado la hipótesis que la hiperprotrombinemia es importante en la génesis de la trombosis venosa. Butenas y colaboradores, usando un modelo *in vitro* de coagulación iniciada por factor tisular, demostraron que niveles de protrombina de 150%, manteniendo un nivel normal de todos los procoagulantes y anticoagulantes naturales, resultaba en un aumento significativo de la generación de trombina. Otros estudios han demostrado además que niveles altos de protrombina, pueden inhibir la inactivación del factor Va mediada por PCA.

Numerosos estudios de casos y controles han demostrado consistentemente la asociación entre protrombina G20210A y tromboembolismo venoso. En el estudio original de Poort se encontró un riesgo relativo de casi 3 veces; estudios posteriores han reportado riesgos relativos entre 2 y 12 con la mayoría de ellos entre 2 y 3. A pesar de que la mayor parte de la evidencia hasta ahora sugiere que la protrombina G20210A es un factor de riesgo real, aunque débil, para trombosis venosa, la homocigocidad no confiere un riesgo tan significativo como se observa en los defectos homocigotos de PC, PS o FV Leiden.

Aunque la mutación G20210A es un factor de riesgo de trombosis relativamente débil, se dispone de mucha evidencia que demuestra que este defecto puede interactuar con otros factores de riesgo conocido y aumentar así su potencial protrombótico. De estas asociaciones la más estudiada es aquella con el FV Leiden. Varios estudios de casos y controles muestran que el riesgo de trombosis aumenta significativamente

cuando existe coherencia de los 2 defectos (riesgo relativo alrededor de 20 veces). El efecto de la mutación G20210A sobre el riesgo de trombosis en otros defectos trombofílicos (deficiencias de PC, PS, ATIII, hiperhomocisteinemia) no está suficientemente demostrado.

El uso de anticonceptivos orales y el embarazo constituyen situaciones en que el riesgo de trombosis aumenta considerablemente en presencia de la mutación G20210A. En usuarias de anticonceptivos orales portadoras de la mutación el riesgo relativo de enfermedad tromboembólica aumenta cerca de 16 veces, situación similar a la reportada para el embarazo (riesgo relativo de 8 a 25 veces). Varios estudios han demostrado la asociación de la mutación G20210A y FV Leiden con mala historia obstétrica, específicamente, aborto de segundo trimestre, placenta previa, retardo de crecimiento intrauterino y preeclampsia. Su papel en el aumento del riesgo de trombosis en la terapia de reemplazo hormonal no se ha establecido.

Hasta ahora no es claro el papel que pueda jugar la mutación G20210A en la enfermedad trombotica arterial. Aunque varios estudios no han demostrado asociación de la mutación con infarto de miocardio y accidente cerebrovascular en poblaciones mayores, varios estudios sugieren que puede ser importante en la génesis de aterosclerosis prematura, especialmente asociada a otros factores de riesgo como cigarrillo e hipertensión.

2.6. Disfibrinogenemias hereditarias

Los defectos cualitativos del fibrinógeno se heredan habitualmente en forma autosómica dominante. Existe un gran número de mutaciones que comprometen al gen del fibrinógeno, por esta razón, la expresión fenotípica de las disfibrinogenemias hereditarias es muy heterogénea, presentándose como hallazgo en personas asintomáticas, como diátesis hemorrágica o predisposición a la trombosis. Alrededor de 20 variantes de la molécula de fibrinógeno se han demostrado asociadas a enfermedad tromboembólica.

Los defectos funcionales del fibrinógeno tales como liberación anormal de los fibrinopéptidos A y B o alteración en la polimerización de la fibrina, no son fáciles de relacionar con la tendencia protrombótica en los pacientes. En algunas disfibrinogenemias se ha encontrado unión anormal de la trombina a la fibrina; en pacientes homocigotos para este tipo de

alteración, se ha observado un fenotipo clínico grave con trombosis recurrente a edad temprana. Se ha sugerido que la alteración en la unión de trombina a fibrina, resultaría en un aumento en la trombina libre en la circulación y generación de un estado protrombótico. Otras mutaciones del fibrinógeno se asocian a defectos en la polimerización de la fibrina y con una resistencia a la lisis por plasmina.

Los defectos funcionales del fibrinógeno se pueden evidenciar en el laboratorio por prolongación de los tiempos de trombina y reptilasa y determinación del nivel de fibrinógeno. Las mediciones funcionales de fibrinógeno resultan ser significativamente inferiores a las antigénicas.

2.7. Deficiencia hereditaria de factor XII

Los pacientes portadores de deficiencia de factor XII (FXII), se presentan con tiempo de tromboplastina parcial activado muy prolongado, en ausencia de manifestaciones hemorrágicas. La ausencia de manifestaciones clínicas en los pacientes con deficiencias de FXII, pre-caliceína o kininógeno de alto peso molecular, son una evidencia de que estos factores no son esenciales para la hemostasia

in vivo. Sin embargo, numerosos casos de enfermedad tromboembólica venosa y arterial se han reportado en pacientes con deficiencia de FXII, incluyendo el primer paciente descrito con este defecto (Mr. Hageman). La tendencia a la trombosis en la deficiencia hereditaria de FXII se ha atribuido a una disminución en la capacidad fibrinolítica del plasma. La magnitud del problema no se ha dimensionado adecuadamente; algunos estudios han encontrado que alrededor de 8% de los pacientes con deficiencia de FXII presentan episodios trombóticos venosos o arteriales, incluyendo infarto de miocardio en personas jóvenes. Otras observaciones han demostrado que la heterocigocidad para deficiencia de FXII no constituiría un factor de riesgo de trombosis. La solución de esta controversia requiere de estudios más grandes en familias deficientes de FXII y seguimiento clínico prolongado.

3. TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS

La trombofilia adquirida es un factor de riesgo específico de tromboembolismo venoso, el que comparado con aquellos que no lo presentan es bajo en relación a otros factores adquiridos de mayor frecuencia. Esto se resume en la tabla 24-3.

Tabla 24-3. Factores de riesgo para tromboembolismo venoso

Condiciones	Riesgo relativo
Cirugía mayor o trauma mayor	5-200
Historia de tromboembolismo venoso	50
Trombofilia adquirida	
Anticuerpos antifosfolípidos	
Anticuerpos anticardiolipinas elevados	2
Inhibidores no específicos (ej. anticoagulante lúpico)	10
Cáncer	5
Enfermedad médica mayor con hospitalización	5
Edad	
> 50 años	5
> 70 años	10
Embarazo	7
Terapia estrogénica	
Contraceptivos orales	5
Terapia reemplazo hormona	2
Moduladores de receptores de estrógeno selectivo	
Tamoxifeno	5
Raloxifeno	3
Obesidad	1-3
Mixto (hereditario, adquirido)	
Hiperhomocisteinemia	3

Es posible que en un paciente se puedan presentar simultáneamente varios factores y que la presencia de trombosis sea la culminación de la suma de estos.

Son elementos diagnósticos de importancia de las trombofilias adquiridas, la posibilidad de su aparición en cualquiera etapa de la vida, y de ser una posible etiología en pacientes ancianos con trombosis venosa profunda espontánea sin historia de trombosis previa. Otro carácter importante es que se pueden desencadenar trombosis venosas y arteriales en diferentes localizaciones, lo cual implica en ocasiones diferente diagnóstico diferencial.

3.1. Síndrome antifosfolípido (SAF)

El Síndrome antifosfolípido (SAF) se caracteriza por la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL), trombosis arterial o venosa recurrente o abortos espontáneos, y en ocasiones trombocitopenia autoinmune.

Los anticuerpos aFL son un grupo heterogéneo de anticuerpos de clase IgG e IgM que además de encontrarse en el SAF se asocian a enfermedades del tejido conectivo, infecciones y drogas. Wasserman en 1906, utilizando un método de fijación de complemento fue el primero que pesquisó estos anticuerpos. Posteriormente durante la Segunda Guerra Mundial, se detectaron individuos positivos para serología de sífilis y que no presentaban evidencias de infección treponémica (falsos positivos); la prueba serológica utiliza una mezcla antigénica que contiene cardiolipina (CL). Diez años más tarde Conley y Hartman demostraron, a través de pruebas de coagulación, la presencia de un anticoagulante circulante. Dos décadas después, Feinstein y Rapaport confirmaron la existencia de esta actividad anticoagulante en pacientes portadores de Lupus eritematoso sistémico (LES) y la denominaron anticoagulante lúpico (AL). En 1983, Harris y colaboradores, mediante un radioinmunoanálisis que utiliza CL en fase sólida, aumentaron significativamente la sensibilidad en la pesquisa de los anticuerpos aFL respecto a las pruebas serológicas para sífilis; desde entonces se denominó anticardiolipina (aCL) a los anticuerpos aFL detectados por este método. Posteriormente, en varios laboratorios desarrollaron un ELISA para pesquisar anticuerpos aCL, método evaluado por primera vez en un taller internacional realizado en 1986.

En 1983 Hughes describe la asociación de anticuerpos aFL y trombosis arteriales y venosa, y en 1985 propone el nombre de síndrome anticardiolipinas, pero finalmente Harris y colaboradores en 1987 lo cambian a SAF.

Actualmente en clínica, la pesquisa de los aFL se realiza por ELISA (anticuerpos aCL) y por pruebas de coagulación (AL).

Los anticuerpos aFL son la causa más frecuente de trombofilia adquirida asociada con trombosis arterial o venosa, o ambas. Pueden localizarse en cualquier vaso arterial o venoso, como trombosis venosa profunda con embolia pulmonar secundaria, trombosis de arterias coronarias, trombosis cerebro vascular, crisis isquémicas transitorias, trombosis de vasos retinales o trombosis vascular placentaria.

En general su diagnóstico clínico se basa en la existencia de una trombosis asociada con un AL persistente, detectado por estudios de coagulación especializados y/o la presencia de títulos elevados de anticuerpos aCL IgG y/o IgM.

3.1.1. Anticuerpos antifosfolípidos

El SAF se presenta en pacientes con autoanticuerpos con especificidad por proteínas que se unen a dichos fosfolípidos (ver punto 3.1.3.). Sin embargo, existen otras causas asociadas a anticuerpos aFL, como por ejemplo infecciones, que determinan la presencia de anticuerpos con especificidad por fosfolípidos aniónicos como CL; éstos deben ser considerados en forma separada al SAF autoinmune. En la actualidad los anticuerpos aFL se clasifican en 4 grupos (tabla 24-4).

No se dispone de mucha información en relación a la prevalencia de anticuerpos aFL, especialmente en individuos asintomáticos. Se ha descrito entre un 1-5% en jóvenes sanos, pero su incidencia aumenta con la edad y en enfermedades crónicas coexistentes.

En pacientes con LES, la prevalencia de anticuerpos aFL fluctúa entre 12-30% para anticuerpos anticardiolipinas (aCL), y entre 15-34% para AL. En Chile existe un solo estudio, de Palomo, I., Pereira, J. y colaboradores, que revela que el 60% de 90 pacientes con LES presentaba algún tipo de anticuerpos aFL y, de ellos el 44.4%, eran anticuerpos aCL, y establecen la existencia de 3,3% de anticuerpos aCL en el grupo control sano.

Tabla 24-4. Clasificación de pacientes con anticuerpos antifosfolípidos

SAF autoinmune Primario Secundario (Asociado a LES u otras enfermedades del tejido conectivo)
Anticuerpos aFL estimulados por infección No asociados a trombosis Sifilis, enfermedad de Lyme, Virus Epstein Barr, Citomegalovirus Posible asociación con trombosis Varicela, VIH, hepatitis C
Anticuerpos aFL asociados a cáncer Síndromes linfoproliferativos Leucemia de células vellosas
Anticuerpos aFL inducidos por medicamentos Fenotiazinas, quinidinas, quinina, penicilina sintéticas, hidralazina, alfa interferón
Anticuerpos aFL prevalentes en la población general

En los pacientes sanos no existe información suficiente que permita establecer qué porcentaje de los que presentan anticuerpos aFL podrían presentar en el futuro un evento trombótico, o un aborto secundario a SAF. En cambio, la posibilidad en un paciente con LES y anticuerpos aFL de desarrollar un SAF, fluctúa entre 50-70%, en un seguimiento a 20 años.

Lo que es de gran importancia para el clínico, es que pacientes con anticuerpos aFL tienen un mayor riesgo de desarrollar trombosis, y por lo tanto podrían ser tributarios de un tratamiento preventivo, aun cuando éste, solo es aplicable en casos de trombosis previa. Los factores de riesgo son: antecedentes de trombosis, presencia de AL, y anticuerpos aCL IgG en títulos altos y persistentes; estos factores aumentan el riesgo de trombosis en 5 veces o más.

3.1.2. Antígenos

Los anticuerpos aFL deben su nombre al hecho que hasta hace algunos años se creía que reconocían fosfolípidos aniónicos. Actualmente se sabe que en realidad tienen especificidad contra algunas proteínas con afinidad por dichos fosfolípidos. Varias proteínas han sido descritas como blanco de anticuerpos aFL, entre ellas: β_2 GPI, protrombina, proteína C, proteína S, anexina V, kininógeno de alto y bajo peso molecular, trombomodulina, factor V y factor VII.

En 1990 tres grupos independientes, Galli y colaboradores, McNeil y colaboradores, y Matsuura y colaboradores, demostraron que los anticuerpos aFL requerían un “cofactor” plasmático, la proteína β_2 GPI, para unirse a los fosfolípidos aniónicos.

La β_2 GPI es también conocida como apoproteína H, por su asociación en el plasma con otras lipoproteínas y porque alrededor del 40% de la β_2 GPI plasmática está unida a triglicéridos. Durante los últimos años, se ha avanzado en el conocimiento del papel que juega la β_2 GPI en la unión de los anticuerpos aFL, específicamente: (a) Dominios de unión de la β_2 GPI para la CL y los anticuerpos anti- β_2 GPI, (b) frecuencia de anticuerpos anti- β_2 GPI en series clínicas y (c) posibles mecanismos trombogénicos de dichos anticuerpos.

La β_2 GPI es una proteína plasmática sintetizada en el hígado y que se une a moléculas con carga negativa, como fosfolípidos aniónicos, heparina y lipoproteínas, y a plaquetas activadas. Esta proteína inhibe la vía intrínseca de la coagulación *in vitro*, la actividad protrombinasa de las plaquetas y la agregación plaquetaria inducida por ADP. Sin embargo, la función de la β_2 GPI *in vivo* es aún desconocida.

Es una glicoproteína formada por una cadena polipeptídica de 326 aminoácidos y que posee un peso molecular aproximado de 50 kDa.

Presenta cinco dominios de aproximadamente 60 residuos, cada uno con patrones altamente conservados de prolina, triptófano y cisteína, estos últimos responsables de los dos puentes disulfuro intradominio. Los dominios I-IV presentan la estructura típica de los miembros

de la superfamilia de proteínas de control del complemento (CCP) también llamados, por su forma, dominios “sushi”. El quinto dominio en cambio, que se encuentra hacia el extremo carboxilo, presenta 82 aminoácidos que incluyen dos cisteínas adicionales (figura 24-1).

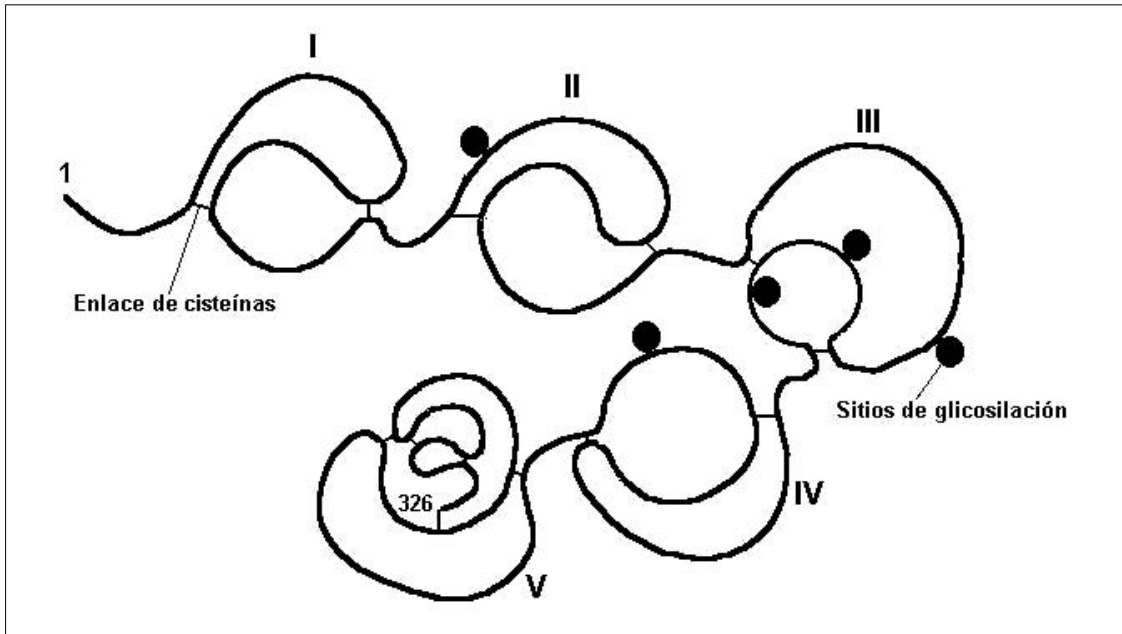


Figura 24-1. Estructura de la β_2 GPI.

El gen que codifica para la β_2 GPI humana fue clonado y secuenciado, y expresado en células eucarióticas. La secuencia aminoacídica deducida a partir del cDNA es de 345 aminoácidos que incluye 19 residuos correspondientes a un péptido señal N-terminal, no presente en la proteína madura.

Dominios de unión de la β_2 GPI. Con el propósito de identificar el (los) epítomos de la β_2 GPI a los que se unían la CL y los anticuerpos anti- β_2 GPI, se han usado básicamente dos estrategias, uso de péptidos sintéticos y mutantes, con los que se han realizado ensayos de inhibición competitiva:

- **Unión a fosfolípidos.** Se ha demostrado que la CL se une a la secuencia aminoacídica $C^{281}KNKEKCC^{288}$ presente en el quinto dominio de la β_2 GPI. La presencia de cuatro lisinas (K), carga positivamente dicha secuencia (figuras 24-1 y 24-2). Por modelamiento computacional de la estructura terciaria de la proteína, establecieron que dicha región se encuentra en la superficie de la molécula.

- **Unión de los anticuerpos anti- β_2 GPI.** Varias investigaciones han permitido establecer que los anticuerpos aCL presentan especificidad contra epítomos crípticos ubicados en el primer y cuarto dominios de la proteína y que se expresan como consecuencia de un cambio conformacional de la β_2 GPI al unirse ésta a fosfolípidos aniónicos, formando el complejo β_2 GPI-FL aniónico (figura 24-2).

3.1.3. Patogénesis

Normalmente los fosfolípidos hexagonales de las células endoteliales están unidas a proteínas de unión a fosfolípidos, como β_2 GPI y protrombina. Cuando se desencadena un SAF, estas proteínas de unión a fosfolípidos aniónicos dejan de estar unidas a las células endoteliales, ya que éstos son ocupados por anticuerpos aFL, o sus niveles plasmáticos disminuyen.

Existen diversos mecanismos que influyen en su patogénesis del SAF, ya sea por interferencia en los sistemas de anticoagulantes naturales, en el endotelio vascular, en las plaquetas, en

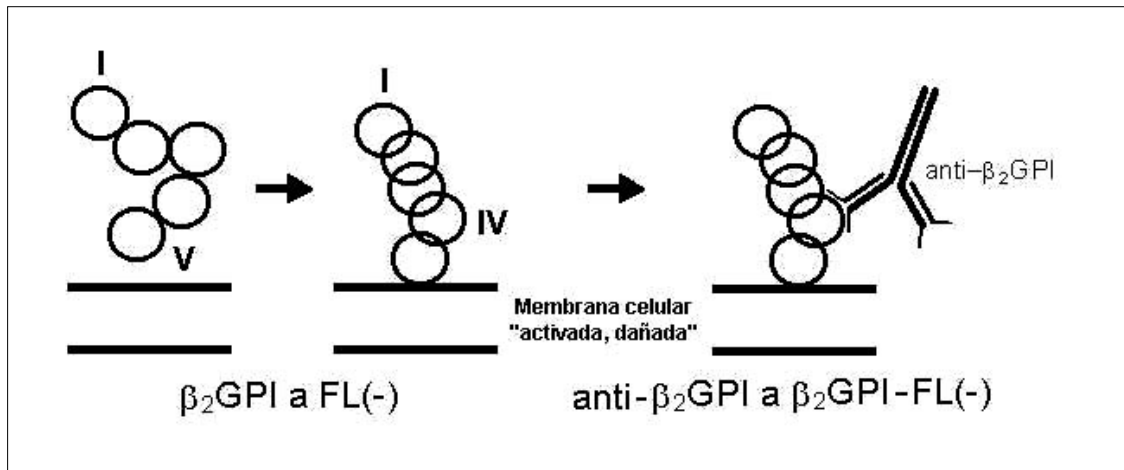


Figura 24-1. Unión de los anticuerpos anti- β_2 GPI

los leucocitos, especialmente en los monocitos y en la fibrinólisis:

a) Mecanismos sobre los anticoagulantes naturales

- Disminución del efecto anticoagulante de anexina V en el sinciotrofoblasto y en las plaquetas.
- Interferencia en el sistema PC (trombomodulina-PC-PS), en sus diferentes niveles:
 - o Inhibición de la formación de trombina (activa la PC) por inhibición de actividad de protrombinasa.
 - o Disminución de la activación de PC por el complejo trombomodulina-trombina.
 - o Inhibición de la conformación del complejo PC.
 - o Inhibición de la actividad de la PC activada (PCa).
 - o Unión a Factor Va y VIIIa protegiéndolos de la proteólisis de la PCa.
 - o Deficiencia de PS.
- Inhibición de la actividad del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y por ende aumentar la actividad del factor tisular.
- Disminución de la actividad de la antitrombina III, ya sea porque algunos

anticuerpos aFL reconocen un epítipo de la trombina, o a través de un mecanismo de reacción cruzada con heparina o moléculas heparinoides que son polianiónicos.

b) Mecanismos sobre el endotelio

- Activación del endotelio mediado por anti- β_2 GPI determinando un aumento en la exposición de moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) y del factor tisular.
- Adhesión de leucocitos al endotelio inducida por anticuerpos aFL.
- Anticuerpos aFL que reconocen anexina V inducen apoptosis en las células endoteliales.
- En casos de trombosis arterial y SAF, se ha detectado aumento de endotelina-1 plasmática que juega un rol en el tono vascular, vasoespasmo y oclusión arterial trombolítica.
- La activación del complemento, con daño endotelial, podría jugar un rol en trombosis asociada a anticuerpos aFL y pérdidas fetales.

c) Mecanismos sobre las plaquetas

- Potencian la activación plaquetaria: las plaquetas de pacientes con SAF presentan mayor expresión de CD63 y liberan mayor cantidad de P-selectina al plasma que las plaquetas de individuos normales. También se ha observado aumento de la expresión de GPIIb-IIIa.

- Los anticuerpos aFL estimulan la agregación plaquetaria. Se ha observado aumento de síntesis *in vitro* de tromboxano A₂.

d) Mecanismos sobre leucocitos

- En pacientes con SAF se ha observado estimulación de monocitos con expresión de factor tisular, lo cual no se observa en casos de pacientes asintomáticos con anticuerpos aFL.
- Activación y degranulación de neutrófilos.

e) Mecanismos sobre la fibrinólisis

- Disminución de la fibrinólisis mediada por aumento del inhibidor del activador del plasminógeno tisular-1 (PAI-1) y por acción de anti-β₂GPI, que inhibe la anti-activación de factor XII, y como resultado la disminución de kalikreina y urokinasa.

3.1.4. Clínica

Los pacientes con SAF pueden presentar tromboembolismo arterial o venoso espontáneo que puede comprometer cualquier localización u órgano. Esta trombosis se observa en un 30% de los pacientes con anticuerpos aFL. Se estima una incidencia de 2,5 eventos trombóticos por 100 pacientes/año, de ellos 2/3 son venosas y 1/3 arteriales.

No existen diferencias clínicas en cuanto a que el SAF sea primario o secundario. Su sintomatología se relaciona con la naturaleza y tamaño del vaso comprometido, y de su agudeza o cronicidad, presentándose a veces con escasos síntomas.

De acuerdo al tamaño del vaso afectado, determinará una insuficiencia de un órgano que tendrá dos orígenes: una microangiopatía trombótica o isquemia secundaria a tromboembolismo.

La trombosis venosa es la manifestación más frecuente del SAF, especialmente de extremidades inferiores; en seguimiento de 6 años fluctúa de un 29-55% de los pacientes, de los cuales más de la mitad presentan embolia pulmonar. Las trombosis aparecen en forma espontánea, o por factores predisponentes: reposo, traumas, cirugía, anticonceptivos orales, etc.

Las trombosis arteriales son menos frecuentes y se manifiestan como isquemia o infarto. El cerebro es el órgano más comprometido (50%) en la forma de accidente vascular o crisis

isquémicas transitorias. El resto de trombosis arteriales se dividen en coronarias (23%) y el resto (27%) incluyendo estas últimas: subclavia, renal, retinal o pedias. Existen también fenómenos embólicos arteriales secundario a vegetaciones de la válvula mitral o aórtica.

Las manifestaciones clínicas del compromiso de capilares, arteriolas o vénulas, son a veces indistinguibles de un síndrome hemolítico urémico (SHU), de un púrpura trombocitopénico trombótico (PTT), u otras microangiopatías trombóticas, a veces sólo diagnosticada por biopsia.

Manifestaciones neurológicas

SAF es frecuente de encontrar en jóvenes con crisis isquémicas transitorias o accidentes vásculo-cerebrales (AVC), especialmente cuando no existen factores de riesgo de enfermedades cerebrovasculares.

Los infartos del sistema nervioso central (SNC) son generalmente pequeños sin evidencia de vasculitis en la biopsia. En pacientes con LES se puede presentar embolia cerebral, y en otros casos trombosis recurrentes del SNC, llevan a una demencia por infartos múltiples.

Otros síndromes neurológicos que se presentan son: migraña, síndrome de Sneddon (AVC, hipertensión arterial y lívido reticularis), síndrome de Guillan-Barré, corea, convulsiones, mielitis transversa, encefalopatía, trombosis venosa cerebral, pseudotumor cerebri, mononeuritis múltiple o amaurosis fugaz.

Manifestaciones cardíacas

El SAF se asocia a enfermedad coronaria, pudiendo condicionar infarto agudo de miocardio en personas jóvenes, y debe sospecharse cuando no existen factores de riesgo de enfermedad coronaria, o existen evidencia de oclusión coronaria trombótica o embolia sin evidencia angiográfica de enfermedad aterosclerótica. El SAF puede ser la causa de oclusiones de "bypass" o "stent" coronarios. El compromiso valvular mitral y/o aórtico con engrosamiento, vegetaciones, regurgitaciones y estenosis se pueden demostrar con el examen de ecografía transesofágica.

Manifestaciones obstétricas

El SAF se asocia con complicaciones del embarazo como abortos, retardo del

crecimiento intrauterino, síndrome de Hellp (hemólisis, elevación de transaminasas y trombocitopenia asociado a preeclampsia) oligohidramnios, insuficiencia útero placentaria y preeclampsia.

Pacientes con anticuerpos aFL tienen una alta incidencia de abortos recurrentes desde las 10 semanas o más de embarazo, aunque en forma más aislada pueden existir abortos de las primeras nueve semanas de embarazo. En ocasiones se asocia a trombocitopenia en la madre. Estas complicaciones son frecuentes cuando los niveles de anticuerpos aCL persisten altos por más de 3- 4 meses. El mecanismo exacto no se conoce, pero se postula que está condicionado a insuficiencia placentaria como resultado de una mala perfusión placentaria y trombosis. En este mecanismo intervendría un desplazamiento por anticuerpos aFL, de aneXina V; ésta es una proteína anticoagulante que se une a fosfolípidos aniónicos, y que existe en la interfase maternofoetal a nivel de las vellosidades placentarias.

Manifestaciones renales

Dependerá del tipo de vaso afectado, si es de grandes vasos puede desencadenar trombosis de la vena o arteria renal, infarto renal, hipertensión, insuficiencia renal aguda o crónica, proteinuria, hematuria o síndrome nefrótico. Si el evento trombotico se presenta a nivel de capilares, arteriolas o vénulas se puede observar insuficiencia renal aguda que a menudo requiere diálisis o microangiopatía trombotica semejando SHU, PTT o hipertensión. Se ha descrito infarto de próstata y testículo secundario a SAF.

Manifestaciones pulmonares

El SAF puede determinar una trombosis espontánea de los vasos pulmonares, o manifestarse como una hipertensión pulmonar, embolia pulmonar, hemorragia alveolar o síndrome de distress respiratorio agudo.

Manifestaciones oftalmológicas

La expresión oftalmológica del SAF puede expresarse como trombosis de la vena central de la retina (TVCR) y de la arteria retinal, y amaurosis fugaz y retinitis.

Manifestaciones gastrointestinales

El tromboembolismo de grandes vasos

secundario a SAF puede manifestarse de diversas maneras: Trombosis de vena mesentérica y vena porta, síndrome de Budd-Chiari, infarto hepático, intestinal o esplénico, perforación esofágica, colitis isquémica, infarto de la vesícula biliar alitiásica, pancreatitis o ascitis.

Manifestaciones endocrinas

Se ha descrito infarto de la glándula suprarrenal o insuficiencia y necrosis de glándula pituitaria o insuficiencia de ella.

Manifestaciones hematológicas

Las manifestaciones hematológicas del SAF incluyen: anemia hemolítica, SHU, PTT y CID en casos de SAF catastrófico. Las complicaciones hemorrágicas son muy raras ya que, en general, la trombocitopenia es moderada en un 20-40% de los pacientes; se ha observado la presencia de anticuerpos antiglicoproteínas plaquetarias (GPIIb-IIIa o GPIb-X) o sensibilización de las membranas plaquetarias activadas por anticuerpos aFL y secuestro de las plaquetas de la circulación.

Manifestaciones cutáneas

La lívido reticularis se observa en un 11-22% de los pacientes y se debe a trombosis capilar que determina una éstasis vascular cutánea caracterizada por un moteado cianótico de la piel. Esta trombosis puede manifestarse además como hemorragia, púrpura necrosante o gangrena periférica.

Manifestaciones misceláneas

Necrosis avascular ósea o perforación del septum nasal.

SAF catastrófico

El SAF catastrófico se define como un cuadro clínico que compromete al menos tres sistemas del organismo en un período de días o semanas con evidencias histopatológicas de oclusiones múltiples de vasos grandes o pequeños. En 2/3 son mujeres jóvenes cercanas a los 40 años y se caracteriza por una "tormenta trombotica" con tromboembolismo venoso masivo, con insuficiencia respiratoria, AVC, alteración de enzimas hepáticas, daño renal, insuficiencia suprarrenal y áreas de infarto en piel. La mayor parte de los casos son SAF primario y una minoría tienen LES u otras enfermedades autoinmunes

como síndrome de Sjogren, escleroderma o artritis reumatoide. La trombosis es una microangiopatía aguda de pequeños vasos que desencadena una falla orgánica múltiple. El órgano comprometido con mayor frecuencia es el riñón (78%), seguido de los pulmones (66%), SNC (56%), corazón (50%) y piel (50%).

El compromiso renal puede requerir diálisis en el 25% de los casos y se asocia a hipertensión a menudo maligna. Pueden desarrollar insuficiencia suprarrenal y CID (25% de los pacientes).

Es un síndrome con una mortalidad de un 50% por falla multiorgánica, y no existe un tratamiento establecido. Se ha obtenido buena respuesta en un pequeño grupo de pacientes con una combinación de anticoagulantes y esteroides, más plasmaféresis o IgG intravenosa (IgG IV).

3.1.5. Diagnóstico

Actualmente el diagnóstico de SAF se basa en el consenso logrado en Sapporo, Japón (1999). Dicho consenso estableció que debe existir 1/2 criterios clínicos y 1/2 criterios de laboratorio:

a) Criterios Clínicos

Los criterios clínicos incluyen trombosis vascular y morbilidad del embarazo:

Trombosis vascular. Consiste en uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos en cualquier tejido u órgano. La trombosis debe estar confirmada por imagenología o Doppler o histopatología, con excepción de trombosis venosa superficial. La histopatología no debe demostrar evidencia significativa de inflamación del vaso sanguíneo.

Morbilidad del embarazo. Se divide en 3 categorías:

- Categoría A: consiste en uno o más muertes no explicables de fetos morfológicamente normales, a las 10 o más semanas de gestación.
- Categoría B: consiste en una o más pérdidas prematuras de neonatos morfológicamente normales a las 34 semanas de gestación o antes, debido a preeclampsia severa o eclampsia o insuficiencia placentaria severa.
- Categoría C: consiste en tres o más abortos espontáneos consecutivos sin explicación antes de las 10 semanas de gestación seguidos de alteraciones hormonales o anatómicas de la madre o alteraciones cromosómicas de ambos padres.

b) Criterios de Laboratorio

Los dos criterios de laboratorio son la presencia y persistencia de anticuerpos aCL o AL.

Los **anticuerpos aCL** deben ser de clase IgG y/o IgM, y estar presentes en títulos medios o altos medidos por ELISA dependiente de β_2 GPI en dos o más ocasiones en un período mínimo de 6 semanas. No están incluidos los anticuerpos aCL IgA, anti- β_2 GPI y anticuerpos aFL contra fosfolípidos diferentes a CL como fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina o contra otras proteínas como protrombina, anexina V, PC o PS. En el ELISA aCL de fase sólida, la CL se fija en pocillos de la microplaca donde formará complejo con la β_2 GPI presente en el suero fetal bovino utilizado en la prueba y en el suero en estudio (donde también podría existir anticuerpos aCL). Luego se agrega un segundo anticuerpo (ej. anti-IgG) conjugado con una enzima (generalmente fosfatasa alcalina) y finalmente la reacción se revela agregando el sustrato adecuado.

La presencia de **AL** detectado en la sangre en dos o más ocasiones en un período de seis semanas. EL AL, determinado con plasma pobre en plaquetas, debe ser detectado en las siguientes etapas: (a) Prolongación de una prueba de coagulación dependiente de fosfolípidos (tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA), tiempo de coagulación con Kaolin (KCT), tiempo de veneno de víbora Russel diluido (DRVVT), tiempo de protrombina diluido (dTP) o tiempo de textarin; se recomienda utilizar dos pruebas de distinta fase: ej. vía intrínseca: KCT y vía extrínseca: dTP); (b) Después de repetir la prueba de coagulación usando una mezcla (1:1) de plasma en estudio y plasma normal, se mantiene alterada; (c) acortamiento o corrección de la prueba de coagulación prolongada al agregar un exceso de fosfolípidos (lisado de plaquetas). Se deben excluir otras alteraciones de la coagulación (inhibidor de Factor VIII o heparina).

3.1.6. Tratamiento

Las recomendaciones terapéuticas actuales para el SAF se basan en estudios observacionales de la asociación de anticuerpos aFL y trombosis, especialmente trombosis recurrente.

Considerando que sus manifestaciones son fundamentalmente de trombosis arteriales o venosas el tratamiento está centrado en el uso de anticoagulantes. En su fase aguda se indica

heparina seguida de tratamiento anticoagulante oral (TACO), por periodos variables de acuerdo al cuadro clínico y a la clase y concentración de anticuerpos aFL presente.

El uso de heparina estándar en pacientes con AL puede ser complejo, ya que éste prolonga el TTPA lo que hace difícil el control de la heparina.

El uso de heparina de bajo peso molecular (HBPM), que no altera el TTPK ni el TT y su monitoreo, se requiere solo en altas dosis terapéuticas, embarazo o cierto grado de insuficiencia renal. Es la mejor indicación para el tratamiento inicial de la trombosis venosa o arterial, seguido de TACO con un periodo de sobreposición de cinco días.

Los pacientes con tromboembolismo espontáneo y SAF deben ser tratados con TACO por largo tiempo, ya que tienen una alta recurrencia de trombosis (50-70%), al no recibir TACO en alta intensidad y al contrario con "International normalized ratio" (INR) mayor de 3, se obtienen los mejores resultados, aunque se asocia a alto riesgo de sangrado. Sin embargo, estudios prospectivos concluyen que INR en rango de 2-3 ó 2-2.8 son efectivos. El uso de aspirina no trae beneficios adicionales y aumenta el riesgo de sangrado.

No se ha establecido la duración del TACO en el SAF, aunque se recomienda un mínimo de 6 meses ante un episodio de trombosis venosa profunda; sin embargo aquellos casos con trombosis venosa recurrente o accidente vascular isquémico debe mantenerse por largo tiempo.

Deben considerarse en esto la localización y extensión de la trombosis y otros factores de riesgo agregados reversibles o irreversibles, junto al riesgo de sangrado de acuerdo a la edad y tiempo de administración del TACO.

En ocasiones el AL prolonga el TP y es difícil el control de TACO, sin embargo el uso de una tromboplastina insensible al AL puede ser de utilidad.

El solo hecho de tener un título alto de anticuerpos aCL no sería indicación de TACO, pero debe estudiarse cada caso en particular. Es así como una historia familiar de complicaciones por SAF, pacientes con LES y SAF con alteraciones de laboratorio o con otros factores de riesgo de trombosis, tendrían

indicación de TACO. Una alternativa al TACO en paciente con LES tratado con ácido acetilsalicílico, sin trombosis, es el uso del antimalárico hidroxiclороquina que tendría algún efecto antitrombótico.

Tratamiento de SAF y Embarazo. El tratamiento profiláctico con HBPM ha permitido llevar a buen término el embarazo de pacientes con SAF. El uso de 40 mg de enoxaparina o 5000 U subcutáneas diarias han sido las dosis utilizadas durante el embarazo y durante 6 semanas del puerperio.

En el caso de SAF se han utilizado simultáneamente aspirina y HBPM, aun cuando sus resultados no están suficientemente evaluados. El uso de aspirina en bajas dosis 75-81 mg/día y heparina estándar, 5000 U subcutánea cada 12 horas han sido de utilidad en pacientes con abortos recurrentes y anticuerpos aFL.

En pacientes refractarios a TACO, con trombocitopenia inmune grave o contraindicación a heparina, está indicado el uso de esteroides.

Bick R. clasificó las trombosis asociadas a anticuerpos aFL en seis tipos, lo cual tiene un sentido práctico en relación a la terapéutica: (a) Tipo I (trombosis venosa profunda con o sin embolia pulmonar), Tipo II (trombosis de arteria coronaria, trombosis de arteria periférica, trombosis aórtica, trombosis de la arteria carótida), (c) Tipo III (trombosis de arteria de la retina, trombosis de vena de la retina, trombosis cerebro vascular, crisis isquémicas transitorias), (d) Tipo IV (mezclas de los tipos I, II, y III), (e) Tipo V (trombosis vascular placentaria, pérdida fetal frecuente en el primer trimestre del embarazo, pérdidas fetales del segundo y tercer trimestre del embarazo), (f) Tipo VI (anticuerpos aFL sin manifestaciones clínicas aparentes).

3.2. Cáncer

La trombosis es una manifestación muy común en los pacientes con enfermedades malignas, asociación descrita por primera vez en el año 1865 por Armand Trousseau. Esta complicación ocurre en forma espontánea, después de cirugía o en pacientes que reciben quimioterapia. La enfermedad tromboembólica puede ser también la primera manifestación de una neoplasia oculta subyacente. La frecuencia de trombosis es diferente según el tipo de cáncer, observándose en algunos de ellos (ej: pulmón,

páncreas), una frecuencia mayor de complicaciones trombóticas. Por otra parte, se ha sugerido que la trombosis se puede asociar a un peor pronóstico y peor supervivencia cuando se compara con pacientes portadores del mismo tipo de tumor que no han presentado eventos trombóticos.

La patogenia de la trombosis en el cáncer comprende una compleja relación entre las

células tumorales, el paciente y el sistema hemostático, incluyendo activación del sistema de la coagulación y fibrinolítico, alteración del endotelio vascular y estimulación de mecanismos procoagulantes sobre la superficie de monocitos y plaquetas circulantes. Los diferentes mediadores en la interacción entre sistema hemostático y las células tumorales se muestran en la tabla 24-4.

Tabla 24-4. Activación de la hemostasia mediada por las células tumorales

Mediadores Procoagulantes
Factor tisular
Proteína procoagulante del cáncer
Mediadores Profibrinolíticos
Activador tisular del plasminógeno (t-PA)
Activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA)
Receptor de uPA (uPAR)
Inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI-1 y -2)
Citoquinas
IL-1 β
Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)
Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)

3.2.1. Moléculas procoagulantes

Las células tumorales a través de la expresión de moléculas procoagulantes son capaces de activar la coagulación; las más caracterizadas hasta ahora son el factor tisular (FT) y la proteína procoagulante del cáncer (PCa). El FT, que constituye el iniciador natural del mecanismo de la coagulación está sobreexpresado sobre la superficie de muchos tipos de células tumorales. El FT no se expresa sobre las células epiteliales normales pero sí lo hace como resultado de la transformación maligna. La expresión de FT no sólo se correlaciona con el grado de desdiferenciación histológica de la célula tumoral sino que también parece alterar el fenotipo de ésta. Por ejemplo, aparte de su función procoagulante, el FT juega un papel importante en la capacidad de crecimiento del tumor y en la producción de metástasis.

La PCa es una cisteína-endopeptidasa de 68 kDa, presente en muchas células tumorales, que tiene la capacidad de activar directamente al factor X (FX) de la coagulación. La activación del FX se logra por escisión de la cadena pesada

en un sitio diferente del que lo hacen otros activadores conocidos del factor. El antígeno de PCa es posible demostrarlo en el suero de pacientes con cáncer y ha sido incluso propuesto como un marcador tumoral sensible y específico. La PCa se ha encontrado aumentada hasta en un 85% de los pacientes con cáncer.

3.2.2. Sistema fibrinolítico

Las células tumorales expresan en su superficie todos los elementos que participan en la regulación del sistema fibrinolítico; los dos tipos de activadores del plasminógeno (t-PS y u-PA), los dos inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI-1 y PAI-2) y el receptor de u-PA (u-PAR). La activación del sistema fibrinolítico sobre la superficie de las células tumorales es importante en la patogenia de los defectos hemorrágicos vistos en algunos tipo de enfermedades malignas (leucemia promielocítica) y también en la capacidad de invadir y generar metástasis. Por otra parte, un defecto en la capacidad fibrinolítica, observado en algunos tipos de tumores, contribuye a la generación de un estado procoagulante.

3.2.3. Citoquinas

Las células tumorales tienen la capacidad de producir una serie de mediadores inflamatorios que pueden producir efectos procoagulantes importantes sobre el endotelio vascular. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral- (TNF α) y la interleuquina-1 β (IL-1 β) inducen la expresión de FT sobre las células endoteliales y disminuyen la expresión de la proteína anticoagulante trombosmodulina, fenómenos que transforman el endotelio normal antitrombótico en uno protrombótico. La secreción por las células tumorales del factor de crecimiento vascular y endotelial (VEGF) induce aumento de la permeabilidad vascular y juega un papel fundamental en la neovascularización del tumor.

3.2.4. Interacciones celulares

La interacción de las células tumorales con las células del huésped constituye otro mecanismo importante de alteración del sistema hemostático y generación de complicaciones tromboembólicas. Esta interacción puede ser directa entre células, mediada por moléculas de adhesión o en forma indirecta a través de la liberación de citoquinas. Un ejemplo del primer mecanismo lo constituye la activación de las plaquetas mediada por las células tumorales y la inducción de interacciones adhesivas entre las células endoteliales y las células tumorales, mediadas por la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria.

El estado protrombótico de los pacientes con cáncer se puede traducir en un evento trombótico como primera manifestación de esta condición o como tromboembolismo venoso en pacientes con cáncer ya diagnosticado, en cualquier etapa de su enfermedad. Estas complicaciones incluyen fenómenos tromboembólicos postoperatorios, inducidos por quimioterapia o de catéteres venosos centrales. Como ya fue sugerido por Trousseau, la trombosis venosa puede ser la primera manifestación de una enfermedad neoplásica.

Se ha demostrado que en pacientes con trombosis venosa o embolia pulmonar, en ausencia de otros factores de riesgo, la probabilidad de tener un cáncer oculto puede ser de hasta un 10%. Sin embargo, estudios de exploración tratando de demostrar un tumor en pacientes con una trombosis venosa han mostrado ser de muy bajo rendimiento, por lo

que parece prematuro recomendar esta práctica en cualquier paciente que se presente con una trombosis venosa no explicada.

En pacientes portadores de enfermedades malignas demostradas, los fenómenos trombóticos se pueden presentar en cualquier momento de su evolución. La cirugía en los pacientes con cáncer representa un factor de riesgo muy importante, encontrando en algunas series seleccionadas cifras de trombosis venosa de sobre un 20%, especialmente asociadas a reposo prolongado. El riesgo de trombosis en pacientes no sometidos a cirugía reciente ha sido evaluado principalmente en cáncer de mama. En pacientes portadoras de cáncer de mama etapa II que reciben quimioterapia, la incidencia de trombosis venosa es alrededor de un 7%. La adición de tamoxifeno aumenta significativamente el riesgo de aparición de fenómenos tromboembólicos en este tipo de pacientes. Por último los pacientes usuarios de catéteres venosos centrales presentan un riesgo marcado de desarrollar trombosis axilar o subclavia. Además los catéteres por sí mismos, son trombogénicos, a pesar del uso de heparina.

3.3. Síndromes mieloproliferativos

Los síndromes mieloproliferativos son neoplasias de la célula troncal hematopoyética (ver capítulo 13). La trombosis y la hemorragia representan complicaciones frecuentes en estos cuadros. La trombosis se puede presentar hasta en un 30% de los pacientes con policitemia vera siendo los fenómenos trombóticos más frecuentes los infartos de miocardio, cerebral y esplénico, y la trombosis de las venas hepáticas (síndrome de Budd-Chiari); también se observa trombosis venosa profunda y tromboembolismo pulmonar. La alta frecuencia de fenómenos tromboembólicos en los síndromes mieloproliferativos sugiere la existencia de un estado de hipercoagulabilidad.

El mecanismo del riesgo aumentado de trombosis en estos cuadros es motivo de debate. Se ha sugerido que el recuento de plaquetas elevado en conjunto con una serie de alteraciones de la función plaquetaria, contribuirían a este estado de hipercoagulabilidad. Entre las alteraciones funcionales plaquetarias se ha encontrado hiperagregabilidad y posiblemente alteración en la capacidad procoagulante de las plaquetas, fenómenos que pueden asociarse a un estado protrombótico.

3.4. Hemoglobinuria paroxística nocturna

Las alteraciones de membrana características de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) están involucradas en las manifestaciones clínicas de la enfermedad tales como hemólisis intravascular crónica, hemoglobinuria, citopenias y trombosis (ver capítulo 8). Una particularidad de la trombosis en la HPN es su predilección por los vasos intraabdominales incluyendo la circulación portal, mesentérica, hepática y renal. El segundo sitio más común de compromiso es el sistema venoso cerebral. El inicio de los episodios de trombosis es independiente de la duración de la enfermedad o del grado de hemólisis.

El mecanismo que predispone a la trombosis en la HPN es mayormente desconocido. Se ha sugerido que las alteraciones de membrana de los leucocitos los hacen susceptibles a la lisis por complemento con liberación de sustancias procoagulantes a la sangre. Las plaquetas también muestran esta misma sensibilidad al daño por complemento que se traduce en hiperagregabilidad y aumento de la actividad procoagulante.

3.5. Síndrome nefrótico

El síndrome nefrótico se caracteriza por pérdida de grandes cantidades de proteína por la orina ($>3.5\text{g/día}$) e hipoalbuminemia concomitante ($<3.0\text{ g/dl}$). La trombosis de la vena renal, que se mencionaba como causa de este cuadro, es ahora considerada una complicación con una frecuencia que puede ser tan alta como el 33% de los casos. Los fenómenos trombóticos pueden comprometer cualquier territorio vascular, lo que confirma un estado de hipercoagulabilidad.

Debido a que en el síndrome nefrótico existe pérdida de gran cantidad de proteínas, la concentración de los factores hemostáticos se puede ver afectada. Cuatro alteraciones del sistema de la coagulación se han invocado como causa de la hipercoagulabilidad en el síndrome nefrótico: (a) aumento de algunos factores de la coagulación (fibrinógeno, FV y FVII), (b) disminución de inhibidores, específicamente de ATIII, (c) defecto de fibrinolisis y (d) aumento del número y de la agregabilidad de las plaquetas.

4. TROMBOFILIA POR MECANISMO MIXTO

4.1. Hiperhomocisteinemia

La homocisteína es un aminoácido intermedio

de tipo sulfidrilo que se forma durante la conversión de metionina a cisteína. La homocisteína está presente normalmente en el plasma a bajas concentraciones (5-15 $\mu\text{mol/L}$). La hiperhomocisteinemia es un factor establecido independiente de riesgo vascular incluyendo la trombosis, aunque existe menos evidencia de que la normalización de sus niveles, disminuya este riesgo.

El metabolismo de la homocisteína tiene dos caminos enzimáticos principales: la transulfuración para formar cistationina, o a través de la remetilación para formar metionina (figura 24-3). La cistationina- β -sintetasa (CBS) cataliza la condensación de la homocisteína y serina para formar cistationina, utilizando piridoxal fosfato (vitamina B_6) como cofactor. La remetilación posee dos vías alternativas: (a) En una vía, 5-metiltetrahidrofolato es el dador de un grupo metil y la cobalamina (vitamina B_{12}) actúa como cofactor, y (b) en la otra vía, la betaína actúa como donante del grupo metilo y la reacción es catalizada por la betaína-homocisteína metiltransferasa. Las deficiencias hereditarias de las enzimas necesarias para la remetilación o transulfuración pueden resultar en niveles elevados de homocisteína, así como defectos adquiridos de los cofactores.

La hiperhomocisteinemia está determinada por alteraciones genéticas o nutricionales o alteraciones metabólicas como la insuficiencia renal crónica o el hipotiroidismo.

La hiperhomocisteinemia puede ser clasificada de acuerdo a los niveles de homocisteína en 3 grupos:

- Grave (concentración plasmática $>100\ \mu\text{mol/L}$)
- Moderada (concentración plasmática 25 a $100\ \mu\text{mol/L}$)
- Leve (concentración plasmática 16 a $24\ \mu\text{mol/L}$)

La hiperhomocisteinemia grave es generalmente causada por la deficiencia homocigota de la enzima CBS. Esta causa retardo mental, cristalino ectópico, alteraciones esqueléticas y enfermedad trombótica arterial y venosa precoz y grave.

La hiperhomocisteinemia moderada o leve está determinada por defectos hereditarios o adquiridos del metabolismo de la homocisteína. Dentro de estos, la deficiencia heterocigota de CBS es la más común (0.3 a 1,4% de la población

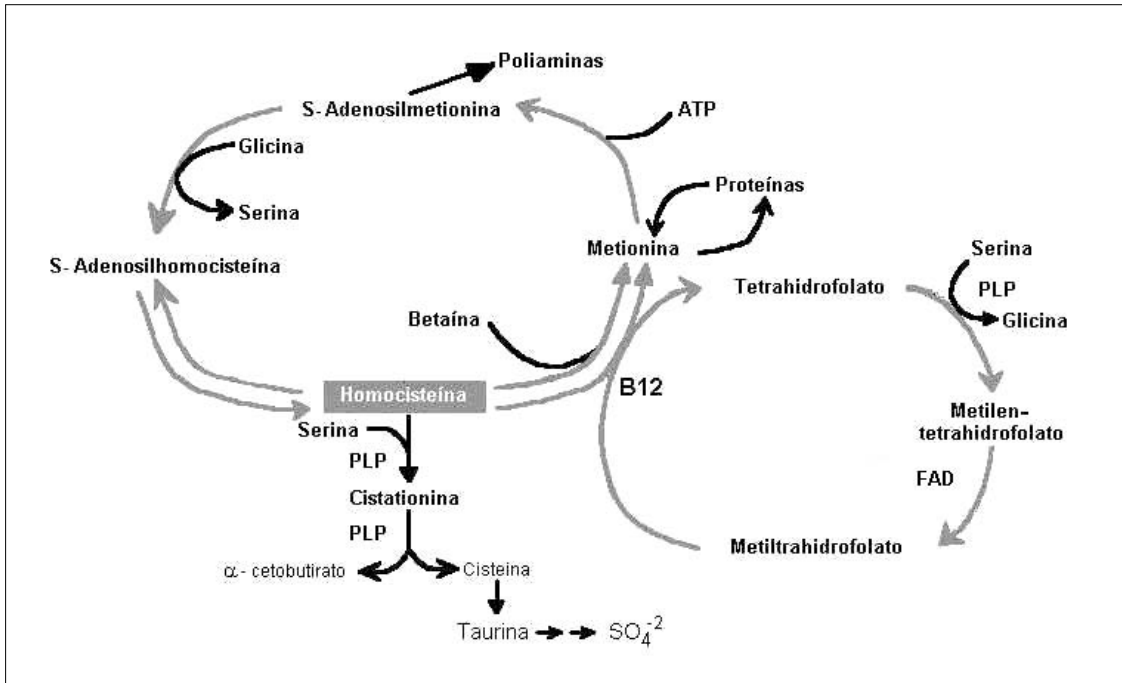


Figura 24-3. Metabolismo de la homocisteína. PLP, Piridoxal-5'-fosfato; FAD, Flavin Adenin Dinucleótido.

caucásica). Las mutaciones de la enzima metilmetiltrahidrofolato reductasa (MTHFR) determinan grados variables de hiperhomocisteinemia.

Una alteración de la vía de remetilación de homocisteína a metionina está determinada por una mutante termolábil de la MTHFR, que se traduce en una reducción de su actividad. Esta variante de la enzima se produce por una transición C→T en el codón 677 que resulta en un cambio de alanina a valina en la proteína madura y que disminuye su actividad en un 50-60% en el estado homocigoto. La prevalencia de esta mutación en la población general es de alrededor de un 5% en caucásicos, 30% en europeos y japoneses y un 11% en afroamericanos. En pacientes portadores de enfermedad coronaria se ha encontrado una prevalencia de la mutación de 17%. La presencia de esta mutación no está siempre asociada a aumento en los niveles de homocisteína, lo que indica que la expresión fenotípica está probablemente influida por otros factores. Por ejemplo, pacientes homocigotos para la forma termolábil de la MTHFR o heterocigotos para deficiencia de CBS, presentan hiperhomocisteinemia especialmente si coexisten con bajas concentraciones séricas de ácido fólico.

4.1.1. Patogenia

Los mecanismos por los cuales la hiperhomocisteinemia induce aterogénesis y trombogénesis no se encuentran totalmente dilucidados. Estudios *in vivo* en animales han demostrado que la homocisteína causa descamación endotelial, proliferación de células musculares lisas y engrosamiento de la íntima. Estudios *in vitro* han encontrado que el daño por homocisteína requiere cobre y oxígeno y es prevenido por catalasa pero no por superóxido dismutasa, sugiriendo que el peróxido de hidrógeno sería responsable del daño de la célula endotelial. Otros efectos de la homocisteína sobre los vasos sanguíneos y sistema hemostático incluyen: daño directo de la célula endotelial a través de la oxidación del colesterol LDL. Inhibición de la expresión de trombomodulina y la activación de PC y supresión de la expresión de heparan sulfato, y aumento de la unión a lipoproteína a fibrina. De esta manera se altera el mecanismo de los anticoagulantes naturales y se disminuye la respuesta fibrinolítica. Es importante señalar que la mayoría de los estudios sobre los efectos *in vitro* de la homocisteína se han demostrado usando concentraciones muy altas de ésta, al menos un orden de magnitud superior a la concentración plasmática.

Estudios más recientes *in vivo* han entregado abundante evidencia de que la hiperhomocisteinemia produce alteraciones funcionales de los vasos sanguíneos; en este sentido, el aumento en el estrés oxidativo y los niveles de especies reactivas de oxígeno, jugarían un papel fundamental en estos cambios vasculares inducidos por hiperhomocisteinemia. Aparte de la alteración vascular funcional, también se ha demostrado que los niveles aumentados de homocisteína promueven el desarrollo de lesiones ateroscleróticas *per se* o las aumenta cuando se asocia a otros factores de riesgo.

Causas de hiperhomocisteinemia

Causas adquiridas de hiperhomocisteinemia incluyen la deficiencia de folato, vitaminas B₆ y B₁₂, cofactores esenciales en su metabolismo. Otra causa frecuente de niveles elevados de homocisteína es la insuficiencia renal crónica. Drogas que interfieren con el metabolismo del folato, tales como metotrexato y anticonvulsivantes, de la vitamina B₁₂ como óxido nítrico y de vitamina B₆ como teofilina, pueden provocar alzas moderadas en los niveles de homocisteína.

Defectos genéticos que se caracterizan por niveles muy elevados de homocisteína presentan un riesgo muy alto de desarrollar precozmente complicaciones vasculares arteriales y venosas graves. Debido a que los pacientes con homocistinuria presentan lesiones ateroscleróticas graves, se postuló que la hiperhomocisteinemia moderada podría constituir un factor de riesgo para enfermedad arterial, lo que se ha comprobado en una serie de estudios epidemiológicos.

Hiperhomocisteinemia y riesgo vascular

La mayoría de los estudios de casos y controles o seccionales cruzados, han demostrado una asociación entre la hiperhomocisteinemia y daño vascular, en la forma de enfermedad coronaria, cerebrovascular o arterial periférica. Sin embargo, en estudios prospectivos en sujetos sanos al momento de enrolos, los resultados son controvertidos ya que de 12 estudios de este tipo solamente en 5 de ellos se encontró asociación entre hiperhomocisteinemia y riesgo cardiovascular. Estudios prospectivos en pacientes portadores de enfermedad coronaria al momento de ingresar al estudio, han mostrado una relación

muy significativa entre los niveles de homocisteína y muerte cardiovascular. Estudios de meta-análisis demuestran un riesgo vascular cuando se combina enfermedad coronaria con homocigotos del alelo 677T y bajos niveles de folatos, sin embargo, este polimorfismo no siempre se asocia a hiperhomocisteinemia.

Estudios de meta-análisis han demostrado que el riesgo de incidencia de un primer episodio de trombosis venosa es 2.5 veces el riesgo normal y del homocigoto para MTHFR C677T es 1 si no se asocia a deficiencia de ácido fólico. Recientes estudios plantean que esta mutación puede proteger del cáncer del colon y de leucemia linfática.

4.1.2. Diagnóstico

La homocisteína plasmática existe libre o unida a proteínas y se mide como homocisteína plasmática total (rango 6 a 15 µmol/L).

El diagnóstico se hace midiendo la homocisteína plasmática después de una noche de ayuno. En caso de que sus valores sean normales, se puede efectuar una carga de L-metionina oral 100 mg/kg con medición de sus niveles a las 4 y 6 horas, cuyo percentil 90 es de 41.3 µmol/L y 58.8 µmol/L, respectivamente.

Deben determinarse los niveles de ácido fólico sérico y de vitamina B₁₂ y eventualmente demostrar la mutación C677T para MTHFR.

4.2. Aumento de los niveles de factores de la coagulación

El aumento moderado de los niveles plasmáticos de los factores de la coagulación VIII, IX y XI se han asociado a un aumento marcado del riesgo de trombosis venosa. Niveles muy altos de factor VIII y IX se asocian a riesgo de trombosis venosa recurrente. El origen adquirido o hereditario de estos niveles elevados de factores es motivo de debate, aunque se acepta que tiene un importante componente hereditario especialmente a nivel del FVIII.

El mecanismo responsable de la hipercoagulabilidad en esta situación no se ha aclarado, aunque se ha encontrado recientemente un aumento importante en la generación de trombina en el plasma de pacientes con niveles elevados de FIX y FXI.

5. ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA

La evaluación indiscriminada de laboratorio en todo paciente que presenta un episodio de tromboembolismo venoso, no aparece justificada en el momento actual. Aparte de constituir una práctica de muy alto costo, los resultados generalmente no se traducirán en cambios de conducta y la identificación de factores de riesgo no modificables generarán una ansiedad innecesaria en pacientes y parientes asintomáticos. Pacientes con trombosis arterial no representan buenos candidatos para investigar defectos trombofílicos hereditarios.

El estudio de trombofilia debería enfocarse a aquellos pacientes en los cuales los hallazgos de laboratorio son con mayor probabilidad positivos o cambiarán conductas terapéuticas.

Entre éstos se incluye a pacientes jóvenes (menores de 45 años) con trombosis inexplicada, recurrente o en sitios inusuales, mujeres con mala historia obstétrica y potenciales usuarias de anticonceptivos orales con historia personal o familiar de trombosis. La investigación de laboratorio a parientes de primer grado de portadores de defectos trombofílicos es motivo de controversia y en caso de hacerlo debe ser acompañada de una cuidadosa explicación de los resultados y consejería especializada.

El estudio de laboratorio debe contemplar un panel mínimo de pruebas que incluyen los defectos de mayor prevalencia en la población y aquellos que aun siendo de baja frecuencia, se asocian a riesgo alto de trombosis (tabla 24-5).

Tabla 24-5 Panel mínimo de estudio de las trombofilias

- Antitrombina III, ensayo funcional
- Proteína C, ensayo funcional
- Proteína S libre, ensayo antigénico
- Resistencia a la proteína C activada
- Mutación G20210A de la protrombina
- Anticuerpos antifosfolípidos (AL, Ac aCL)
- Homocisteína plasmática

AL, Anticoagulante lúpico, Ac aCL, Anticuerpos anticardiolipina

El momento en que se realiza el estudio de laboratorio también es una variable importante a considerar. Los episodios tromboembólicos agudos, con o sin tratamiento concomitante, pueden influir de modo importante en los resultados y dificultar su interpretación. Por esta razón se recomienda efectuar la investigación de laboratorio 6 meses después del episodio agudo. Debido a que el uso de anticoagulantes orales afecta los valores de la PC, PS el estudio no se debiera realizar antes de dos semanas de suspendido el tratamiento.

LECTURAS SUGERIDAS

Trombofilias hereditarias

Bauer, K.A. "Hypercoagulable states" In : **Hematology basic principles and practice**, Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein LE. 2nd Edition. Churchill Livingstone, New York, 1995, pp. 1781-1795.

Bertina, R.M. "Genetic approach to thrombophilia". *Thromb Haemost*; 86: 92-103, 2001.

De Stefano, V., Finazzi, G., Mannucci, P.M. "Inherited thrombophilia: pathogenesis, Clinical syndromes and management". *Blood*; 87: 3531-3544, 1996.

De Stefano, V., Rossi, E., Paciaroni, K., Leone, G. "Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications". *Haematologica*; 87: 1095-1108, 2002.

Donati, M.B. "Cancer and thrombosis: from phlegmasia alba dolens to transgenic mice". *Thromb Haemost*; 74: 278-281, 1995.

Greaves, M., Baglin, T. "Laboratory testing for heritable thrombophilia: impact on clinical management of thrombotic disease". *Br J Haematol*; 109: 699-703, 2000.

Kitchens, C.S. "Thrombophilia and thrombosis in unusual sites" En: **Hemostasis and Thrombosis, Basic principles and clinical practice**, Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Salzman, E.W. JB Lippincot Co. Philadelphia, 1994, pp. 1255-1273.

Lane, D.A., Mannucci, P.M., Bauer, K.A., Bertina, R.M., Bochkov, N.P., Boulyjenkov, V., Chandy, M., Dahlbäck, B., Ginter, E.K., Miletich, J.P., Rosendaal, F.R., Seligsohn, U. "Inherited thrombophilia: Part 1". *Thromb Haemost*; 76: 651-662, 1996.

Lane, D.A., Mannucci, P.M., Bauer, K.A., Bertina, R.M., Bochkov, N.P., Boulyjenkov, V., Chandy, M., Dahlbäck, B., Ginter, E.K., Miletich, J.P., Rosendaal, F.R., Seligsohn, U. "Inherited thrombophilia: Part 2". *Thromb Haemost*; 76: 824-834, 1996.

Trombofilias adquiridas

Asherson, R.A., Cervera, R. "The antiphospholipid syndrome: multiple faces beyond the classical presentation". *Autoimmunity Reviews*; 2: 140-51, 2003.

Bick, R.L. "Antiphospholipid thrombosis syndromes". *Hematol Oncol Clin N Am*; 17: 115 - 47, 2003.

Forastiero, R.R., Martinuzzo, M.E., De Larranaga, G., Broze, G.J. "Antibodies to tissue factor pathway inhibitor are uncommonly detected in patients with infection-related antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost*; 1(10):2250-1, 2003.

Lee, A.Y.Y., Levine, M.N. "Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes". *Circulation*; 107: 1-17, 2003.

Levine, J.S., Branch, D.W., Ranch, J. "The Antiphospholipid Syndrome". *New England J Med*; 346: 752-63, 2002.

Levine, M.N., Lee, A.Y., Kakkar, A.K. "From Trousseau to targeted therapy: new insights and innovations in thrombosis and cancer". *J Thromb Haemost*; 1 : 456-1463, 2003.

Maiolo, A., Tua, A., Grignani, G. "Hemostasis and cancer: tumor cells induce the expression of tissue factor-like procoagulant activity on endothelial cells". *Haematologica*; 87: 624-628, 2002.

Palomo, I., Pereira, J., Alarcón, M., Larrain, A.M., Vasquez, M., Leon, M., Espínola, R., Pierangeli, S. "Antiphospholipid antibodies in Chilean patients with systemic lupus erythematosus". *J Lab Clin Med*; 140: 336-41, 2002.

Palomo, I., Pereira, J., Alarcon, M., Vasquez., Pinochet, C., Velez, M.T., Sandoval, J., Icaza, G., Pierangeli, S. "Prevalence and isotype distribution of antiphospholipid antibodies in unselected Chilean patients with venous and arterial thrombosis". *Clin Rheumatol*. 23(2):129-33, 2004.

Palomo, I., Cabral, A., Pierangeli, S., Forastiero, R. "Síndrome Antifosfolípido" En: **Inmunología Básica y Clínica**, Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Rosseblatt, M., Vergara, U. (eds.), Cap. 25, Editorial Universidad de Talca, 2002.

Trombofilia mixta

Green, R. "Homocysteine Today: The Folate-Cobalamin connection. ASH Education Program Book". *Hematology*; 69 - 73, 2003.

Merkel, M. "Homocysteine as a risk factor of cardiovascular disease". *International Congress series*; 1262: 376-79, 2004.

Seligsohn, U., Lubetsky, A. "Genetic susceptibility to venous thrombosis". *N Engl J Med*; 344: 1222-1231, 2001.

Tripodi, A., Mannucci, P.M. "Laboratory investigation of thrombophilia". *Clin Chem*; 47: 1597-1606, 2001.

TRATAMIENTO ANTITROMBÓTICO

Jorge Aldunate O. y María Jesús Vial C.

1. Introducción

2. Fármacos antiplaquetarios

- 2.1. Mecanismo de acción de los antiplaquetarios
- 2.2. Uso de pruebas de laboratorio para el control del tratamiento con antiplaquetarios
- 2.3. Bases farmacológicas de los fármacos antiplaquetarios
 - 2.3.1. Ácido acetilsalicílico
 - 2.3.2. Clopidogrel
 - 2.3.3. Dipyridamol
 - 2.3.4. Eptifibatide
 - 2.3.5. Ticlopidina
 - 2.3.6. Tirofiban

3. Anticoagulantes

- 3.1. Anticoagulantes parenterales: heparinas
 - 3.1.1. Historia de las heparinas
 - 3.1.2. Composición química de la heparina
 - 3.1.3. Mecanismo de acción de la heparina: Efecto sobre la AT-III
 - 3.1.4. Uso de pruebas de laboratorio para el control del tratamiento con heparina
 - 3.1.5. Farmacocinética de las heparinas
 - 3.1.6. Efectos secundarios y reacciones adversas del uso de heparinas
 - 3.1.7. Contraindicaciones
 - 3.1.8. Indicaciones terapéuticas

3.2. Anticoagulantes orales

- 3.2.1. Generalidades
- 3.2.2. Mecanismos de acción de los anticoagulantes orales
- 3.2.3. Fármacos anticoagulantes orales disponibles en Chile
- 3.2.4. Interacciones de los anticoagulantes orales
- 3.2.5. Mecanismos de interacción farmacológica
- 3.2.6. Efectos secundarios de los anticoagulantes orales
- 3.2.7. Monitorización del tratamiento anticoagulante oral
- 3.2.8. Indicaciones clínicas de la terapia anticoagulante oral
- 3.2.9. Contraindicaciones de terapia anticoagulante oral
- 3.2.10. Resistencia a los anticoagulantes orales

4. Fármacos fibrinolíticos

- 4.1. Proceso fibrinolítico
- 4.2. Uso médico del proceso fibrinolítico
- 4.3. Fármacos anticoagulantes fibrinolíticos disponibles en Chile.

5. El futuro en el tratamiento antitrombótico

RESUMEN

La trombosis puede producir la obstrucción de un vaso sanguíneo y está implicada en varias enfermedades de alta morbimortalidad (infarto de miocardio, infarto cerebral, tromboembolismo pulmonar). La respuesta hemostática, es la sumatoria de eventos celulares y plasmáticos. Ambos tipos de procesos pueden ser afectados por fármacos que cuando previenen la formación y el crecimiento de un trombo, o cuando lisan un trombo existente, se les conoce como agentes antitrombóticos. Actualmente, existen tres clases de fármacos disponibles para uso clínico: los agentes antiplaquetarios, los medicamentos anticoagulantes y las drogas trombolíticas.

Los fármacos antiplaquetarios son un grupo de medicamentos que actúa sobre la agregación plaquetaria, siendo el más clásico el ácido acetilsalicílico. Su acción se produce al inhibir irreversiblemente el metabolismo de producción del ácido araquidónico de las plaquetas, evitando su agregación y por ende el crecimiento del trombo.

Los fármacos anticoagulantes evitan el crecimiento del trombo, siendo la heparina el anticoagulante de uso parenteral más utilizado, actúa potenciando el efecto de la Antitrombina III, anticoagulante natural y que tiene la capacidad de neutralizar algunos de los factores activados de la coagulación, fundamentalmente la trombina o factor II, el factor X activado, el factor IX activado y el factor XI activado.

Los anticoagulantes orales pertenecen a dos grandes familias de drogas, las cumarinas y las inandionas, siendo los más utilizados, el acenocumarol y la warfarina. Su mecanismo de acción es interferir en la síntesis de vitamina K, y por ello, afectando la producción de los factores de la coagulación IX, X, VII, II, y de las proteínas C y S, todos los cuales son dependientes de la vitamina K. El objetivo principal del tratamiento anticoagulante oral es mantener niveles óptimos de anticoagulación para evitar episodios trombóticos o recurrencias.

Los fármacos fibrinolíticos activan la plasmina, proteasa que actúa sobre las moléculas de fibrina que forman parte del coágulo y por tanto provocando su lisis y permitiendo la recanalización de los vasos sanguíneos que se encuentran obstruidos. Este tipo de tratamiento antitrombótico es el único tratamiento verdaderamente curativo, aunque tiene importantes riesgos hemorrágicos.

1. INTRODUCCIÓN

Alrededor de 1850, Rudolf Virchow, patólogo alemán, postuló dos términos asociados a la inflamación de las venas, la trombosis y la embolia. En una vena, localmente se podían asociar tres elementos: (a) cambios en la pared de los vasos por daño del endotelio, (b) disminución del flujo sanguíneo (éstasis sanguíneo) y (c) cambios en la sangre (hipercoagulabilidad). Esta tríada de elementos, hoy conocida como la tríada de Virchow, daban cuenta de la generación de un trombo venoso, el cual si se soltaba y circulaba por la sangre, se transformaba en un émbolo.

Hoy en día, se sabe que si se produce una sección de un vaso, se activa un conjunto de células y proteínas que transporta la sangre, interactuando con la pared lesionada. Tales elementos activados provocan la conversión de la sangre, desde su estado líquido a una sustancia sólida (coágulo) que se deposita

alrededor y en el interior de la pared actuando como tapón, proceso conocido como hemostasia. Si en lugar de existir una ruptura del vaso, en la parte interna de su pared se produce una grieta o una rugosidad, se activarán los mismos mecanismos y se producirá también un coágulo en el interior del vaso, en este caso, se habla de trombosis.

La trombosis, es una complicación importante de varias condiciones médicas y quirúrgicas, que pueden ser prevenidas o ser efectivamente tratadas.

Hemostasis y trombosis

La respuesta hemostática es la sumatoria de eventos celulares y plasmáticos, siendo los primeros más significativos en las arterias, por su acción rápida y los segundos, por ser más lentos, más importantes en la respuesta de las venas.

Ambos tipos de procesos, celulares y plasmáticos, se interrelacionan y se amplifican, pero también se regulan, impidiendo que el fenómeno hemostático se generalice, provocando una oclusión general de los vasos sanguíneos. Es importante señalar aquí, que independiente de cuál sea el mecanismo más importante, siempre se activan, los procesos celulares y plasmáticos:

a) Procesos celulares. Son generados principalmente por las plaquetas. Éstas actúan *per se* y por la liberación de factores propios. Además, la vasoconstricción permite la acción de las plaquetas (ver capítulo 19). La función primordial de las plaquetas es agregarse para formar el trombo (primera etapa de la hemostasia). Esta función está determinada por 4 características: (a) capacidad de adhesión. Al adherirse las plaquetas al endotelio vascular lesionado, liberan sustancias que ayudan a contrarrestar la lesión, entre ellas destaca la serotonina un potente agente vasoconstrictor que produce contracción de las células vasculares musculares lisas, reduciendo, el flujo sanguíneo; (b) liberación de gránulos desde el interior de la plaqueta, hacia la superficie. Esta reacción se desencadena por acción de la trombina, el colágeno o el ADP. La liberación de los gránulos genera liberación de ADP y otros agonistas plaquetarios, creando una reacción en cadena, aumentando la agrupación plaquetaria, proceso que se conoce como activación plaquetaria, (c) una agregación plaquetaria reversible, en un primer momento, y luego (d) la agregación irreversible, que aparece cuando se organiza el trombo.

vaso sanguíneo tiene un rol fundamental el factor de von Willebrand (ver capítulos 19 y 20).

La adhesión provoca la liberación de los gránulos plaquetarios, que llevan a que las plaquetas cambien su forma, exponiendo más moléculas, GPIIb-IIIa, que posibilita la agregación plaquetaria mediante puentes de fibrinógeno. La sumatoria de estos eventos produce el tapón plaquetario, el que al depositarse sobre endotelio sano, hace que este tejido libere sustancias que tienen efecto antiagregante plaquetario provocando la limitación del crecimiento del tapón de plaquetas. El AMP cíclico tiene un efecto opuesto al ADP, ya que inhibe la agregación plaquetaria; así los metabolitos que aumentan el AMPc como la prostaciclina (PGI₂) y el óxido nítrico endoteliales contrarrestan la agregación.

b) Procesos plasmáticos. La reacción bioquímica central del proceso de coagulación, es la transformación de fibrinógeno a fibrina, molécula que al polimerizar produce un soporte donde se depositan células y factores sanguíneos que llevan a la generación del coágulo o el trombo, según sea la lesión que haya sufrido el vaso sanguíneo.

Una serie de proteínas presentes en el plasma (factores de la coagulación) producidas principalmente en el hígado, reaccionan en cascada, activándose, produciendo la coagulación de la sangre (ver capítulo 20). La activación de la coagulación lleva a la transformación de protrombina a trombina, molécula que a su vez transforma el fibrinógeno a fibrina (figura 25-1).

En la adhesión de las plaquetas a la pared del

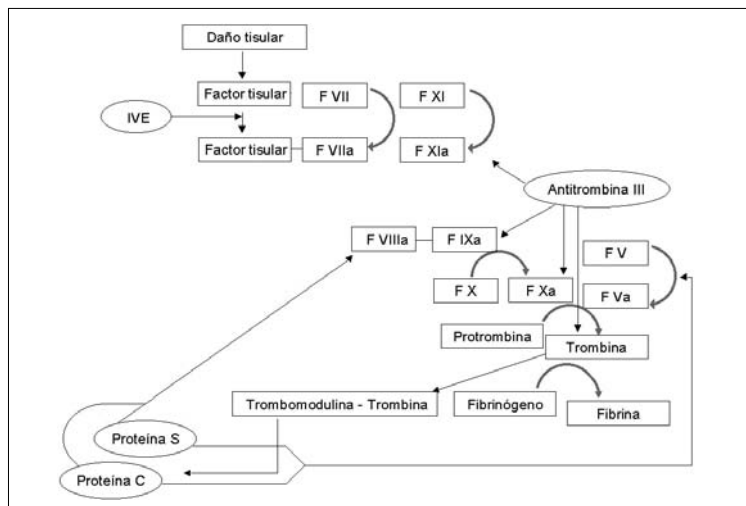


Figura 25-1. Esquema del Sistema de la coagulación.

Fármacos antitrombóticos

La trombosis puede producir la obstrucción de un vaso sanguíneo y está implicada en varias enfermedades de alta morbilidad (infarto del miocardio, infarto cerebral, tromboembolismo pulmonar). Actualmente, tres clases de fármacos están disponibles para ello: agentes antiplaquetarios, fármacos anticoagulantes y medicamentos trombolíticos. Los primeros dos grupos previenen la formación y crecimiento del trombo, mientras que el tercer grupo lisa el trombo previamente existente. En este capítulo se describirán los aspectos más relevantes sobre estos tres tipos de fármacos.

2. FÁRMACOS ANTIPLAQUETARIOS

Las plaquetas participan en la hemostasis, pero también en condiciones patológicas de tromboembolismo intravascular (ver capítulo 19). La base de estos trastornos, es la agregación plaquetaria, por eso esta etapa es blanco de los fármacos que buscan evitar o controlar la activación plaquetaria en sitios sin ruptura del endotelio.

En los sitios donde exista lesión o disfunción endotelial, las plaquetas se adhieren mediante receptores específicos localizados en su membrana (GPIb) al factor de von Willebrand, el cual a su vez, se une al colágeno del subendotelio vascular; la adhesión plaquetaria estimula la secreción de ADP, a partir de los gránulos densos y estimula la actividad de la enzima fosfolipasa C, presente en la membrana plaquetaria y cuya función es desencadenar la síntesis de ácido araquidónico, prostaglandinas y tromboxano A₂. Luego, la activación de las plaquetas tiene lugar por dos vías principales, la vía de la ciclooxigenasa y una vía dependiente de ADP.

Las plaquetas activadas liberan ADP y activan la fosfolipasa A₂. Lo anterior tiene como consecuencia, la hidrólisis del ácido araquidónico presente en la superficie plaquetaria, el cual es metabolizado por la ciclooxigenasa para formar prostaglandinas G₂ y H₂, y finalmente tromboxano A₂ por acción de la enzima tromboxano sintetasa (figura 25-2).

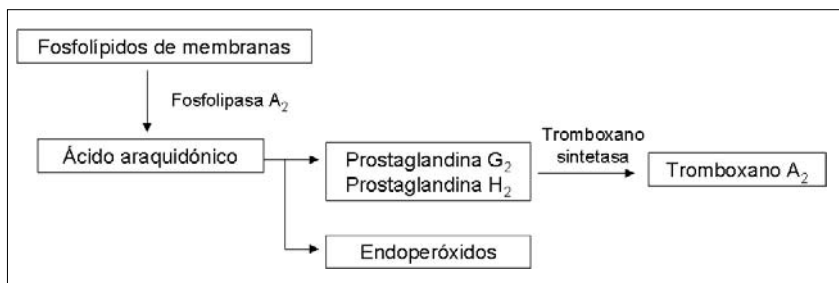


Figura 25-2. Esquema representativo de la síntesis de tromboxano A₂.

2.1. Mecanismo de acción de los antiplaquetarios

Los medicamentos que afectan a las plaquetas han tenido un gran desarrollo en los últimos años, principalmente por su utilidad para prevenir y tratar el desarrollo de la aterotrombosis. Un fármaco antiplaquetario ideal es aquel que afecta solo una actividad enzimática en una vía metabólica de la célula. En términos generales los fármacos antiplaquetarios, según su mecanismo de acción, se diferencian según sea su efecto, reversible o irreversible, es decir, si actúan inhibiendo reversiblemente una actividad enzimática de las plaquetas o si su acción sobre

la función enzimática plaquetaria, es permanente.

El más clásico de los fármacos antiplaquetarios es sin lugar a dudas, el ácido acetilsalicílico (AAS), conocido por aspirina. Su acción se produce al inhibir irreversiblemente, inhibiendo la enzima prostaglandina H sintetasa, enzima que sintetiza la prostaglandina H₂, precursor de la formación del tromboxano A₂. La aspirina acetila el grupo hidroxilo de la serina 529 de la enzima, la cual tiene dos actividades catalíticas diferentes, por una parte actúa como ciclooxigenasa I (COX I), participando en la formación de la prostaglandina G₂, y también lo hace como hidroxidasa reduciendo dos

electrones de esa prostaglandina y produciendo así, Prostaglandina H_2 . La O-acetilación provoca la pérdida permanente de la actividad Cox I, en cambio, la actividad de peroxidasa no es afectada. La inactivación de la Cox I es la base de la acción antitrombótica de la aspirina, pero también es la causa de su principal efecto adverso, el sangramiento gástrico.

Existen dos tienopiridinas, la ticlopidina y el clopidogrel, que afectan irreversiblemente la agregación plaquetaria dependiente de ADP. Aunque no está claramente demostrado, se postula que ambos fármacos actuarían a través de un(os) metabolito(s) intermediario(s), que se originaría(n) en el hígado. La inactivación por las tienopiridinas produce el bloqueo del receptor $P2Y_{12}$ de las plaquetas, sitio donde fisiológicamente se une el ADP necesario para la agregación plaquetaria. El clopidogrel actúa más rápido que la ticlopidina.

La Cox I, la GP IIb/IIIa, el receptor de prostaglandina H_2 / tromboxano A_2 y el receptor $P2Y_{12}$ son proteínas plaquetarias posible de inhibir por acción medicamentosa. Se ha estudiado principalmente, la inhibición reversible de la GP IIb/IIIa, la cual no muestra un efecto clínico beneficioso, peor aún, se provoca un aumento de los sangramientos dosis dependiente. En cambio, fármacos que actúan como antagonistas de la GP IIb/IIIa sí tienen utilidad clínica (tirofiban y eptifibatide).

En el caso del dipiridamol, su mecanismo de acción es poco claro, se conoce que incrementa los niveles de AMP cíclico por inhibición de la fosfodiesterasa, y por ende, inhibe la reutilización de adenosina, es poco eficaz por sí solo aunque parece potenciar la acción antiplaquetaria de la aspirina.

2.2. Uso de pruebas de laboratorio para el control del tratamiento con antiplaquetarios

En general, los fármacos antiplaquetarios, inhiben la agregación plaquetaria, pero no parecen afectar ni la viabilidad ni el recuento de plaquetas. La forma de controlar la acción de los agentes antiplaquetarios es midiendo el resultado de su acción farmacológica, por ello, es esperable la prolongación del tiempo de sangría. Por otra parte, es importante la monitorización del hematocrito y de la hemoglobina para pesquisar eventuales hemorragias ocultas, secundarias al tratamiento.

2.3. Bases farmacológicas de los fármacos antiplaquetarios

2.3.1. Ácido acetilsalicílico

La capacidad del AAS de actuar como antiagregante plaquetario define sus usos clínicos en la prevención del infarto agudo de miocardio (IAM) y en la disminución del riesgo de trombosis en portadores de prótesis de válvulas cardíacas.

Los efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios del AAS se deben a las asociaciones de las porciones acetilo y salicilato de la molécula intacta, como también a la acción del metabolito salicilato activo. Al administrarse por vía oral, su absorción es rápida. Un alto porcentaje del fármaco se une a proteínas, lo cual produce que en casos de hipoalbuminemia aumenta la concentración plasmática, con concentraciones bajas de albúmina del fármaco. Se elimina por vía renal como ácido salicílico libre y como metabolitos conjugados.

Como antitrombótico, las indicaciones son prevención y tratamiento de trombosis venosas o arteriales y en la prevención del infarto de miocardio en pacientes con angina inestable.

La dosificación como antitrombótico es una dosis de 100 a 300 mg/día, luego de un IAM o de un accidente isquémico transitorio.

En el uso como antitrombótico de la aspirina, las reacciones adversas más comunes como náuseas, vómitos, diarrea, epigastralgia, y gastritis, no son muy frecuentes, debido a las bajas dosis requeridas para acción antiplaquetaria, respecto de las dosis utilizadas para sus acciones analgésica, antipirética y antiinflamatoria. En pacientes con antecedentes de úlcera péptica, gastritis o anormalidades de la hemostasis, hay que evaluar las ventajas de su uso respecto del riesgo de hemorragias.

Al administrarse puede interaccionar con otros medicamentos que se unen a las proteínas, por ej., tiroxina, penicilina sódica, fenitoína, produciendo cambios en las dosis requeridas de estos fármacos. Potencian su efecto de los anticoagulantes orales lo cual puede llevar a valores de INR (ver punto 32.7) por encima de los requeridos como prevención trombótica.

2.3.2. Clopidogrel

Se administra en dosis de 75 mg/día. A las 2 horas, se observa inhibición de la agregación plaquetaria y el estado estacionario se alcanza entre el 3° y 7° días, con una inhibición del 40% al 60% de la agregación plaquetaria.

El Clopidogrel se metaboliza muy rápidamente, por lo que la molécula original se encuentra en cantidades mínimas en la circulación, y además tiene una alta unión a proteínas plasmáticas. Se excreta por vía renal (50%) y por las deposiciones (45%).

El fármaco es bien tolerado, presentando efectos adversos similares que la aspirina. Se debe administrar con precaución en pacientes con riesgos de hemorragia. En casos de cirugía programada, el clopidogrel se debe suspender 7 días antes, ya que prolonga el tiempo de sangría y no debe usarse en casos de úlcera péptica sangrante y de hemorragia intracraneana.

El clopidogrel interacciona con otros antiplaquetarios como el AAS; se debe tener en consideración el efecto sinérgico sobre la agregación plaquetaria. Con las heparinas, el activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA) y los anticoagulantes orales, pueden ocurrir efectos sinérgicos sobre la coagulación.

2.3.3. Dipyridamol

En dosis de 300 a 600 mg/día dipyridamol, se usa conjuntamente con anticoagulantes orales, en la prevención del tromboembolismo originado en las válvulas cardíacas mecánicas. La absorción es variable y lenta, lo mismo que sus niveles plasmáticos, que alcanzan su "peak" máximo a los 90 minutos. Se metaboliza en el hígado por glucuronoconjugación y se elimina por vía biliar, mediante el proceso de recirculación entero-hepática.

Las reacciones adversas más frecuentes son náuseas, vómitos, diarrea y cefalea. En dosis altas produce hipotensión por ser un fuerte vasodilatador, por lo cual su uso debe evitarse en pacientes con trastornos hemodinámicos. Al asociar dipyridamol con otros agentes antiplaquetarios, con heparina, con anticoagulantes orales, o con trombolíticos (estreptoquinasa o uroquinasa) hay que evaluar las ventajas de su uso con el aumento del riesgo hemorrágico.

2.3.4. Eptifibatide

La principal indicación de eptifibatide es la prevención del IAM y por ende de la muerte en pacientes con angina inestable o con IAM no Q, cuando ellos requieren tratamientos con intervención coronaria percutánea, como también en pacientes sometidos a angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) y aterectomía.

Se administra simultáneamente en inyección endovenosa asociado a una solución para infusión. En pacientes con angina inestable o IAM no Q, se inicia el tratamiento con una dosis de 180 mg/kg seguido de una infusión continua de 2 ng/Kg/minuto hasta por 72 horas. Si durante el tratamiento, se realiza algún procedimiento intervencionista, la infusión debe seguir por 24 horas post-intervención. En cambio, si el paciente requiere de cirugía de urgencia, la infusión debe suspenderse de inmediato.

La contraindicación más importante de uso de eptifibatide es una hemorragia activa importante de cualquier origen; el uso clínico en otras situaciones como INR > 2,0, trombocitopenias, entre 50.000 a 100.000 plaquetas/ μ L, patologías hematológicas, etc., deben ser evaluadas según las condiciones particulares del paciente a tratar.

Por otra parte, la reacción adversa más descrita al usar este medicamento es la hemorragia. El riesgo de hemorragia es más común en el sitio de acceso, en aquellos pacientes sometidos a intervención arterial percutánea. El uso de eptifibatide a dipyridamol, ticlopidina, clopidogrel y anticoagulantes orales debe evitarse, pues se potencia su acción; en cambio, no está claramente definido qué ocurre al asociar este medicamento con fármacos trombolíticos.

2.3.5. Ticlopidina

La ticlopidina, luego de una administración oral de 250 mg, se absorbe rápidamente y alcanza su "peak" plasmático a las 2 horas; se absorbe más de un 80%. Presenta alta afinidad por las proteínas plasmáticas y su metabolización hepática es casi en un 100%. Se indica principalmente, como alternativa a otros agentes antiplaquetarios, en dosis de 250 – 500 mg día.

Las reacciones adversas más observadas son:

diarrea, náuseas, dispepsia, prurito y dolor gastrointestinal. La ticlopidina puede aumentar la acción de la antipirina y puede ocasionar lo mismo con otros fármacos que tengan metabolismo hepático.

Como en otros antiplaquetarios, las contraindicaciones más importantes del uso de ticlopidina son los trastornos hemostáticos o las hemorragias activas.

2.3.6. Tirofiban

Este medicamento se usa en forma endovenosa en pacientes coronarios (angina inestable) para prevenir eventos isquémicos, en especial si se les realizará aterectomía o angioplastía coronaria.

En pacientes con angina inestable o IAM no Q, inicialmente se administra en infusión de 0,4 µg/kg/min por 30 minutos, luego en una dosis de mantenimiento de 0,1 µg/kg/min. La

infusión debe mantenerse por 12 a 24 horas luego de la angioplastía o de la aterectomía en estos pacientes se combina con heparina, pero debe suspenderse si el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) supera los 180 segundos. En procedimientos como una angioplastía o una aterectomía, el tirofiban se inicia con un bolo de 10 µg/kg administrado en 3 minutos, luego en una infusión de mantenimiento de 0,15 µg/kg/min, la que se debe mantener por 36 horas, siempre que el TTPA sea <180 seg. En nefrópatas crónicos la dosis debe ser un 50% del resto de los pacientes.

El tirofiban está contraindicado en pacientes con hemorragias masivas actuales, accidentes vasculares encefálicos hemorrágicos, aneurismas o con antecedentes de reacciones adversas al fármaco.

Los fármacos antiplaquetarios disponibles en Chile, se detallan en la tabla 25-1.

Tabla 25-1. Fármacos antiplaquetarios disponibles en Chile

Fármaco	Principio activo	Presentación	Laboratorio
Agrastat	Tirofiban	Vial de 50 ml contiene 12,5 mg.	Merck Sharp & Dohme
Artevil	Clopidogrel	Comprimidos recubiertos de 75 mg	Drugtech
Ateroclar	Clorhidrato de ticlopidina	Grageas de 250 mg	Drugtech
Cardioaspirina	Ácido acetilsalicílico	Comprimidos microencapsulados de 100 mg	Bayer
Dipiridamol	Dipiridamol	Comprimidos de 75 mg	Laboratorio Chile
Ecotrin	Ácido acetilsalicílico	Comprimidos con recubrimiento entérico de 325 mg o 100 mg	GlaxoSmithKline
Integrilin	Eptifibatide	Inyección en bolo: 10 ml, 2 mg/ml. Infusión endovenosa: 100 ml, 0,75 mg/ml	Schering Plough Essex
Persantin	Dipiridamol	Cápsulas de 250 mg	Boehringer Ingelheim
Plaquetil	Clorhidrato de ticlopidina	Grageas de 75 mg	Rider
Plavix	Clopidogrel	Comprimidos recubiertos de 75 mg	Sanofi-Synthelabo
Thrombo AS	Ácido acetilsalicílico	Comprimidos con recubrimiento entérico de 100 mg	Merck
Ticinil	Dipiridamol	Cápsulas de 75 mg	Labomed
Ticlid	Clorhidrato de ticlopidina	Comprimidos recubiertos de 250 mg	Sanofi-Synthelabo

3. FÁRMACOS ANTICOAGULANTES

Los fármacos anticoagulantes se agrupan en dos tipos, parenterales y orales.

3.1. Anticoagulantes parenterales: heparinas

3.1.1. Historia de las heparinas

La heparina fue descubierta en 1916 por McLean, aislándola del hígado (de ahí su nombre). Desde el principio se observó una acción anticoagulante, permitiendo conservar sangre sin que ésta se coagulara. Se utilizó como tratamiento anticoagulante por primera vez en 1938, en un tromboembolismo pulmonar y desde entonces se creyó que los efectos anticoagulante-antitrombina y antitrombótico iban íntimamente unidos, utilizándose las pruebas de coagulación (tiempo de coagulación en tubo y posteriormente TTPA y/o tiempo de trombina) para controlar la dosis a administrar.

En un principio sólo existía una sal sódica, lo que obligaba a su administración por vía endovenosa. La obtención de una sal cálcica a inicios de los años 1970 permite su uso subcutáneo y de esta forma su aplicación como profilaxis.

En 1980 se fracciona buscando evitar efectos secundarios (trombocitopenia) y casualmente se halla una fracción que posee actividad antitrombótica pero carece de la actividad antitrombina.

3.1.2. Composición química de la heparina

Se deben distinguir entre la heparina no fraccionada o tradicional y la heparina fraccionada o de bajo peso molecular.

Heparina no fraccionada

Es una sustancia natural, presente en todos los vertebrados. Hallándose particularmente en el hígado, pulmón e intestino de los mamíferos. En condiciones normales no existe heparina en circulación y su equivalente sería el sulfato de heparán (un heparinoide), que se encuentra en el endotelio, en contacto con la sangre y contribuiría a la no trombogenicidad del endotelio vascular.

La heparina no posee un peso molecular fijo ya que está formado por múltiples cadenas de pesos moleculares variables lo que le otorga una gran heterogeneidad. Todas las cadenas

están integradas por la combinación de dos azúcares, el ácido urónico y la glucosamina. La longitud de cada cadena es variable y aunque la mayoría de las cadenas poseen más de 18 azúcares, la media es de 50 azúcares por cadena, con un peso molecular medio de 15 kDa. A pH fisiológico es un compuesto aniónico, por eso se fija de forma inespecífica a numerosos compuestos biológicos y proteínas plasmáticas, provocando que la actividad farmacológica se presente sobre otros sistemas distintos de la coagulación sanguínea (metabolismo lipídico, crecimiento celular, fibrinólisis, inflamación, etc.)

La heparina se une a la antitrombina III (AT-III) uno de los inhibidores naturales del sistema de la coagulación, a través de una combinación de 5 azúcares sucesivos (pentasacárido). Esto aumenta muy significativamente la capacidad anticoagulante de la AT-III (ver capítulo 20).

Para que se produzca el efecto anticoagulante es necesario que la AT-III neutralice la enzima coagulante activa: factor II activado o trombina, factor X activado (FXa) y factor IX activado (FIXa). Esta neutralización se realiza mediante dos mecanismos:

a) Mecanismo de estabilización. Zonas de la molécula de heparina, distintas del pentasacárido, se unen a los factores de la coagulación activos y permiten que la AT-III conformacionalmente modificada por el pentasacárido se pueda unir al sitio activo. En este caso la molécula de heparina debe ser lo suficientemente larga como para permitir que por un lado se una a la superficie del factor y por otro a la AT-III.

b) Mecanismo de inhibición del centro activo. Por neutralización mediante unión con el centro activo de la AT-III, que ha sufrido un cambio alostérico al fijarse el pentasacárido.

No todos los factores de la coagulación que pueden ser inhibidos por la AT-III requieren la acción de los dos mecanismos para neutralizar su actividad coagulante. Así, mientras que la trombina precisa de los dos mecanismos, al FXa le es indiferente el tamaño de la molécula.

La heparina se dosifica en Unidades Internacionales (UI), por referencia a un estándar, variando la cantidad de miligramos en relación al número de Unidades que posee. Por definición una UI es igual a una Unidad AT y una unidad anti-FXa.

Heparina fraccionada o de bajo peso molecular

Se producen por la despolimerización, química o enzimática de la heparina convencional. Existe una gran proporción de cadenas que poseen 18 azúcares o sea ≈ 5 kDa; por debajo de esta longitud los efectos de la heparina cambian desde el punto de vista enzimático, como su farmacocinética.

Por lo anterior, las heparinas de bajo peso molecular, poseen poca acción inhibitoria de la trombina y en cambio conservan la acción inhibitoria sobre el FXa.

Dado que varían los métodos utilizados para la preparación de las distintas heparinas, se ha hecho difícil consensuar sobre la UI a elegir y ya que todas poseen actividad antiFXa se ha escogido esta propiedad para definir las unidades, pero este término se halla sujeto a variaciones por el método usado en la determinación del FXa, déficit de un estándar y la falta de contribución de la longitud de la cadena al efecto anticoagulante. En la práctica se debe tener en cuenta que a pesar de que las actividades son equivalentes, los productos son distintos entre sí y no pueden ser intercambiados. La nadroparina (Fraxiparina) y la enoxiparina (Clexane) poseen pesos moleculares similares (4,5 kDa), aunque difieren en el método usado para su obtención despolimerizando la heparina tradicional; varía también la dosificación: la nadroparina cálcica se expresa en unidades propias (Choay), mientras que la enoxiparina sódica lo hace en miligramos.

Hoy existe un estándar internacional, una UI anti-FXa al que se refieren las dos heparinas: 1 Unidad Instituto Choay (Unidades Fraxiparina) = 0.41 UI y 1 mg de enoxiparina (Clexane) = 100 UI.

3.1.3. Mecanismo de acción de la heparina: Efecto sobre la AT-III

Las heparinas no fraccionadas, actúan potenciando el efecto de la AT-III, anticoagulante natural que tiene la capacidad de neutralizar algunos de los factores activados de la coagulación, fundamentalmente la trombina (factor IIa), el F-Xa, F-IXa y F-XIa.

Esta neutralización se realiza por bloqueo del centro activo, en una unión que se realiza con lentitud, pero la velocidad de esta reacción

puede acelerarse por cambios alostéricos (de estructura terciaria) de la AT-III, como los que se producen al unirse esta proteína con la heparina, especialmente con el fragmento pentasacárido de la heparina.

Algunos factores de la coagulación activados, como la trombina, para ser neutralizados rápidamente por la AT-III, necesitan la unión de la heparina, por ello cuando la heparina es de cadena corta, como sucede con las heparinas de bajo peso molecular no se produce esta neutralización. Esta circunstancia explica la ausencia de actividad antitrombínica de las heparinas de bajo peso molecular. En cambio sí poseen la capacidad de potenciar la neutralización de aquellos factores activados que no requieren ser inmovilizados por la heparina para su rápido acoplamiento con la AT-III, como sucede con el FXa.

3.1.4. Uso de pruebas de laboratorio para el control del tratamiento con heparina

El mecanismo de acción de las heparinas de bajo peso molecular, limitado al FXa explica que sólo altere moderadamente el TTPA, ya que no se altera la trombina y sólo afecta al FXa, mientras que en el caso de la heparina no fraccionada, se produce además una marcada reducción de la trombina, prolongando el TTPA. Es por lo tanto, la prueba que se ha seleccionado para comprobar su efecto cuando se usa la heparina no fraccionada. Si solo se usara el tiempo de trombina, se limitaría el estudio de su efecto sobre esta proteína.

En el caso de las heparinas de bajo peso molecular, la alteración que producen del TTPA es muy moderada, no sirviendo esta determinación para controlar su efecto. Para su monitorización se debería usar la cuantificación del FXa; esta técnica es engorrosa y difícilmente se realiza de urgencia.

3.1.5. Farmacocinética de las heparinas

Heparina no fraccionada

La farmacocinética de la heparina no fraccionada tiene en cuenta su cantidad. Así a bajas dosis o a las dosis habituales, las cadenas de alto peso molecular de que está formada esta heparina, se eliminan por un sistema saturable en el sistema reticuloendotelial o en el endotelio. La cinética de aclaramiento plasmático se denomina no-lineal puesto que las constantes de aclaramiento dependen de la dosis y la vía

de administración. La vida media plasmática es de 60 a 90 minutos.

Por lo anterior, en caso de querer realizar una heparinización mediante administración discontinua por vía endovenosa, deben practicarse inyecciones cada dos horas, aumentar este intervalo somete al paciente a periodos de fuerte anticoagulación, seguidos de periodos en que no se detecta heparina.

Cuando se realiza una heparinización por vía endovenosa continua, el tiempo que se tarda en alcanzar un equilibrio es de 6 horas, por ello se aconseja antes de iniciar esta forma de tratamiento, administrar una alta dosis inicial de heparina para de esta forma alcanzar rápidamente el rango terapéutico. Entonces se provoca una situación en que no existe una relación simple entre la concentración alcanzada y la dosis administrada, ya que la eliminación de la heparina es más rápida cuando son menores las concentraciones.

Si se inyecta heparina cálcica subcutánea el "peak" plasmático se alcanza a las 2 a 3 horas de la inyección y su aclaramiento plasmático se verá influenciado por la velocidad de absorción y su eliminación. Su biodisponibilidad es excelente. Las dosis diarias son casi idénticas a las usadas en tratamiento curativo y deben realizarse dos inyecciones diarias.

Cuando se administran pequeñas cantidades de heparina ésta se elimina por el sistema reticuloendotelial o el endotelio, pero este sistema es saturable, y cuando se alcanza se produce una eliminación renal, cuya velocidad es mucho más lenta (3 a 4 horas). Aunque esta dosis raramente se alcanza en tratamientos habituales.

Existen situaciones en que se produce una absorción de la heparina por proteínas del tipo reactivo (Fibrinógeno, fibronectina, etc.) impidiendo su acción. Esta circunstancia debe conocerse cuando al intentar monitorizar un tratamiento heparínico se observa que no aumenta la capacidad de alterar el TTPA con la dosis administrada, obligando a aumentar la cantidad de heparina a administrar y llegando a sospechar una resistencia a la heparina.

Dado que la heparina se neutraliza por el sistema reticuloendotelial y el endotelio, existe una gran variabilidad entre individuos, así, como en el mismo individuo, varía con el tiempo y el estado del sujeto. Si a esto agregamos los efectos

neutralizantes de las proteínas plasmáticas, se comprende la necesidad de monitorizar este tratamiento.

Heparina de bajo peso molecular

La administración de la heparina de bajo PM se realiza por vía subcutánea, alcanzando un "peak" plasmático a las 2 ó 3 horas. Las pocas cadenas largas que poseen estas heparinas se neutralizan por el sistema reticuloendotelial pero con un menor aclaramiento. El resto de cadenas pequeñas se elimina por el riñón de forma muy lenta. La vida media de la eliminación de la actividad anti FXa es de 3 a 4 horas. El tiempo medio de permanencia de la heparina de bajo PM en el compartimento plasmático es de varias horas, permitiendo la administración de sólo una a dos inyecciones al día.

Si no existe insuficiencia renal, no es necesario monitorizar la cantidad de heparina de bajo PM a administrar, dada la poca variabilidad interindividual que existe y las pocas variaciones que se producen en el transcurso del tiempo.

Al ser la heparina un anticoagulante será incompatible con el uso simultáneo de otros fármacos antitrombóticos entendiéndose como tales los antiagregantes plaquetarios (aspirina, ticlopidina, etc.), fibrinolíticos y anticoagulantes orales (warfarina y acenocumarol), dado que se potencian sus efectos anticoagulantes y aumentan el riesgo de efectos secundarios. Sin embargo, a esta premisa deben realizarse varias observaciones:

Heparina y anticoagulante oral. La heparina posee una acción inmediata, mientras que los anticoagulantes orales tardan más de un día en presentar su acción anticoagulante, por lo tanto, cuando se desea pasar de tratamiento inyectable a oral, si se suprimiera la heparina para iniciar tratamiento con los anticoagulantes orales existiría un periodo en que el enfermo no se hallaría correctamente anticoagulado. Por lo anterior, debe iniciarse el tratamiento con anticoagulantes orales sin retirar el tratamiento heparínico, y monitorizar el efecto que produce el anticoagulante oral, con el tiempo de protrombina (TP) y cuando se alcanza el nivel de anticoagulación esperado se suspende la administración de heparina.

Heparina y aspirina. En algunos enfermos y todavía en el plano experimental, se asocia la administración de heparina con pequeñas

cantidades de aspirina, así se observa en pacientes sometidos a tratamientos con angioplastias o en accidentes isquémicos miocárdicos. Los resultados se hallan pendientes de validación por expertos mundiales, por lo tanto, no es aconsejable esta asociación como una norma.

Heparina y fibrinolíticos. Al finalizar un tratamiento fibrinolítico debe instaurarse siempre un tratamiento con heparina, con el objetivo de evitar la retrombosis. Este se inicia inmediatamente o cuando se ha alcanzado un nivel adecuado de fibrinógeno, que impide la aparición de hemorragias.

3.1.6. Efectos secundarios y reacciones adversas del uso de heparinas

Hemorragias. En la literatura se describe un 2 - 5% de cuadros hemorrágicos severos dados por sangramientos intracranéanos, retroperitoneales, intramusculares, llegando a producir un síndrome compartamental. En estos casos si el sangramiento es leve se debe bajar la dosis de heparina o suspender la inyección hasta evidenciar que ya no existe sangramiento y en casos más severos se recomienda el uso de sulfato de protamina. Los hematomas en sitios de punción o hematurias son complicaciones altamente frecuentes.

Trombosis o trombocitopenia. Puede aparecer en los primeros días del tratamiento de cantidad moderada y corrige al suspender la inyección de heparina. Existen algunos cuadros de trombocitopenia severa a los pocos días de iniciado la inyección de heparina, es grave y se asocia a cuadros trombóticos. Las causas en ambos casos es la existencia de anticuerpos antiplaquetarios inducidos por la heparina.

3.1.7. Contraindicaciones

Se considera contraindicación absoluta al tratamiento heparínico: (a) cuadro hemorrágico grave activo o la posible aparición de un cuadro hemorrágico, ya sea gastrointestinal, intervención neuroquirúrgica, accidente vascular reciente o la existencia de una trombocitopenia severa y (b) hipersensibilidad a las heparinas o presencias de trombocitopenia secundaria a la heparina.

Si se está frente a cualquiera de las circunstancias antes mencionadas, es recomendable instalar un filtro de vena cava en caso de sufrir una trombosis venosa profunda (TVP). Esta medida

también se utiliza en caso de recidiva de trombosis en un paciente en tratamiento anticoagulante.

Las heparinas de bajo PM no atraviesan la barrera placentaria, por lo que su uso durante el embarazo se presenta seguro para la paciente y el feto, ya que no existen estudios que demuestren su fetotoxicidad ni efectos sobre la función reproductora o de tipo mutagénico.

3.1.8. Indicaciones terapéuticas

La heparina no fraccionada está indicada en la prevención de tromboembolismo pulmonar (TEP), en el tratamiento de la TVP y embolia pulmonar, en el tratamiento inicial de los pacientes con angina inestable e IAM; en los pacientes que serán sometidos a cirugía cardíaca en que se utilizará "bypass" cardiopulmonar, cirugía vascular, angioplastia coronaria o instalación de "stent".

En pacientes con TEP las dosis de heparina no fraccionada se ajustan al TTPA de 1.5 a 2.5 (paciente/control).

La heparina de bajo PM se utiliza para la prevención de tromboembolismo venoso, en el tratamiento de TVP de TEP y en el manejo temprano de pacientes con angina inestable. En la tabla 25-2 se muestran las recomendaciones para el uso de heparina no fraccionada y heparina de bajo PM, según el tipo de patología.

3.2. Anticoagulantes orales

3.2.1. Generalidades

Variadas investigaciones científicas en las últimas dos décadas han llevado a un notable mejoramiento de los resultados de la terapia anticoagulante oral y junto con ello, han aumentado las indicaciones médicas. En estos avances se incluye la definición de adecuadas indicaciones médicas, la identificación del rango terapéutico óptimo para cada patología y la estandarización de las pruebas de laboratorio que permiten un control seguro de la terapia.

La dosificación de la terapia y el tiempo en que el paciente se mantiene en rango terapéutico óptimo son dos de los factores más importantes en la efectividad terapéutica y en la reducción de las complicaciones hemorrágicas. Idealmente, el INR "International Normalized Ratio" (ver punto 3.2.7) debería mantenerse en rango terapéutico la mayor parte del tiempo,

Tabla 25-2. Recomendaciones para el uso de heparinas

Patología	Heparina no fraccionada	Heparina de bajo peso molecular	
		Clexane	Fraxiparina
Profilaxis tromboembolismo venoso	5000 U c/8 - 12 horas	60 mg cada día	90 UI cada 12 horas
Cirugía general y Cirugía ortopédica		60 mg cada día	90 UI cada 12 horas
Tromboembolismo venoso	Bolo de 5.000 U y continuar con 35.000 a 40.000 U en 24 horas en infusión ev. Se debe ajustar dosis según TTPA	80 mg cada 12 horas	90 UI cada 12 horas
Enfermedad coronaria	Bolo de 5000 U y continuar con 35.000 a 40.000 U en 24 horas en infusión ev. Se debe ajustar dosis según TTPA	60 mg cada 12 horas	90 UI cada 12 horas
Angina inestable	Bolo de 5.000 U y continuar con 32.000 a 40.000 U en 24 horas en infusión ev. Se debe ajustar dosis según TTPA	60 mg cada 12 horas	90 UI cada 12 horas
Infarto agudo miocardio	Bolo de 5.000 U y continuar con 32.000 U en 24 horas en infusión ev. Se debe ajustar dosis según TTPA	60 mg cada 12 horas	90 UI cada 12 horas
Trombolisis coronaria	Bolo de 5.000 U y continuar con 24.000 U en 24 horas en infusión ev. Se debe ajustar dosis según TTPA	60 mg cada 12 horas	90 UI cada 12 horas

ev, endovenoso;

pero muchos factores influyen en el logro de este objetivo. Éstos incluyen factores fisiológicos y farmacológicos, tales como la interacción con fármacos o enfermedades que afectan la biodisponibilidad del anticoagulante; la dieta, factores gastrointestinales que afectan la disponibilidad de vitamina K; o factores fisiológicos que afectan la síntesis o metabolismo de los factores de coagulación dependientes de vitamina K. Además, factores intrínsecos del paciente como la adherencia al tratamiento son también muy importantes.

Junto a lo antes descrito se requiere una adecuada monitorización de la terapia por parte del laboratorio, mediante la determinación del TP y una óptima comunicación médico-paciente. Esto último con el propósito de conocer antecedentes del paciente, como por ejemplo patologías del mismo y otros fármacos que pueda estar recibiendo.

3.2.2. Mecanismo de acción de los anticoagulantes orales

La síntesis de los factores de coagulación se realiza, principalmente, en el hígado y en el endotelio vascular. Los principales factores e inhibidores de la coagulación de síntesis hepática, sin incluir la fibrinólisis, son los factores IX, X, V, II (protrombina), fibrinógeno, proteína C y S, AT-III y factor VII. De todos ellos, los factores IX, X, VII, II, proteína C y S son dependientes de vitamina K. La actividad de la vitamina K sobre dichos factores no está directamente relacionada con la síntesis, sino con modificaciones químicas finales que multiplican por varios logaritmos su actividad.

La vitamina K es un cofactor para la gammacarboxilación de los residuos de ácido glutámico en el extremo N-terminal de la molécula de las proteínas dependientes de

vitamina K (figura 25-3). Esta carboxilación está catalizada por la carboxilasa que utiliza como cofactor la forma reducida de la vitamina K (vitamina KH_2) (ver capítulo 20).

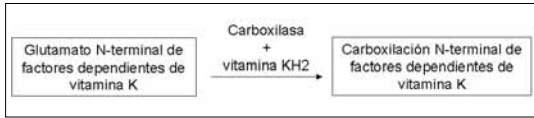


Figura 25-3. Esquema de gamma-carboxilación de las proteínas dependientes de vitamina K.

Durante la reacción de gamma-carboxilación ocurre el reciclaje de vitamina K (figura 25-4). La vitamina KH_2 se oxida a vitamina K epóxido (se almacena de esta forma). Para ser usada nuevamente, debe ser reconvertida en vitamina K, lo que se realiza mediante una reducción mediada por la vitamina K epóxido reductasa. Luego, se reduce a vitamina KH_2 por una reacción catalizada por la vitamina K reductasa.

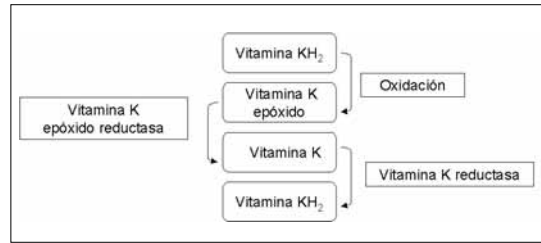


Figura 25-4. Esquema de la reacción de reciclaje de vitamina K.

Los fármacos anticoagulantes inhiben la vitamina K epóxido reductasa y la vitamina K reductasa, por ende disminuyen los niveles de vitamina KH_2 , lo que impide la carboxilación de los factores de coagulación vitamina K dependientes. En la tabla 25-3 se indica la vida media de estos factores.

Tabla 25-3. Vida media de factores de coagulación

Proteína	Vida media (Hrs)
Factor II	60
Factor VII	4-6
Factor IX	20-24
Factor X	48-72
Proteína C	6
Proteína S	42

3.2.3. Fármacos anticoagulantes orales disponibles en Chile

Los anticoagulantes orales pertenecen a dos grandes familias de drogas: las cumarinas y las

inandionas. Los anticoagulantes que se comercializan en Chile pertenecen a la familia de las cumarinas y son el acenocumarol y la warfarina (tabla 25-4).

Tabla 25-4. Tipos de agentes anticoagulantes disponibles en Chile

Compuesto	Acenocumarol	Warfarina
Nombres comerciales y Laboratorio que distribuye	Neo-sintrom (Novartis) Coarol (Andrómaco) Isquelium (Rider)	Coumadín (Bristol-Myers Squibb)
Presentación	Comprimidos de 4 mg	Comprimidos verde claro de 2.5 mg Comprimidos durazno de 5 mg

En España el fármaco más utilizado es acenocumarol; en Francia se usa Previscan® de 20 mg que es una inandiona; y en los países anglosajones se utiliza la warfarina sódica, que

es el medicamento con el que se han realizado la mayor parte de los estudios y los ensayos clínicos.

Tabla 25-5. Características de los anticoagulantes disponibles en Chile

	Acenocumarol	Warfarina
Administración	Oral	Oral *
Absorción	Rápida, gastrointestinal	Rápida, gastrointestinal
Concentración plasmática máxima	1 a 3 hrs.	1 a 9 hrs.
Fijación proteínas plasmáticas	98.7%	97%
Duración de efecto anticoagulante	2 días	2 a 5 días
Vida media	8 a 11 hrs.	36 a 42 hrs.
Biotransformación	Hígado y riñones	Hígado y riñones
Eliminación	Orina y heces	Orina y heces
Barrera hematoencefálica	Sí	Sí
Atraviesa barrera placentaria	Sí	Sí
Leche materna	Indetectable	Indetectable

* En EEUU existen formas inyectables.

En las primeras horas de iniciada la terapia anticoagulante oral se produce un rápido descenso del factor VII y de las proteínas C y S (vida media más corta; tabla 25-3), que conlleva cierta tendencia procoagulante en los pacientes. Este efecto de tipo procoagulante, se produce durante los tres primeros días de tratamiento, para luego continuar con su acción anticoagulante. Este estado procoagulante puede verse agravado en individuos con déficit congénito de proteína C, en los que se puede desencadenar cuadros de trombosis, a modo de ejemplo, necrosis dérmica. Por todo ello, se recomienda, en todos los casos, iniciar el tratamiento anticoagulante oral manteniendo simultáneamente la terapia con heparina y luego suspenderla al alcanzar los niveles de INR deseados, lo que ocurre en 4 ó 5 días, aproximadamente.

Los últimos años se ha estudiado el rol de otra proteína dependiente de vitamina K en los procesos de coagulación, como es la proteína Z, la cual es una proteína de 62 kDa, que actúa como

cofactor de la inhibición del FXa por el inhibidor de proteasa dependiente de proteína Z (IPZ). La proteína Z aumenta más de 1000 veces la inhibición del FXa que realiza el IPZ, en presencia de Ca⁺² y fosfolípidos, pero no afecta la inhibición del FXIa que realiza el IPZ. En la práctica, lo anterior se traduce en que pacientes con bajos niveles de proteína Z, presentan tendencia al sangramiento, en cambio, si el bajo nivel de proteína Z está asociado a la presencia de la mutación del factor V Leiden produce una alta frecuencia de fenómenos tromboembólicos.

3.2.4. Interacciones de los anticoagulantes orales

La vitamina K se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, especialmente en los vegetales de hoja verde (tabla 25-6). Otra fuente importante está dada por la flora bacteriana intestinal normal. Es una vitamina liposoluble, por lo que requiere de la presencia de grasas, las que son aportadas por la dieta, para su absorción y metabolismo.

Tabla 25-6. Alimentos con mayor contenidos de vitamina K

Alimento	Vitamina K (µg/100 g)
Té verde (infusión)	1428
Perejil	540
Hoja de espinaca	400
Cáscara de pepino	360
Cilantro	310
Bruselas	308
Té negro (infusión)	262
Nabos	251
Berros	250
Brócoli	238
Lechuga	210
Salsa de soya	193
Cebollines	190
Mayonesa	81
Cáscara de manzana verde	60
Coliflor	57
Palta	40
Poroto soya	47
Kiwis	25

La respuesta a los anticoagulantes orales está influenciada por factores farmacocinéticos y metabólicos, dentro de los cuales está su mecanismo de acción y el metabolismo de la vitamina K. La mayoría de los pacientes que están en terapia anticoagulante oral están polimedicados y/o sufren otras enfermedades, por ende pueden existir interacciones farmacológicas importantes. Estas interacciones pueden producir aumento o disminución de la acción esperada del anticoagulante oral. Si la interacción aumenta el efecto del anticoagulante, puede llevar a producir sangramientos y si la disminuye puede mantener el riesgo trombótico.

Un elemento muy importante a considerar es el tipo de anticoagulante usado, en general, la mayoría de los trabajos publicados de interacción de fármacos han sido realizados con warfarina y vitamina K, lo que se explica por ser publicaciones en lengua inglesa. Por otra parte, en la literatura existen reportes contradictorios para la interacción de un mismo fármaco con anticoagulantes orales, es el caso del paracetamol, que según algunos autores produce aumento del efecto de los anticoagulantes orales, en cambio, otros refieren disminución de su acción. En el caso de algunas familias de fármacos, ej. Los antibióticos macrólidos, para algunos se ha referido que interactúan aumentando el efecto de la warfarina

(eritromicina y claritromicina) en cambio, otros (roxitromicina y azitromicina) disminuyen su acción.

Por estas razones el tratamiento anticoagulante oral (TACO) requiere control periódico y a veces se debe anticipar e incrementar la frecuencia de los controles, hasta que se logre un nuevo equilibrio en otro nivel de dosis.

3.2.5. Mecanismos de interacción farmacológica

Algunos medicamentos potencian y otros inhiben el efecto de los anticoagulantes orales (tabla 25-7).

Potencian efecto del anticoagulante

- Por disminución de la flora bacteriana intestinal que provoca deficiencia de vitamina K: antibióticos (cotrimoxazol, ciprofloxacino, amoxicilina con o sin clavulánico y metronidazo).
- Por desplazamiento de las proteínas plasmáticas o inhibición del citocromo P-450: amiodarona, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de enzima convertidora, hipolipemiantes, cimetidina, fenilbutazona, alopurinol.

- Por efecto antiagregante plaquetario: aspirina, antiinflamatorios no esteroideos, penicilina en altas dosis.

Inhiben efecto del anticoagulante

- Ingesta elevada de vitamina K: alimentos ricos en vitamina K o suplementos vitamínicos.

- Por disminución de absorción: colestiramina, sucralfato.

- Por inducción enzimática en el hígado: fenobarbital, rifampicina.

- Por incremento de factores de coagulación: estrógenos (anticonceptivos orales, terapia de reemplazo hormonal).

Tabla 25-7. Fármacos que interactúan con los anticoagulantes orales

Aumentan la respuesta		
Acetaminofeno	Estreptoquinasa	Propafenona
Ácido acetilsalicílico	Eutirox	Propil-tiouracilo
Ácido etacrínico	Fenilbutazona	Pentoxifilina
Ácido mefenámico	Fenoprofeno cálcico	Piroxicam
Ácido nalidixico	Fluoroquinolonas	Propranolol
Alcohol (intoxicación aguda)	Gemfibrozilo	Propoxifeno
Alopurinol	Glucagón	Quinina
Amiodarona	Hidrato de cloral	Quinidina
Antidepresivos tricíclicos	Ibuprofeno	Quinolonas
Cefamandol	Indometacina	Salicilatos
Cimetidina	Isoniacida	Sulfinpirazona
Clofibrato	Itraconazol	Sulfonamidas
Cloramfenicol	Ketoprofeno	Sulindac
Co-trimoxazol	Lovastatina	Tamoxifeno
Danazol	Meclofenamato	Tetraciclinas
Diazóxido	Metronidazol	Tiazidas
Diflunisal	Miconazol	Uroquinasa
Disulfiram	Metil-tiouracilo	Vacuna antigripal
Eritromicina	Neomicina	Vitamina E
Esteroides anabolizantes	Omeprazol	
Disminuyen la respuesta		
Alcohol (alcoholismo crónico)	Corticosteroides	Rifampicina
Anticonceptivos orales	Colestiramina	Espironolactona
Azatioprina	Dicloxacilina	Trazodona
Barbituratos	Griseofulvina	Sucralfato
Carbamazepina	Mercaptopurina	Vitamina K
Ciclosporina	Nafcilina	

3.2.6. Efectos secundarios de los anticoagulantes orales

Los efectos secundarios al uso de anticoagulantes orales.

No hemorrágicos

Necrosis dérmica. Su ocurrencia es excepcional. Aparece bruscamente entre el tercer y quinto día de tratamiento y es causado por una extensiva trombosis de vénulas y capilares del tejido

adiposo subcutáneo. La patogénesis de este cuadro y el porqué de la localización es aún desconocido. Se ha asociado a casos de déficit de proteína C o S, en estos pacientes se produce un descenso adicional de estos inhibidores cuando sólo ha comenzado a descender el factor VII, pero los factores II y X son aún normales, pero también se han reportado casos en individuos no deficientes. Por esto, se intenta evitar las anticoagulaciones “bruscas” e intensas en la etapa inicial y mantener heparina hasta alcanzar el INR deseado.

Alopecia. Es casi siempre parcial, su frecuencia oscila entre el 1 - 5 %. Se observa desde el primer trimestre de tratamiento con anticoagulantes orales y rara vez obliga a interrumpir el tratamiento.

Síndrome del dedo púrpura. Dedos de ambos pies fríos y cianóticos que se atribuyen a microembolización del material de la placa ateromatosa calcificada. Es raro y no es exclusivo del tratamiento anticoagulante oral.

Alergia o “rash” cutáneo. Es raro y un cuadro urticariforme o una vasculitis, pueden obligar a cambiar de anticoagulante.

Osteopenia. Es un efecto secundario muy debatido. Pareciera que la vitamina K aumenta la actividad osteoblástica, postulándose que sus inhibidores harían lo contrario; el efecto parece mínimo (muy inferior al de la heparina) y generalmente carente de significación clínica, incluso en el periodo de climaterio.

Embriopatías. Mantener la terapia anticoagulante oral durante el embarazo, conlleva riesgo (1-5%) de inducir anomalías fetales: hipoplasia nasal, condrodysplasia punctata en las epífisis, xifoesciosis, braquidactilia, entre otras malformaciones.

Efectos hemorrágicos

El efecto más característico y potencialmente grave de los anticoagulantes orales es la hemorragia. Según su severidad pueden ser:

Críticas. Aquellas que ocurren a nivel del sistema nervioso central. Son infrecuentes (1% de los casos), aunque pueden ser de alta letalidad.

Mayores. Tienen su origen en el tubo digestivo, espacio retroperitoneal, pulmón y suprarrenales. Son potencialmente letales y requieren hospitalización para su adecuado manejo médico.

Menores. Muy frecuentes. Se trata de gingivorragia, epistaxis, hematomas, equimosis, hipermenorrea y principalmente hematuria.

En los casos de complicaciones hemorrágicas, se debe controlar el tratamiento anticoagulante oral con el TP y evaluar otros factores causales. Sin embargo, cualquiera sea el valor del INR, el objetivo es detener el sangramiento y para ello se debe seguir las siguientes conductas:

- Si el INR es < 2.0: buscar causa local.

- Si el INR está dentro del rango terapéutico óptimo, se suspende una dosis de anticoagulante oral y se busca otras causas. Luego reanudar el tratamiento anticoagulante oral, en las mismas dosis pre-establecidas y controlar a los 5 días.
- Si el INR está una unidad por sobre el óptimo, suspender el anticoagulante oral durante 1 día, luego se reinicia con el mismo esquema previo y se controla en una semana.
- Si el INR está hasta dos unidades por sobre el óptimo, se suspende el anticoagulante oral durante 2 días, y se reinicia con una dosis 25% menor a la dosis previa.
- Si el INR está hasta más de dos unidades por sobre el óptimo, se suspende el anticoagulante oral durante 2 días, y se administra vitamina K (fitomenadiona, konakion®).

Una dosis de 5 mg EV de vitamina K, normaliza el INR en 6 horas y causa siempre cierto grado de refractariedad al reintroducir el anticoagulante oral, que dura entre 5 a 7 días, tras el episodio hemorrágico.

En pacientes con INR hasta 7, se aconseja administrar media ampolla en agua por vía oral, en INR sobre 7 y hasta 10, administrar 5 mg endovenoso (1/2 ampolla de 10 mg) y en INR sobre 10, una ampolla EV.

En caso necesario, se puede aportar plasma fresco. Cada unidad de plasma fresco por peso del paciente incrementa entre un 4 y un 7% el complejo protrombínico y lo hace de forma inmediata.

Para revertir del efecto del anticoagulante oral sin presencia de sangramiento, pero con INR sobre rango terapéutico óptimo, se puede: (a) suspender dosis, (b) administrar 0.5-1 mg EV de vitamina K para INR hasta 10 y (c) administrar 3-5 mg EV de vitamina K para INR mayor a 10.

3.2.7. Monitorización del tratamiento anticoagulante oral

El objetivo principal de la monitorización del tratamiento anticoagulante oral es mantener niveles óptimos de anticoagulación para evitar episodios trombóticos o recurrencias y prevenir hemorragias secundarias.

El control del laboratorio es necesario para adecuar la dosis farmacológica de cada paciente, por lo tanto debe ser desarrollado con alta

calidad técnica y estandarizado.

El TP es el examen utilizado para monitorizar el tratamiento anticoagulante oral; es simple y de bajo costo. Es sensible a la disminución de tres de los cuatro factores dependientes de vitamina K (II, VII, X). El TP se define como el tiempo en segundos requerido para que se forme un coágulo de fibrina en una muestra de plasma citratado a la cual se ha agregado tromboplastina y calcio. La tromboplastina se refiere a un extracto tisular de cerebro, pulmón o placenta que contiene factor tisular y los fosfolípidos necesarios para promover la activación del FX por el FVII.

A lo largo del tiempo se han observado ciertos inconvenientes en la monitorización de la terapia anticoagulante oral, dependientes de la determinación del TP, que son: factores pre-analíticos (toma de muestra inadecuada); factores analíticos (reactivos de tromboplastinas de diferente sensibilidad) y factores post-analíticos (diferentes formas de expresión de resultados: tiempo de coagulación en segundos, actividad de protrombina en porcentaje y mediante el índice INR (“International Normalized Ratio”). Todo lo anterior trae como consecuencia que existan distintos grados de anticoagulación en los diversos hospitales, por ende dificulta la comparación interlaboratorios y que exista dificultad en establecer una estandarización universal del tratamiento anticoagulante oral (rango terapéutico óptimo).

Los reactivos de tromboplastinas tienen distinta sensibilidad frente a la acción de los anticoagulantes orales, dependiendo de su fuente de origen, contenido en fosfolípidos y su preparación. Una tromboplastina poco sensible produce menor prolongación del tiempo de protrombina que una más sensible al déficit de factores de coagulación dependientes de vitamina K. La sensibilidad de una tromboplastina puede ser medida a través de su ISI (“International Sensitivity Index”), que es el valor de la pendiente de la recta de regresión, que relaciona los valores obtenidos con cualquier tromboplastina, versus la de referencia. Tromboplastinas altamente sensibles tienen un ISI aproximado de 1,0. El valor ISI de las tromboplastinas varía, además, según el método utilizado para realizar el TP (manual o automatizado) y según el equipo utilizado.

En EEUU y Canadá, se emplearon, durante muchos años, tromboplastinas procedentes de cerebro de conejo que eran menos sensibles al

déficit de factores dependientes de vitamina K. Posteriormente, se desarrollaron tromboplastinas mucho más sensibles (de cerebro humano), que se comenzaron a utilizar en Inglaterra. Al incrementarse los viajes transoceánicos de pacientes anticoagulados, se observó que los pacientes europeos con INR de 2,5 presentaban en Norteamérica INR de 1,5 que se consideran insuficientes, mientras que los americanos anticoagulados con INR de 2,0, presentaban en Europa INR de 5,0; evidentemente elevados, lo que generaba modificaciones en las dosis y mayores complicaciones hemorrágicas.

En 1977, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un preparado de cerebro humano como la primera tromboplastina de referencia internacional. Posteriormente, este primer estándar fue reemplazado por otras tromboplastinas de referencia primaria y secundaria y actualmente son utilizadas tromboplastinas recombinantes. Los reactivos de tromboplastinas que se comercializan deben traer la información de su ISI, que indica la sensibilidad de la tromboplastina. La OMS recomienda que para el control del TACO, sólo se usen tromboplastinas con ISI < 1,5. Existen también varias, entre 1 y 1,5, que se consideran válidas pero no óptimas.

El sistema INR es la escala universal para expresar el tiempo de protrombina en terapia anticoagulante oral. El empleo del INR se extiende en Europa desde 1985 y desde 1990 es adoptado por Norteamérica. Corresponde al cociente entre el TP del paciente expresado en segundos y el TP de un control normal, elevado al ISI. El cálculo del INR se obtiene mediante la fórmula: $INR = (PT \text{ paciente en seg} / PT \text{ control en seg})^{ISI}$. El INR por lo tanto es la razón del TP que se habría obtenido si hubiese usado la tromboplastina de referencia internacional de la OMS.

3.2.8. Indicaciones clínicas de la terapia anticoagulante oral

En la práctica, las prescripciones de TACO son realizadas por médicos de diversas especialidades como: cardiólogos, neurólogos, hematólogos, internistas, reumatólogos, cirujanos vasculares, periféricos, etc. Se indica en toda patología en la cual existe el riesgo de embolia sistémica, tanto como profilaxis primaria o secundaria.

Las principales indicaciones de TACO, se resumen en la tabla 25-8.

Tabla 25-8. Indicaciones clásicas de la terapia anticoagulante oral

Patología	Rango INR óptimo	Duración
TVP distal sintomática	2 - 3	6-12 semanas
TEP + TVP proximal	2 - 3	6 meses
TVP - TEP idiopático (más de un episodio),	2 - 3	Indefinido
TVP primer episodio con factores de riesgo transitorios: cirugías, traumas, inmovilización, uso estrógenos	2 - 3	3 - 6 meses
TVP – TEP por coagulopatías, malignidad o síndrome Antifosfolípidos	2 - 3	Indefinido
Accidente vascular encefálico embólico	2 - 3	Indefinido
Profilaxis trombotica venosa en cirugías de cadera y ginecológicas o pacientes oncológicos con catéter subclavio, cáncer mama estadio IV en quimioterapia.	2 - 3	3 meses
Infarto miocardio con o sin trombolisis	2 - 3	3 meses
Infarto miocardio con o sin trombolisis asociado a fibrilación auricular, disfunción ventricular y/o auricular izquierda o trombo intracavitario.	2 - 3	Indefinido
Fibrilación auricular	2 - 3	Indefinido
Cardioversión de arritmias supraventriculares	2 - 3	3 sem. preCV y 6 sem. postCV
Estenosis mitral y/o regurgitación mitral con antecedentes de embolismo sistémico, fibrilación auricular, dilatación auricular izquierda mayor a 5.5 cm.	2 - 3	Indefinido
Enfermedad reumática de válvula mitral en ritmo sinusal cuando existen factores de riesgo de co-morbilidad: tamaño aurícula izquierda, edad, estabilidad hemodinámica, embolia sistémica o fibrilación auricular crónica o paroxística.	2 - 3	Indefinido
Prolapso de válvula mitral más fibrilación auricular, TIA, AVE, embolismo sistémico.	2 - 3	Indefinido
Calcificación del anillo mitral + fibrilación auricular o embolismo sistémico	2 - 3	Indefinido
Ateromas aórticos móviles o placas ateromatosas mayores a 4 mm. (por ecografía transesofágica)	2 - 3	Indefinido
Pacientes con un episodio de trombosis y presencia de un foramen oval persistente (excepto si se cierra)	2 - 3	Indefinido
Endocarditis infecciosa en válvula natural o bioprótesis	2 - 3	Indefinido
Prótesis valvular biológica mitral o aórtica	2 - 3	3 meses
Prótesis valvular biológica mitral o aórtica + FA, trombo auricular, embolismo sistémico	2 - 3	Indefinido
Prótesis valvular mecánica mitral	3 - 4	Indefinido
Prótesis valvular mecánica aórtica	2,5 – 3,5	Indefinido
Insuficiencia arterial aguda de EEII (tromboembolización)	2 - 3	Indefinido
“Bypass” infrainguinal y otras reconstrucciones vasculares	2 - 3	Indefinido
Síndrome antifosfolípido	3 – 4	Indefinido

TVP, Trombosis venosa profunda; TEP, Tromboembolismo pulmonar; preCV, precordioversión; postCV, postcardioversión; TIA, Accidentes isquémicos transitorios; AVE, Accidente vascular encefálico; FA, fibrilación auricular; EEII, extremidades inferiores.

Algunas recomendaciones en relación al TACO, son las siguientes:

- El “American College of Chest Physician” (ACCP) recomienda la anticoagulación oral permanente en todas las válvulas mecánicas.
- El rango terapéutico óptimo en pacientes con prótesis valvular mecánica, ha sido un aspecto muy discutido entre las sociedades científicas relacionadas. La “European Society of Cardiology” difiere con la ACCP respecto a las recomendaciones de terapia

anticoagulante oral en prótesis valvulares cardíacas, en general, la ACCP recomienda INR más bajos.

- Actualmente, la intensidad de anticoagulación en prótesis valvulares mecánicas depende del tipo de válvula y su perfil hemodinámico, y del sitio de implantación. El “European Working Group” recomienda INR entre 3.0 y 4.5 para pacientes con válvulas mecánicas de primera generación (Starr-Edwards, Björk-Shiley estándar). Para válvulas de segunda

generación (St. Jude, Medtronic, Monostrut) el INR debe estar entre 3.0 y 3.5 para prótesis en posición mitral y entre 2.5 y 3.0 para prótesis aórtica

- En el caso de estenosis mitral y/o regurgitación mitral, si ocurre un episodio de trombosis, a pesar de una adecuada terapia con anticoagulantes orales, se recomienda aumentar el rango de INR a 2.5 – 3.5 o agregar aspirina. No se recomienda el TACO en enfermedad de válvula aórtica, a menos que exista otra condición que lo justifique.
- El embarazo se asocia a un estado de hipercoagulabilidad determinado por un aumento de los factores de coagulación y disminución de la actividad fibrinolítica. Esto se traduce, en la práctica, en mayor riesgo materno de complicaciones trombóticas. Si la paciente está recibiendo TACO, es habitual la necesidad de controles repetidos que se traducen muchas veces en un incremento de la dosis habitual de anticoagulantes. Los anticoagulantes orales atraviesan la barrera placentaria y su uso puede asociarse a embriopatías como por ejemplo: hipoplasia nasal, alteraciones en la calcificación de las epífisis, muerte fetal, cuando la madre está expuesta a ellos entre la 6° y 12° semana de gestación, a daño neurológico del niño por malformaciones del sistema nervioso central, por hemorragia cerebral durante todo el embarazo y a mayor incidencia de abortos. Se estima que el riesgo de embriopatía fluctúa entre 3 y 4% y el riesgo de daño neurológico del feto sería de 2%. Sin embargo, por lo poco frecuente que es la condición de embarazo en paciente con TACO, la verdadera incidencia de estas complicaciones no es bien determinada. Por otro lado, la gran mayoría de los casos graves reportados corresponden al período en que no se había uniformado el uso de las tromboelastinas, época en la cual se usaban altos niveles de anticoagulación. Hasta ahora no existe un acuerdo universal con respecto al esquema ideal de TACO, que evite la teratogenicidad, con mínimo riesgo de complicaciones trombóticas. Actualmente los esquemas más utilizados, una vez confirmado el embarazo son los siguientes: (a) manejar con heparina todo el embarazo y (b) anticoagular con heparina estándar o heparinas de bajo PM hasta la semana 13 de embarazo, para luego reiniciar TACO oral hasta la mitad del tercer trimestre, y después continuar con heparina hasta el parto.

3.2.9. Contraindicaciones de terapia anticoagulante oral

Las contraindicaciones de TACO oral se clasifican en:

Absolutas: Hemorragia masiva activa.

Mayores: Aneurisma intracraneal y cirugía en presencia de hemorragia activa grave del SNC, accidente vascular encefálico en evolución, retinopatía hemorrágica, hipertensión arterial severa no controlada, coagulopatías congénita (Hemofilia, Enfermedad de von Willebrand), y embarazo.

Menores: Pacientes alcohólicos, trastornos mentales severos (falta de adherencia a tratamiento), insuficiencia renal crónica, hipertensión arterial, traumatismo cráneo-encefálico (3-4 semanas), úlcera péptica activa, cirrosis hepática con várices esofágicas, enfermedad Inflamatoria Intestinal, trombocitopenia (50.000-100.000 plaquetas/ μ L).

3.2.10. Resistencia a los anticoagulantes orales

Los motivos por los que los pacientes pueden mostrar una aparente resistencia a los anticoagulantes orales, pueden resumirse en dos grupos:

Resistencia adquirida. Habitualmente debida a un aumento en la ingesta de vitamina K de origen medicamentoso o con los alimentos (dietas para adelgazar, ricas en verduras). Otro subgrupo abarcaría a aquellos pacientes con alteraciones en el metabolismo del anticoagulante, como disminución de la absorción o aumento del aclaramiento. También algunas drogas son capaces de inhibir el efecto de los anticoagulantes: colestiramina que disminuye la absorción, los barbituratos, alcohol, aloperidol, griseofulvina y el meprobamato que aumentan la biotransformación del isómero S de la warfarina. Algunos fármacos pueden interferir aumentando la síntesis de factores de coagulación, como los contraceptivos orales y los corticosteroides.

Resistencia hereditaria. Se ha postulado que es causada por la presencia de una enzima anormal o un receptor que muestra una afinidad disminuida por los cumarínicos o aumentada por la vitamina K. Esta forma de resistencia es

extremadamente rara y ha sido descrita en un escaso número de pacientes.

La actitud terapéutica depende del tipo de resistencia: Ajustes en la dieta o en el tratamiento del paciente, resolverán el problema en un gran número de casos. En otros el cambio de aumento de la dosis de anticoagulante o el cambio entre fármacos distintos puede resultar una aproximación aceptable.

4. FÁRMACOS FIBRINOLÍTICOS

4.1. Proceso fibrinolítico

En la disolución del coágulo juega un rol central la plasmina, esta es una serinoproteasa que se origina a partir del plasminógeno, proteína de una cadena polipeptídica, que sufre una ruptura hidrolítica del enlace peptídico entre la arginina 561 y la valina 562, originándose así una molécula de dos cadenas peptídicas unidas por enlaces S-S (ver capítulo 20). La ruptura hidrolítica del plasminógeno es catalizada por el activador tisular del plasminógeno (t-PA), la uroquinasa y una proteína bacteriana, la estreptoquinasa (figura 25-5).

La plasmina, actúa sobre las moléculas de fibrina que forman parte del coágulo y libera las células que forman parte de él, produciéndose la recanalización del vaso sanguíneo que estaba obstruido. La fibrina no circula libre en la sangre, ya que para su activación se requiere que el plasminógeno y el t-PA se unan a porciones bien específicas de las moléculas de fibrina del coágulo, simultáneamente. Además, un potente inhibidor de la plasmina, el factor α_2 -antiplasmina, se encuentra en altas concentraciones en la sangre y rápidamente inactiva las pocas moléculas de plasmina que circulan libres.

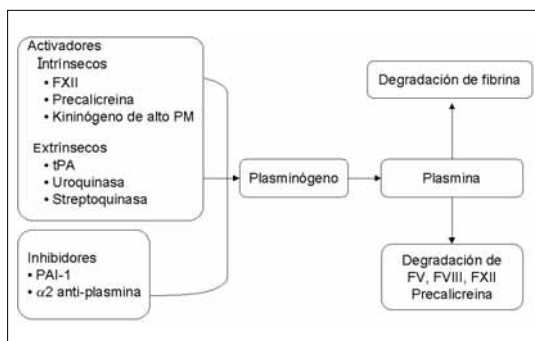


Figura 25-5. Esquema del sistema fibrinolítico

4.2. Uso médico del proceso fibrinolítico

Desde los años 50, se ha pensado utilizar el mecanismo fibrinolítico como blanco de acción de fármacos antitrombóticos. Lamentablemente, la falta de pureza de las preparaciones utilizadas, el desconocimiento de la regulación del mecanismo fibrinolítico, la presencia del inhibidor α_2 -antiplasmina, y la activa degradación de la plasmina libre, etc., han sido causales de que recién en los últimos años, se haya logrado actuar eficazmente sobre el coágulo que está bloqueando la circulación sanguínea.

Todos los fármacos disponibles para uso clínico son activadores de plasmina. Se trata de la uroquinasa, activador tisular del plasminógeno (t-PA) y la estreptoquinasa, todos los cuales tienen como requerimiento básico para actuar, la presencia de una gran cantidad de plasminógeno. Esta situación ocurre en trombos pequeños, por ejemplo los que se encuentran en las arterias coronarias, pero que no ocurre en trombos largos y de gran tamaño, como sucede en las oclusiones de arterias de mayor calibre y en las trombosis venosas profundas.

Un ejemplo de los resultados médicos de la trombólisis, es la controversia aún presente del uso de estos fármacos en el TEP. Se ha descrito que los agentes trombolíticos producen una resolución precoz al usarse asociados a heparina, si se compara con los resultados obtenidos con heparina sola. Además, se ha descrito que el uso de agentes trombolíticos reduce la mortalidad de pacientes con TEP masivos, probablemente dado por mejorar el flujo sanguíneo pulmonar y secundariamente el trabajo del ventrículo derecho. La discusión se origina en que si son suficientes las ventajas de usar trombolíticos con el riesgo de producir hemorragias importantes.

Normalmente, las vías de la coagulación y de la fibrinólisis están reguladas para proteger al organismo de la hemorragia y de la formación de trombo no asociado a rupturas vasculares. En esta regulación juega un rol clave, la trombosmodulina, proteína que lleva a la trombina a actuar como enzima anticoagulante al activar la proteína C, pero por otra parte, hace que la trombina actúe como anti-fibrinolítica, al activar al inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI).

4.3. Fármacos anticoagulantes fibrinolíticos disponibles en Chile

En la actualidad, en nuestro país se encuentran

disponibles dos productos fibrinolíticos, "Streptase" (Laboratorio Aventis) y el "Kabikinase" (Laboratorio Pharmacia & Upjohn); ambos productos contienen estreptoquinasa.

La estreptoquinasa, se purifica a partir del filtrado de cultivos de estreptococos beta hemolíticos del grupo C. Actúa produciendo activación del plasminógeno a plasmina. Su vida media varía de 12 a 85 minutos, dependiendo de si el paciente ha sufrido exposición previa a estreptococos, ya que es inactivada por anticuerpos antiestreptococos circulantes.

Las indicaciones clínicas son las que rigen la vía de administración. Se usa administración local, para recanalizar los vasos coronarios en el IAM, así como también en las embolias de las arterias periféricas y en la limpieza de cánulas arteriovenosas. Se usa la vía sistémica, en el TEP masivo, en las TVP de venas abdominales, en las enfermedades crónicas oclusivas de las arterias, incluidas las oclusiones de los vasos oftálmicos centrales.

Las principales reacciones adversas más importantes que manifiesta el uso de estreptoquinasa, son las hemorragias de cualquier origen y volumen. En forma esporádica se presentan cefaleas, hipotensión brusca, náuseas, arritmias ventriculares por sobrecarga y urticaria.

La estreptoquinasa interacciona con todos aquellos fármacos que afectan el sistema de la coagulación, potenciando la acción del acenocumarol y la warfarina, así como de los antiagregantes plaquetarios.

5. EL FUTURO EN EL TRATAMIENTO ANTITROMBÓTICO

El aumento de las expectativas de vida de la población ha producido que el número de pacientes que requiere de tratamiento antitrombótico, también se incrementa. Por otra parte, las condiciones de sedentarismo, el estrés, el hábito de fumar, el uso de anticonceptivos hormonales también ha provocado que la población en riesgo de problemas trombóticos aumente. Por ello, son cada vez más las líneas de investigación que buscan nuevos fármacos, en lo posible de alta efectividad y que tengan las menores reacciones adversas posible, así como que no interaccionen con otros fármacos, ya que muchos de los pacientes, en especial aquéllos que reciben TACO, son polimedicados.

Ejemplos de nuevos antitrombóticos son: la hirudina y sus derivados, que inhibe a la trombina, el desarrollo de bloqueadores del sitio activo del factor IX_a o anticuerpos contra el complejo IX / IX_a; también se encuentran en desarrollo inhibidores del factor X_a. Otras investigaciones se han centrado en activadores de la actividad anticoagulante intrínseca, o en la modulación de la actividad fibrinolítica.

En el caso del laboratorio clínico, también existen avances. Se conoce que en los estados de hipercoagulabilidad, como son: la TVP y el TEP, se produce incrementos en la producción de fibrina, la cual cuando es metabolizada por el sistema fibrinolítico produce numerosos fragmentos solubles, llamados productos de degradación de la fibrina (PDF), entre ellos el llamado dímero D (D-D). Hoy en día, se utiliza la medición cuantitativa del dímero D, para evaluar los estados de hipercoagulabilidad. La obtención de un valor negativo en la determinación por ELISA de este parámetro es una evidencia muy significativa para descartar TVP o TEP. En pacientes, que han sufrido episodios trombóticos y que luego han sido anticoagulados, al utilizar la medición de dímero D para monitorizarlos, se ha demostrado que los valores del parámetro tienden a disminuir, lo cual evidencia que el tratamiento está siendo efectivo y se está produciendo la degradación del trombo.

Además, se discute en la literatura, cuál es el tiempo necesario de tratar con TACO a los pacientes que han sufrido un episodio trombótico, tratamientos que muchas veces se alargan innecesariamente, lo cual puede evitarse al utilizar este parámetro objetivo del estado de la coagulabilidad del paciente y tomar una adecuada decisión de alta.

LECTURAS SUGERIDAS

American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patient with Valvular Disease). Guidelines for the Management of Patients with Valvular Heart Disease. ACC/AHA Practice Guidelines 1973-1984, 1998.

Ansell, J., Hirsh J., Dalen J., Bussey H., Anderson D.R., Poller L., Jacobson A., Deykin D., Matchar D. "Managing Oral Anticoagulant Therapy". *Chest*, 119: 22S-38S, 2001.

- Arcasoy, S.M., Kreit, J.W. "Thrombolytic therapy of pulmonary embolism". *Chest*, 115:1695-1707, 1999.
- Bórquez ,C., Vial, M.J., Sakurada, A., Ramírez, V., Aldunate, J. "Bases fisiopatológicas y clínicas del tratamiento anticoagulante oral". *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, 14:217-230, 2003.
- Broze, G.J. Jr. "Protein Z-dependent regulation of coagulation". *Thromb Haemost*, 86:8-13, 2001.
- De Stefano, V., Finazzi, G., Mannucci, P. "Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, Clinical Syndromes and Management". *Blood*, 87: 3531-3544, 1996.
- Dunn, A.S., Turpie, A.G. "Perioperative management of patients receiving oral anticoagulants". *Arch Intern Med*, 163:901-908, 2003.
- Hirsh, J., Anand, S., Halperin, J., Fuster, V. "Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin a statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association". *Circulation*, 103: 2994-3018, 2001.
- Hirsh, J., Dalen, J.E., Anderson, D.R., Poller, L., Bussey, H., Ansell, J., Deykin, D. "Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range". *Chest*, 2001.119: 85-21S, 2001.
- Hirsh, J., Fuster, V., Ansell J., Halperin, J. "American Heart Association / American College of Cardiology, Foundation Guide to Warfarin Therapy". *Circulation*, 107: 1692-1711, 2003.
- Hirsh, J., Warkentin, T., Shaughnessy, S., Anand, S., Halperin, J., Raschke, R., Granger, C., Ohman, M., Dalen J.E. "Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin". *Chest*, 119: 64S-94S, 2001.
- Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., Conley, P.B. "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs". *Nature*, 409:202-207, 2001.
- Hyers, T.M., Agnelli, G., Hull, R.D., Morris, T.A., Samama, M., Tapson, V., Weg, J.G. "Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease". *Chest*, 119:176S-193S. 2001.
- Jaffer, A., Bragg, L. "Practical tips for warfarin dosing and monitoring". *Cleve Clin J Med*, 70:361-371, 2003.
- Kearon, C. "Duration of therapy for acute venous thromboembolism". *Clint Chest Med*, 24:63-72, 2003.
- Lee, A.Y., Levine, M.N. "Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes". *Circulation*, 107(suppl I):I17-I21, 2003.
- NCCLS Document H21-A2. Approved Guideline. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays. - 3^a editions, 18(20): 1-6, 1991.
- NCCLS Document H47-A. One-stage prothrombin time (PT) test and activated partial thromboplastin time (APTT) test. Approved Guideline, 16(3): 1-7, 1996.
- Nesheim, M. "Thrombin and fibrinolysis". *Chest*, 124:33S-39S, 2003.
- Novokhatny, V.V., Jesmok, G.J., Landskroner, K.A., Marder, V.J., Zimmerman, T.P. "Locally delivered plasmin; why should it be superior to plasminogen activators for direct thrombolysis?". *Trends Pharmacol Sci*, 25:72-75, 2004.
- Parra, C., Kauffmann, R., Chateau, B., Cabrera, E. "Heparina subcutánea durante el primer trimestre del embarazo en mujeres con prótesis valvulares cardíacas". *Rev méd Chile*, 127:1475-1479, 1999.
- Patrono, C. "Aspirin as an antiplatelet drug". *N Engl J Med*, 330:1287-1294, 1994.
- Patrono, C., Bachmann, F., Baigent, C., Bode, C., De Caterina, R., Charbonnier, B., Fitzgerald, D., Hirsh, J., Husted, S., Kvasnicka, J., Montalescot, G., García Rodríguez, L.A., Verheugt, F., Vermylen, J., Wallentin, L. "Expert Consensus Document on the Use of Antiplatelet Agents. The Task Force on the Use of Antiplatelet Agents in Patients with Atherosclerotic Cardiovascular Disease of the European Society of Cardiology". *Eur Heart J*, 25:166-181, 2004.

Patrono, C., Collier, B., Dalen, J.E., FitzGerald, G.A., Fuster, V., Gent, M., Hirsh, J., Roth, G. "Platelet-Active Drugs: The relationships among dose, effectiveness, and side effects". *Chest*, 119:39S-63S, 2001.

Patrono, C. "Pharmacology of antiplatelet agents" In: **Thrombosis and Hemorrhage**, Loscalzo J, Schafer AI, (eds.). Baltimore: William & Wilkins; pp. 1181-92, 1998.

Salem, D.N., Hartnett Daudelin, D., Levine, H.J., Pauker, S.G., Eckman, M.H., Riff, J. "Antithrombotic therapy in valvular heart disease". *Chest*, 119:207S-219S, 2001.

Streiff, M. "Vena Cava Filters: a comprehensive review". *Blood* 95: 3669-3677, 2000.

Stein, P.D., Alpert, J.S., Bussey, H.I., Dalen, J.E., Turpie, A.G.G. "Antithrombotic therapy in patients with mechanical and biological prosthetic heart valves". *Chest*, 119:220S-227S, 2001.

Stein, P.D., Hull, R.D., Patel, K.C., Olson, R.E., Ghali, W.A., Brant, R., Biel, R.K., Bharadia, V., Kalra, N.K. "D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism". *Ann Intern Med*, 140:589-602, 2004.

Tripodi, A., Mannuccio Mannucci, P. "Laboratory Investigation of Thrombophilia". *Clin Chem*, 47: 1597-1606, 2001.

Triplett, D. "Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update". *Clin Chem*, 46: 1260-1269, 2000.

Weitz, J.I., Hirsh, J. "New anticoagulant drugs". *Chest*, 119:95S-107S, 2001.

Wu, H.L., Chang, B.I., Wu, D.H., Chang, L.C., Gong, C.C., Lou, K.L., Shi, G.Y. "Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation". *J Biol Chem*, 265:19658-19664, 1990.

HEMATOLOGÍA

Fisiopatología y Diagnóstico
Iván Palomo G., Jaime Pereira G., Julia Palma B.
Editorial Universidad de Talca, 2005



SECCIÓN V

LABORATORIO

SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA: MUESTRAS Y VALORES DE REFERENCIA

Iván Palomo G., Marcelo Alarcón L., Claudio Cruzat C. y Eduardo Retamales C.

- 1. Introducción**
- 2. Anticoagulantes**
 - 2.1. Ácido etilendiaminotetracético
 - 2.2. Citrato de sodio
 - 2.3. Heparina
- 3. Recolección de sangre periférica**
 - 3.1. Sistemas de recolección de muestras
 - 3.2. Tipos de punción
 - 3.2.1. Punción venosa
 - 3.2.2. Punción capilar
 - 3.3. Almacenaje y transporte
 - 3.4. Frotis sanguíneo
- 4. Obtención de médula ósea**
 - 4.1. Aspirado de médula ósea
 - 4.2. Biopsia de médula ósea
- 5. Tinción de May-Grünwald Giemsa**
- 6. Unidades hematológicas internacionales**
- 7. Valores de referencia normal**

RESUMEN

El estudio de la sangre periférica (aspectos citológicos y cuantitativos) es fundamental en la etapa de diagnóstico y control de la evolución en las enfermedades hematológicas. En algunas patologías con compromiso de la médula ósea es necesario su estudio. Este capítulo se refiere, en términos generales, a los procedimientos de colección de sangre (punción venosa y punción capilar) y médula ósea (mielograma y biopsia de médula ósea), y a la tinción de hematología clásica (tinción de May Grünwald-Giemsa).

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la sangre periférica y médula ósea son procedimientos fundamentales en el diagnóstico y de control de la evolución de las enfermedades hematológicas. Estos procedimientos son dependientes de la calidad de las muestras la cual debe ser recolectada, identificada, transportada y almacenada adecuadamente para no provocar hemólisis, todo lo cual contribuirá a un buen análisis de la muestra.

Este capítulo revisa los aspectos más importantes sobre recolección de muestras de sangre periférica y de médula ósea, y la tinción de hematología clásica (tinción de May Grünwald-Giemsa). Adicionalmente se incluyen tablas con valores de referencia normal.

2. ANTICOAGULANTES

Cuando la sangre se recibe en frascos sin anticoagulantes ésta se coagula dentro de los 5 a 10 minutos de recolectada la muestra. Luego se produce la retracción del coágulo liberándose el suero (carece de plaquetas y factores de la coagulación) el que se emplea en estudio bioquímicos.

Cuando se requiere obtener plasma (contiene los factores de la coagulación), estudiar algunas propiedades de la sangre total o analizar algunos de sus componentes celulares es necesario agregar un anticoagulante. Es importante el tipo de anticoagulante, la concentración del mismo y la relación sangre:anticoagulante; cuando ésta es incorrecta pueden ocurrir importantes errores.

Las sales de sodio o potasio son los tipos de anticoagulantes más efectivos y usados, puesto que no se produce hemólisis ni deformación celular, y evitan la agregación plaquetaria.

2.1. Ácido etilendiaminotetracético

La coagulación requiere de iones calcio (Ca^{2+}), por lo que su quelación inhibe el proceso. El quelante más usado en hematología es el ácido etilendiaminotetracético (EDTA); la concentración recomendada es de 1 a 1.5 mg/mL de sangre. Un exceso de EDTA afecta a los glóbulos rojos y leucocitos, altera el volumen corpuscular medio (VCM) y causa cambios degenerativos, respectivamente. Una concentración de 2 mg/mL puede disminuir el hematocrito y la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VHS) y aumentar la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

2.2. Citrato de sodio

El citrato de sodio es el anticoagulante por elección para las pruebas de hemostasia (Ej. Tiempo de protrombina y Tiempo de tromboplastina parcial activada, entre otras). El más usado es la sal trisódica pues preserva muy bien los factores de la coagulación. Inhibe la coagulación por precipitación de los iones calcio. La concentración sugerida es de 3.2% (109 mM) y se debe usar en una relación 9:1; esta relación es aconsejada para hematocritos normales; en casos de anemia y policitemia se debe ajustar dicha relación.

2.3. Heparina

La heparina se obtiene a partir de tejido bovino

o porcino; corresponde a polímeros de ácido idurónico y glucosamina, altamente sustituidos por grupos N-sulfato y O-sulfato. Su estructura es similar al heparán sulfato un glicosaminoglicano presente en la superficie de las células endoteliales. La inhibición de la coagulación la realiza aumentando significativamente la velocidad de acción de la antitrombina III, inhibidor natural de las serino proteasas de la coagulación. No afecta el VCM y causa menos hemólisis que el EDTA. La concentración recomendada es de 15 a 20 UI/mL de sangre. Provoca un color azulado en los frotis de sangre periférica teñidos con May Grünwald-Giemsa debido a que modifica el pH, y altera el recuento de leucocitos por causar agregación leucocitaria.

Se utiliza para anticoagular la sangre que se recolecta para la prueba de fragilidad osmótica. Es el único anticoagulante que además de usarse para recolectar sangre, se utiliza como tratamiento anticoagulante.

3. RECOLECCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA

3.1. Sistemas de recolección de muestras

Los tubos son los elementos más usados para la recolección de muestras de sangre. Estos pueden ser al vacío (aspiran automáticamente la sangre) o no, de plástico o vidrio, con o sin anticoagulante. Pueden diferenciarse por el color de la tapa del tubo, según si contienen o no anticoagulante y en el primer caso identifican el anticoagulante; los colores usados internacionalmente son: rojo (sin anticoagulante), lila (EDTA), celeste (citratato de sodio).

Antes de la recolección de la muestra, el primer paso es una adecuada identificación del (los) tubo(s) en que se depositará la muestra; al menos debe incluir el nombre y apellido del paciente, examen, y fecha.

3.2. Tipos de punción

3.2.1. Punción venosa

Cuando se debe realizar una punción venosa (flebotomía), siempre que sea posible, se debe explicar al paciente el procedimiento que se le realizará, puesto que la flebotomía produce ansiedad en algunos casos lo que puede afectar algunas pruebas de laboratorio, como por ejemplo causar leucocitosis (aumento del recuento de leucocitos).

El material a usar en la punción venosa debe ser estéril (jeringa desechable). El tamaño de las agujas dependerá de la cantidad de sangre a recolectar y de la edad del paciente; una combinación de un número y una letra indica el diámetro y longitud, así por ejemplo la más usada 21G1 indica que la aguja tiene un diámetro de 21 mm y 4 cm de longitud. Generalmente las venas a puncionar son las ubicadas en la fosa antero cubital. Se deben descartar las zonas que presentan hematomas, quemaduras, cicatrices y edema. En caso de mastectomía, se debe puncionar el brazo contrario, puesto que en esa región ocurre linfostasis. Las posibles venas a puncionar deben ser evaluadas aplicando un torniquete por un período no superior a 1 minuto, ya que un mayor tiempo se asocia con hemoconcentración y actividad fibrinolítica.

Antes de la punción se debe limpiar la zona elegida con un algodón impregnado en alcohol 70%, luego se debe fijar la vena traccionando suavemente la piel, introducir la aguja en el mismo sentido de la vena y liberar inmediatamente el torniquete; la sangre debe ser aspirada suavemente. Luego se retira la jeringa y con un algodón se presiona el lugar de punción para evitar sangramiento.

Antes de depositar la sangre en el(los) tubo(s) se retira la aguja, la sangre se agrega lentamente por las paredes del tubo. Luego de tapar éste (si no es al vacío) y si la sangre fue recolectada en un tubo con anticoagulante, se mezcla inmediatamente por inversión en forma suave, para evitar alteraciones y daño celular.

3.2.2. Punción capilar

Cuando por diversas razones no se puede realizar la punción venosa o la cantidad de la muestra requerida es pequeña, se puede obtener sangre por punción capilar. La sangre capilar es obtenida por una punción con una lanceta; en adultos y niños el lugar a elección es la parte lateral de un dedo de la mano y en recién nacidos es la parte lateral de la planta del pie. Se debe hacer una punción fuerte y certera, se elimina la primera gota de sangre y para tener una adecuada recolección se debe presionar muy suavemente, evitando la salida de líquido tisular.

3.3. Almacenaje y transporte

Dentro de la primera hora de tomada la muestra de sangre los cambios en las células sanguíneas

son imperceptibles; éstos se hacen más evidentes a partir de las tres horas hasta completarse a las 8 horas, a temperatura ambiente. Las alteraciones incluyen: leucocitos vacuolados, cambios degenerativos en el núcleo, crenación de los glóbulos rojos, incremento del hematocrito, disminución de la VHS, alteración en el recuento de reticulocitos, plaquetas y leucocitos, los cuerpos de Döhle tienden a desaparecer con el tiempo, y también alteración del tamaño y distribución de las plaquetas. Todas estas alteraciones son evitables si la muestra de sangre se almacena a 4°C.

Cuando una muestra de sangre va a ser transportada se deben tomar precauciones para evitar las alteraciones descritas; aunque el transporte se realice entre lugares cercanos se aconseja hacerlo en contenedores refrigerados.

Las condiciones para las pruebas de coagulación son más exigentes y se describen en el capítulo 31.

3.4. Frotis sanguíneo

El examen microscópico de un frotis de sangre periférica es muy importante para el estudio inicial de varias patologías hematológicas tanto de la serie roja, serie blanca y plaquetas. El frotis sanguíneo se puede realizar a partir de muestras anticoaguladas con EDTA dentro de las 2 horas posteriores a la recolección. Sin embargo, aunque es preferible que éste se realice inmediatamente después de recolectada la sangre, sin mediar uso de anticoagulante; esto porque se ha visto que algunos pacientes presentan satelitismo plaquetario asociado a EDTA, debido a que las plaquetas se adhieren a neutrófilos, causando así trombocitopenia.

Los portaobjetos a utilizar deben haber sido desengrasados previamente. Al realizar un frotis sanguíneo se debe colocar una gota de sangre de 3 mm de diámetro en un extremo del portaobjetos y, rápidamente, con un cubreobjetos se debe tocar la gota de sangre y esperar que ésta se distribuya a todo el ancho del cubreobjetos, seguidamente con este último en un ángulo de 45° se realiza un rápido movimiento del mismo hacia el otro extremo del portaobjetos; así la gota de sangre se distribuirá en el frotis (figura 26-1).

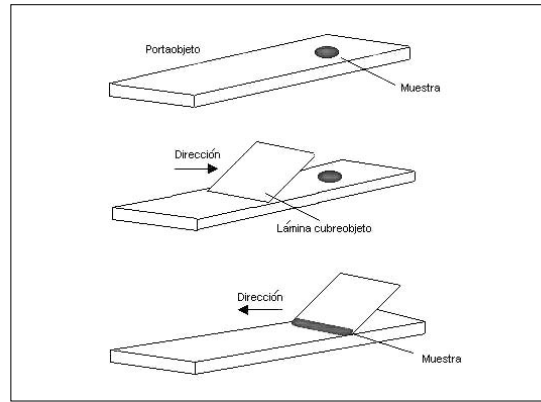


Figura 26-1. Frotis sanguíneo. Tomar la lámina por la parte inferior, procurando que la superficie superior de ésta quede totalmente despejada. Desplazar el cubreobjetos en forma diagonal desde el área izquierda hacia la derecha. Una vez realizado el contacto con la muestra, levantar y bajar el cubreobjetos de manera suave (sin perder contacto). Posteriormente arrastrar el cubreobjetos con la muestra de manera firme y rápida hacia el lado opuesto. La muestra debe quedar homogénea (sin burbujas de O₂).

La densidad celular del frotis permite reconocer tres zonas: una zona de alta densidad celular (cabeza del frotis), una zona de densidad intermedia (cuerpo del frotis) y una zona de baja densidad (cola del frotis). Dos factores que influyen en la calidad del frotis son el ángulo y tamaño de la gota. Así una gota muy grande produce un frotis largo y grueso, una gota pequeña origina un frotis corto y pequeño. Un buen frotis debe cubrir aproximadamente el 80% del largo del portaobjetos, debe tener una cola redondeada y lados visibles, sin irregularidades o agujeros.

Actualmente existen equipos automatizados que realizan frotis sanguíneos; depositan una gota de sangre en un portaobjetos y la desplazan por capilaridad.

Una de las desventajas de esta técnica es la mala distribución de los leucocitos; los monocitos y neutrófilos tienden a distribuirse en el extremo de la cola del frotis, lo que aumenta el número de linfocitos. Además del trauma celular que se ocasiona, lo que es particularmente notorio en los síndromes linfoproliferativos.

4. OBTENCIÓN DE MÉDULA ÓSEA

4.1. Aspirado de médula ósea

Al igual que el hemograma, el mielograma, es un examen fundamental para realizar el diagnóstico de varias patologías hematológicas. El mielograma corresponde a un estudio citológico cuantitativo y cualitativo de médula ósea obtenida por aspiración.

Lugar de toma de muestra. La médula ósea se encuentra preferentemente en los huesos planos y epífisis de los huesos largos, por ello los principales sitios de punción según edad son los siguientes: (a) En niños menores de 2 años se utiliza preferentemente el tercio superior de la cara interna de la tibia y la espina pósterosuperior, (b) en niños mayores de 2 años, jóvenes se prefiere el esternón y alternativamente las espinas ilíacas póstero y ántero-superiores o apófisis espinosa de las vértebras lumbares 1^{era} a 4^a.

El esternón, es el hueso más usado para aspirar médula ósea, la posición más frecuente es cerca de su extremo proximal, bajo el ángulo de Louis.

Punción, aspirado y preparación de los frotis.

Previa desinfección de la piel y uso de anestesia local (piel y periostio), se introduce en el hueso un trocar especial para mielograma (figura 26-2). Una vez retirado el mandril del trocar se adapta a éste una jeringa y se aspira 0.5–1 mL de contenido medular con el cual se realizan varios frotis. Éstos son teñidos igual que los frotis de sangre periférica con tinción de May-Grünwald Giemsa (ver punto 5). Para una mayor información sobre mielograma ver capítulo 24.



Figura 26-2. Trocar para mielograma

4.2. Biopsia de médula ósea

El estudio histológico de la médula ósea (Biopsia) proporciona información respecto a la densidad y constitución celular del tejido hematopoyético y sobre la topografía del tejido medular.

En general, se recurre a la biopsia de médula ósea en las siguientes situaciones: (a) cuando el cuadro clínico y los hallazgos del hemograma justifican el procedimiento, como complemento o certificación diagnóstica; (b) cuando, habiendo realizado dos o más punciones para mielograma, no se obtuvo muestra o ésta fue insuficiente para poder realizar un informe adecuado; y (c) para etapificación de neoplasias hematológicas (ver capítulo 27).

Toma de muestra y procesamiento técnico.

La biopsia de médula ósea transcutánea se realiza, bajo anestesia local, con trocar de Jamshidi desde la cresta ilíaca pósterosuperior o, dependiendo de la edad del paciente, se elige el hueso a puncionar considerando la mayor actividad hematopoyética esperable y/o el sitio específico de localización de alguna lesión “blanco” a estudiar. La muestra (cilindro de médula ósea), en su procesamiento de rutina, se fija en Bouin o formalina al 10% y luego se decalcifica con ácido nítrico al 7%. Al cabo de esto (aproximadamente 24-48 hrs.), se efectúa el procesamiento histológico, el cual requiere 12-24 hrs. y consiste en deshidratación del tejido, inclusión en parafina, corte, tinción con hematoxilina-eosina y montaje. De esta manera, la biopsia por punción de médula ósea permite una completa evaluación histológica de las células hematopoyéticas y del estroma. En caso necesario, se pueden realizar técnicas especiales de histoquímica e inmunohistoquímica.

5. TINCIÓN DE MAY GRÜNWARD-GIEMSA

Desde hace muchos años la tinción de May Grünwald-Giemsa ha sido usada para teñir tanto los frotis de sangre periférica como de médula ósea. Es considerada una tinción policroma porque posee eosina y azul de metileno, el Giemsa contiene además, azul de eosina. Esta tinción permite reconocer las diferentes células sanguíneas y sus diferentes estadios madurativos, tanto en células normales como patológicas.

El frotis sanguíneo se deja secar a temperatura ambiente. Se debe identificar con el nombre del

paciente en el sector de la cabeza del frotis.

El metanol fija las células al portaobjeto; el tampón cambia el pH del medio y los reactivos se fijan a sus estructuras celulares, proceso pH dependiente. La oxidación del azul de metileno y la eosina forman el complejo tiazin-eosinato, que tiñe los componentes neutros, de color azul. El azul de metileno (básico) tiñe además a las sustancias ácidas (o basófilas), como el RNA y ciertas proteínas citoplasmáticas. Por su parte, la eosina (ácida) tiñe sustancias básicas (o eosinofílicas) como la hemoglobina o los gránulos de los eosinófilos.

Los frotis deben estar secos antes de su estudio al microscopio. Actualmente existen tinciones comerciales que usando básicamente los mismos reactivos, el proceso puede durar 1 minuto (tinción de Wright's). Los laboratorios que procesan un gran número de muestras pueden utilizar métodos automatizados para la tinción de los frotis de sangre periférica; los principios utilizados en la fijación y tinción son los mismos del método manual.

El examen del frotis sanguíneo debe incluir observación con al menos dos aumentos

diferentes del microscopio. La primera observación debe hacerse con objetivo de 40x (o 10x según experiencia y costumbre del profesional) para observar la distribución de los eritrocitos y leucocitos. Luego se hace la observación en inmersión para realizar la fórmula leucocitaria y estudiar la citología de los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Así, a modo de ejemplo: (a) en los glóbulos rojos se analiza la eventual presencia de alteraciones del tamaño (anisocitosis; microcitosis y macrocitosis), de la forma (poiquilocitosis: codocitos, esferocitos, esquistocitos, etc.), presencia de inclusiones (cuerpos de Howell-Jolly, etc.) y alteraciones en el color (hipocromia), (b) en los leucocitos (granulaciones tóxicas de los neutrófilos, linfocitos reactivos, blastos, etc.) y (c) en las plaquetas (trombocitopenia, trombocitosis, macroplaquetas).

6. UNIDADES HEMATOLÓGICAS INTERNACIONALES

En la actualidad, se recomienda expresar los resultados de los parámetros biológicos de acuerdo con el llamado sistema internacional de unidades (sistema SI) (tabla 26-1).

Tabla 26-1. Unidades básicas del Sistema Internacional (SI)

Parámetro	Unidad básica	Símbolo
Longitud	Metro	m
Masa	Kilogramo	Kg
Tiempo	Segundo	s
Corriente eléctrica	Amperio	A
Temperatura termodinámica	Kelvin	K
Intensidad lumínica	Candela	cd
Cantidad de sustancia	Mol	Mol

La existencia de parámetros con valores superiores o inferiores a la unidad fundamental ha obligado, para facilitar la expresión de los resultados, a emplear múltiplos o submúltiplos

de los mismos, cada uno de los cuales posee un prefijo que debe ser colocado junto al signo que representa la unidad fundamental (tabla 26-2).

Tabla 26-2. Prefijos recomendados para los múltiplos y submúltiplos de las unidades básicas.

Factor	Prefijo	Símbolo
10^{12}	Tera	T
10^9	Giga	G
10^6	Mega	M
10^3	Kilo	K
10^2	Hecto	H
10^1	Deca	D
10^{-1}	Deci	d
10^{-2}	Centi	c
10^{-3}	Mili	m
10^{-6}	Micro	μ
10^{-9}	Nano	n
10^{-12}	Pico	p
10^{-15}	Femto	f
10^{-18}	Atto	A

El empleo del sistema SI en los laboratorios clínicos favorece la estandarización de métodos y unifica la forma de expresar los resultados, facilitando con ello la comparación de los estudios realizados en laboratorios y países diferentes. Por ello, el “International Council for Standardization in Haematology” (ICSH), la “International Federation of Clinical Chemistry” (IFCC) y la “World Association of Societies of Pathology” (WAPS) nombres en español y siglas en inglés han elaborado una declaración conjunta sobre el uso del sistema SI, que consta de los siguientes apartados fundamentales: (a) se reconoce la aceptación del sistema internacional de unidades SI, (b) la unidad del volumen es el litro que se expresa con el símbolo «L» (o l), (c) para representar los múltiplos y submúltiplos de unidades, se empleará solamente el prefijo correspondiente,

(d) la concentración de sustancias se expresará siempre en relación al litro, y (e) en el caso de sustancias cuya composición química es conocida se recomienda emplear el mol para indicar la cantidad de las mismas.

En hematología, la introducción del sistema SI ha supuesto un cambio relativamente importante en la expresión de los resultados, aunque mucho menor que el observado en el campo de la química clínica, donde ha creado ciertas dificultades de incorporación a la práctica clínica diaria.

De acuerdo con el sistema SI desaparecen, entre otras, expresiones tan familiares al hematólogo como el milímetro cúbico (mm^3), las micras cúbicas (μ^3), las gammas (g) o los tanto por ciento (%) (tabla 26-3).

Tabla 26-3. Expresión de los parámetros hematológicos básicos según el sistema SI

Parámetro	Sistema clásico	Sistema SI
Concentración de hemoglobina	15 g/dL	150 g/L
Hematocrito	45%	0.45*
Recuento de hematíes	5 millones/ mm^3	$5 \times 10^{12}/\text{L}$ (5T/L)
VCM	$86 \mu^3$	86 fL
HCM	$30 \mu\mu\text{g}(\gamma\gamma)$	30 pg
Recuento de leucocitos	$5.000/\text{mm}^3$	$5 \times 10^9/\text{L}$ (5G/L)
Recuentos de plaquetas	$240.000/\text{mm}^3$	$240 \times 10^9/\text{L}$ (240G/L)
Recuento de reticulocitos	$60.000/\text{mm}^3$	60×10^9 (60G/L)
Velocidad de sedimentación globular	5 mm/hr	5 mm/h

* En el sistema SI, el hematocrito carece de unidad ya que ésta corresponde al cociente L/L.

(T/L) = Tera-Hematíes/L

(G/L) = Giga-leucocitos/L; Giga-plaquetas/L; Giga-reticulocitos/L

mm^3 o μL

El significado del sistema SI y su relación con el sistema clásico empleado para expresar las

unidades hematológicas, se comprenderá mejor con los ejemplos que se refieren en la tabla 26-4.

Tabla 26-4. Tabla de conversión de las unidades clásicas al sistema SI de los principales parámetros usados en hematología

Parámetro	Unidades clásicas	Factor de conversión	Sistema SI
Concentración de hemoglobina	g/dL	10	g/L
Hematocrito	%	0.01	
Recuento de hematíes	Millones/mm ³	10 ¹²	10 ¹² /L (T/L)
VCM	μ ³	1	FL
HCM	μμg (γγ)	1	Pg
Recuentos de leucocitos	x mm ³	10 ⁶	10 ⁹ /L (G/L)
Recuento de plaquetas	x mm ³	10 ⁶	10 ⁹ /L (G/L)
Reticulocitos	x mm ³	10 ⁶	10 ⁹ /L (G/L)
Bilirrubina sérica	mg/dL	17.1	μmol/L
Sideremia	μg/dL	0.1791	μmol/L
Fibrinógeno	mg/dl	0.02941	μmol/L
Ácido fólico	mg/dl	2.265	μmol/L
Transferrina	mg/dl	0.1136	μmol/L
Vitamina B ₁₂	pg/dL	0.7378	μmol/L

(T/L) = Tera-hematíes/L

(G/L) = Giga-leucocitos/L; Giga-plaquetas/L; Giga-reticulocitos/L

Recuentos celulares

Clásicamente, el recuento de hematíes, de leucocitos y de plaquetas se ha expresado en número de células por mm³ de sangre: hematíes (4.5-5.5 millones/mm³), leucocitos (5.000-10.000/mm³) y plaquetas (150.00-350.000/mm³). La primera modificación para adaptar estas expresiones al sistema SI fue emplear múltiplos de 10 para expresar el número de células y

substituir el mm³ por su equivalente, el microlitro (μL). Con ello, la nueva forma de expresión fue: hematíes (4.5-5.5 x 10⁶/μL), leucocitos (5-10 x 10³ /μL) y plaquetas (150 - 350 x 10³ /μL). No obstante, la determinación de expresar cualquier cantidad de substancia en relación al litro (1 L 10⁶ μL) hizo que la forma de expresión definitiva de estos parámetros fuera: hematíes (4.5-5.5 x 10¹² /L), leucocitos (5-10 x 10⁹ /L) y plaquetas (150 -350 x 10⁹ /L).

Ej: Recuento de leucocitos

$$\frac{5 \times 10^9}{L} = \frac{5.000.000.000}{1.000 \text{ cc}} = \frac{5.000.000}{1 \text{ cc}} = \frac{5.000.000}{1.000 \text{ mm}^3} = 5.000 / \text{mm}^3$$

Hematocrito

La forma clásica de expresar el hematocrito (Hto) en porcentaje (%) ha sido substituida por las unidades correspondientes de acuerdo con el sistema SI. Debido a que el Hto corresponde a la relación existente entre el volumen de hematíes y el de sangre total, su unidad resulta de un cociente entre dos unidades de volumen

idénticas (L/L), por lo que equivale a 1. De acuerdo con ello, un Hto de 45% corresponde según el sistema SI a 0.45 L/L o simplemente 0.45.

Concentración de hemoglobina

Este es el parámetro hematológico cuya forma de expresión ha sido más discutida. Así,

mientras se ha preconizado expresarlo en milimoles por litro (mmol/L), todavía se considera aceptable hacerlo en gramos por litro (g/L). La variación del nuevo valor con respecto al de concentración de hemoglobina expresada en unidades clásicas (g/dL) es pequeña.

Índice eritrocitario

La adopción del sistema SI ha supuesto también un importante cambio en la expresión de los resultados correspondientes al volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), si bien

no ha supuesto una modificación de su valor absoluto.

De acuerdo con el sistema clásico, el VCM se expresaba en (μ^3); la HCM, en ($\mu\mu\text{g}$) o gamma-gamma ($\gamma\gamma$) y la CHCM en g/dL. Según el sistema SI, el VCM debe expresarse siempre en femtolitros (fL); la HCM, en picogramos (pg), y la CHCM, en gramos por litro (g/L).

7. VALORES DE REFERENCIA NORMAL

En las tablas 26-5 a 26-9 se mostrarán los valores de los parámetros hematológicos utilizados con más frecuencia en clínica.

Tabla 26-5. Valores normales del hemograma en adultos, según sexo

Parámetro	Unidades	Hombres	Mujeres
Hemoglobina	g/L	140 - 175	123 - 153
Hematocrito		0.38 - 0.52	0.35 - 0.47
Hematíes	$10^{12}/\text{L}$	4,5 - 5,9	4,1 - 5,1
VCM	fL		80 - 96
HCM	pg		28 - 33
CHCM	g/L		320 - 360
Reticulocitos	%		5 - 20
VHS	mm/h	4 - 7	5 - 12
Plaquetas	$10^9/\text{L}$		150 - 400
Leucocitos	$10^9/\text{L}$		4.5 - 11.0

Tabla 26-6. Valores normales de leucocitos totales y subpoblaciones leucocitarias

Leucocito	Edad	Número absoluto (μ/l)
Totales	Lactantes-niños	5.000 - 15.000
	Adultos	4.500 - 11.000
Basófilos	Lactantes – adultos	<50
Eosinófilos	Lactantes – adultos	<500
Baciliformes	Lactantes – adultos	<500
Segmentados	Lactantes – adultos	2.000 - 8.000
Linfocitos	Lactantes – niños menores	3.000 - 10.000
	7-14 años	2.000 - 8.000
	Adultos	1.500 - 6.000
Monocitos	Lactantes – adultos	<1000

Tabla 26-7. Valores normales de parámetros de hierro, ácido fólico y vitamina B₁₂

Parámetro	Unidades	Hombres	Mujeres
Hierro sérico	µg/dL	80 - 180	50 - 150
TIBC	µg/dL		200 - 400
Porcentaje de Saturación	%		15 - 45
Ferritina sérica	ng/mL	29 - 455	7 - 140
Ácido fólico	ng/mL		3.6 - 17.8
Vitamina B ₁₂	pg/mL		200 - 950

Tabla 26-8. Valores normales del mielograma

Célula	%
Mieloblastos	0.2 - 1.5
Promielocitos	2.1 - 4.1
Neutrófilos totales	49.2 - 65
Mielocitos	8.2 - 15.7
Juveniles	9.6 - 24.6
Baciliformes	9.5 - 15.3
Segmentados	6.0 - 12
Eosinófilos totales	1.2 - 5.3
Mielocitos	0.2 - 1.3
Juveniles	0.4 - 2.2
Baciliformes	0.2 - 2.4
Segmentados	0 - 1.3
Basófilos y mastocitos	0 - 0.2
Serie eritrocitaria total	18.4 - 33.8
Proeritroblastos	0.2 - 1.3
Eritroblasto basófilo	0.5 - 2.4
Eritroblasto policromático	17.9 - 29.2
Eritroblasto ortocromático	0.4 - 4.6
Linfocitos	11.1 - 26.2
Células plasmáticas	0.4 - 3.9
Monocitos	0 - 0.8
Megacariocitos	0 - 0.4
Células reticulares	0 - 0.9
Razón mieloide:eritroide	1.5 - 3.3

Tabla 26-9. Valores normales de pruebas de la hemostasia

Prueba	Unidades	Valor normal
Tiempo de sangría	min	3 - 9,5
Tiempo de protrombina (TP)	seg	12 - 14
Tiempo de trombina (TT)	seg	10 - 15
Tiempo de trombolastina parcial activada (TTPA)	seg	20 - 40
Tiempo de coagulación	min	5 - 15
Productos de degradación del fibrinógeno (PDF)	µg/ml	< 10

LECTURAS SUGERIDAS

Bandi, Z.L. "Estimation, prevention and quality control of carbon dioxide loss during aerobic sample processing". *Clin Chem* 27:1676, 1981.

Cabrera, M.E., Undurraga, M., Bertin, P., Quiroz, A.M., Suárez, M., Romero, M., Consultlé, I., Labra, S., Palma, T., Maffioletti, M., Merino, R., Díaz, J., Pape, I., Liendo, F., Retamales, E. Recomendaciones para la interpretación del hemograma en morfología hematológica. Subprograma de morfología hematológica, Programa de evaluación externa de la calidad (PEEC). Instituto de Salud Pública de Chile, 2003.

Henry, J.B. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 19th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1996.

Lofsness, K.G., Spanjers, E.M.. "Preparation and Evaluation of Bone Marrow" In **Clinical Hematology principles, procedures, correlations**, Anne, E. *et al* (eds). second edition, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1998, pp. 373-385.

McCall, R.E., Tankersley, C.M.. **Phlebotomy Essentials**. Philadelphia, JBLippincott, 1993.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. 2nd ed; Approved Guideline Document H21-A2. Villanova PA, NCCLS. 1991.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluated tubes for blood specimen collection 3rd ed, Approved standard document H1-A3. Villanova, PA NCCLS. 1991.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture 3rd ed. Approved standard document H3-A3. Villanova, PA, NCCLS 1991.

Olesinski, R. "Specimen Collection for Hematology and Hemostasis" In **Clinical Hematology principles, procedures, correlations**, Anne, E. *et al* (eds), second edition, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1998, pp 9-19.

Pelan, S. **Phlebotomy techniques**. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1993.

Perkins, S. "Normal blood and bone marrow values in humans" In Lee, G.R. (ed), **Wintrobe's clinical hematology**. Philadelphia, 1999, pp. 2738-2748.

HEMOGRAMA, MIELOGRAMA Y BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA

Iván Palomo G., Claudio Cruzat C., Marcelo Alarcón L.,
Marianela Agurto O. y Eduardo Retamales C.

1. Introducción

2. Hemograma

2.1. Glóbulos rojos

2.1.1. Análisis cuantitativo

- a) Hematocrito
- b) Hemoglobina
- c) Recuento de glóbulos rojos
- d) Constantes hematológicas
- e) Recuentos de reticulocitos
- f) Índice ictérico
- g) Velocidad de eritrosedimentación

2.1.2. Análisis citológico

- a) Alteraciones del tamaño
- b) Alteraciones del color
- c) Alteraciones en la forma
- d) Inclusiones intraeritrocitarias

2.2. Glóbulos blancos

2.2.1. Análisis cuantitativos

- a) Recuento de leucocitos
- b) Fórmula leucocitaria

2.2.2. Análisis cualitativo

- a) Neutrófilos
- b) Linfocitos

2.3. Plaquetas

2.3.1. Análisis cuantitativo

- a) Recuento de plaquetas

2.3.2. Análisis citológico

2.4. Contadores celulares

- 2.4.1. Principio de los contadores celulares
- 2.4.2. Tipos de contadores
- 2.4.3. Muestra de sangre
- 2.4.4. Aseguramiento de la calidad
- 2.4.5. Procedimientos e instrucciones
- 2.4.6. Fuentes de error
- 2.4.7. Limitaciones del sistema
- 2.4.8. Confiabilidad de los resultados
- 2.4.9. Correlación con frotis sanguíneo

2.5. Recomendaciones para la interpretación del hemograma

3. Estudio de médula ósea

3.1. Mielograma

3.2. Biopsia de médula ósea

3.2.1. Aspectos generales

3.2.2. Médula ósea normal

- a) Distribución de la médula hematopoyética y celularidad
- b) Células hematopoyéticas normales
- c) Composición celular de la médula ósea y relación mieloide/eritroide

3.2.3. Alteraciones estructurales y anomalías morfológicas en la biopsia de médula ósea.

- a) Alteraciones generales
- b) Biopsia de médula ósea en enfermedades hematológicas específicas

RESUMEN

El diagnóstico de enfermedades hematológicas requiere el estudio cuantitativo y cualitativo de las células de sangre periférica.

Entre los aspectos cuantitativos del hemograma se incluye, entre otras, las siguientes determinaciones: recuento de glóbulos rojos, recuentos de leucocitos totales y de subpoblaciones, recuento de plaquetas.

Actualmente los recuentos pueden ser realizados con contadores celulares.

Los aspectos cualitativos se refieren a las características citológicas de las tres líneas celulares.

El estudio de la médula ósea a través de mielograma y/o biopsia es requerido para el diagnóstico de ciertas enfermedades hematológicas, como por ejemplo las de tipo hipoplásticas y las infiltrativas.

1. INTRODUCCIÓN

El hemograma es un examen hematológico fundamental. El estudio cuantitativo y citológico de las células sanguíneas, permite avanzar significativamente en la mayoría de las enfermedades hematológicas, en que los glóbulos rojos, leucocitos y/o plaquetas se ven afectados, ya sea por la falta de producción en la médula ósea o por destrucción periférica.

Por su parte, el mielograma (estudio citológico de la médula ósea) constituye el examen necesario para confirmar un diagnóstico planteado con el estudio de sangre periférica (hemograma) o para avanzar en el diagnóstico de enfermedades más complejas. Adicional o alternativamente, según el caso, el estudio de médula ósea se puede realizar a través de una biopsia.

En este capítulo se describirá brevemente los diferentes componentes del hemograma, como también los aspectos fundamentales del mielograma y la biopsia de médula ósea.

2. HEMOGRAMA

2.1. Glóbulos rojos

2.1.1. Análisis cuantitativo

a) Hematocrito

El hematocrito corresponde al volumen de glóbulos rojos expresado porcentualmente respecto a un volumen de sangre; de esta forma provee un valor estimativo del grado de anemia. El valor del hematocrito se obtiene por centrifugación de sangre anticoagulada. El procedimiento es simple y reproducible. Brevemente, a un capilar (7.5 cm x 1 mm), se agrega sangre anticoagulada con EDTA y luego de sellar un extremo se centrifuga (5 min. a 12.000 r.p.m). Realizado el procedimiento se pueden distinguir tres capas: glóbulos rojos, "buffy coat" (glóbulos blancos y plaquetas), y plasma. El porcentaje de hematíes (hematocrito), se obtiene a partir de una tabla graduada. La tabla 27-1 muestra los valores normales según sexo y edad.

Tabla 27-1. Valores normales de hematocrito

Edad	(%)	SI
Recién nacido	50-65	0.50-0.65
Lactante-niño	32-42	0.32-0.42
Hombre adulto	42-52	0.42-0.52
Mujer adulta	38-45	0.38-0.45

Entre las observaciones del método se encuentran: (i) un exceso de EDTA causa una disminución del hematocrito, (ii) en muestras analizadas entre 6 a 8 horas de tomadas éstas, aumenta el hematocrito, (iii) en la lectura se debe descartar el “buffy coat”, ya que un número elevado de leucocitos y/o plaquetas altera el resultado, (iv) las muestras que presentan coágulo deben ser descartadas ya que el hematocrito se encontrará disminuido.

Entre los aspectos a controlar en el método están la adecuada homogeneización de la muestra, y el tiempo y velocidad de la centrifugación

La determinación del hematocrito también se puede realizar en contadores celulares (ver punto 2.4).

b) Hemoglobina

La función primordial de la hemoglobina, principal proteína de los glóbulos rojos, es

transportar el oxígeno y el dióxido de carbono hacia y desde los tejidos, respectivamente. Su determinación ayuda a establecer el grado de la anemia. Para determinar la concentración de la hemoglobina en la sangre, se utiliza el método de la cianmetahemoglobina (HiCN), recomendado por el “International Committee for Standardization in Hematology” (ICSH). Brevemente, la sangre es diluida con el reactivo de Drabkin (incluye ferricianuro de potasio y cianuro de potasio). Todos los tipos de hemoglobina son oxidadas por el ferricianuro de potasio a metahemoglobina, que en presencia de ferricianuro de potasio forma un compuesto estable, cianmetahemoglobina, cuya concentración es directamente proporcional a la absorbancia determinada a 540 nm. Para determinar la concentración de las muestras se debe interpolar en una curva de calibración previamente preparada usando un estándar. Junto con las muestras se debe procesar controles. En la tabla 27-2 se muestra los valores normales según edad y sexo.

Tabla 27-2. Valores normales de hemoglobina

Edad	g/dL	g/L
Recién nacido	15-20	150-200
Lactante-niño	11-15	110-150
Hombre adulto	14-17,5	140-175
Mujer adulta	12,5-15, 0	125-150

Entre las desventajas del método de la cianmetahemoglobina se encuentran: (i) el reactivo de Drabkin es muy sensible a la luz, por lo que se debe guardar en oscuridad, (ii) leucocitosis marcada, muestras lipémicas, hemoglobinas S y C (resistentes a la hemólisis), hiperglobulinemia (Ej. Macroglobulinemia de Waldenström’s), producen una turbidez que puede afectar la lectura, (iii) la carboxihemoglobina demora cerca de una hora en convertirse en cianmetahemoglobina, por lo que en individuos muy fumadores, podrían obtenerse valores erróneos de hemoglobina.

c) Recuento de glóbulos rojos

El recuento de hematíes solo se debe realizar en contadores celulares (ver punto 2.4.)

d) Constantes hematológicas

La relación entre hematocrito y hemoglobina o recuento de glóbulos rojos permite obtener índices que ayudan a clasificar las anemias según el tamaño y cromía de los glóbulos rojos: normocíticas-normocromas, macrocíticas y microcíticas-hipocromas. Las constantes más usadas son Volumen Corpuscular Medio (VCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM). A continuación se indican las fórmulas y valores normales de ambos índices:

La VCM es el volumen de los glóbulos rojos expresado en femtolitros (fL), ó 10⁻¹⁵ L:

$$\text{VCM: } \frac{\text{Hematocrito (\%)} \times 10}{\text{Recuento de glóbulos rojos (x10}^6\text{/}\mu\text{L)}}$$

Los glóbulos rojos son considerados normocíticos cuando el VCM fluctúa entre 80-100 fL, microcíticos cuando el valor es inferior a 80 fL (ej. anemia ferropriva) y macrocíticos cuando el valor es superior a 100 fL (Ej. anemia megaloblástica)

La CHCM se expresa en gramos por decilitros, pero formalmente expresada en porcentaje.

$$\text{CHCM: } \frac{\text{Hemoglobina (g/dL)} \times 100}{\text{Hematocrito (\%)}}$$

El valor de referencia normal de la CHCM es de 32 a 36%. Valores inferiores a 32% los presentan los hematíes hipocromos, (Ej. anemia ferropriva, talasemias).

$$\text{Porcentaje de reticulocitos: } \frac{\text{Número de reticulocitos contados} \times 100}{\text{Número de glóbulos rojos contados}}$$

Actualmente el recuento de reticulocitos se puede determinar por citometría de flujo; el RNA es marcado con "tiazol orange". El resultado se puede informar en porcentaje y como número absoluto de reticulocitos; este método es estadísticamente más significativo puesto que permite analizar un número mucho mayor de células.

En los adultos el 0.2 a 2% de las células eritroides circulantes corresponden a reticulocitos; en recién nacidos la cifra es superior (2 a 6%). Cuando aumenta la eritropoyesis, como por ejemplo en las anemias hemolíticas se presenta

$$\text{Porcentaje de reticulocitos corregido: } \frac{\% \text{ reticulocitos} \times \text{Hto del paciente}}{\text{Hto normal (hombre: 45\%, mujer: 40\%)}}$$

Cuando se observan reticulocitos de estrés (de mayor tamaño) se debe aplicar adicionalmente

$$\text{Índice de Producción Reticulocitaria: } \frac{\% \text{ reticulocitos corregido}}{\text{Tiempo de maduración de reticulocitos desplazados, basado en el Hto, 2}}$$

Esta última corrección considera el tiempo de maduración de los reticulocitos, este tiempo normalmente es de 2 días en médula ósea y 1 día en circulación; este último dependiendo del

e) Recuento de reticulocitos

Los reticulocitos son eritrocitos jóvenes que contienen remanentes de ácido ribonucleico (RNA), mitocondrias y ribosomas. Son teñidos con azul cresil brillante, el cual hace precipitar los elementos antes mencionados. Se debe evitar confundir los reticulocitos con cuerpos de Heinz o cuerpos de Howell Jolly. Para hacer el recuento de reticulocitos se hacen 2 frotis de una mezcla de sangre con azul cresil brillante al 1% y se cuentan 1000 glóbulos rojos en la zona donde no se superponen, anotándose los reticulocitos encontrados. Los glóbulos rojos a los que con el microscopio óptico se les reconoce dos o más partículas de color azul son considerados reticulocitos. El porcentaje de reticulocitos, por método microscópico se obtiene con la siguiente fórmula:

reticulocitosis. En cambio, cuando la eritropoyesis no es adecuada (Ej. anemia aplásica), se presenta una disminución del recuento reticulocitario. Los reticulocitos, además de expresarse como porcentaje también se pueden expresar como recuento absoluto; para esto último se necesita el recuento de glóbulos rojos. El porcentaje de reticulocitos se debe corregir según el grado de anemia que presente el paciente; en casos de anemia, el porcentaje de reticulocitos puede verse falsamente elevado porque hay menos glóbulos rojos; la corrección se hace considerando un hematocrito normal:

otra corrección que se indica en la siguiente fórmula:

grado de la anemia puede llegar hasta 3 días, así el recuento de reticulocitos se podría dividir por días obteniéndose el índice de producción reticulocitario; como una forma de simplificar

el cálculo se estima un período de maduración de 2 días. El índice reticulocitario es fundamental al momento de clasificar la anemia en estudio como regenerativa o arregenerativa.

f) Índice icterico

El grado de ictericia del plasma, basado en una semicuantificación, como índice icterico, al leer el resultado del hematocrito realizado por centrifugación, puede apoyar el diagnóstico diferencial de las anemias. Así, por ejemplo, el aumento de la concentración de bilirrubina sérica, podría estar asociada a anemia hemolítica, particularmente extramedular. Este examen se basa en la comparación del color del plasma con diferentes diluciones de una solución de dicromato de potasio 1%. El informe se expresa en unidades (valor normal: <5U); una unidad de II equivale aproximadamente a 1 mg/dL de bilirrubina.

g) Velocidad de eritrosedimentación

La velocidad hemática de sedimentación (VHS) es usada como apoyo al diagnóstico y control de la evolución de las enfermedades inflamatorias (Ejs: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea) o infecciones (Ejs: neumonía, pielonefritis). El método más aceptado por la ICSH es el del Westergren; éste mide la tasa de sedimentación de los glóbulos rojos en el plasma; es obtenida por medición de la distancia entre el menisco del plasma hasta el límite superior de la columna de los glóbulos rojos y se expresa en mm/hora. La VHS depende de la cantidad de eritrocitos, contenido plasmático, y factores mecánicos y técnicos. Ciertas enfermedades pueden causar la formación de "roleaux" (pilas de monedas), producto de alteraciones en las globulinas séricas y el fibrinógeno plasmático, situación en la que los eritrocitos tienden a aglutinarse aumentando la VHS. En esta técnica se usa sangre anticoagulada con EDTA, la cual se diluye con citrato de sodio 3.2% en una relación 1:4. Se debe asegurar que no existan coágulos en la muestra, además, el mesón en que se realiza el examen no debe presentar vibración, ni existir altas temperaturas cerca del ensayo; si la concentración del anticoagulante es superior a la recomendada disminuye la VHS. El uso de heparina como anticoagulante aumenta la VHS. La presencia de "sickle cells" y esferocitos impiden la formación de pilas de monedas, disminuyendo la VHS. Los valores normales son los siguientes: niños <10 mm/Hr, hombres <50 años 4-7 mm/Hr, >50 años <20 mm/Hr;

mujeres, <50 años 5-12 mm/Hr, >50 años <30 mm/Hr. Entre las enfermedades que alteran la VHS se pueden citar solo, a modo de ejemplos: policitemia (disminuye la VHS), por el contrario: neumonía, sepsis y mieloma múltiple (aumentan la VHS). En la actualidad existen métodos automatizados para determinar la VHS, así por ejemplo el sistema Ves-Matic usa un sensor optoeléctrico que mide los cambios de la opalescencia de la columna de la VHS; la sangre es adicionada en tubos especiales con anticoagulante, los que se ubican en el instrumento, en un ángulo de 18° (grados) y el resultado se obtiene en 20 minutos.

2.1.2. Análisis citológico

a) Alteraciones del tamaño

Las alteraciones del tamaño del glóbulo rojo (anisocitosis) son de dos tipos: macrocitosis (eritrocitos de mayor tamaño que lo normal:>100 fL) y microcitosis (eritrocitos de menor tamaño).

La macrocitosis es característica de la anemia megaloblástica (déficit de vitamina B₁₂ y/o ácido fólico; ver capítulo 7). También se puede observar cierto grado de macrocitosis en algunos pacientes con aplasia medular. Otro ejemplo de macrocitosis no megaloblástica se puede observar en algunas hepatopatías. Los hematíes de los recién nacidos son de mayor tamaño que en el adulto.

Los glóbulos rojos microcíticos se observan en la anemia ferropriva, talasemias y en algunos pacientes con anemias secundarias a enfermedades crónicas.

b) Alteraciones del color

Las alteraciones del color se refieren a modificaciones en el contenido hemoglobínico. La hipocromía es consecuencia de una disminución del contenido hemoglobínico eritrocitario.

Los eritrocitos policromatófilos (tonalidad azul grisácea por el contenido de RNA) corresponden a reticulocitos, los que aumentan en las anemias regenerativas. Ante la presencia de policromatofilia es recomendable realizar recuento de reticulocitos.

La anisocromía se refiere a la coexistencia de eritrocitos hipocromos y normocromos.

c) Alteraciones en la forma

Las alteraciones de la forma de los glóbulos rojos (poiquilocitosis) obedecen a diversas causas, entre otras: diseritropoyesis, causas hereditarias

y acción de diversos agentes sobre eritrocitos normales. En la figura 27-1 se muestran las alteraciones morfológicas más frecuentes de los eritrocitos.

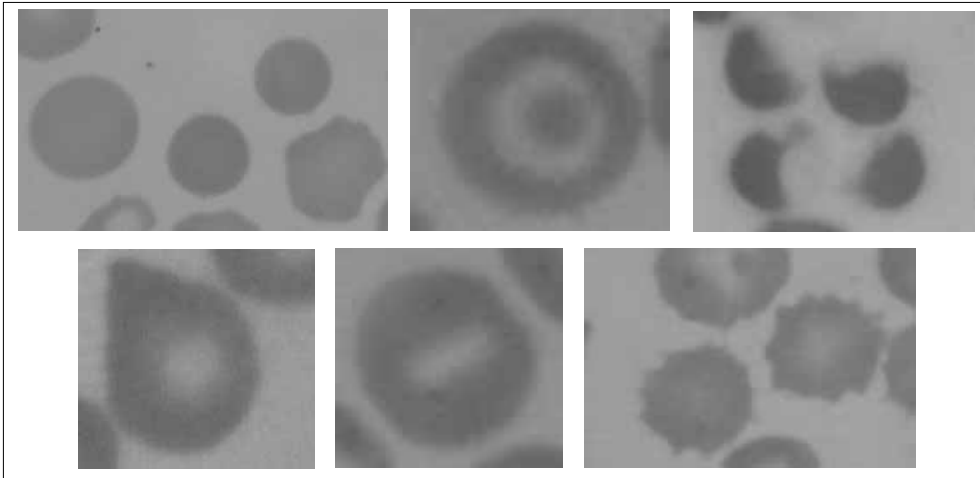


Figura 27-1. Alteraciones morfológicas de los glóbulos rojos. Fila superior de izquierda a derecha (Esferocito, Dianocito y Esquistocito) y fila inferior en el mismo sentido (Dacriocito, Estomatocito y Crenocito).

En la diseritropoyesis se pueden observar eritrocitos con poiquilocitosis variada. En caso de causas hereditarias suele predominar un tipo de alteración morfológica. Entre las poiquilocitosis, destacan:

Esferocitos. Son glóbulos rojos que en lugar de presentar forma bicóncava como en los glóbulos rojos normales presentan forma esférica. A modo de ejemplo se puede mencionar la esferocitosis hereditaria y la anemia hemolítica inmune (ver capítulo 8).

Eliptocitos u ovalocitos. Son eritrocitos que presentan una forma ovalada. Se observan en la elipticitosis hereditaria (ver capítulo 8). Además suelen encontrarse en anemias microcíticas.

Acantocitos (“spurr cells”). Corresponden a eritrocitos un tanto esferoideales que presentan prominencias superficiales alargadas distribuidas en forma irregular. Los acantocitos se presentan en la acantocitosis (enfermedad congénita), en hepatopatías, y en post-esplenectomizados.

Dianocitos (“target cells”). Son hematíes que poseen un exceso de superficie, por lo que se forma una zona central con mayor contenido hemoglobínico. Se observan en las talasemias (ver capítulo 8), anemia ferropriva (ver capítulo 6) y en ciertas enfermedades hepáticas.

Esquistocitos. Son fragmentos de eritrocitos. Suelen observarse en anemias hemolíticas de origen mecánico, anemias hemolíticas microangiopáticas, (Ej. coagulación intravascular diseminada (ver capítulo 23).

Dacriocitos. Corresponden a eritrocitos en forma de lágrimas o gotas; se observan en mielofibrosis, talasemias y policitemias.

Estomatocitos. Son eritrocitos con hendidura central en forma de boca. Se observan en la estomatosis hereditaria y afecciones hepáticas.

Crenocitos (“Burr cells”). Habitualmente corresponden a artefactos; en caso de ser verdaderos crenocitos se asocia a deshidratación, carcinoma gástrico y uremia.

Drepanocitos o hematíes falciformes (“Sickle cells”). Son glóbulos rojos en forma de hoz. Se observan en casos de anemia drepanocítica, un tipo de hemoglobinopatía (ver capítulo 8).

d) Inclusiones intraeritrocitarias

En ocasiones, los eritrocitos presentan inclusiones de diversa naturaleza:

Punteado basófilo. Se refiere a la presencia de punteado múltiple que se tiñe con colorantes básicos. Equivalen a hematíes jóvenes con

restos de RNA. Se presentan en talasemias e intoxicación por plomo, entre otras situaciones.

Granulación azurófila. Son pequeñas granulaciones de color violeta púrpura en los glóbulos rojos; corresponden a restos de núcleo de eritroblastos. Se observan en síndromes diseritropoyéticos congénitos y/o adquiridos.

Anillos de Cabot. Corresponde a restos de microtúbulos de eritroblastos que quedan, después de mitosis anormal, en los hematíes. Su presencia indica alteración de la eritropoyesis. Se pueden observar en la anemia megaloblástica, en las anemias hemolíticas.

Cuerpos de Howell Jolly. Son restos de cromatina que persisten en el interior del eritrocito. Suelen observarse en individuos post-esplenectomizados o en pacientes con anemia megaloblástica; en este último caso constituyen un signo periférico de diseritropoyesis.

Eritroblastos. Son células inmaduras de la serie roja, cuya característica principal es la presencia de núcleo. Su presencia en sangre periférica, corresponde a un signo de intensa regeneración eritroblástica, pero también se pueden presentar en el contexto de una reacción leucoeritroblástica la que podría estar asociada a infiltración medular (mieloptosis).

Cuerpos de Pappenheimer. Son gránulos sideróticos de color púrpura en la periferia del eritrocito. Suelen encontrarse en anemias con alteraciones en la incorporación del hierro a la hemoglobina, como por ejemplo: anemias sideroblásticas, talasemias e intoxicación por plomo.

Cuerpos de Heinz. Corresponden a precipitados de hemoglobina desnaturalizada. Se presentan en caso de anemia hemolítica intracorpuscular por déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G6PD) y anemias hemolíticas inducidas por fármacos.

Parásitos. La parasitosis intraeritrocitaria más característica es la malaria. Los plasmodios realizan parte de su ciclo vital en el interior de los glóbulos rojos; toman una forma anillada que contiene un pequeño núcleo central correspondiente al trofozoito. Entre las parasitosis extraeritrocitarias se encuentra la enfermedad de chagas, en la cual se observan tripanozomas en circulación.

2.2. Glóbulos blancos

Las alteraciones que pueden presentar los leucocitos en el hemograma son de dos tipos, cuantitativos y cualitativos (citológicos). A continuación se describirán brevemente ambos tipos de alteraciones:

2.2.1. Análisis cuantitativos

a) Recuento de leucocitos

El recuento normal de leucocitos fluctúa entre 5.000–10.000/ μL y en recién nacidos entre 15.000–20.000/ μL . El recuento leucocitario se realiza en forma manual o en contadores celulares (ver punto 2.4.). En el caso del método manual se utiliza una cámara de Neubauer la que consta de dos áreas cuadradas de 3x3 mm (9 mm²). Está dividida en nueve cuadrados de 1x1 mm; el cuadrado central (retículo de Thomas) está dividido en 25 cuadrados. Al instalar el cubrecámara se produce una distancia de 0.1 mm, con lo cual el volumen total de la cámara es de 9 mm³. Antes de realizar el recuento, la sangre debe ser diluida 1:10 ó 1:20 con el diluyente Hayem B (contiene ácido acético que destruye los glóbulos rojos y azul de metileno que tiñe los núcleos de leucocitos). Realizado el recuento de los glóbulos blancos encontrados en los 4 cuadrantes externos de la cámara, el cálculo final se obtiene por la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento de leucocitos: } \frac{\text{Número promedio de células contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{Área contada (mm}^2\text{)} \times \text{la profundidad de la cámara}}$$

Algunas patologías de la médula ósea liberan eritroblastos hacia periferia. Si hay más de 10 eritroblastos por 100 leucocitos en el frotis sanguíneo, el recuento de leucocitos debe ser corregido, puesto que estaría falsamente

umentado. Esto ocurre porque el reactivo Hayem B destruye solo las células no nucleadas, razón por la que los eritroblastos no son destruidos. Para corregir el recuento se utiliza la siguiente fórmula:

Recuento de leucocitos corregido: $\frac{\text{Recuento de leucocitos no corregido} \times 100}{(\text{eritroblastos}/100 \text{ leucocitos}) + 100}$

b) Fórmula leucocitaria

El extendido o frotis sanguíneo, es un elemento muy importante en la realización del hemograma. Es posible obtener información con respecto a la morfología de las tres series sanguíneas glóbulos rojos, leucocitos, y plaquetas. Adicionalmente, el citohematólogo experimentado puede tener una apreciación sobre aspectos cuantitativos: índices hematológicos, recuento de leucocitos y recuento de plaquetas. Los frotis sanguíneos y su estudio deben cumplir ciertas condiciones para que sean de utilidad: grosor, calidad de la tinción y lugar del frotis donde se realiza la observación. En cuanto a su tinción se usa la de May Grünwald - Giemsa (ver capítulo 23, punto 5).

La fórmula leucocitaria mide el porcentaje de cada subpoblación leucocitaria en la muestra de sangre. El aumento o disminución del porcentaje de un tipo de leucocitos en particular puede ser solo relativa (porcentual) o bien absoluta (verdadera); para obtener este último valor se debe considerar el recuento total de leucocitos. Así por ejemplo, 70% de linfocitos, en el contexto de un hemograma que tiene 2.000 leucocitos/ μL corresponde a una linfocitosis relativa (1.400 linfocitos/ μL), pero en un hemograma con 50.000 leucocitos/ μL se trata de una linfocitosis absoluta (35.000 linfocitos/ μL). Los valores normales se indican en la tabla 27-3.

Tabla 27-3. Rango de referencia normal de subpoblaciones leucocitarias

	%	Número absoluto ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Basófilos	0 – 1	0 – 0.1
Eosinófilos	0 – 4	0 – 0.3
Neutrófilos	46 – 73	1.3 – 6.7
Linfocitos	18 – 44	0.9 – 3.2
Monocitos	3 – 9	0.12 – 0.6

En términos generales a los glóbulos blancos se les puede clasificar en **polimorfonucleares** (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los **mononucleares** (linfocitos y monocitos).

En cuanto a los leucocitos el análisis citológico del frotis sanguíneo entrega información sobre aspectos cualitativos y cuantitativos de los diferentes leucocitos y permite detectar la eventual presencia de células anormales.

Aumento o disminución en el número absoluto de algunas subpoblaciones de leucocitos puede orientar al diagnóstico de enfermedades infecciosas, inflamatorias, y procesos proliferativos. En términos generales, las alteraciones cuantitativas pueden ser de tres tipos: (a) Aumento de una subpoblación de leucocitos, (b) disminución de una subpoblación de leucocitos, y (c) presencia de células inmaduras o blastos.

El sufijo filia, significa un incremento por sobre lo normal de una población determinada, y el

sufijo penia se usa para indicar disminución en una población de leucocitos.

Aumento de una subpoblación de leucocitos

Neutrofilia. Valor normal de neutrófilos en circulación es 46-73%. Se habla de neutrofilia cuando el valor es superior a $6.7 \times 10^3/\mu\text{L}$. Se observa neutrofilia en casos de ejercicios en exceso o brusco, estrés e hipoxia; en estos casos no se trata de un aumento de la granulopoyesis sino que un aumento de la demarginación de neutrófilos que se encuentran en el “pool” marginal que está en la pared endotelial; se trata de pseudoneutrofilias explicadas por cambios en su distribución.

En infecciones de tipo bacteriano se produce neutrofilia por aumento de la granulopoyesis; posteriormente los neutrófilos migran al sitio de infección (tejido) para llevar a cabo su acción fagocítica.

También se presenta neutrofilia en situaciones clínicas asociadas a los excesos de metabolitos

como ocurre en la uremia, la gota y la acidosis diabética; y por sustancias químicas como por ejemplo el plomo, el mercurio y los corticoides.

Eosinofilia. La eosinofilia ($>500/\mu\text{L}$) se observa en las siguientes enfermedades: Enfermedades alérgicas (asma, alergias medicamentosas, eccema atópico, urticaria y otras), parasitosis (hidatidosis, triquinosis, cisticercosis y otras), ingesta de medicamentos, y enfermedades de la piel (eccema, pénfigo, psoriasis, dermatitis herpetiforme).

Monocitosis. Se habla de monocitosis cuando el recuento de monocitos es $>1000/\mu\text{L}$. Esta situación se presenta en: recuperación de enfermedades agudas, infecciones bacterianas, enfermedades reumáticas y enfermedades autoinmunes (LES, artritis), en enfermedades hematológicas, tales como Leucemia mieloide aguda, Leucemia mielomonocítica crónica (SMD), Leucemia aguda mielomonocítica (FAB-M4) y monocítica (FAB-M5), y en tipo de destrucción de tejidos tales como accidentes y cirugías muy extensas. En situaciones que pueden presentar una fase de recuperación medular, como por ejemplo, post-quimioterapia, post-trasplante de médula ósea, recuperación de aplasia medular, y de agranulocitosis, suele observarse como primer signo de generación mieloide un incremento transitorio de monocitos; esto se explica porque el período de maduración de los monocitos en la médula ósea es más corto que en los neutrófilos.

Basofilia. Los basófilos son los leucocitos que se presentan en menor de proporción en la sangre periférica. Se presenta basofilia en: Alergias, post-irradiación, cirrosis y Síndromes mieloproliferativos crónicos (Leucemia mieloide crónica y Policitemia vera).

Linfocitosis. Entre las causas más importantes de linfocitosis destacan: infecciones virales (Mononucleosis infecciosa, tos ferina, rubéola, varicela, influenza, hepatitis, citomegalovirus) y leucemia linfática crónica.

Disminución de una subpoblación de leucocitos

Neutropenia. Se define como neutropenia a un valor absoluto de neutrófilos en sangre periférica menor a $1.5 \times 10^3/\mu\text{L}$; neutropenia leve se define como $1 - 1.5 \times 10^3/\mu\text{L}$, y de neutropenia marcada o agranulocitosis cuando el recuento es inferior a $0.5 \times 10^3/\mu\text{L}$. En los niños menores

de 1 año de edad, se define como neutropenia cuando la cifra es inferior a $1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$. En la mayoría de los casos de agranulocitosis, el riesgo de infección es muy marcado, pudiendo incluso producirse infección por la flora comensal.

La neutropenia puede producirse por diversas causas, que pueden ser de origen central o periférico:

- De origen central: (a) por defectos de la producción, neutropenias hipoplásicas: congénitas e inducidas por fármacos, (b) por granulocitopoyesis ineficaz, déficit de vitamina B_{12} y/o ácido fólico) y (c) por liberación disminuida de neutrófilos desde la médula ósea.
- De origen periférico: (a) por destrucción excesiva o de salida a los tejidos (inmunológicas, idiopática, neonatal, inducida por fármacos) y (b) pseudoneutropenias, en las cuales existe un aumento del compartimiento marginal con respecto al circulante.

Linfopenia. Es el descenso de la cifra de linfocitos por debajo de $1.5 \times 10^3/\mu\text{L}$. Se puede observar durante el curso de Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA (infección por VIH).

Presencia de células inmaduras o blastos

La existencia en sangre periférica de células inmaduras, de la serie roja o serie leucocitaria, es siempre patológica.

Serie roja. La presencia de eritroblastosis puede ocurrir como respuesta a un estímulo extramedular (eritroblastosis fetal, síndromes hemolíticos intensos) o tener un origen medular de diferente tipo (diseritropoyesis congénita o adquirida). En la Eritroleucemia o Enfermedad de Di Guglielmo (Leucemia mieloide aguda tipo M6, según, FAB presenta eritroblastos), pero también se puede observar en otras infiltraciones medulares.

Serie leucocitaria. En las leucemias agudas dependerá de la línea celular el tipo de blastos que se puede observar en periferia. Se les clasifica en dos grandes grupos, tipo mieloide y tipo linfoides. En su diferenciación se utilizan criterios morfológicos, inmunofenotípicos y citoquímicos.

En los linfomas que se leucemizan aparecen células linfoides reactivas. En otros síndromes

linfoproliferativos, los elementos linfoides circulantes suelen presentar características morfológicas que orientan a un tipo de diagnóstico, como por ejemplo la tricoleucemia y la enfermedad de Sézary.

2.2.2. Análisis cualitativo

Algunas alteraciones morfológicas que se pueden presentar en neutrófilos y linfocitos de sangre periférica, pueden ser de valor diagnóstico.

a) Neutrófilos

Alteraciones de la granulación. La denominada **granulación tóxica** corresponde a un aumento de gránulos primarios, con abundante actividad mieloperoxidasa y suele presentarse en el curso de infecciones bacterianas. Otras alteraciones citoplasmáticas menos frecuentes en neutrófilos son los llamados **cuerpos de Dhle**, inclusiones ovaladas compuestas fundamentalmente de RNA, situadas en la periferia del citoplasma de los neutrófilos.

En las anomalías de **Alder Reilly** y de **Chediak-Higashi**, se presentan gránulos gigantes en los leucocitos, que se originan por fusión de gránulos.

Alteraciones del núcleo. Normalmente el núcleo de los neutrófilos tiene entre 3 a 4 lóbulos; se puede observar aumento en el número de lóbulos (neutrófilos polisegmentados) en la anemia megaloblástica. Una alteración congénita de la segmentación nuclear de los neutrófilos, denominada **anomalía de Pelger-Huet**, que se caracteriza por presentar núcleo bilobulado, con una especial condensación cromatínica en alrededor del 90% de los neutrófilos. Estos neutrófilos presentan un trastorno genético, en que solo maduran hasta la etapa de baciliforme, dando origen a una “pseudo-desviación a la izquierda” sin que exista infección.

Reacción leucemoide. Es una leucocitosis reactiva que puede aparecer como una forma de respuesta medular a una causa subyacente. Se caracteriza por cambios hematológicos que semejan una Leucemia Mieloide Crónica. En

general cursa con un recuento leucocitario superior a $20 \times 10^3/\mu\text{L}$, con presencia de formas inmaduras en sangre periférica. Puede presentarse en infecciones bacterianas y virales, alergias, enfermedades inflamatorias o que cursan con necrosis tisular, y asociadas a algunos fármacos (corticoides, adrenalina, litio). En pacientes afectados con el Síndrome de Down, se ha descrito este cuadro en los recién nacidos pero en forma transitoria.

Reacción leucoeritroblástica. La leucoeritroblastosis es un término utilizado para describir la presencia de células inmaduras de las series mieloide y eritroide en sangre periférica. Generalmente se acompaña de anemia; puede o no existir compromiso de las plaquetas.

b) Linfocitos

Existe un pequeño grado de pleomorfismo en los linfocitos. En el curso de ciertas infecciones virales (mononucleosis infecciosa, infección causada por el virus de Epstein Barr y en otras enfermedades virales relacionadas), pueden observarse linfocitos con citoplasma más abundante con distintos grados de basofilia (leve, moderada e intensa), cuya forma se adapta a los glóbulos rojos vecinos, reciben el nombre de linfocitos activados o reactivos.

2.3. Plaquetas

2.3.1. Análisis cuantitativo

a) Recuento de plaquetas

El recuento de plaquetas se puede realizar con microscopio de contraste de fase y con contadores hematológicos (ver punto 2.4). En el primer caso el recuento se realiza en una cámara de Neubauer, específicamente en el retículo de Thomas. El rango de referencia normal es $150 - 350 \times 10^3/\mu\text{L}$. Se utiliza muestra de sangre anticoagulada con EDTA, la cual es diluida (1:100) con oxalato de amonio, que lisa las otras células. Después de 20 minutos de “cargada” la cámara se hace el recuento de plaquetas con objetivo 40x. El número de plaquetas se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento de plaquetas: } \frac{\text{Número de células contadas} \times \text{factor de dilución}}{10}$$

Una estimación del recuento plaquetario debe realizarse en el frotis sanguíneo teñido con May-Grünwald Giemsa en objetivo de inmersión;

normalmente se observan entre 8 y 20 plaquetas por campo.

2.3.2. Análisis citológico

Además del recuento, al igual que en las otras líneas celulares, interesa la morfología de las plaquetas. Al usar sangre sin anticoagulante para hacer los frotis sanguíneos, las plaquetas tienden a formar agregados de distintos tamaños, lo que no sucede cuando se utiliza con sangre anticoagulada con EDTA, caso en el cual se distribuyen uniformemente por toda la extensión. Después de una hemorragia o en casos de anemia ferropriva, el tamaño de las plaquetas puede ser variable y su número puede aumentar. En ciertas hemopatías pueden observarse plaquetas gigantes o con signos de displasia. Se ha observado que la sangre anticoagulada con EDTA- Na_2 presenta aglutinación plaquetaria lo que podría ser informado como trombocitopenia al realizar un recuento de plaquetas en contadores celulares, situación que debe ser pesquisada al observar el frotis sanguíneo.

La adsorción de las plaquetas en la superficie de los neutrófilos o satelitismo plaquetario puede ser una causa de falsa trombocitopenia en el recuento automático; de ser así solo la observación al frotis permitirá pesquisar este fenómeno cuya causa se desconoce.

La **trombocitopenia** (recuento de plaquetas $<140 \times 10^3/\mu\text{L}$) puede deberse a alteraciones de la médula ósea (trombocitopenias centrales) o a una afección de las plaquetas circulantes (trombocitopenias periféricas). Entre las causas de trombocitopenias **centrales** se distinguen: (a) depresión medular por infecciones, agentes tóxicos, (b) invasión de la médula ósea por células anómalas (leucemias, linfomas), (c) insuficiencia medular (aplasia, mielodisplasias, mielofibrosis).

Las trombocitopenias **periféricas** pueden deberse a causa inmunológica o a hiperconsumo. En el primer caso, la trombocitopenia puede estar mediada por alo o autoanticuerpos. La trombocitopenia por consumo aumentado se presenta en sepsis, hiperesplenismo, procesos microangiopáticos y CID (ver capítulo 19).

En pacientes con trombocitopenias, las macroplaquetas se asocian a plaquetas más jóvenes (plaquetas reticuladas) y se observan en trombocitopenia regenerativas o periféricas. En los síndromes mielodisplásticos es posible observar plaquetas gigantes, degranuladas, vacuoladas y con gránulos gigantes.

La **trombocitosis** (aumento del recuento plaquetario) puede ser primaria como trombocitemia esencial y otros síndromes mieloproliferativos, o secundaria. En este último caso se trata de trombosis reactiva que se puede presentar en cualquier patología inflamatoria, como por ejemplo en trastornos inflamatorios crónicos: artritis reumatoidea, fiebre reumática, colitis ulcerosa, TBC y cirrosis hepática; recuperación de infección aguda; deficiencia de hierro, anemia megaloblástica; anemia hemolítica; enfermedad de Hodgkin y otros.

2.4. Contadores celulares

2.4.1. Principio de los contadores celulares

El primer contador automático de células sanguíneas fue descrito por W. Coulter en 1956. El principio del método está basado en que el equipo utiliza un sistema de medición no óptico y provee un rango de cuantificación que excede las 6.000 células individuales por segundo, con un intervalo de tiempo de 15 segundos. Una suspensión de elementos formes es impulsada a través de un orificio, simultáneamente con una corriente eléctrica. Las células sanguíneas, individualmente pasan a través del orificio generando un cambio de impedancia (resistencia) en la apertura, este pulso varía con el tamaño de la célula, de esta manera, el equipo contabiliza las células individuales y provee una distribución del tamaño (figura 27-2). El número de células cuantificadas por muestra es aproximadamente 100 veces mayor que los recuentos microscópicos, reduciendo de esta manera el error estadístico en 10 veces. Los contadores modernos aún siguen usando este sistema, es el método de referencia para recuentos celulares.

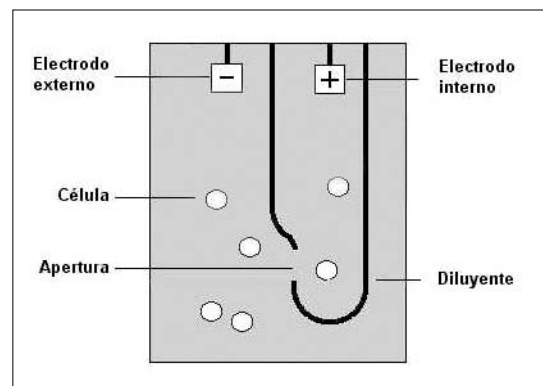


Figura 27-2. Principio de contadores celulares.

La progresiva incorporación de autoanalizadores al laboratorio hematológico ha logrado un mejoramiento, no sólo en la rapidez y precisión, sino también en la confiabilidad de los resultados, orientado a la tipificación de las anemias, por cuanto junto a la concentración de hemoglobina, proporcionan en forma sistemática otros parámetros eritrocitarios de gran valor clínico, tales como el recuento de hematíes, el hematocrito y los valores hematimétricos: VCM, HCM, CHCM, dispersión de la hemoglobina (HDW) y área de distribución del glóbulo rojo (RDW). Si bien el empleo de autoanalizadores hematológicos ha mejorado el diagnóstico de las anemias, el análisis de la morfología eritrocitaria mediante observación microscópica de un frotis de sangre periférica bien realizado y teñido constituye todavía un procedimiento diagnóstico fundamental, más aún en algunas patologías eritrocitarias, como por ejemplo en la esferocitosis hereditaria o en la eliptocitosis congénita donde la observación morfológica de los hematíes constituye el principal criterio diagnóstico, de la misma manera ocurre con la leucemia de células vellosas. La presencia de nuevos parámetros puede indicarnos la heterogeneidad de la población eritrocitaria, como lo es el RDW, o los histogramas de distribución que son sumamente útiles para confirmar el grado de anisocitosis en una primera parte, como diagnóstico diferencial de anemias en la segunda (figura 27-3).

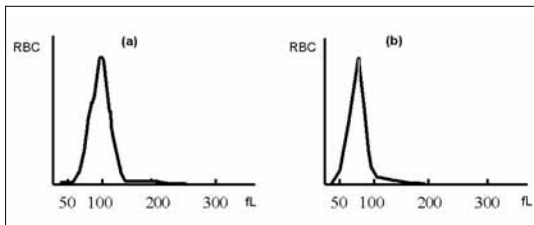


Figura 27-3. Histograma de glóbulos rojos. (a) hematíes normales, (b) eritrocitos microcíticos.

En este contexto, es importante seleccionar un analizador para el laboratorio de hematología que responda a las necesidades y proyecciones del usuario.

Para el recuento diferencial de las cinco poblaciones celulares, algunos analizadores automatizados emplean el "Adaptative Cluster Analysis System". Las células blancas se analizan mediante citometría de flujo utilizando un láser semiconductor. Una dispersión a doble ángulo proporciona dos tipos de información para

separar las poblaciones. Impulsos de dispersión en ángulo bajo entregan información sobre el tamaño celular. Impulsos de dispersión en ángulo alto facilitan información sobre la complejidad interna de las células.

Otros analizadores poseen cubículos independientes para eritrocitos y leucocitos. En el de eritrocitos se encuentra una apertura de 50 μm y en el de los leucocitos de 100 μm . En cada apertura se realizan 3 recuentos de 4 segundos y se obtiene el promedio. En la primera, el sistema identifica los eritrocitos como aquellas partículas de volumen igual o mayor que 36 fL, además realiza el recuento de plaquetas, las cuales tienen un volumen entre 2 y 20 fL. En la cámara de leucocitos, posterior a una dilución con diluyente isotónico, se aplica agente lisante que destruye la membrana citoplasmática de eritrocitos y leucocitos, permaneciendo los núcleos intactos. Así las partículas que midan ≥ 35 fl, son contadas como leucocitos. En el caso de presencia de núcleos de eritroblastos, éstos serán contabilizados y declarados con una señal de alerta por el equipo; su existencia se debe confirmar en el frotis sanguíneo. Los últimos se deben descontar del recuento de leucocitos.

Actualmente existen contadores hematológicos que incluyen además de los valores hematimétricos ya conocidos (VCM, HCM y CHCM), el índice RDW que corresponde a la heterogeneidad en los tamaños celulares de los glóbulos rojos conocida como anisocitosis en el frotis de sangre periférica, se expresa como una desviación estándar en fL o como un coeficiente de variación (porcentual). De la misma manera, singular relevancia tienen los histogramas de glóbulos rojos cuyo estimador de distribución eritrocitaria depende del contenido hemoglobínico y grado de dispersión, HDW. El disponer del RDW y HDW permite mejorar el significado de la heterogeneidad del volumen celular y de la hemoglobina, relacionada con diversas patologías hematológicas.

Las muestras con un valor de RDW bajo o normal (aproximadamente 14%) tienen generalmente una población homogénea y un histograma de distribución por tamaño de carácter gaussiano, a diferencia de las que poseen un RDW alto (generalmente mayor de 18%) que tienen poblaciones celulares heterogéneas directamente relacionadas con el grado de anisocitosis observados en el frotis de sangre periférica. Existen evidencias de que el

RDW en la mayoría de los casos sería útil para detectar estados tempranos de deficiencia de hierro, ácido fólico o vitamina B₁₂. Un incremento en el RDW sería sugerente de una deficiencia nutricional precoz, especialmente con respecto al hierro. También sería útil en la diferenciación de las anemias microcíticas hipocrómicas como son la anemia ferropénica y la β-Talasemia heterocigota. Es de interés la presencia de histogramas de distribución celular de carácter bimodal (donde en muchos casos el volumen corpuscular medio resultaría ser normal por compensación de tamaños) que generalmente se hallan asociados a pacientes con algunas de las deficiencias nutricionales bajo tratamiento, pacientes con deficiencias mixtas, pacientes transfundidos y síndromes mielodisplásicos.

Algunos contadores incluyen la IRF (Fracción de Reticulocitos Inmadura) y el MRV (Volumen Medio de Reticulocitos). Estos parámetros se presentan más sensibles que el recuento de reticulocitos en la respuesta medular de pacientes con anemia, incluidos recién nacidos, enfermedades crónicas, respuesta a terapias de anemias (eritropoyetina, hierro, B₁₂, folato), respuesta medular a mielosupresión, pacientes trasplantados y evaluación de anemias y de actividad de eritropoyetina.

El histograma de glóbulos rojos, muestra la gráfica del tamaño (en fL) en el eje X y la relación relativa en el eje Y. Es usado para determinar el tamaño promedio, distribución del tamaño, y subpoblaciones. Este histograma representa la distribución normal de eritrocitos. La cola de la curva representa la coincidencia del pasaje de células al mismo tiempo.

2.4.2. Tipos de contadores

En la actualidad, en el país se utilizan los siguientes modelos de contadores hematológicos:

Abbott Cell Dyn 3500-3700-4000, Celdyn 1400-1500-1600-1700, Bayer Advia 60, Coulter automáticos Act·8-Act·diff-T540-890- TJ-STKS-MAX·M-Onyx-Gen S, Coulter CBC – 5, Clay Adams, Spirit, Erma Ermax 18, Hycel modelo Celly-Diana 5, Medonic Mimer - CA- 530, CA-620, Micros OT 18 ABX Cobas, , Meter Tech Excel 300-500-710, Nihon Kohden Celltac automáticos, Nihon Kohden Celltac MEK Serie 5000, Serono, Sysmex K4500 - SF3000 – KX21N, Pentra 60.

2.4.3. Muestra de sangre

La muestra debe ser extraída con anticoagulante. El anticoagulante que presenta mejores propiedades para el almacenamiento de la muestra es la sal dipotásica del ácido etilendiaminotetracético (K2EDTA), en una concentración entre 1,5 mg/mL de sangre. Antes de ser procesadas las muestras de pacientes deben ser mezcladas rigurosamente a lo menos 20 veces, o en su defecto, por 3 a 5 minutos en un mezclador mecánico. La muestra debe ser procesada dentro de las 8 horas desde la toma de muestra, pero a 4 °C se puede cuantificar hasta en un periodo de 27 horas.

2.4.4. Aseguramiento de la calidad

Calibrador

En el pasado algunos modelos de contadores hematológicos requerían ser calibrados por el usuario para distinguir los glóbulos rojos, blancos y plaquetas. Los actuales modelos incluyen la hemoglobina, recuentos y volúmenes celulares. De todas maneras, se les debe controlar la exactitud a través de calibradores sanguíneos.

Los calibradores son comercializados por los mismos proveedores de equipos y traen registrado el intervalo de cada parámetros hematológico. En su defecto, localmente con sangre preservada pueden ser preparadas por el laboratorio, procedimiento descrito en el documento WHO LAB/97.2. El recuento de eritrocitos y leucocitos debe ser cuantificado por mediciones repetidas usando pipetas calibradas para diluir la sangre en cámaras de recuento celular. Un número significativo de células deben ser contadas para obtener la distribución del error a 2 %. En el caso de la hemoglobina, debe ser obtenida por un método de referencia (ICSH, “The International Council for Standardization in Haematology”). La calibración debe realizarse cuando el equipo es instalado, cuando se cambia algún repuesto y, con una periodicidad de a lo menos una a dos veces en el año.

2.4.5. Procedimientos e instrucciones

a) Los controles internos de sangre preservada pueden ser de producción de laboratorio o comerciales, los cuales permiten evaluar la precisión y reproducibilidad de los equipos. Deben ser probados al inicio de la rutina de

trabajo diario y graficar cartas controles de Levey –Jennings para identificar errores sistemáticos.

b) Los factores que deben verificarse en el control de los equipos y reactivos son: fecha de vencimiento de los reactivos, estabilidad eléctrica, permeabilidad de los drenajes, presión de vacío, identificar fugas a través de los sellos, indemnidad de las tuberías y mantener niveles de reactivos y desechos.

c) Es importante conocer el ruido electrónico y el material particulado del diluyente, se espera que los valores sean los siguientes: Recuento de glóbulos rojos menor de $0.03 \times 10^{12}/L$, Recuento de glóbulos blancos menor de $0.04 \times 10^9/L$, Hemoglobina menor de 0.2 g/L , Recuento de plaquetas menor de $5 \times 10^9/L$.

d) Dependiendo de las instrucciones del proveedor el instrumento debe ser cebado con muestra fresca antes de iniciar la rutina diaria.

e) En centros donde se procesen más de 100 muestras debe realizarse un control diario de los parámetros absolutos, para detectar resultados fuera del rango establecido de las 2 desviaciones estándares.

f) Mantener permeable la apertura de recuento celular con agua destilada para evitar el depósito de sales cuando no se utilice el equipo y, en el caso de obturación se puede destapar con cepillo delgado efectuando flujos repetidos de diluyente. Cuando se trate de depósitos de proteínas se debe mantener la apertura con una solución de detergente (baño) u otra solución recomendada por el proveedor.

g) Registre las actividades de calibración y control interno, mantención de laboratorio, reparación y repuestos, visita de servicio técnico y mal funcionamiento.

2.4.6. Fuentes de error

Las principales fuentes de error son las siguientes: mezcla insuficiente, dilución errónea, error del volumen de la alícuota, fluctuación del voltaje e interferencia con otro equipo, presencia de burbujas de aire, defecto en la aspiración por fuga, pérdida de vacío, apertura obstruida, contaminación del diluyente, presencia de trazas de agente lítico o detergente, presencia de crioaglutininas, glóbulos rojos fragmentados o extremadamente microcíticos.

Entre las causas de una falsa trombocitopenia se encuentra la aglutinación de plaquetas o bien que éstas se encuentren en forma de satélite alrededor de glóbulos blancos. Las plaquetas aglutinadas pueden observarse en el lado derecho del histograma correspondiente.

Por otro lado, se debe confirmar con la observación marginal del frotis sanguíneo la presencia de plaquetas gigantes. Estas células exceden el tamaño de los eritrocitos y aparecen a la derecha del histograma de las plaquetas o a la izquierda del histograma de glóbulos rojos.

Algunos instrumentos cuantifican la presencia de eritroblastos como linfocitos, simulando de esta manera recuento leucocitarios elevados.

2.4.7. Limitaciones del sistema

Los contadores diferencian a eritrocitos, leucocitos y plaquetas, en general, células sanguíneas no conductoras de electricidad que están suspendidas en una solución electrolítica tamponada y que son pasadas a través de un orificio, entre dos electrodos. La interrupción de las células no conductoras modifican la carga eléctrica produciendo un pulso. El número total y la amplitud de cada pulso es proporcional al recuento celular y volumen medido, respectivamente.

Las limitaciones de este método están relacionadas con los tipos de partículas que se encuentran en el flujo; como condición básica: (a) Las partículas en estudio deben ser menos conductoras de electricidad que el medio en que están disueltas y (b) El tamaño de las partículas a medir deben estar entre el 2 y el 60 % del diámetro de la apertura.

2.4.8. Confiabilidad de los resultados

En las distintas etapas del procesamiento de las muestras, la preanalítica, analítica y post-analítica debe validarse los resultados antes de emitir un informe: (a) Interrelacionar la condición clínica del paciente, (b) Contrastar con el frotis sanguíneo, (c) Relacionar con otros exámenes solicitados en el mismo laboratorio, (d) Trazabilidad del control de calidad, (e) Diferencia con exámenes anteriores del paciente. En este caso no debiera diferir para: hemoglobina en 2 g/dL , VCM en 6 fL , HCM en 5 pg , recuento de leucocitos de normal a anormal y de anormal a muy anormal, recuento de plaquetas en 50 %.

2.4.9. Correlación con frotis sanguíneo

El frotis sanguíneo no siempre es solicitado con todos los parámetros que involucran a un Hemograma. Si el profesional citomorfólogo requiere correlacionar los valores hematimétricos y recalificar la fórmula diferencial, es necesario realizar la extensión para corroborar la hipótesis diagnóstica. Las circunstancias en que se debe revisar el frotis son las siguientes: (a) solicitud del recuento sanguíneo por primera vez con valores hematimétricos anormales, (b) semanalmente en pacientes oncológicos, (c) visita de pacientes hematológicos ambulatorios, (d) semanalmente en pacientes en radioterapia o quimioterapia, (e) pacientes neonatos o pediátricos, (f) pacientes con linfadenopatía y hepatoesplenomegalia, (g) cuando el contador hematológico presenta una alerta electrónica (asterisco) en algunos de los estimadores sanguíneos.

2.5. Recomendaciones para la interpretación del hemograma

El subprograma de morfología hematológica del

Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) del Instituto de Salud Pública (ISP) de Chile, ha acordado algunas recomendaciones para la interpretación del hemograma en morfología hematológica de la línea linfoide. Aún no han acordado el consenso para glóbulos rojos, granulocitos y plaquetas.

Respecto a la expresión cuantitativa y su relación con adverbio de cantidad se recomienda: hasta 10% (escaso, leve, discreto, algunos), 10-30% (regular cantidad, moderada cantidad) y >30% (abundantes, relevante).

El porcentaje de células caracterizadas de la serie blanca deben ser contadas respecto de la serie representada. Ejemplo, porcentaje de linfocitos con basofilia leve y citoplasma abundante, respecto del total de linfocitos.

En la tabla 27-4 se indican las características citológicas de consenso, para serie linfoide, establecidas por un grupo de expertos del subprograma de morfología hematológica (PEEC, ISP).

Tabla 27-4. Características citológicas de consenso para serie linfoide para ser utilizadas en informes de hemograma

Tipo de cromatina	Nomenclatura		Cuadros hematológicos
	Consenso	Equivalente	
Cromatina madura	Condensada	Densa, madura, compacta.	Leucemia prolinfocítica T y B, linfoma esplénico de células vellosas, leucemia de células plasmáticas, linfoma centrofolicular, linfoma linfoplasmocítico, LLC, LLG, linfocito mediano, inmunocito.
	Grumosa	Condensada en grumos.	Linfoma esplénico de células vellosas, LLC, LLC de células B
	Homogéneo		Leucemia de las células vellosas , LLA-L1
Cromatina inmadura	Laxa	Reticular, semilaxa, finamente dispersa, fina, inmadura, granular	Linfoma de células grandes, linfoma de manto de células blásticas, síndrome de Richter, LLA-L3, linfoma linfoblástico B.
No recomendados	Picnótico, dispersa, algodonosa, punteada, hipercromática, cuarteada, trazos lineales.		
Tipo de núcleo			
Formas regulares	Redondo	Redondeado, contorno regular borde regular ovalado.	Leucemia de las células vellosas, variante de leucemia de células vellosas, LLA-L3, LLC, LLA-L1, normales, linfocitos reactivos.

Formas irregulares	Hendido	Indentado, hendico, clivado, escotado, fisurado, abollonado lobulado.	Linfoma folicular, LLC atípica, leucemia de las células vellosas, mononucleosis infecciosa, coqueluche.
	Arriñonado		Leucemia de células vellosas.
	Pleomórfico	Bilobulado, foliado, plegado, bifoliado, polimorfo.	Linfomas
	Cerebriforme	Cerebroideo, circonvoluciones.	Síndrome de Sézary
	Multilobulado, en flor	Flower cell, atrebolado, pétalos en flor, polilobulado.	LLTA
	Pseudo pelger-huet	Tipo pelger, pelgeroide	SMD
	Polisegmentado	Policitos, hipersegmentado	SMDC
No recomendados	Ovalado, boca de pez, plegado, serpentino, vesicular, en mitosis (anafase).		Leucemia de células plasmáticas (mitosis)
Tipo de Nucléolo			
Cantidad	Nucléolo único (central o no).		Leucemia prolinfocítica.
	Múltiples nucléolos	Varios nucléolos, muchos nucléolos	LLA-L3, linfoma de células grande.
	1 a 2 nucléolos		LLA-L1.
	3 a 4 nucléolos		LMA, SMD.
Tamaño	Nucléolo pequeño		LLC
	Nucléolo grande		LLA-L2
Visualización	Nucléolo prominente		Linfoma de manto con características blásticas, síndrome de Richter, leucemia prolinfocítica B, linfoma difuso de células grandes B, LLA-L3
	Nucléolo visible	Evidente, notorio.	LLA-L2
	No visible	Ausente, indistinguible, poco evidente (FAB), Escasamente visible.	LLA, LLC, linfoma de manto, linfoma esplénico de células vellosas, linfocito normal, linfocito normal, inmunocito, linfocito reactivo.
No recomendados	Muy pequeño, periférico, no aparente, esbozo, bien delineado, distintivo, poco notorio, uno o más notorios.		
Relación núcleo/ citoplasma			
Relación	Relación N/C alta (*)		LLA-L1, inmunocito
	Relación N/C baja (**)		LLA-L2, infecciones virales
Tipo de citoplasma			
Cantidad	Escaso	Muy escaso	Linfoma linfoplasmocítico, LLC, linfoma de manto.
	Regular cantidad	Moderada cantidad	LLA-L2
	Abundante		Linfocitosis B policlonal, tricoleucemia.
Inclusiones	Granulación tóxica	Granulación patológica	Infecciones bacterianas
	Vacuolado		LLA-L3
	Agranular		SMD
	Hipogranular	Degranulado	SMD, leucemia promielocítica variante
	Cuerpos de döhle		SMD
	Gránulos azurófilos	Gránulos, granulaciones	LLG, leucemia agresiva de células tipo NK.
	bastones de auer		LMA
Forma	Regular		
	Prolongaciones citoplasmáticas	Tipo bello y protrusión, vellosidades, proyecciones finas, proyecciones gruesas e irregulares.	Leucemia de células vellosas, variante de Leucemia de células vellosas, linfoma esplénico de células vellosas.
	Borde irregular	A specto ameboideo, monocitoides, fusiforme	Linfocitos reactivos, tipo Downey

No recomendados	Apenas visible, con protrusiones, amplio		
No consensuados	vellos en los polos		
Posición del núcleo			
Ubicación	Central (no se informa)		Normal, LLA
	Excéntrico		LLG, leucemia de células plasmáticas, Linfocito reactivo.
No recomendados	Centrocitoides		
No consensuados	en mitosis		LLA
Basofilia citoplasmática			
Intensidad	Basofilia leve		LLA-L1
	Basofilia moderada	Linfocitos reactivos	
	Basofilia intensa		Leucemia prolinfocítica T
Ubicación	Reborde hiperbasófilo	Periférica, borde citoplasmático, contorno citoplasmático.	Linfocitos reactivos.
No recomendados	Basófilo, marcadamente basófilo, discreta, profunda.		
No consensuados	Borde hiperbasófilo, citoplasma hiperbasófilo		
Elementos celulares			
Indiferenciado	Restos de gümprecht		LLA, LMA
	Blastos pequeños		
	Blastos medianos		
	Blastos grandes		
Linfoide	Serie normal	Linfocito pequeño 6 – 10 µm	Características normales
	Linfocito mediano	11 – 15 µm	Linfocitosis reactiva
	Linfocito grande	16 – 25 µm	Linfocitosis reactiva
	Linfoblasto		LLA
	Prolinfocito		LLC
	Linfocito reactivo	Activado, virocito, atípico.	Virosis
	Linfocitos tipo downey		Mononucleosis infecciosa, hepatitis, herpes, toxoplasma, citomegalovirus.
	Inmunoblasto		Hanta
	Inmunocito		Hanta
	Plasmoblasto		MM, leucemia linfoplasmocítica
Mieloide	Serie normal	Serie mieloide normal	
	Mieloblasto	15-20 µm	
	Promielocito	16-25 µm	
	Mielocito	12 a 18 µm	
	Juvenil	10 - 15 µm	
	Baciliforme	12-14 µm	
	Neutrófilo	12-14 µm	
	Eosinófilo	12-14 µm	
	Basófilo	10-13 µm	
	Monoblasto		
Promonocito			

	Monocito	15 a 30 μ	
Eritroide	Serie normal	glóbulos rojos normales, 7 a 9 μ .	
	Proeritroblasto	20-25 μ m	
	Eritroblasto basófilo	15-18 μ m	
	Eritroblasto	8 - 12 μ m	
	Policromático		
	Eritroblasto	9-10 μ m	
	Ortocromático		
Trombocitoide	Serie normal	plaquetas normales, 2 a 3 μ m	
	Megacarioblasto	20-45 μ m	
	Promegacariocito	20-80 μ m	
	megacariocito	80 μ m o más	

(*) citoplasma ocupa < 20% de la superficie celular

(**) citoplasma ocupa > 20 % de la superficie celular

LLC, leucemia linfática crónica; LLA, leucemia linfoblástica aguda; LLTA, linfoma leucemia T del adulto; LMC, leucemia mieloide Crónica; SMD, síndromes mielodisplásicos; LLG, linfocito grande granular; MM, mieloma múltiple.

3. ESTUDIO DE MÉDULA ÓSEA

3.1. Mielograma

Además del hemograma, el mielograma es un examen fundamental para realizar diagnóstico de varias patologías hematológicas.

En el nacimiento, la mayoría de los huesos tienen células hematopoyéticas, luego las células adiposas comienzan a poblar la médula ósea y en los adultos solo el esqueleto axial y la parte proximal de los huesos largos mantienen capacidad hematopoyética. La obtención de la muestra de médula ósea, su estudio microscópico, requiere preparación especializada.

El mielograma corresponde a un estudio citológico cuantitativo y cualitativo de la médula ósea, la que es obtenida por aspiración. El mielograma debe ser precedido por el informe de uno o más hemograma(s) que justifiquen su realización.

Indicaciones. Entre las indicaciones del mielograma se incluyen: Bicitopenia o pancitopenia, anemias refractarias, anemia macrocítica, síndromes mieloproliferativos, leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos crónicos.

Lugar de toma de muestra. Considerando que la médula ósea se encuentra preferentemente en los huesos largos, los principales sitios de punción, según edad son los siguientes: (i) en niños menores de 2 años se utiliza preferentemente el tercio superior de la cara interna de la tibia y la espina iliaca pósterio-

superior y (ii) en niños mayores de 2 años, jóvenes y adultos se prefiere el esternón a la altura del segundo espacio intercostal y alternativamente las espinas iliacas antero y pósterio-superior, o apófisis espinosa de las vértebras lumbares 1^{era} a 4^{ta}.

Punción, aspirado y preparación de los frotis.

En la punción se usa material estéril; se desinfecta la zona a puncionar, luego se infiltra la piel y el periostio con un anestésico local (Ej: lidocaina al 2%). Posteriormente se inserta el trocar para mielograma; se retira el estilete y con una jeringa se aspira aproximadamente 0.5 mL. El contenido se vierte en un reservorio con solución de EDTA para evitar la agregación de las plaquetas y coagulación sanguínea; también puede colocarse directamente en varios portaobjetos. Luego se procede a preparar los frotis y teñirlos como se describió para sangre periférica. De ser necesario se separa una fracción de la muestra para análisis por citometría de flujo y/o estudio citogenético.

Informe. El informe del mielograma incluye aspectos cuantitativos y citológicos. El estudio cuantitativo incluye una estimación de la celularidad, cantidad de megacariocitos, recuento diferencial de la serie granulocítica, recuento total de serie eritroblástica y serie agranulocítica. El estudio citológico del mielograma se realiza con aumento menor (10x) e inmersión (100x). En el primer caso, el propósito es estimar la densidad celular (celularidad) y observar la cantidad de megacariocitos y eventual presencia de grupos de células metastásicas. La celularidad se debe estimar en base a la proporción de células

hematopoyéticas versus las células adiposas. Un aspecto importante a observar con aumento menor es determinar si la celularidad es heterogénea (diversidad de líneas celulares y estadios madurativos) u homogénea (predominio de un solo tipo de células, Ej: leucemias agudas). La celularidad es diferente según la edad del paciente, así en niños la médula contiene pequeñas cantidades de grasa y en adultos mayores puede llegar a un 50-70%. La observación con aumento de inmersión

permite realizar el recuento diferencial de células y el estudio citológico de las diferentes líneas celulares (serie granulocítica, con estadios madurativos; serie agranulocítica y serie eritroblástica). El recuento diferencial se realiza en > 300 células nucleadas. En adultos la proporción mieloide:eritroide (M:E) es de 1.5-3.3. Los valores normales se muestran en la tabla 27-2.

Tabla 27-4. Valores normales en médula ósea

	Rango (%)
Neutrófilos totales	49.2 – 65
Mieloblastos	0.2 – 1.5
Promielocitos	2.1 – 4.1
Mielocitos	8.2 – 15.7
Juveniles	9.6 – 27.6
Baciliformes	9.5 – 15.3
Segmentados	6.0 – 12
Eosinófilos totales	1.2 – 5.3
Mielocitos	0.2 – 1.3
Juveniles	0.4 – 2.2
Baciliformes	0.2 – 2.4
Segmentados	0 – 1.3
Basófilos y mastocitos	0 – 0.2
Serie Eritrocitaria total	18.4 – 33.8
Proeritroblastos	0.2 – 1.3
Eritroblasto Basófilo	0.5 – 2.4
Eritroblasto Policromático	17.9 – 29.2
Eritroblasto Ortocromático	0.4 – 4.6
Linfocitos	11.1 – 23.2
Células plasmáticas	0.4 – 3.9
Monocitos	0 – 0.8
Megacariocitos	0 – 0.4
Células reticulares	0 – 0.9
Razón mieloide:eritroide	1.5 - 3.3

El informe del mielograma debe incluir: (a) celularidad, (b) megacariocitos, (c) recuento diferencial (mieloblastos, promielocitos, mielocitos, juveniles, baciliformes y segmentados neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas y eritroblastos), (d) indicar el sitio de punción y cantidad de material medular obtenido, (e) breve comentario sobre los hallazgos cuantitativos y citológicos de cada serie celular (serie granulocítica, serie agranulocítica, serie eritroblástica y serie megacariocítica); y (f) conclusión.

La muestra de mielograma se obtiene por aspirado medular. Éste no permite informar sobre la estructura medular, ya que este tejido se disocia durante la aspiración. El mielograma proporciona mayor información sobre la citología de las células en estudio.

Antecedentes sobre las características del mielograma en las diferentes patologías hematológicas se describen en los respectivos capítulos en que éstas son desarrolladas. Las características de la biopsia de médula ósea en

patologías hematológicas son descritas a continuación.

3.2. Biopsia de médula ósea

3.2.1. Aspectos generales

La biopsia de médula ósea corresponde al estudio histológico del tejido medular hematopoyético obtenido mediante punción ósea dirigida, donde se analiza cuantitativa y cualitativamente las series celulares mieloides, linfoides y megacariocítica, las características generales del estroma, la estructura del hueso que lo contiene y, eventualmente, se identifican fenómenos inflamatorios específicos e inespecíficos y procesos infiltrativos exógenos o metastásicos. La biopsia medular proporciona información respecto a la densidad, topografía y constitución celular del tejido hematopoyético. En relación a toma de muestra y procesamiento técnico, ver capítulo 26.

La tinción histológica de rutina, en el procesamiento habitual de la muestra de médula ósea, es la hematoxilina-eosina (tinción corriente). Sin embargo, en caso necesario, se pueden efectuar tinciones histoquímicas

especiales, tales como: Van Gieson (fibras de colágeno), Gomori (fibras de reticulina), Azul de Prusia (hemosiderina), Rojo Congo (amiloides), Grocott (hongos), Zielhl Neelsen (bacilos ácido alcohol resistentes), PAS (mucosustancias) y Giemsa (como complemento de la tinción Hematoxilina-eosina). De una muestra incluida en parafina se pueden obtener cortes para realizar técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales, particularmente útiles para: definir estirpes celulares y tipificación de neoplasias (citoqueratinas, vimentina, antígeno leucocitario común, etc.), determinar clonalidad de infiltrados linfoides (CD3, CD/20, kappa, lambda, etc.), identificar marcadores tumorales, oncoproteínas y factores de proliferación celular (CEA, alfafetoproteína, p-53, Ki-67, etc.) e incluso, reconocer algunos microorganismos (citomegalovirus, bacilo de Koch, pneumocistis carinii, virus Epstein Barr, etc.).

Para optimizar el rendimiento del examen biopsico e incrementar la certeza diagnóstica del patólogo, los hallazgos histológicos siempre deben correlacionarse con el cuadro clínico del paciente y los resultados del hemograma y mielograma. Las indicaciones de biopsia de médula ósea se indican en la tabla 27-5.

Tabla 27-4. Indicaciones de la biopsia de médula ósea por aguja

<ul style="list-style-type: none">• Para precisar y/o definir diagnóstico, cuando existe sospecha clínica de las siguientes condiciones:<ul style="list-style-type: none">Procesos mieloproliferativosProcesos linfoproliferativosMieloma de células plasmáticasAnemia aplásticaMetástasisAmiloidosisEnfermedades granulomatosas crónicasEnfermedades metabólicas del huesoEnfermedades de depósitoAlteraciones de los depósitos de hierro• Para etapificar y evaluar respuesta a tratamiento en linfomas y leucemias.• Cuando, habiendo realizado dos o más punciones para mielograma, no se obtuvo muestra o ésta fue insuficiente para poder realizar un informe adecuado.

Cuando se estudia la médula ósea mediante biopsia por punción con aguja, se deben evaluar los siguientes parámetros: (a) celularidad, (b) relación Mieloide/Eritroide, (c) maduración de series mieloide y eritroide, (d) número de

megacariocitos, (e) linfopoyesis, (f) porcentaje de eosinófilos, células plasmáticas y mastocitos, (g) presencia de otras células: histiocitos, metastásicas, (h) contenido de hemosiderina, (i) alteraciones del estroma: fibrosis, necrosis,

granulomas, y (f) anormalidades óseas.

3.2.2. Médula ósea normal

La médula ósea es una estructura mesenquimática compleja, constituida por precursores hematopoyéticos y elementos estromales heterogéneos. Las células hematopoyéticas, incluyendo granulocitos, monocitos, eritrocitos, linfocitos, plaquetas e histiocitos, son derivadas de células medulares multipotenciales (“Stem-cells”). Los elementos de sostén están representados por células estromales (adipocitos, fibroblastos y células reticulares), vasos sanguíneos, fibras nerviosas, pequeñas cantidades de reticulina, matriz extracelular y citoquinas de regulación. Así constituida, la médula hematopoyética se encuentra ocupando los espacios interóseos o intertrabeculares del hueso. El tejido óseo que la contiene, con su estructura de matriz calcificada y revestimiento osteoblástico y osteoclástico se organiza en hueso compacto y esponjoso.

a) Distribución de la médula hematopoyética y celularidad

La médula ósea puede ser “médula roja” conteniendo células hematopoyéticas o “médula amarilla” representada predominantemente por tejido adiposo. La distribución de la médula hematopoyética es dependiente de la edad. En el neonato, las cavidades medulares de la mayoría de los huesos están casi completamente ocupadas por células hematopoyéticas proliferantes y, a medida que el individuo crece, la médula roja se contrae centrípetamente, siendo reemplazada por médula adiposa. En la vida adulta, la médula hematopoyética está confinada principalmente al esqueleto axial, esternón y pelvis. Además, en respuesta a las demandas, el volumen medular ocupado por tejido hematopoyético se expande.

Celularidad. La celularidad medular se define como el porcentaje de médula ósea ocupado por células hematopoyéticas.

Porcentaje de celularidad = $\frac{\text{área medular total}}{\text{área ocupada por grasa}}$

La celularidad de la médula ósea depende de la edad del paciente, localización en el esqueleto (sitio de toma de la muestra), tamaño del espécimen tisular obtenido y, en menor medida, de factores técnicos en el procesamiento

histológico. La estimación y determinación de la celularidad en la biopsia de médula ósea puede realizarse subjetivamente, o bien mediante métodos más objetivos como histomorfometría o análisis computarizado.

En relación a la edad, la médula ósea de los recién nacidos es extremadamente celular (90-100%, con escasas células adiposas) y disminuye aproximadamente 10% por cada década de vida. Los individuos menores de diez años tienen una celularidad alrededor de un 80%; esta cifra baja al 50% hacia los treinta años, manteniéndose relativamente estable hasta los setenta años, en que disminuye a un 30%. El descenso del porcentaje de cavidad medular ocupado por células hematopoyéticas es consecuencia tanto de una disminución verdadera en la cantidad de tejido hematopoyético como también de una pérdida de sustancia ósea y su reemplazo por tejido adiposo en los espacios medulares.

En cuanto a la localización en el esqueleto, la cresta ilíaca contiene menos tejido hematopoyético que el esternón, pero más que las costillas. La celularidad de las vértebras lumbares es aproximadamente 10% mayor que la celularidad de la cresta ilíaca. Las vértebras son también más celulares que el esternón. El tamaño de la muestra es importante ya que muchas veces en un mismo espécimen de biopsia hay áreas hipocelulares y áreas de celularidad conservada, por lo cual se requiere una muestra representativa (óptimamente 1,5 cm de longitud y sin alteraciones dependientes de la mantención y del traslado de la muestra). Con respecto al procesamiento técnico, las muestras sometidas a descalcificación e inclusión en parafina evidencian una celularidad aproximadamente 5% más baja que aquellas embebidas en resinas plásticas.

b) Células hematopoyéticas normales

La médula hematopoyética normal consiste en una población heterogénea de células en diferentes estados de diferenciación y maduración, mientras la sangre periférica contiene solamente células en estados de maduración terminal.

Una “Stem-cell” multipotencial da origen a todos los tipos de células mieloides: granulocitos y sus precursores, eritrocitos y sus precursores, macrófagos/monocitos y sus precursores, megacariocitos y sus precursores y mastocitos (ver capítulos 1 y 2).

La médula ósea normal contiene además, en adición a las células mieloides, pequeñas cantidades de células linfoides (incluyendo células plasmáticas) y células estromales, como ya se mencionó anteriormente.

A continuación, para poder comprender e interpretar los procesos patológicos primarios y secundarios que afectan la médula, se describirán las **características morfológicas normales** de cada una de las líneas celulares de diferenciación hematopoyética en la **Biopsia de médula ósea**, recordando que las “stem-cells” no son reconocibles histológicamente.

Serie eritroide

El término “eritroblasto” incluye todos los precursores eritroides reconocibles, mientras el término “normoblasto” se aplica cuando la eritropoyesis es normoblástica. Durante el proceso de maduración, la relación núcleo / citoplasma disminuye, la cromatina nuclear se hace más densa y picnótica, el nucléolo aparece menos prominente, el citoplasma acumula hemoglobina (va perdiendo su basofilia) y finalmente la célula madura pierde su núcleo. Los eritroblastos se desarrollan en estrecha proximidad a un macrófago, creando imágenes conocidas como “islas eritroides”, correspondientes a varias generaciones concéntricas de eritroblastos asociados a un macrófago, donde las células más cercanas al macrófago son más inmaduras que las periféricas. La eritropoyesis ocurre relativamente cercana a los sinusoides medulares. En las secciones histológicas, los precursores inmaduros son menos numerosos que los eritroblastos tardíos.

Existen algunas características útiles para distinguir precursores eritroides de otras células hematopoyéticas, tales como: (a) “islas eritroides” conteniendo precursores de distinto tamaño y diferente maduración; (b) condensación cromatínica homogénea en eritroblastos tardíos, a diferencia del aspecto granular de la cromatina en células linfoides; (c) distribución cohesiva de los eritroblastos; (d) forma redondeada de los núcleos y (e) en eritroblastos tempranos, basofilia citoplásmica intensa con una pequeña zona de tinción negativa adyacente al núcleo (Golgi).

En los casos de rápida regeneración medular o cuando la eritropoyesis es anormal (como ocurre por ejemplo en la mielodisplasia), se observa islas eritroblásticas con precursores en

un mismo estado de maduración (células inmaduras).

Serie granulocítica

La serie granulocítica incluye neutrófilos, eosinófilos y línea basófilo / mastocito. Existen al menos cuatro generaciones de células identificables entre el precursor granulocito-monocito (no reconocible morfológicamente) y el granulocito maduro: mieloblasto, promielocito, mielocito y metamielocito. Durante el proceso de maduración, la relación núcleo / citoplasma disminuye (> del 20 % de citoplasma), la cromatina nuclear se hace más densa y gruesa, los nucléolos aparecen menos prominentes y el citoplasma acumula gránulos lisosomales (primarios azurófilos) que más tarde se tornan específicos (gránulos secundarios).

Los mieloblastos son los primeros precursores granulocíticos identificables histológicamente. Se caracterizan por un tamaño celular similar a un proeritroblasto (15-20 micrones), pero de forma más irregular, tienen un núcleo grande redondo u oval localizado centralmente, cromatina fina dispersa y varios nucléolos. Aunque pueden contener gránulos citoplásmicos (tipos II y III), estas células generalmente se definen como carentes de granulación. En el contexto de mielopoyesis anormal (leucemia mieloide aguda y síndromes mielodisplásticos), células primitivas con gránulos pueden ser aceptadas como mieloblastos. En la médula ósea normal, los mieloblastos son sobrepasados en número por los promielocitos y mielocitos.

Los promielocitos son algo más grandes que su célula antecesora (16-25 micrones), su núcleo es excéntrico, a veces levemente indentado, el citoplasma es más amplio, contiene abundantes granulaciones azurófilas y muestra un área pálida perinuclear (Golgi). Los mieloblastos son HLA-DR+ y pueden expresar CD-34, mientras que los promielocitos son negativos para HLA-DR y CD-34.

Los mielocitos (12-18 micrones) y metamielocitos (10-15 micrones) son células más pequeñas, con citoplasma abundante, cromatina densa, nucléolo indistinguible, núcleo progresivamente indentado y con granulaciones específicas. Células en banda (baciliforme) y células segmentadas (polimorfonucleares) representan el estado de maduración terminal de la serie granulocítica. En el corte histológico teñido con Hematoxilina-eosina, los eosinófilos

muestran núcleo bilobulado y gránulos eosinofílicos grandes y refráctiles, los neutrófilos evidencian polisegmentación nuclear y gránulos suavemente eosinofílicos; los gránulos basofílicos son solubles en agua, por lo tanto los basófilos maduros no son identificables en especímenes de biopsia procesados en forma habitual (fijación acuosa).

Con respecto a la disposición histológica de los precursores granulocíticos, los mieloblastos se encuentran en pequeño número principalmente a nivel paratrabecular o cercano a las arteriolas. A medida que se produce la maduración, los precursores se ubican más profundamente en los cordones hematopoyéticos, pero lejos de los sinusoides. Cuando alcanzan el estado de metamielocito, se desplazan hacia los sinusoides, donde los granulocitos segmentados cruzan las paredes vasculares para entrar a la circulación.

Las células cebadas (mastocitos), íntimamente relacionadas con los basófilos, se diferencian de éstos por sus características nucleares y la disposición de sus gránulos. Los mastocitos son raros de ver en la médula ósea normal y difíciles de reconocer en las secciones histológicas teñidas con Hematoxilina-eosina; sin embargo, son fácilmente identificables con tinción de Giemsa. Se distribuyen irregularmente en la cavidad medular, siendo más numerosos cerca del endostio, en relación con la adventicia de pequeños vasos sanguíneos y en la periferia de agregados linfoides.

Serie monocítica

Monocitos y macrófagos se derivan de un precursor común con los granulocitos. Los monoblastos son células más grandes que los mieloblastos y, junto a los promonocitos, son difíciles de identificar en los cortes histológicos. Los promonocitos maduran a monocitos, los cuales migran hacia la sangre periférica. Los monocitos se reconocen histológicamente como células de núcleo lobulado más grandes que los neutrófilos y, en individuos normales, sólo pequeño número de ellos se distribuye al azar en la médula. Los monocitos maduran a macrófagos tanto en la médula como en otros tejidos.

Los macrófagos se identifican como células grandes de distribución irregular en la médula ósea, presentan un núcleo pequeño (a veces no visible según el plano de corte) y abundante citoplasma, en ocasiones con detritus de

fagocitosis. Algunos macrófagos se encuentran asociados a eritroblastos, células plasmáticas o nódulos linfoides.

Serie megacariocítica

Los megacariocitos (grupos II y III) se derivan de un proceso madurativo de endomitosis continua de los megacarioblastos (megacariocitos grupo I). Los megacariocitos son las células más grandes de la médula ósea normal, tienen citoplasma abundante y núcleo lobulado. Se encuentran en los cortes histológicos asociados con los sinusoides y distantes de las trabéculas óseas, a veces muestran figuras mitóticas y, en ocasiones, pierden su citoplasma (“núcleo desnudo”). Es importante recordar que los megacariocitos individuales son muy grandes (30-160 micrones), por lo cual un sólo plano de corte no permite una adecuada valoración del tamaño celular y del grado de lobulación nuclear. Morfológicamente, los megacariocitos también pueden evidenciar imágenes de emperipolesis (seudofagocitosis de otras células hematopoyéticas). Cuando la hematopoyesis es normal, los megacariocitos no forman grupos de más de 2 ó 3 células; así, grandes agregados de megacariocitos sólo se observan bajo condiciones anormales (médula regenerativa, post-quimioterapia, trasplante de médula ósea). Junto a esto, la disposición paratrabecular de estas células sólo se identifica en hematopoyesis anormal. La cuantificación de megacariocitos puede realizarse mediante conteo por unidad de área o subjetivamente (normales, disminuidos o aumentados en número).

Linfopoyesis

Los linfocitos, similar a otras células hematopoyéticas, se derivan de “Stem-cell” multipotenciales. La médula ósea contiene células maduras y células precursoras de ambas líneas linfoides (T y B). Las primeras células linfoides identificables morfológicamente son los linfoblastos, caracterizados por elevada relación núcleo/citoplasma (< de 20 % de citoplasma), cromatina dispersa, núcleo redondo u oval, uno a dos nucléolos y fino margen citoplásmico basofílico no granular. Los linfocitos maduros son levemente más grandes que los eritrocitos y se caracterizan por escaso citoplasma, núcleo redondeado, cromatina densa y nucléolo inconspicuo. Histológicamente, la médula ósea normal contiene linfocitos intersticiales dispersos y, a veces, pequeños agregados o folículos

linfocitos. Aproximadamente 10% de las células medulares son linfocitos, con una relación LT/LB de 6:1. Los linfocitos suelen concentrarse alrededor de vasos arteriales, cercano al centro de los cordones hematopoyéticos.

Células plasmáticas

Los plasmocitos representan el producto madurativo terminal de la línea linfocítica B. Estas células se caracterizan por un núcleo excéntrico de cromatina granular (“en rueda de carreta”) y abundante citoplasma basofílico con una prominente zona Golgi paranuclear. La médula ósea normal contiene células plasmáticas intersticiales dispersas, preferentemente localizadas pericapilares y, a veces, asociadas con macrófagos.

c) Composición celular de la médula ósea y relación mieloide/eritroide

El término mieloide puede ser usado con dos significados diferentes. Primero, para referirse a todas las células derivadas de la “Stem-cell” mieloide (incluyendo las series eritroide, granulocítica, monocítica y megacariocítica); o bien, para indicar solamente la línea granulocítica/monocítica (como en la expresión mieloide-eritroide).

Histológicamente, la médula ósea normal contiene, en promedio 60% de células granulocíticas, 20% de células eritroides, 10% de linfocitos, 1-4% de células plasmáticas y pequeños porcentajes de otras células hematopoyéticas, siendo el conteo de megacariocitos de 7-15 células por mm².

La relación mieloide/eritroide (M/E) normal es de 1,5/1 a 3/1. Cuando la biopsia es celular y la relación M/E es menor de 1,5/1 se habla de hiperplasia eritroide. Las causas más frecuentes son: anemia hemolítica, anemia megaloblástica, hemorragia crónica, policitemia, eritroleucemia, etc. La hipoplasia eritroide se encuentra en casos de toxicidad por drogas, infecciones virales, irradiación, hipoplasia idiopática y otras.

3.2.3. Alteraciones estructurales y anomalías morfológicas en la biopsia de médula ósea.

a) Alteraciones generales

Desviaciones patológicas de la celularidad

a) Médula ósea hipocelular. Exceptuando edad avanzada, se considera hipocelular cuando la

médula tiene una celularidad menor a 20-25%.

b) Médula ósea hiper celular. Exceptuando individuos menores de diez años, se considera hiper celular cuando la médula tiene una celularidad mayor a 75-80%.

Puede haber disminución o proliferación de algunas o todas las series celulares.

Causas de médula ósea hipocelular: Idiopática, congénita, exposición a tóxicos, medicamentos, irradiación, anemia refractaria, infecciones crónicas, mielofibrosis, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), otras.

Causas de médula ósea hiper celular: leucemias, reacciones leucemoides, síndromes mieloproliferativos, procesos linfoproliferativos, síndromes mielodisplásticos, anemia hemolítica, otras.

Fibrosis

La fibrosis de la médula ósea es un fenómeno relativamente común en asociación con una amplia variedad de condiciones patológicas. Puede ser de dos tipos: aumento del Reticulo y aumento del colágeno (detectada mediante tinción de reticulina y tinción tricrómica, respectivamente). La fibrosis puede aparecer como un proceso difuso, por ejemplo en la mielofibrosis primaria, o bien ser focal y en parches, como en las metástasis. Su cuantificación se gradúa de 0 a 4 +. La fibrosis colágena representa una etapa tardía de mayor compromiso. La mayoría de los individuos hematológicamente normales tiene una reticulina de grado 0 a 1, aunque ocasionalmente algunos sujetos pueden tener un grado 2. Los principales procesos patológicos que evidencian fibrosis medular son: Síndromes mieloproliferativos crónicos, metástasis de carcinoma, linfoma de Hodgkin, granulomas y enfermedad renal crónica.

Necrosis

Las condiciones patológicas más frecuentemente asociadas con necrosis de la médula ósea son: leucemias, metástasis, infecciones por bacterias Gram negativas, tuberculosis y efecto quimioterápico. La causa primaria de la necrosis medular es la isquemia, de tal forma que las secciones histológicas muestran necrosis coagulativa o fibrinoide.

Granulomas

Los granulomas son colecciones de histiocitos epitelioides, con o sin células gigantes multinucleadas, con o sin necrosis, frecuentemente rodeados por linfocitos y plasmocitos. Las principales causas de granulomas en la médula son: tuberculosis miliar, sarcoidosis, brucelosis, infecciones fúngicas, mononucleosis infecciosa y linfomas. Ciertas condiciones pueden simular granulomas, tales como: metástasis de carcinoma, linfoma de células grandes y agregados de mastocitos.

Amiloidosis

El amiloide es un depósito hialino amorfo extracelular que puede encontrarse en casos de: amiloidosis primaria, enfermedad inflamatoria crónica y gammapatías monoclonales. La tinción de Rojo Congo es muy útil para su identificación histológica.

Metástasis

Las lesiones metastásicas frecuentemente se asocian con grados variables de fibrosis y pueden evidenciar áreas de necrosis. Habitualmente son osteolíticas pero puede haber reacción osteoblástica, especialmente en casos de carcinoma prostático, mamario o renal. La extensión del compromiso medular metastásico fluctúa entre mínima infiltración focal (micrometástasis) a un completo reemplazo de la médula ósea por células tumorales. El estudio inmunohistoquímico ayuda a detectar y tipificar estas lesiones. La biopsia es más efectiva que el mielograma en la detección de metástasis.

Transformación gelatinosa

Consiste en la acumulación medular de ácido hialurónico (material gelatinoso), frecuentemente asociado con involución grasa e hipoplasia de médula ósea. Este fenómeno puede ser confundido con necrosis, amiloidosis o edema. El material gelatinoso reacciona positivamente con las tinciones de PAS y Alcian Blue.

Cambios post-quimioterapia e irradiación

Consisten en acentuada hipocelularidad, edema y dilatación vascular, necrosis, fibrosis variable e incremento del número de macrófagos.

Depósitos de hierro

El hierro es almacenado en macrófagos de la médula ósea como hemosiderina (agregados insolubles) y menos abundantemente como ferritina (soluble). La tinción histoquímica de Perls es una de las más utilizadas para identificar hemosiderina. Los depósitos de hierro se cuantifican como ausentes, disminuidos, normales o aumentados. Las enfermedades asociadas con aumento de los depósitos de hierro son: anemias hemolíticas y megaloblásticas, anemia de las enfermedades crónicas, anemia sideroblástica, hemosiderosis y hemocromatosis. La disminución de los depósitos de hierro puede observarse asociada con la HPN.

b) Biopsia de médula ósea en enfermedades hematológicas específicas

Síndromes mielodisplásticos

Celularidad: aumentada; ocasionalmente puede ser normo o hipocelular.

Serie eritroide: morfología anormal, principalmente cambios megaloblásticos y, en frotis, presencia de sideroblastos en anillo.

Serie granulocítica: aumento de formas inmaduras (porcentaje de blastos inferior al 5%), hiper o hipogranulación citoplásmica, hiper o hiposegmentación nuclear.

Megacariocitos: aumentados, presencia de formas atípicas, micromegacariocitos.

Alteraciones de la topografía celular. Fundamentalmente presencia de agregados de mieloblastos y promielocitos en el centro del tejido medular, lejos de estructuras vasculares y de la superficie endostal del hueso trabecular (Localización Anormal de Precursores Inmaduros-ALIP). Además, se observa disposición peritrabecular de células eritroides y megacariocitos.

Cambios en el estroma. Fibrosis focal o difusa, presencia de edema y células inflamatorias.

Cambios mielodisplásticos, similares a los síndromes mielodisplásticos, han sido observados en varias condiciones tales como endocrinopatía, enfermedades autoinmunes y VIH – SIDA. Sin embargo, estos cambios displásticos no son clonales y por lo tanto no se asocian con alteraciones citogenéticas.

La clasificación morfológica de los síndromes mielodisplásicos se basa fundamentalmente en el porcentaje de blastos en la médula y sangre periférica; tipo y grado de displasia; presencia de sideroblastos en anillo.

Leucemia mieloide aguda

La médula ósea es hiper celular, con un 20 % o más de blastos de linaje no linfóide. Con tinción de Giemsa se evidencian los blastos, ya que el nucléolo se hace prominente y el citoplasma se observa celeste. No se identifican elementos maduros de la serie blanca. Los promielocitos anormales en la leucemia promielocítica aguda, los monoblastos y promonocitos en la leucemia monocítica aguda y los megacarioblastos en la leucemia megacariocítica aguda son considerados equivalentes blásticos para los propósitos de establecer un diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda. Los eritroblastos no son incluidos en el conteo de blastos.

Los megacariocitos y la serie roja están marcadamente disminuidos. Ocasionalmente, la médula puede ser normo o hipocelular pero, hay incremento de los blastos, sin evidencia de maduración de la serie blanca.

Enfermedades mieloproliferativas crónicas

En las enfermedades mieloproliferativas crónicas (leucemia mieloide crónica, mielofibrosis idiopática crónica, policitemia vera, trombocitemia esencial) la médula es fundamentalmente hiper celular, con marcado aumento del retículo y, en algunos casos fibrosis colágena. Los megacariocitos están aumentados y pueden ser normotípicos o atípicos dependiendo de la entidad específica.

Leucemia mieloide crónica (granulocítica). La biopsia de médula ósea es hiper celular debido principalmente a incremento de neutrófilos y sus precursores. Se observa maduración de la serie mieloide con numerosos granulocitos segmentados. La relación M/E es de 10:1 o más. También están aumentadas las formas inmaduras de la serie blanca y, en algunos casos, el revestimiento paratrabecular formado por precursores granulocíticos inmaduros alcanza un espesor de 5-10 células (en contraste a los 2-3 estratos celulares observados normalmente). Sin embargo, el conteo de blastos es menor a 10% (más de 10% indica transformación a una fase acelerada). Los eosinófilos pueden estar sustancialmente incrementados en algunos pacientes. Los megacariocitos están

frecuentemente aumentados, pero pueden ser normales en número o estar levemente disminuidos. La morfología de los megacariocitos habitualmente es normotípica, pero muchas veces son más pequeños y con núcleo hipolobulado. La serie eritroide está disminuida.

Mielofibrosis idiopática crónica. Se caracteriza morfológicamente por proliferación de células granulocíticas y megacariocíticas maduras e inmaduras en la médula ósea, asociado a fibrosis medular de grado variable. Así, los cambios histológicos varían desde una panhiperplasia hasta un cuadro de reemplazo de los elementos medulares por fibrosis. En las fases tempranas de la enfermedad (estado prefibrótico), la médula ósea es hiper celular, con significativo aumento del número de neutrófilos y abundantes megacariocitos marcadamente atípicos. Aunque existe una cierta desviación a izquierda de la granulopoyesis, los "Clusters" de mieloblastos no son significativos (menos de 5-10%). Los megacariocitos atípicos se disponen en la vecindad de trabéculas óseas y sinusoides, la fibrosis reticulínica es mínima o ausente. En la fase tardía (estado fibrótico), se observa prominente fibrosis reticulínica y colágena con marcada hipocelularidad representada por aislados focos de células mieloides inmaduras y megacariocitos atípicos. Característicamente, se observa aumentado número y dilatación de sinusoides con hematopoyesis intrasinusoidal. Raras veces, en esta fase, la médula puede ser hiper o normocelular. La serie eritroide está muy disminuida.

Policitemia vera. La celularidad medular está aumentada (rango de 35-100%), con una proliferación eritroide, megacariocítica y granulocítica (pan mielosis). La relación M/E es de 1:1 en favor de la serie roja. Los megacariocitos son atípicos, la eritropoyesis es normoblástica y la granulopoyesis es morfológicamente normal. El porcentaje de mieloblastos no está aumentado. La combinación de hiperplasia eritroide y abundantes megacariocitos atípicos es característica. Los depósitos de hemosiderina están disminuidos o ausentes y el retículo está siempre aumentado. En la policitemia secundaria, la hiperplasia eritroide se acompaña de series granulocítica y megacariocítica normales.

Trombocitemia esencial. La médula ósea es moderadamente hiper celular, caracterizada por

una proliferación de megacariocitos maduros, grandes a gigantes y levemente atípicos. Las series granulocítica y eritroide están habitualmente disminuidas y no presentan alteraciones de maduración.

Enfermedades linfoproliferativas de linaje T y B

Linfoma linfoblástico/Leucemia linfoblástica aguda (FAB - L1, L2 y L3). La médula ósea se encuentra extensamente infiltrada por linfoblastos en una distribución difusa o intersticial, infrecuentemente en parches o focal, acompañándose de una marcada reducción en la hematopoyesis normal. Los blastos linfoides son células inmaduras habitualmente monomorfas, de núcleo ovoide vesiculoso, cromatina fina, nucléolo prominente y escaso citoplasma. Para su correcta tipificación es necesario el mielograma. La tinción del Ácido Peryódico Schiff (PAS) es la técnica histocitoquímica más comúnmente utilizada como complemento diagnóstico de esta neoplasia, sin ser específica. Los linfoblastos por lo general evidencian gránulos citoplásmicos PAS positivos. El estudio inmunofenotípico es muy importante para el correcto diagnóstico entre los marcadores más estudiados se encuentran CD3, CD5, CD10, CD19, IgC, IgS y TdT (ver capítulos 14 y 30)

Leucemia linfocítica crónica/ Linfoma de células maduras. Las Leucemias Linfoides Crónicas son el resultado de una proliferación monoclonal de linfocitos de aspecto maduro. La mayoría de estas leucemias son del tipo B. Los linfocitos neoplásicos son típicamente pequeños, con escaso citoplasma, núcleo redondo, cromatina densa y nucléolo inconspicuo. Los prolinfocitos son un componente frecuente, pero no exceden el 10% de las células tumorales. El compromiso medular es usualmente intersticial o difuso, pero un "pattern" nodular también puede ser observado. La infiltración linfomatosa de la médula ósea habitualmente se presenta en forma de nódulos en las áreas paratrabeculares. Sin embargo, en ocasiones el compromiso es difuso (como se observa en las leucemias), en estas circunstancias, el diagnóstico diferencial entre leucemia y linfoma debe hacerse clínicamente. La biopsia es un excelente método para detectar compromiso medular por linfoma, ésta no debe utilizarse para la subclasificación histológica de las neoplasias linfoides, en estos casos es menester realizar biopsia de un linfonodo comprometido. Los linfocitos maduros expresan los siguientes marcadores

de anticuerpos monoclonales: CD19 +, CD20 +, CD 22 débil, CD23 +, CD38 -/+ y CD5 +, además expresión de IgS con monoclonalidad.

Tricoleucemia. Es una neoplasia de células linfoides pequeñas de tipo B que compromete médula ósea y sangre periférica. Las células "vellosas" son de tamaño pequeño a mediano con núcleo ovoide, redondo o indentado, cromatina dispersa homogénea (menos densa que la de linfocitos normales), ausencia de nucléolo y citoplasma relativamente abundante con bordes celulares prominentes y halo claro perinuclear (imagen en "huevo frito"). El "pattern" de infiltración medular es difuso o intersticial, las células se disponen separadas entre sí, rodeadas por una fina pero bien constituida malla de reticulina. En ocasiones, el compromiso de la médula puede ser en parches, pero sin configurar agregados nodulares. La médula es normo o hiper celular. Los tricoleucocitos expresan los siguientes marcadores de anticuerpos monoclonales (inmunofenotipificación): CD19 intenso, CD22, CD79b y FMC-7 medio, además CD11c, CD25 y CD103. La expresión IgS es asimismo intensa. Son CD5 y CD23 negativos.

Neoplasias de células plasmáticas (Mieloma múltiple). El Mieloma de células plasmáticas corresponde a una proliferación monoclonal neoplásica de plasmocitos y linfocitos plasmacitoides con compromiso multifocal de la médula ósea. El diagnóstico diferencial con otras neoplasias de células plasmáticas debe hacerse mediante una combinación de hallazgos patológicos, radiológicos, clínicos y de laboratorio. En la médula ósea, más de un 5% de células plasmáticas se considera plasmacitosis; en estos casos, los plasmocitos son morfológicamente normales y se ubican de preferencia en los espacios perivascularares. Como criterio mayor, para el diagnóstico de Mieloma se requiere más de un 30% de células plasmáticas. Las células neoplásicas muestran grados variables de displasia, desde células plasmáticas morfológicamente muy similares a las normales, hasta células plasmacitoides atípicas y multinucleadas o francamente blásticas. El patrón de infiltración medular puede ser: a) intersticial; b) nodular o en bandas gruesas; y c) difuso (médula completamente reemplazada). Pueden observarse, además, cuerpos eosinofílicos de Russell (intracitoplasmáticos) y de Dutcher (intranucleares). Alteraciones adicionales incluyen: aumento del retículo, infiltrados linfocitos, hipervascularización y, a veces,

presencia de granulomas. Los cambios óseos descritos son osteoporosis difusa y lesiones líticas. La plasmacitosis medular en el rango de 10-30%, como criterio diagnóstico menor, debe asociarse con otros hallazgos (radiológicos y clínicos) para confirmar Mieloma. Con propósitos pronósticos, un informe de biopsia medular con diagnóstico de Mieloma debe incluir: (a) Extensión de la infiltración (estado histológico), (b) patrón de infiltración y (c) características citológicas de las células neoplásicas (grado histológico). Un importante número de enfermedades se asocia con plasmacitosis medular reactiva; por ejemplo, síndromes autoinmunes, hipergammaglobulinemia, cirrosis hepática, etc. Las células plasmáticas expresan el siguiente inmunofenotipo: CD38, antígeno de células plasmáticas, una minoría expresa CD10, HLA-DR y CD20.

Linfoma de Hodgkin. Se describen cambios reactivos de la médula ósea asociados con Enfermedad de Hodgkin linfoganglionar, tales como: hiper celularidad (hiperplasia granulocítica), aumento de macrófagos y células plasmáticas, eritropoyesis disminuida y megacariocitos normales o incrementados. La infiltración medular por Linfoma de Hodgkin ocurre en 5-15% de los pacientes no tratados, siendo más frecuente en hombres, en individuos de mayor edad y en aquellos casos de subtipo histológico desfavorable. La biopsia de médula ósea es fundamental para la etapificación del Linfoma de Hodgkin (ya que la punción para mielograma a menudo resulta "en blanco"). El diagnóstico de compromiso medular se basa en el hallazgo de células de Reed Sternberg o variantes mononucleares, en el marco de un estroma fibroso, con abundantes fibroblastos, y proporciones variables de linfocitos normotípicos, eosinófilos, neutrófilos y células plasmáticas. La fibrosis está siempre presente y varía de leve a intensa. El patrón de infiltración por lo general es difuso, pero puede ser focal. La celularidad habitualmente está aumentada. La identificación de células de Reed Sternberg en la médula no es indispensable si el diagnóstico se ha hecho previamente en biopsia de linfonodo. La subclasificación de la Enfermedad de Hodgkin no puede hacerse sobre la base de histología medular. En la actualidad, las técnicas inmunohistoquímicas y la citometría de flujo no sólo constituyen un

importante complemento en el estudio de las malignidades hematológicas, sino que muchas veces éstas son esenciales para un adecuado diagnóstico en linfomas y leucemias. El inmunofenotipo clásico es: CD19, CD20, CD22, CD74, CDw75, CD45RA y LCA.

LECTURAS SUGERIDAS

Atlas de Hematología. Nagoya University, School of Medicine. Department of Medicine. The Branch Hospital. December, 1996.

Bain, B.J., Clark, D.M., Lampert, I.A., Wilkins, B.S. **Bone marrow pathology.** third edition. blackwell science, 2001.

Fourcade, C.H. *et al.* "Reticulocyte Analysis Provided by the Coulter GEN.S: Significance and Interpretation in Regenerative and Nonregenerative Hematologic Conditions". *Laboratory Hematology* 5:153-158, 1999.

Guías Técnico- Metodológicas Laboratorios Clínicos. Ministerio de Salud. Series Minsal 03: Guías Metodológicas. División de salud de las Personas; 1: 22-23, 1998.

Naeim, F. **Atlas of bone marrow and blood pathology.** W.B. Saunders co., 2001.

Recommendations for Reference Method for Haematology in Human Blood (ICSH Standard 1995) and Specifications for International Haemiglobincyanide Standard (4th edition). *Journal of Clinical Pathology*; 49: 271-4, 1996.

Sans Sabrafen, J. **Hematología Clínica.** 4^o edición, Harcourt, caps.14,18, 2002.

Stone, R., **Harrison: principios de medicina interna.** Mc Graw Hill. 15a edición, 2002. pp. 835-850

Wittels, B. **Surgical pathology of bone marrow. core biopsy diagnosis. Major problems in pathology.** vol 17, W.B. Saunders co., 1985.

World Health organization classification of tumours. Pathology and genetics: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 2001.

ESTUDIO DE LABORATORIO DE ANEMIAS NUTRICIONALES

Iván Palomo G., Fernando Pizarro A., Manuel Olivares G., Miguel Arredondo O., Marcelo Alarcón L. y Gonzalo Pombo V.

- 1. Introducción**
- 2. Métodos de laboratorio para estudio de las anemias hipocromas**
 - 2.1. Etapas de la deficiencia de hierro
 - 2.2. Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de hierro
 - 2.3. Diagnóstico diferencial
- 3. Estudio de laboratorio de las anemias megaloblásticas**
 - 3.1. Estudio de anemia megaloblástica
 - 3.1.1. Hemograma
 - 3.1.2. Mielograma
 - 3.1.3. Bioquímica sérica
 - 3.1.4. Vitamina B₁₂ y ácido fólico
 - 3.1.5. Prueba terapéutica
 - 3.2. Pruebas para diagnóstico de anemia perniciosa
 - 3.2.1. Endoscopia con biopsia duodenal
 - 3.2.2. Anticuerpos anti-factor intrínseco
 - 3.2.3. Pruebas de Shilling
 - 3.3. Otras pruebas

RESUMEN

Las anemias nutricionales (déficit de hierro; déficit de vitamina B₁₂ o ácido fólico) requieren del laboratorio para su diagnóstico y control de tratamiento.

En este capítulo se describen las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de la anemia ferropriva (ej. Hierro sérico y ferritina sérica) y anemia megaloblástica (ej. mielograma, nivel sérico de las vitaminas involucradas).

1. INTRODUCCIÓN

Las características de las anemias ferropriva y megaloblástica fueron descritas en los capítulos 6 y 7, respectivamente.

El diagnóstico diferencial de las anemias microcíticas hipocromas (entre las que se encuentra la anemia ferropriva) y de las anemias macrocíticas (entre las que se ubica la anemia megaloblástica), requiere un importante apoyo de laboratorio.

En este capítulo, primero se aborda el diagnóstico diferencial de las anemias hipocromas, destacándose la utilidad de las pruebas que son fundamentales en el diagnóstico de anemia ferropriva: hierro sérico, capacidad total de combinación de hierro por la transferrina (TIBC), saturación de transferrina y ferritina sérica. Posteriormente se muestran las pruebas que son usadas en el diagnóstico de las anemias megaloblásticas: hemograma, mielograma, nivel sérico de vitamina B₁₂ y ácido fólico, y otras pruebas.

2. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA ESTUDIO DE LAS ANEMIAS HIPOCROMAS

La anemia hipocroma se observa en el déficit de hierro, talasemia, enfermedades crónicas, saturnismo y anemia sideroblástica.

La deficiencia de hierro es la principal causa de anemia en la población mundial. Esta deficiencia afecta a los lactantes y adolescentes debido a sus mayores requerimientos determinados por

el crecimiento; y a mujeres en edad fértil por la pérdida de hierro debido al sangrado menstrual o a las mayores necesidades de este mineral por el embarazo.

2.1. Etapas de la deficiencia de hierro

La anemia ferropénica se define como el descenso de la concentración de la hemoglobina en sangre secundaria a una disminución de la concentración de hierro en el organismo, ya sea por un aporte insuficiente, un aumento del consumo o a un exceso de las pérdidas. El desarrollo es progresivo y se realiza a través de varias etapas (figura 28-1). Primero ocurre un agotamiento de los depósitos de hierro que se caracteriza por una reducción de la ferritina sérica por debajo de lo normal (deficiencia latente de hierro o depleción de los depósitos). Al progresar el déficit se compromete el aporte de hierro a los tejidos (eritropoyesis deficiente en hierro) que se caracteriza en forma precoz por un aumento de la concentración sérica del receptor de transferrina, presentándose más tardíamente una reducción de la saturación de la transferrina y un aumento de la protoporfirina libre eritrocitaria. En esta etapa ya se aprecia una reducción de la síntesis de hemoglobina, sin embargo su concentración aún no cae por debajo del límite normal. Finalmente se llega a la etapa más severa de la deficiencia en la cual se constata una anemia microcítica e hipocroma. Habitualmente en la deficiencia de hierro de origen nutricional la anemia es leve (excepto en el prematuro), de modo que ante anemias moderadas o severas se debe pensar en otras causas que lleven al déficit de hierro, tales como malabsorción, sangrado crónico, etc.

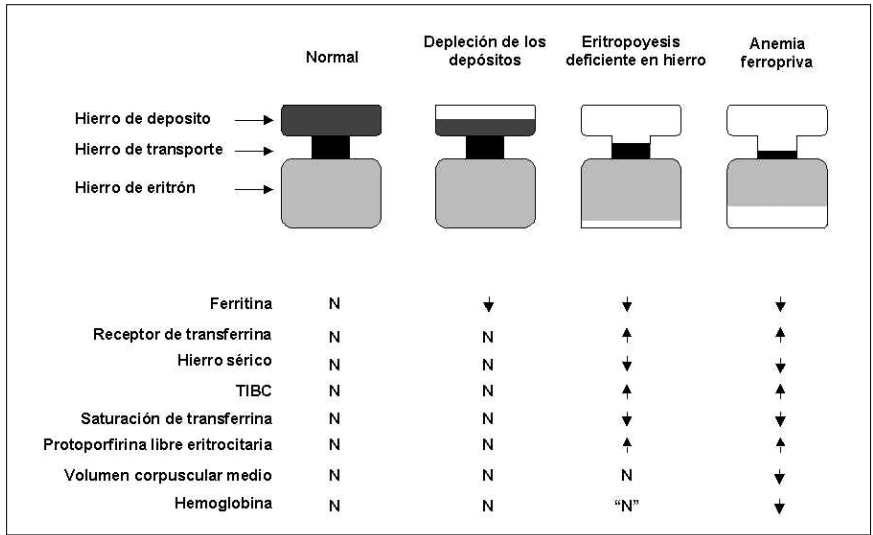


Figura 28-1. Etapas de la deficiencia de hierro.

Las principales causas de anemia ferropénica se describen en la tabla 28-1.

Tabla 28-1. Causas de deficiencia de hierro

Disminución de los depósitos de hierro al nacer	Prematuros, gemelos, ligadura precoz del cordón, hemorragias perinatales
Aporte insuficiente	Dieta con bajo contenido de hierro Baja biodisponibilidad del hierro de la dieta Síndromes de malabsorción Diarrea crónica o a repetición Giardiasis masiva
Pérdidas aumentadas	Hemorragias ocultas o evidentes (patología intestinal, ginecológica, etc.) Parásitos hematófagos
Aumento de requerimientos	Crecimiento Embarazo

2.2. Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de hierro

Para el diagnóstico de la deficiencia de hierro se cuenta con una serie de pruebas de laboratorio. Se dispone de un grupo de análisis sencillos de realizar y de bajo costo los que se utilizan en la pesquisa de esta patología y otros más complejos y más costosos que se emplean para su confirmación. Entre los primeros se encuentran la medición de la hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y prueba terapéutica. Los exámenes

confirmatorios incluyen las mediciones de la saturación de la transferrina, protoporfirina libre eritrocitaria, receptor de transferrina sérico y ferritina sérica e intraeritrocitaria.

La medición de la concentración de hemoglobina es un examen que se puede realizar en una muestra sanguínea capilar o venosa. Este parámetro mide la última etapa de la carencia de hierro y su especificidad va a depender de la prevalencia del déficit de este mineral en la población o grupo a estudiar. La superposición que existe entre los valores

normales y anormales de hemoglobina es un hecho a considerar en la interpretación de este examen. El hematocrito, si bien es más simple de realizar, es algo menos sensible que la hemoglobina en la detección de anemia.

El volumen corpuscular medio para que tenga valor debe ser medido con un contador electrónico de eritrocitos. Se puede realizar en una muestra sanguínea capilar o venosa. Cabe señalar que en el recién nacido y embarazada existe una macrocitosis fisiológica. La microcitosis no es exclusiva de la deficiencia de hierro, también se puede apreciar en otras condiciones en las que existe un defecto de la hemoglobinización de los precursores eritroides (talasemia, infección o inflamación crónica, intoxicación plúmbica, anemias sideroblásticas, etc.). Al comenzar el descenso en la concentración de hemoglobina en la deficiencia de hierro puede que no se aprecie la microcitosis. En los contadores electrónicos de eritrocitos más avanzados se puede cuantificar el ancho de la distribución del volumen de los eritrocitos (RDW: "Red Distribution Width"), el que se encuentra aumentado en algunas variedades de anemias, entre ellas la ferropriva.

La prueba terapéutica certifica la existencia de la anemia ferropriva. Esta es una prueba fácil de realizar a escala individual, pero difícil en el ámbito poblacional. Consiste en administrar hierro medicinal en una dosis terapéutica (3-5 mg/kg de hierro elemental en niños y 80 mg diarios en adultos, fraccionado en dos dosis) durante un mes. Se considera que la prueba es positiva cuando el aumento de la concentración de hemoglobina es igual o superior a 1 g/dl. Una prueba positiva indica que el sujeto es verdaderamente anémico ferroprivo, incluso a pesar que pueda tener una hemoglobina dentro de los límites normales. Una prueba negativa, siempre que el sujeto haya recibido el hierro en dosis y tiempo adecuados, indica la inexistencia de una anemia ferropriva, no excluyendo una deficiencia de hierro en una etapa previa a la anemia. Una opción es la de administrar una dosis de hierro polimaltosato (100 mg) o hierro sorbitex (600 mg), por vía IM, valorando el pico reticulocitario entre el 7mo – 10mo día. Otras posibilidades son que el sujeto sea normal a pesar de tener una hemoglobina levemente disminuida o corresponder a una anemia de otro origen.

La protoporfirina libre eritrocitaria aumenta cuando existe una disminución del hierro disponible en el eritroblasto para combinarse

con la protoporfirina y formar el hem, es por ello que se eleva en la eritropoyesis deficiente en hierro. Al contar con hematofluorómetros esta medición es sencilla de realizar, bastando para su determinación una gota de sangre, por lo que se puede realizar en una muestra capilar. Valores aumentados se encuentran también en la intoxicación plúmbica y en la anemia de la inflamación/infección aguda y crónica.

Las mediciones del hierro sérico, TIBC y saturación de la transferrina se utilizan frecuentemente como exámenes de confirmación de la deficiencia de hierro. El TIBC constituye una medida de la cantidad de transferrina circulante, proteína que normalmente se encuentra saturada en un tercio de su capacidad. Estos parámetros requieren de una macro muestra sanguínea obtenida en ayunas y en material libre de minerales. Por otra parte el hierro sérico y saturación de la transferrina presentan una gran variabilidad, existiendo importantes fluctuaciones diarias (ciclo circadiano) e inter-días. En la eritropoyesis ferropénica ocurre una disminución del hierro sérico y un aumento de la transferrina, lo que determina que en esta condición exista una reducción de la saturación de la transferrina. En la infección/inflamación aguda o crónica se encuentran disminuidos el hierro sérico, TIBC y saturación de la transferrina. Por otra parte una reducción del TIBC se encuentra en el kwashiorkor, síndrome nefrótico y enteropatía perdedora de proteínas.

Recientemente se encuentra disponible la cuantificación del nivel sérico del receptor de transferrina, parámetro que ya se altera en la deficiencia tisular de hierro incipiente. Estudios en adultos han demostrado que este parámetro tiene una alta sensibilidad y especificidad en la detección de la deficiencia de hierro. Un estudio reciente en lactantes ha demostrado que su sensibilidad no es tan alta como en el adulto si bien posee una gran especificidad. En el mercado, existen varios "kits" para su medición los que tienen valores que no son comparables hasta que no se disponga de un estándar internacional de referencia. Este parámetro se eleva en la deficiencia de hierro y en la hiperplasia eritroide que es un acompañante de algunas anemias como la hemolítica. La gran limitación de esta medición es su elevado costo y su gran ventaja es que no se altera en los procesos infecciosos/inflamatorios agudos o crónicos.

En condiciones normales circula una pequeña

cantidad de ferritina en el plasma que se cuantifica por medio de una técnica de ELISA. Su concentración es directamente proporcional al contenido de hierro de los depósitos y sólo se encuentra reducida en la deficiencia de hierro. Sin embargo, la ferritina sérica es un reactante de fase aguda por ello aumenta en la inflamación/infección aguda o crónica. También se encuentra aumentada en la necrosis hepática. Se estima que existe una depleción de los depósitos de hierro cuando la ferritina desciende bajo 10 ug/L en el niño y de 12 ug/L en el adulto. En sujetos con infección/inflamación una ferritina mayor de 50 ug/L descarta la existencia de una depleción de los depósitos de hierro.

Ciertos parámetros de laboratorio tales como la hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio (tabla 28-2), saturación de la transferrina, protoporfirina libre eritrocitaria, ferritina sérica (tabla 28-3) y receptor de transferrina, experimentan modificaciones con el desarrollo, condición que deben ser tenida en cuenta. La hemoglobina presenta variaciones durante el embarazo y en la altitud. En sujetos que viven en la altura los valores de referencia se deben incrementar a partir de los 1000 metros. También se debe realizar una corrección en los individuos fumadores.

Tabla 28-2. Límites inferiores normales para hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto) y volumen corpuscular medio (VCM)

Edad Hb	Hto (g/dL)	VCM (%)	(fL)
Nacimiento	13,5		
1 mes	10,7		
2 meses	9,4		
3 meses	9,5		
0,5-1,9 años	11,0	33	70
2-4 años	11,0	34	73
5-7 años	11,5	35	75
8-11 años	12,0	36	76
12-14 años			
Mujer	12,0	36	78
Hombre	12,5	37	77
15-17 años			
Mujer	12,0	36	79
Hombre	13,0	38	78
18-49 años			
Mujer	12,0	37	80
Hombre	14,0*	40	80
Embarazada			
1er trim.	11,0**		
2° trim.	10,5**		
3er trim.	11,0**		

* Límites propuestos por CDC 13,5 g/dL y OMS 13,0 g/dL

** Límites propuestos por OMS

Tabla 28-3. Límite inferior normal para ferritina sérica (FS) y saturación de la transferrina (Sat Tf), y límite superior normal para protoporfirina eritrocitaria libre (PLE).

Edad	FS (µg/L)	Sat Tf (%)	PLE (µg/dL GR)
6 - 12 meses	10	9	120
13 - 24 meses	10	9	100
2 - 6 años	10	9	80
7 - 12 años	10	11	70
Adultos	12	16	70

GR, glóbulos rojos

Las pruebas de laboratorio confirmatorias se emplean para la detección de la deficiencia de hierro: (a) antes de la aparición de la anemia, y (b) para la confirmación de la etiología ferropriva especialmente en estudios poblacionales, y en el ámbito individual cuando no se obtuvo una respuesta terapéutica satisfactoria, al igual que si existen dudas de la etiología ferropriva de la anemia.

Como la sensibilidad y especificidad de los indicadores de laboratorio en la valoración del estado férrico difieren considerablemente, el déficit de hierro puede detectarse más precisamente en estudios poblacionales usando una batería de exámenes. En la selección de los exámenes a utilizar se debe considerar el tipo de muestra sanguínea (capilar o venosa), equipamiento y facilidades de laboratorio, rapidez deseada de obtención de los resultados, costo y prevalencia de la carencia de hierro. También deben considerarse en esta selección, la existencia de otras condiciones que puedan complicar el diagnóstico.

Como criterio para el diagnóstico de anemia ferropriva se exige una reducción de la Hb (o Hto) junto con una prueba terapéutica positiva, o una reducción de la hemoglobina sumado uno o más de los otros exámenes de laboratorio alterados. Para el diagnóstico de deficiencia de hierro sin anemia se exige Hb (o Hto) normal sumado a dos o más de los otros exámenes de laboratorio alterados. Depleción de los

depósitos de hierro se diagnostica cuando existe sólo una FS bajo el límite normal.

2.3. Diagnóstico diferencial

En el diagnóstico diferencial de la anemia ferropriva se deben considerar otras condiciones. Muy importantes por su prevalencia, en ciertos períodos del ciclo vital, son los procesos inflamatorios/infecciosos agudos o crónicos. Estos cuadros se pueden acompañar de una anemia, microcítica (si son crónicos), disminución del hierro sérico, TIBC, Sat Tf, aumento de la PLE y de la FS. En las infecciones/inflamaciones agudas estas alteraciones pueden persistir hasta 3 semanas después de resuelto el proceso. La talasemia menor es una patología más frecuente de lo que se piensa. Esta se caracteriza por una anemia microcítica hipocroma con un ancho de distribución de los eritrocitos, PLE, Sat Tf y FS normales. La intoxicación plúmbica, según su severidad, se asocia a anemia microcítica, con punteado basófilo de los eritrocitos y protoporfirina libre eritrocitaria muy elevada. Cabe recordar la posibilidad de una falsa anemia, debido a que el límite inferior de lo normal de la concentración de hemoglobina corresponde a -2 desviaciones estándar del promedio encontrado en una población normal, y por tanto es posible encontrar un 2,5% de sujetos normales por debajo del límite recomendado para definir anemia (tabla 28-4).

Tabla 28-4. Diagnóstico diferencial de anemias hipocromas

Anemia	Ferropriva	Talasemia	Enfermedades crónicas	Intoxicación plúmbica	Anemias sideroblásticas crónicas
Ferritina sérica	↓	N	↑	N	↑
Receptor transferrina	↑	N o ↑	N	N	N
Saturación transferrina	↓	N	↓	N	N
Protoporfirina libre eritrocitaria	↑	N	↑	↑↑	N

3. ESTUDIO DE LABORATORIO DE LAS ANEMIAS MEGALOBLÁSTICAS

Las anemias megaloblásticas tienen en común una alteración en la síntesis del DNA por carencia de vitamina B₁₂ y/o ácido fólico, con la consiguiente falla en la maduración y multiplicación de las células hematopoyéticas, dando lugar a alteraciones morfológicas y funcionales de los glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas (ver capítulo 7). La vitamina B₁₂ se obtiene de productos animales (carne, leche y derivados) y el ácido fólico, principalmente de los vegetales verdes, carnes rojas poco cocidas, y cereales.

A continuación se describen, brevemente, las principales pruebas de laboratorio que son utilizadas en el diagnóstico de las anemias megaloblásticas:

3.1. Estudio de anemia megaloblástica

3.1.1. Hemograma

En el hemograma, además de la presencia de anemia macrocítica (VCM: >100 fL), se puede observar leucopenia con presencia de granulocitos de mayor tamaño, así como también trombocitopenia con presencia de macroplaquetas.

La característica de anemia arregenerativa que presenta la anemia megaloblástica al momento del diagnóstico (sin tratamiento) se puede comprobar con el índice reticulocitario (ver capítulo 27).

En el frotis sanguíneo generalmente se observa anisocitosis, macrocitosis, poiquilocitosis e inclusiones citoplasmáticas (cuerpos de Howell Jolly, punteado basófilo y anillos de Cabot). Con respecto a los glóbulos blancos, generalmente se observan neutrófilos hipersegmentados (núcleo con más de cinco lobulaciones). Se debe tener en consideración que no todas las anemias macrocíticas, tienen características de megaloblásticas.

3.1.2. Mielograma

La muestra de aspirado de médula ósea (ver capítulo 26), permite observar las características citológicas de la médula ósea (mielograma). En los pacientes con anemia megaloblástica la médula ósea se caracteriza por presentar aumento de la densidad celular e hiperplasia eritroblástica con alteraciones de maduración núcleo-citoplasmáticas. Además la serie granulocítica y megacariocítica, generalmente presenta normalidad cuantitativa pero con alteraciones citológicas.

3.1.3. Bioquímica sérica

La enzima láctico deshidrogenasa (LDH) aumenta en los pacientes con anemia hemolítica y en la eritropoyesis ineficaz o muerte intramedular por la liberación de la LDH intraeritrocitaria. La bilirrubina con predominio de la forma indirecta puede estar aumentada por un incremento del catabolismo de la hemoglobina. La hormona estimulante de la glándula tiroidea (TSH) se debe cuantificar para descartar patología tiroidea.

3.1.4. Vitamina B₁₂ y ácido fólico

Ante la sospecha de anemia megaloblástica se determina la concentración de cobalamina (vitamina B₁₂) y folato sérico. Además es recomendable cuantificar el folato intraeritrocitario; éste no se altera por la dieta o hemólisis de la muestra. Los valores normales de la vitamina B₁₂ sérica oscilan entre 200 y 900 pg/mL, los de folato sérico entre 2,5 a 20 ng/mL y los de folato intraeritrocitario entre 93-641 ng/mL. En la determinación de los niveles séricos de vitamina B₁₂ y ácido fólico se han utilizado métodos con base microbiológica y radioinmunoensayo; actualmente se utiliza ELISA de fase sólida.

3.1.5. Prueba terapéutica

En caso de no contar con la metodología diagnóstica (punto 3.1.4) puede realizarse la denominada prueba terapéutica. Esta consiste en la administración de dichos co-factores, pero una por vez, y observar la aparición de un pico reticulocitario entre el día 3-5 después de la inyección. Se indica cianocobalamina (1.000 ug) vía intramuscular; en caso que no se observe el pico reticulocitario, se administra ácido fólico (15 mg), por la misma vía, valorándose dicho pico en un lapso similar.

3.2. Pruebas para diagnóstico de anemia perniciosa

3.2.1. Endoscopia con biopsia duodenal.

La presencia de gastritis atrófica con ausencia de células parietales y principales junto a metaplasia intestinal es característico de la anemia perniciosa. Se puede encontrar aclohidria con elevación del pH gástrico entre 6.8-7.2, tras la administración de histamina.

3.2.2. Anticuerpos anti-factor intrínseco

Para pesquisar los anticuerpos anti-Factor intrínseco el método más utilizado es ELISA de fase sólida. Brevemente, en pocillos de poliestireno se fija el factor intrínseco (FI); luego para evitar uniones inespecíficas se bloquea con albúmina bovina. Se agrega el suero del paciente, luego se agrega un anticuerpo anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina y posteriormente el sustrato. La reacción da positiva en los pocillos cuyo suero del paciente presenta autoanticuerpos anti-FI de isotipo IgG. Este ensayo es sensible y bastante específico. Otros anticuerpos que se detectan en un alto

porcentaje en pacientes con anemia perniciosa, pero cuya especificidad es baja, ya que pueden estar presentes en otras enfermedades autoinmunes, son los siguientes: anticuerpos anti-células parietales, anticuerpos anti-tiroideos y anticuerpos anti-músculo liso.

3.2.3. Prueba de Shilling

Esta es una prueba clásica, pero dada la dificultad para realizarla no se utiliza en la práctica clínica. La prueba de Schilling mide la absorción de vitamina B₁₂ radiactiva en presencia y ausencia de factor intrínseco. Es muy útil para establecer el diagnóstico en pacientes que han sido tratados y están en remisión clínica, pero en los que existen dudas respecto a la validez del diagnóstico. La prueba se realiza mediante la administración por vía oral de vitamina B₁₂ marcada radiactivamente, seguida al cabo de 1-6 horas de una dosis «de refuerzo» parenteral (1.000 mg de B₁₂) para evitar el depósito hepático de la B₁₂ radiactiva. A continuación se determina el porcentaje de material radiactivo en la orina de 24 horas (valor normal >9% de la dosis administrada). Una excreción urinaria reducida (<5% si la función renal es normal) indica una disminución de la absorción de vitamina B₁₂. Esta prueba (Schilling I) puede repetirse (Schilling II) empleando cobalto radiactivo unido a factor intrínseco de origen porcino. La corrección de una excreción previamente reducida sugiere que la ausencia de factor intrínseco es el mecanismo fisiopatológico responsable de los valores bajos de vitamina B₁₂ radiomarcada. Finalmente, la incapacidad para corregir la excreción indica un mecanismo de malabsorción gastrointestinal (ej. esprue).

3.3. Otras pruebas

Homocisteína (Hy) plasmática

La homocisteína es un aminoácido sulfurado presente en el plasma. Un 70% se encuentra formando parte de proteínas y el resto, libre. La homocisteína es requerida para la síntesis de DNA; folato y vitamina B₁₂ actúan como cofactores, para la conversión de homocisteína en metionina.

Aproximadamente el 96% de los casos de déficit de vitamina B₁₂ y el 91% de los casos de déficit de folatos cursan con hiperhomocisteinemia y homocistinuria. Sin embargo, la especificidad de la determinación es baja. La homocisteína además puede aumentar en deterioro de la función renal,

algunas neoplasias, en ciertos tratamientos con drogas, al igual que en tiroideopatías.

La muestra de sangre para la determinación de homocisteína plasmática debe ser tomada en ayunas, puesto que sus niveles pueden ser influenciados por los alimentos, especialmente proteínas y vitaminas.

La muestra debe ser enviada de inmediato al laboratorio, ya que los glóbulos rojos siguen liberando homocisteína *in vitro*, por lo que debe separarse rápidamente el plasma, el cual puede congelarse a -20°C hasta la realización del ensayo.

Para la determinación de la homocisteína se ha usado suero o plasma, utilizando la forma libre o la unida a proteínas, en general las metodologías para la medición de homocisteína pueden agruparse en aquellas que: (a) generan H_2 libre reduciendo los puentes disulfuro con agentes reductores, (b) separan la H_2 de otros compuestos que poseen grupos tioles mediante cromatografía (cromatografía líquida de alta resolución o por cromatografía gaseosa capilar), (c) utilizan una detección electroquímica para su cuantificación (espectrofotometría de masa o la fluorimetría), y determinan H_2 mediante el uso de anticuerpos monoclonales (ELISA).

Ácido metilmalónico

La deficiencia tisular de vitamina B_{12} ocasiona aciduria metilmalónica y propiónica (cetoacidosis metabólica); en consecuencia este ensayo permite confirmar su déficit en el suero. Es una prueba muy sensible y específica; pesquisa precozmente los cambios en los niveles de vitamina B_{12} . Este análisis permite realizar el diagnóstico en caso de sospechar valores falsos negativos, sobre todo en los ancianos, de los que el 5-10% tienen valores séricos de B_{12} normales a pesar de los indicios de deficiencia tisular. Un valor normal de ácido metilmalónico, con una cifra elevada de homocisteína es diagnóstico de déficit de folato. La vitamina B_{12} y la enzima metilmalónico CoA mutasa son necesarias para la conversión de metilmalonil CoA a succinil CoA. Si existe déficit de vitamina B_{12} , el ácido metilmalónico comienza a acumularse rápidamente en suero y orina. Los niveles se miden por una técnica espectrofotométrica.

Complejo de transcobalamina II-vitamina B_{12}

Se trata de un análisis poco habitual; consiste en

identificar un equilibrio negativo de vitamina B_{12} cuando el complejo transcobalamina II-vitamina B_{12} es menor de 40 pg/ml (<30 pmol/l).

Test de supresión de deoxiuridina

Se trata de una prueba altamente sensible, que detecta déficit subclínicos, en el cual se utilizan células de médula ósea. La mayor desventaja de esta prueba es que requiere de aspirado medular. Determina la deficiencia de $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ metilFH₄. En condiciones normales, la deoxiuridina que se incorpora al dUMP impide la incorporación de timidina marcada al dTMP y posteriormente al DNA, lo cual no ocurre en caso de deficiencias de folato o vitamina B_{12} . Las deficiencias se detectan al existir corrección, luego de agregar al cultivo, folato y/o vitamina B_{12} .

LECTURAS SUGERIDAS

Anemias hipocromas

Center for Disease Control. "CDC criteria for anemia in children and childbearing-age women". *M.M.W.R.* 38:400-404, 1989.

Dallman, P.R. "Laboratory diagnosis of iron deficiency in infants and children". *Annales Nestlé.* 53:8-14, 1995.

Ferguson, B.J., Skikne, B.S., Simpson, K.M., Baynes, R.D., Cook, J.D. "Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia". *J. Lab. Clin. Med.* 19:385-90, 1992.

Olivares, M., Walter, T., Cook, J.D., Hertrampf, E., Pizarro, F. "Usefulness of serum transferrin receptor and serum ferritin in diagnosis of iron deficiency in infancy". *Am. J. Clin. Nutr.* 72:1191-1195, 2000.

Yip, R., Johnson, C., Dallman, P.R. "Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency". *Am. J. Clin. Nutr.* 39:427-436, 1984.

Anemias megaloblásticas

Chui, C.H., Lau, F.Y., Wong, R., Soo O.Y., Lam, C.K., Lee, P.W., Leung, H.K., So, C.K., Tsoi, W.C., Tang, N., Lam, W.K., Cheng, G. "Vitamin B12 deficiency—need for a new guideline". *Nutrition* 17(11-12):917-20, 2001.

Ingram, C.F., Fleming, A.F., Patel, M., Galpin, J.S. "The value of the intrinsic factor antibody test in diagnosing pernicious anaemia". *Cent Afr J Med.* 44(7):178-81, 1998.

Klee, G.G. "Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate". *Clin Chem.* 46(8 Pt 2):1277-83, 2000.

Savage, D.G., Ogundipe, A., Allen, R.H., Stabler, S.P., Lindenbaum, J. "Etiology and diagnostic evaluation of macrocytosis". *Am J Med Sci.* 319(6):343-52, 2000.

Torres Gomez, A., Casano, J., Sanchez, J., Madrigal, E., Blanco, F., Alvarez, M.A. "Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias". *Clin Lab Haematol.* 25(5):283-8, 2003.

Ward, P.C. "Modern approaches to the investigation of vitamin B12 deficiency". *Clin Lab Med.* 22(2):435-45, 2002.

ESTUDIO DE LABORATORIO DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Iván Palomo G., Marcela Vásquez R., Marcelo Alarcón A.,
Mónica Maldonado R. y Leonor Armanet B.

1. Introducción

2. Anemias hemolíticas intracorporales

2.1. Membranopatías

2.1.1. Esferocitosis Hereditaria

2.1.2. Hemoglobinuria paroxística nocturna

2.2. Enzimopatías

2.2.1. Déficit de Glucosa fosfato deshidrogenasa (G6PD)

2.2.2. Déficit de Piruvato kinasa (PK)

2.3. Globinopatías

3. Anemias hemolíticas extracorporales

3.1. Anemias hemolíticas inmunes

3.1.1. Anemias hemolíticas aloinmunes

3.1.2. Anemias hemolíticas autoinmunes

3.2. Anemias hemolíticas no inmunes

RESUMEN

Las anemias hemolíticas representan un grupo diverso de anemias regenerativas. En general son normocíticas-normocromas y desde el punto de vista fisiopatológico se les clasifica en intra y extracorpúsculares.

En este capítulo se describen los aspectos fundamentales de las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de las anemias hemolíticas más frecuentes de cada grupo. A modo de ejemplo, entre las anemias hemolíticas intracorpúsculares se mencionan las pruebas que permiten realizar diagnóstico de Esferocitosis hereditaria y entre las anemias hemolíticas extracorpúsculares se describen las pruebas para establecer el diagnóstico de anemias hemolíticas inmunes.

1. INTRODUCCIÓN

Las anemias hemolíticas son un grupo heterogéneo de anemias, que se caracterizan por ser regenerativas. Desde el punto de vista fisiopatológico se les agrupa en anemias hemolíticas intracorpúsculares y extracorpúsculares (ver capítulo 8).

Las anemias regenerativas, se caracterizan por presentar un índice reticulocitario aumentado (>3) (ver capítulo 27). Si bien pueden incluirse las anemias hemolíticas y secundarias a hemorragias no crónicas, este capítulo solo se referirá a las primeras.

El volumen corpuscular medio (VCM) es generalmente normal, pero si la reticulocitosis es muy marcada puede haber leve macrocitosis. Igualmente si la hiperactividad medular consume y agota las reservas de ácido fólico se producirá macrocitosis. En casos de talasemia y anemia con presencia de esferocitos puede haber microcitosis.

Ante una anemia cuyo mecanismo presuntamente es de un tipo hemolítico, se deben contestar dos preguntas: (a) ¿Existe hemólisis? y (b) ¿Cuál es la causa de la hemólisis?.

Respecto a lo primero, los siguientes son signos de hemólisis: Reticulocitosis, disminución de la haptoglobina libre en sangre, aumento de la

LDH en la sangre, hemoglobinuria sin hematíes en el sedimento, células con hemosiderina en el sedimento urinario e ictericia (con bilirrubina indirecta predominante). Respecto a lo segundo, se requiere realizar pruebas de laboratorio específicas, las que se describirán brevemente en los puntos 2 y 3 de este capítulo, según se trata de pruebas utilizadas en el diagnóstico de anemias hemolíticas intra y extracorpúscular, respectivamente.

En algunos casos de anemias hemolíticas los glóbulos rojos presentan ciertas características (poiquilocitosis) que pueden orientar al diagnóstico.

2. ANEMIAS HEMOLÍTICAS INTRACORPUSCULARES

Las anemias hemolíticas intracorpúsculares se clasifican en membranopatías, enzimopatías y hemoglobinopatías (ver capítulo 8). A continuación se describen brevemente las pruebas diagnósticas para las patologías más frecuentes de cada tipo.

2.1. Membranopatías

2.1.1. Esferocitosis hereditaria

El frotis de sangre periférica de los pacientes portadores de Esferocitosis hereditaria (EH) se caracteriza por la presencia de esferocitos en el contexto de una anemia regenerativa.

Los esferocitos generalmente también están presentes en las anemias hemolíticas inmunes, es por ello que se debe realizar un diagnóstico diferencial con la **Prueba de antiglobulina humana** (Prueba de Coombs; ver punto 3.1), la que se presenta negativa en el caso de EH.

Fragilidad osmótica. La prueba más utilizada para el diagnóstico de la EH es la Fragilidad osmótica de los glóbulos rojos, la cual mide la capacidad de los glóbulos rojos de aumentar su volumen cuando son sometidos a soluciones hipotónicas de NaCl. Debido a que los esferocitos tienen una relación superficie/volumen disminuida, tienen una menor capacidad para aumentar su volumen y se lisan a una concentración de sales más elevada que las células normales. La sensibilidad de esta prueba puede incrementarse con la preincubación de las células a 37°C.

Autohemólisis y Prueba de glicerol. Se han señalado otras modificaciones de la prueba de fragilidad osmótica; entre éstas está la autohemólisis, la cual determina la hemólisis de los glóbulos rojos incubados sin glucosa en condiciones estériles y la prueba del glicerol, pero ninguna de ellas parece ser más sensible que la fragilidad osmótica incubada.

Ectacitometría osmótica. La introducción de la ectacitometría, que cuantifica la deformabilidad de los eritrocitos por la medición de la fuerza que induce la elongación de la célula, permitió el desarrollo de la ectacitometría osmótica, la cual parece ser la prueba más sensible en la actualidad. Sin embargo, esta técnica solo está disponible en laboratorios especializados.

Electroforesis en gel de poliacrilamida. El análisis de las proteínas de la membrana eritrocitaria en electroforesis de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) se utiliza para determinar la presencia o ausencia de las proteínas.

Biología molecular. El estudio molecular ha permitido identificar un número importante de mutaciones en distintas proteínas de la membrana eritrocitaria.

Para un diagnóstico adecuado de la EH es importante realizar un estudio familiar.

2.1.2. Hemoglobinuria paroxística nocturna

La Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una forma de membranopatía adquirida, a

diferencia de la EH que es hereditaria. La HPN se explica por la disminución o ausencia de proteínas reguladoras del sistema del complemento como por ejemplo CD55, CD59 (ver capítulo 8). El diagnóstico se basa en diferentes pruebas:

a) Pruebas serológicas

El diagnóstico de la HPN se basa en pruebas serológicas especiales que detectan la sensibilidad de los glóbulos rojos a la lisis mediada por el sistema del complemento, activado por la vía alterna.

Test de Ham: El fundamento de esta prueba lo constituye la susceptibilidad de los eritrocitos HPN a la lisis por complemento en suero humano acidificado. Su eficacia es limitada, porque puede dar resultados falsos negativos por el efecto de transfusiones previas, y falsos positivos en la anemia diseritropoyética congénita tipo II o HEMPAS.

Prueba de la sucrosa: La base de esta prueba es la fijación del complemento mediante la disminución de la potencia iónica del medio, lo que provoca la hemólisis exagerada de los eritrocitos HPN. Este examen es sensible, pero poco específico.

b) Identificación de los defectos proteicos de la membrana celular

La demostración de glóbulos rojos y/o granulocitos carentes de proteínas de membrana ligadas a glicerol fosfatidil inositol (GPI) mediante el uso de anticuerpos monoclonales (anti-CD55 y anti-CD59) utilizando citometría de flujo, es la mejor forma de diagnosticar la HPN. Este método es sensible y específico, puede informar sobre la proporción de poblaciones celulares anormales.

2.2. Enzimopatías

2.2.1. Déficit de Glucosa fosfato deshidrogenasa (G6PD)

La enzimopatía más frecuente es una deficiencia congénita en la actividad de la G6PD.

La G6PD cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas-fosfato y su rol en el eritrocito es metabólico por su potencial reductor. Reduce la nicotinamida adenina dinucleótido (NADP) generando NADPH y oxidando la glucosa 6 fosfato (G6P), manteniendo así los

grupos sulfhidrilos y ayuda a detoxificar radicales libres y peróxidos.

Para diagnosticar el déficit de G6PD existen pruebas de laboratorio, tanto rutinarias como específicas.

a) Hematológicas. Se observan concentraciones de hemoglobina entre 3 a 4 g/dl, excentrocitos (presentan un desplazamiento de la hemoglobina hacia uno de los extremos).

Cuerpos de Heinz. La oxidación de la hemoglobina da lugar a la formación de cuerpos de Heinz, que se descubren en la tinción supravital, como la del violeta de genciana.

b) Químicas: Se observa un aumento de hemoglobina, bilirrubina plasmática y urobilinógeno urinario y fecal, disminución de haptoglobina, hemoglobinuria y hemosidenuria.

c) Cuantificación de la actividad enzimática. Para el diagnóstico definitivo existen técnicas como: ensayo enzimático cuantitativo que es la medida de la actividad enzimática en el hemolizado en UI por gramo de hemoglobina (rango normal: 4.6 - 13.5 UI/gHb), prueba de fluorescencia, prueba de reducción de metahemoglobina, prueba de ascorbato-cianide y electroforesis.

d) Biología molecular. Las mutaciones pueden ser estudiadas por métodos de biología molecular.

2.2.2. Déficit de Piruvato kinasa (PK)

La PK es la enzima que cataliza una de las etapas más importantes de la glucólisis transformando el fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, proceso en que se produce una molécula de ATP.

Para diagnosticar que existe un déficit de PK hay distintas pruebas de laboratorio, tanto rutinarias como específicas. Entre las pruebas rutinarias están:

a) Hematológicas. Se puede encontrar concentración de hemoglobina entre 6 a 12 g/dL, reticulocitosis, moderada macrocitosis (VCM: 98-105 fL), disminución de la vida media eritrocitaria, considerable número de equinocitos, ausencia de esferocitos circulantes y fragilidad osmótica normal.

b) Químicas. Se observa un aumento moderado de bilirrubina no conjugada, 2,3 DPG y PEP, y disminución de haptoglobina, de ATP, de

lactato y de piruvato.

c) Cuantificación de la actividad enzimática. Para el diagnóstico definitivo existen técnicas como: ensayo enzimático cuantitativo que es la medida de la actividad enzimática en el hemolizado en UI por gramo de hemoglobina (rango normal: 11.1-18.9 UI/gHb) test de fluorescencia y autohemólisis.

d) Biología molecular. La determinación de las distintas mutaciones de PK se realiza a través de técnicas moleculares.

2.3. Globinopatías

Electroforesis de la hemoglobina. Este método es muy útil en el estudio de las hemoglobinopatías. Permite pesquisar Hb A, HbA₂, Hb F, Hb S, Hb C, etc. Así por ejemplo para el diagnóstico de la anemia drepanocítica, se realiza la electroforesis de hemoglobina usando hemolizado de sangre periférica. La corrida electroforética se realiza en acetato de celulosa (pH 8,6 a 9,2) por 30 minutos de 250 a 300 voltios. Después de revelar y decolorar la tira se observa las diferencias de movilizaciones de las hemoglobinas de la sangre.

Cuando la hemoglobinopatía no se acompaña de cambios en la carga eléctrica, no presentan alteración electroforética; a modo de ejemplo ello ocurre en algunas hemoglobinas inestables.

Test de falsiformación. Se basa en la desoxigenación de la sangre *in vitro* cuando se pone en contacto con un agente reductor (metabisulfito de sodio) y por lo tanto los glóbulos rojos adquieren la forma falciforme. Es un método poco sensible que se ha usado en estudios poblacionales como "screening".

Hb F (Elución ácida Kleihauer). Usando este método que somete los glóbulos rojos a pH ácido, la Hb A es eluida de los hematíes, en cambio la Hb F se mantiene en el interior de los mismos. Es útil en el estudio de Talasemiaβ y Persistencia hereditaria de Hb F.

Cuerpos de Heinz espontáneos. Se pueden pesquisar al incubar los hematíes con azul de cresil brillante o violeta de metilo. Es útil en el diagnóstico de Hemoglobinas inestables.

Prueba de la termoestabilidad hemoglobínica Consiste en incubar a 50°C una solución de Hb tamponada durante 2 horas. Es útil en el diagnóstico de Hemoglobinas inestables.

Prueba de estabilidad al isopropanol. Se utiliza en el diagnóstico de Hemoglobinas inestables.

Cromatografía líquida de alta presión. Se utiliza para detectar algunas hemoglobinas anormales que no son pesquisadas por electroforesis de Hb.

Biología molecular. Los estudios moleculares para el diagnóstico de hemoglobinopatías son poco utilizados. Entre otros métodos, en investigación se utilizan RT-PCR, secuenciación, PCR-RFLP (PCR seguida de uso de enzima de restricción). Estos estudios pueden realizarse con una única muestra de sangre. El diagnóstico prenatal se determina a partir del muestreo de la velloidad coriónica o de la amniocentesis.

3. ANEMIAS HEMOLÍTICAS EXTRACORPUSCULARES

3.1. Anemias hemolíticas inmunes

Estas anemias se caracterizan por el acortamiento de la sobrevivida normal de los hematíes, la acumulación de los productos del catabolismo de la hemoglobina, un aumento de la eritropoyesis en la médula ósea, en un intento de compensar la pérdida de hematíes, que se manifiesta clínicamente por aumento del índice de formación de reticulocitos. Cuando los reticulocitos están elevados una prueba clave a realizar es la antiglobulina humana directa (PAD), para determinar el papel desempeñado por las Igs en la hemólisis, y en el diagnóstico de procesos hemolíticos mediados por anticuerpos. Si la PAD es positiva, aun cuando no es sinónimo de hemólisis inmune, podría indicar una posible AHI. En este caso, se deben hacer estudios complementarios para confirmar el mecanismo hemolítico y determinar su causa, tales como la cuantificación de haptoglobina libre, que se encuentra disminuida en las anemias hemolíticas intracorpúsculares y la LDH y bilirrubina indirecta, que se encuentran aumentadas

dependiendo del grado de hemólisis. También se deben hacer estudios inmunohematológicos para determinar su especificidad antigénica. Si la PAD fuera negativa se debe investigar otras causas tales como hemorragia aguda o anemia hemolítica no inmune.

3.1.1. Anemias hemolíticas aloinmunes

En las anemias hemolíticas aloinmunes hay una destrucción de los hematíes debido a una reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). La causa es la combinación *in vivo* de un anticuerpo con hematíes que poseen el antígeno correspondiente sobre la superficie del glóbulo rojo, aun cuando no son los anticuerpos los que destruyen los hematíes (ver capítulo 8). Los cuadros clínicos que se asocian a este tipo de anemia son: la reacción transfusional hemolítica y la enfermedad hemolítica del recién nacido.

a) Reacción transfusional hemolítica

Según el tiempo de aparición, las Reacciones transfusionales hemolíticas (RTH) se clasifican en reacción inmediata o aguda, y retardada. Según el sitio de producción de la hemólisis, en intravascular y extravascular. Una reacción hemolítica aguda intravascular constituye una emergencia médica. La reacción ocurre en minutos tras la transfusión y se debe a anticuerpos que ya estaban presentes al iniciarla. Usualmente se debe a la transfusión de sangre incompatible para el sistema ABO, producida la mayoría de las veces, por una incorrecta identificación del paciente o de sus muestras de sangre. La forma retardada se debe a una exacerbación de la respuesta anamnésica secundaria a la transfusión. Es sangre incompatible no detectada en las pruebas cruzadas que genera una elevación del título de anticuerpos IgG y que se unen a las células transfundidas, provocando la hemólisis extravascular y la falta de rendimiento transfusional. Sus diferencias principales se resumen en la tabla 29 - 1

Tabla 29-1: Características diferenciales de las reacciones transfusionales agudas y retardadas

	Aguda o Inmediata	Retardada
Instauración	Inmediata (0 – 120 min)	Lenta (1 – 7 días)
Lugar de hemólisis	Intravascular; raro extravascular (por Rh)	Extravascular; raro intravascular (por Kidd)
Mecanismo	Citolisis mediada por complemento Anticuerpos IgM	FcgR en monocitos y macrófagos Anticuerpos IgG
Sistema sanguíneo más frecuente	ABO Kell Rh (raro)	Rh Kidd Duffy
Clínica	Fiebre, escalofríos, disnea hipotensión, “shock”, dolor lumbar	Fiebre, ictericia, anemia, esplenomegalia (raro)
Hallazgos de laboratorio	Hemoglobinemia, elevada Hemoglobinuria, disminución de la haptoglobina libre, PAD positivo	Disminución de la hemoglobina, Disminución del hematocrito, hiperbilirrubinemia, PAD positivo, PAI positivo, aumento de reticulocitos, esferocitos en frotis sanguíneo, urobilinuria
Complicaciones	CID IRA	

FcγR, Receptor de Fc de IgG; CID, Coagulación intravascular diseminada; IRA, Insuficiencia renal aguda; PAD, Prueba antiglobulina directa; PAI, Prueba antiglobulina indirecta.

La actitud frente a una reacción hemolítica aguda intravascular debe ser: detener la transfusión inmediatamente; forzar diuresis con sueroterapia y furosemida; mantener tensión arterial y vía aérea adecuada; revisar hojas de trabajo en el circuito de transfusión; observar si hay hemoglobinemia y hemoglobinuria; realizar una PAD y eluir el anticuerpo de los hematíes; vigilar función renal, coagulación y parámetros de hemólisis. Si el paciente se mantiene hemodinámicamente estable, sin cambios en la función renal y en la coagulación después de 24 horas de la transfusión de sangre incompatible para ABO, el suceso puede considerarse pasado y son muy raras las

secuelas. En la reacción hemolítica aguda extravascular, la hemoglobinuria y hemoglobinemia generalmente no está presente, el paciente suele estar clínicamente estable y es raro el deterioro de la función renal y presencia de coagulopatía de consumo. A menudo no requieren tratamiento.

La reacción hemolítica retardada, generalmente es inevitable y se debe la presencia de aloanticuerpos dirigidos contra antígenos eritrocitarios, que no fueron detectados en las pruebas pretransfusionales. La investigación serológica a seguir cuando se sospecha una RTH retardada se muestra en la figura 29-1.

Antecedentes importantes				
Síntomas clínicos Datos de laboratorio Antecedentes del paciente (diagnóstico, transfusiones y embarazos, reacciones previas, EHRN).				
Muestra pretransfusional (si dispone)		Muestra postransfusional		Muestra donante
Hemáties	Suero/Plasma	Hemáties	Suero/Plasma	(si dispone)
Confirmar grupo ABO y Rh PAD (Anti-IgG y Anti-C3)	Repetir las pruebas de detección de anticuerpos (Incluir autocontrol). Repetir las pruebas cruzadas	Grupo ABO y Rh PAD Eluido (si la PAD es positiva) para identificar el anticuerpo	Realizar PAI (Incluir autocontrol). Si es positiva, identificar. Realizar pruebas de compatibilidad.	Tipificar hemáties para determinar presencia de antígenos contra el anticuerpo producido se sospecha en el receptor. Antecedentes (Raza/nacionalidad)

Figura 29-1: Estudio serológico de Reacción transfusional hemolítica retardada.

b) Enfermedad hemolítica del recién nacido

En la EHRN los hematíes fetales se encuentran recubiertos por aloanticuerpos IgG de origen materno, dirigidos contra antígenos eritrocitarios de origen paterno. Dichos hematíes se destruyen de forma acelerada antes y después del nacimiento. La gravedad clínica es muy variable, oscilando desde la muerte *in útero*, a formas benignas sólo detectables mediante pruebas serológicas al nacimiento (ver capítulo 8). La EHRN puede diagnosticarse antes o después del nacimiento (prenatal y postnatal).

Diagnóstico prenatal

Es importante que el diagnóstico prenatal se realice lo más pronto posible. Se debe: (a) Obtener los antecedentes, tanto obstétricos (historia de partos previos con recién nacidos hidrópicos, ictericia en las primeras 24 horas después del parto, así como abortos en el primer trimestre del embarazo), así como también su historia transfusional (si la embarazada ha sido transfundida, si ha presentado reacción a la transfusión, si conoce su condición de Rh negativo, etc.).

A toda mujer embarazada, en la primera visita prenatal, se le debe investigar el grupo sanguíneo y los anticuerpos irregulares; inicialmente a través de pruebas de pesquisa como PAI, y no sólo a las embarazadas Rh negativas, ya que existen otros sistemas de interés clínico. Atendiendo a los resultados, si

la PAI es negativa y existe compatibilidad ABO y Rh con el padre, no es necesario realizar más estudios. Si existe incompatibilidad ABO y compatibilidad Rh, es conveniente la búsqueda de anti-A y/o anti-B de clase IgG. El método más sensible y satisfactorio para su estudio es tratar el suero de la madre con sustancias reductoras como el ditiotreitól (DTT) y el 2-mercaptoetanol (2-ME), que inactivan los anticuerpos IgM y luego se determina el título de IgG anti-A, anti-B mediante la PAI con el reactivo Antiglobulina Humana mono-específico anti-IgG. El mecanismo hemolítico en este tipo de enfermedad es de lisis citotóxica inducida por células fagocíticas, especialmente macrófagos esplénicos. El complemento no es activado por los anticuerpos IgG anti-A o anti-B en la EHRN por ABO. Si el padre es Rh positivo y la madre Rh negativa con PAI negativa, se debe monitorear mediante PAI al 4°, 7°, 9° mes de embarazo. Cuando el resultado de la PAI resulta positivo, se debe investigar la especificidad y el título del anticuerpo. Este título se realiza todos los meses y cada semana en el último mes de gestación. La titulación del anticuerpo es válida e importante sólo en la primera gestación donde aparece el anticuerpo, puesto que indica las conductas a seguir en la prevención y tratamiento de la enfermedad hemolítica. Pueden existir diferencias en cuanto al valor crítico del título, por lo que cada laboratorio deberá determinarlo y utilizar los controles necesarios para garantizar que sus resultados son válidos y reproducibles. Un título alto o en alza representa aloinmunización

importante de la madre y por tanto requiere estudios y evaluación del feto. En las pacientes previamente inmunizadas, los títulos seriados de anticuerpos no son un método confiable para evaluar el estado del feto ya que este puede aumentar más aún, disminuir o permanecer inalterado. En estos casos debe evaluarse al feto por los métodos descritos anteriormente (ver capítulo 8).

Un examen de valor diagnóstico es aquel que con una extracción percutánea de sangre de cordón, se evalúa directamente variables hematológicas y bioquímicas del feto, lo que permite establecer un diagnóstico de seguridad y gravedad. Un inconveniente que muchas veces se presenta, es la contaminación con sangre materna o fluido amniótico, para diferenciarlas se utilizan marcadores tales como el tamaño de los eritrocitos y la presencia de Hb fetal. Otras pruebas diagnósticas reservadas para mujeres con pareja heterocigota para el antígeno problema, marcadamente inmunizadas, con antecedentes de EHRN grave y muerte intrauterina son la toma de muestras de vellosidades coriónicas que al romper las vellosidades se obtienen glóbulos rojos fetales y se puede efectuar la tipificación antigénica y la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar el Rh fetal.

Diagnóstico postnatal

El diagnóstico postnatal de EHRN se puede efectuar en base a la clínica y al laboratorio: (a) clínicamente a partir del aspecto físico del recién nacido, el que presenta palidez, taquicardia y taquipnea debido a la anemia, hepatoesplenomegalia debido a la hemólisis extravascular y a la hematopoyesis extramedular, y además pueden constatarse signos neurológicos de la encefalopatía bilirrubínica (letargo, hipotonía), y (b) inmunohematológico que confirma el diagnóstico, evalúa la gravedad y ayuda a establecer la conducta a seguir.

En relación con las pruebas de confirmación para la madre y el recién nacido pueden ser: en la madre: (a) fenotipificación ABO y Rh, que incluye prueba de determinación de variantes débiles del antígeno D, (b) PAI para determinar aloanticuerpos maternos y su especificidad, (c) prueba de rosetas, para determinar si hubo o no paso de hematíes fetales a la circulación materna, (d) prueba de Kleihauer-Betke, para cuantificar la cantidad de sangre fetal en la circulación materna y (e) citometría de flujo para

precisar si ocurrió o no hemorragia fetomaterna y cuantificarla. En el niño: (a) fenotipificación ABO y Rh, (b) PAD para demostrar anticuerpos unidos al eritrocito, (c) Hb y hematocrito de cordón, (d) bilirrubina indirecta de cordón, (e) recuento de reticulocitos, que en la EHRN puede ser superior al 6%, (f) gases en sangre arterial, que puede mostrar acidosis metabólica, y (g) elución de anticuerpos de los hematíes del recién nacido que presentan una PAD positiva. Son bien conocidos los resultados discrepantes de la PAD como diagnóstico de EHRN por ABO, ya que ésta puede ser positiva, débil o moderada y aún negativa. Este fenómeno es debido a que existen pocas moléculas de IgG anti-A o anti-B sensibilizando los eritrocitos del recién nacido (menos de 220 moléculas de IgG por hematíe). Usando para la PAD métodos más sensibles que el tubo, como por ejemplo el autoanalizador, esta sería positiva en todos los casos de incompatibilidad ABO, pues esta metodología emplea potenciadores de baja fuerza iónica que pueden detectar niveles menores de moléculas de IgG en la membrana eritrocitaria. La elución de anticuerpos de las células rojas del recién nacido para enfrentarlas a células A ó B es otra técnica que se aplica, cuando la PAD es negativa.

Las pruebas para la valoración de la gravedad son principalmente la determinación de albúmina sérica y la relación albúmina/bilirrubina y la determinación de carboxihemoglobina (COHb). Los niveles de COHb están aumentados en neonatos con hemólisis.

c) Biología molecular en el diagnóstico de anemias hemolíticas aloinmunes

La identificación y secuenciación de los genes que codifican para los diferentes sistemas sanguíneos, ha permitido realizar ciertos procedimientos de biología molecular aplicados a dos situaciones relacionadas con las anemias hemolíticas aloinmunes:

Genotipificación de antígenos eritrocitarios

La genotipificación de antígenos eritrocitarios por métodos de biología molecular es útil cuando las pruebas de hemaglutinación, usadas habitualmente, no se pueden emplear. Esto puede ocurrir en el caso de pacientes politransfundidos, quienes se han inmunizado con al menos un aloanticuerpo. La identificación del fenotipo permite conocer la posible especificidad del anticuerpo, sin embargo, la presencia de glóbulos rojos transfundidos

impide realizar este procedimiento. Pacientes cuyos glóbulos rojos están fuertemente sensibilizados con anticuerpos IgG o fracciones del complemento que dificultan la adecuada fenotipificación. El análisis molecular de variantes genéticas puede ayudar también a complementar las investigaciones serológicas. En todas estas situaciones se requiere de estudios para evitar probables reacciones hemolíticas post-transfusionales.

Los mayores avances en materias de genotipificación eritrocitaria se han realizado en el sistema RH dado el gran polimorfismo de éste. Su genotipificación requiere del empleo de diversos partidores (“primers”) para lograr la determinación correcta de variantes antigénicas del antígeno D, alelos D débiles, híbrido RHD-CE-D y el recientemente descrito gen RHD ψ (pseudogén con una inserción de una secuencia nucleotídica de 37pb en el límite entre el intrón 3 y exón 4, múltiples mutaciones de sentido alterado en el exon 5 y una mutación sin sentido en el exon 6), todos los cuales se manifiestan como un fenotipo D negativo.

Respecto al sistema ABO se sabe que en los dos últimos exones (exones 6 y 7) está la región que codifica el dominio catalítico de las glicosiltransferasas ABO; basado en las diferencias a este nivel existen más de 100 alelos ABO distintos. Para realizar estudios moleculares en estos casos, es necesario obtener DNA a partir de la fracción de células mononucleares de una muestra de sangre anticoagulada con EDTA. La amplificación por PCR se realiza mediante el empleo de partidores para los genes de los distintos antígenos eritrocitarios de importancia clínica, que han sido descritos en detalle por St-Louis y colaboradores en 2003.

Identificación de fetos en riesgo de enfermedad hemolítica del recién nacido

La determinación prenatal del grupo sanguíneo es actualmente posible en mujeres embarazadas aloimmunizadas contra un antígeno de importancia clínica. Esta determinación se realiza por PCR usando

material derivado del feto obtenido del líquido amniótico, de las vellosidades coriónicas, o más recientemente, a partir de una muestra de sangre materna ya que el DNA fetal circula libre en el plasma o suero materno en relativamente alta cantidad (3,4% y 6,2% del DNA plasmático total, al inicio y final del embarazo, respectivamente). El DNA fetal está presente en el plasma materno a partir de las 10 a 12 semanas de gestación y hasta 10 a 100 horas después del nacimiento. Este descubrimiento ha abierto grandes posibilidades para realizar genotipificación sin recurrir a métodos invasivos para la obtención de la muestra.

La mayoría de las técnicas para la genotipificación RH usan a lo menos 2 pares de partidores. Un par es específico para un fragmento de 186 pb del exón 10 del *gen RHD* y otro para amplificar un fragmento de 136 pb del exón 7 del *gen RhD* o *RhCE*. La gran diversidad entre los fenotipos Rh (D) negativos descritos en la actualidad, ha producido una evolución gradual de las técnicas basadas en PCR, así las técnicas de tercera generación son capaces de detectar alelos negativos para D, deleciones del gen RHD y el gen RHD. Estas técnicas incluyen, además de los partidores para los exones 7 y 10, partidores para amplificar segmentos génicos de los exones 4, 5 y 6 que permiten distinguir variantes genotípicas que inducirían a una falsa tipificación de los fetos como D positivos.

La amplificación del DNA se puede realizar técnicas de PCR clásico o por el PCR en tiempo real (“PCR real time”).

Amplificación de DNA por PCR clásico. Se deben seleccionar los partidores adecuados, alguno de los cuales se indican en la tabla 29-2, además se debe incorporar la amplificación de una secuencia génica de alta frecuencia como control positivo. Las condiciones del PCR tienen algunas variaciones según los distintos fragmentos a amplificar. La visualización de los productos del PCR se realiza por electroforesis en gel de azarosa; así los fragmentos son separados por tamaño.

Tabla 29 -2: Secuencia de los oligonucleótidos seleccionados para PCR del sistema Rh

Nombre del partidor	Secuencia del oligonucleótido (5' -3')	Reconoce
EX4F EX4R EX4P	CTGCCA AAG CCT CTA CAG G (Sense) ATG GCA GAC AAC TGG GTG TC TTG CTG TCT GAT CTT TAT CCT CCG TTC CCT	Exón 4 gen RhD
EX5F EX5R EX5P	CGC CCT CTT CTT GTG GAT G GAA CAC GGC ATT CTT CTT TTC TCT GGC CAA GTT TCA ACT CTG CTC GCT	Exón 5 gen RhD
EX6F EX6R EX6P	ACA CGC TAT TTC TTT GCA GAC TTC T AGG TAC TTG GCT CCC CCA AC AGA TAG CCC AGC CAC AAG ACC CAG	Exón 6 gen RhD

PCR, reacción de polimerasa en cadena.

PCR en tiempo real. Esta técnica usa, además de los partidores, una sonda marcada con un fluoróforo. En el sistema se aprovecha la actividad 5' exonucleasa de las Taq polimerasas para producir un aumento de la intensidad de fluorescencia de una sonda que hibrida con un fragmento de 20 a 30 nucleótidos ubicados dentro del fragmento amplificado. Esta sonda posee un fluoróforo en su extremo 5' y un quenche en el extremo 3' (procedimiento que evita la pérdida de fluorescencia), de esta forma, si el fragmento se está amplificando, la actividad exonucleásica de la Taq escinde al fluoróforo, separándolo del quenche y de esta manera el aumento de la fluorescencia será proporcional a la cantidad de DNA presente en la muestra inicialmente. Este sistema detecta la amplificación que se lleva a cabo durante cada ciclo de la PCR y se visualiza sin tener que realizar una electroforesis en gel de agarosa. Con esta técnica se debe calcular un valor umbral de ciclo (Ct), que es en el cual la fluorescencia sobrepasa la línea base; este valor debe ser determinado para crear una curva estándar de referencia en la que se puede estimar la cantidad de DNA en el plasma materno.

Es necesario incorporar controles tales como la detección del DNA del receptor de quimioquina 5 (CCR5) fetal y materno, con el objetivo de detectar la eficiencia del procedimiento de extracción de DNA y estimar la cantidad total de DNA (tanto materno como fetal) presente en el plasma materno y la detección de cromosoma Y asociado al gen SRY en fetos masculinos con el objetivo de confirmar la presencia de DNA fetal en el plasma y estimar su cantidad en aquellas

mujeres cuyos fetos eran de sexo masculino.

3.1.2. Anemias hemolíticas autoinmunes

Las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) son procesos patológicos que cursan con disminución de la vida media eritrocitaria (ver capítulo 8, tabla 8-9).

El diagnóstico suele ser un hallazgo en el Banco de Sangre al recibir una solicitud de transfusión por anemia y al realizar las pruebas de compatibilidad pretransfusional se detecta una prueba antiglobulina directa (PAD) positiva y el autoanticuerpo libre en suero. Suponen un problema para la terapia transfusional, debido a que los autoanticuerpos suelen ir dirigidos contra antígenos presentes en los hematíes de casi todos los individuos, lo que hace prácticamente imposible la posibilidad de encontrar sangre completamente compatible. A su vez, el autoanticuerpo puede enmascarar la existencia de aloanticuerpos de importancia transfusional.

Los hallazgos de laboratorio reflejan tanto la intensidad del proceso hemolítico (aumento de LDH, hiperbilirrubinemia, descenso de haptoglobina libre) como la respuesta regenerativa de la médula ósea (reticulocitosis). El frotis muestra policromatofilia, esferocitos, algunos esquistocitos e, incluso, eritroblastos en los casos más intensos. La médula ósea muestra hiperplasia eritroide; si el cuadro hemolítico es crónico muestra rasgos megaloblásticos por el hiperconsumo de ácido fólico. La ausencia de reticulocitosis no excluye el diagnóstico de AHAI, pero sugiere mayor

gravedad, presumiblemente por la acción del autoanticuerpo sobre los eritroblastos. Las pruebas de fragilidad osmótica, de autohemólisis y los estudios de sobrevivencia de los hematíes son innecesarios.

Una prueba importante en el diagnóstico diferencial entre la AHAI y otras formas de anemia hemolítica, es la PAD. Esta prueba detecta el hecho central de las AHAI: la presencia de IgG y/o componentes del complemento unido a la superficie eritrocitaria. Cuando la PAD es positiva, deben realizarse pruebas específicas para IgG y para C3d para saber la proteína adherida. Una PAD positiva, confirmada con un específico IgG puede observarse aproximadamente en uno de cada 10.000 donantes de sangre. También una PAD positiva por C3d puede verse ocasionalmente en sujetos sanos, aunque este resultado casi siempre apunta la presencia de un autoanticuerpo frío o caliente, por lo que se debe destacar que la existencia de una PAD positiva no implica necesariamente una anemia hemolítica autoinmune. Por otra parte, aunque son raras (5%), existen anemias hemolíticas autoinmunes con PAD negativa. Estas AHAI que cursan con una PAD negativa se han atribuido a autoanticuerpos IgA, autoanticuerpos IgG de baja afinidad u otros mecanismos de autoinmunidad no mediada por anticuerpos. En aproximadamente el 70 % de los casos de AHAI los autoanticuerpos están también presentes en el suero y son detectados con la prueba antiglobulina indirecta (PAI) positiva.

Como toda prueba de laboratorio, la prueba antiglobulina requiere ser interpretada. Como ya se mencionó, se ha visto que individuos

sanos pueden presentar una PAD positiva y que pacientes con AHAI pueden tener una PAD negativa. Además una PAD positiva no siempre significa que los hematíes estén recubiertos de IgG y/o complemento. En ocasiones se presentan pruebas falsas positivas en pacientes hospitalizados y se debe a muestras coaguladas, tubos que contienen gel de silicona, muestras de vías que contienen soluciones de baja fuerza iónica e hipergammaglobulinemia.

Los autoantígenos son en la mayoría de los casos desconocidos, e incluso en los casos en que la especificidad de grupo sanguíneo se sabe, las estructuras relevantes no han sido descritas. Estos autoantígenos están presentes sobre todos los eritrocitos normales y así, en la práctica, todos los hematíes son incompatibles en las pruebas pretransfusionales.

La actitud a seguir con este tipo de anemias es realizar un estudio inmunohematológico adecuado: prueba antiglobulina, eluidos, titulaciones, paneles de identificación, estudio para descartar aloanticuerpos, etc. según el comportamiento térmico de los autoanticuerpos, criterio que clasifica las AHAI (ver capítulo 8).

a) AHAI por anticuerpos calientes

Los estudios apuntan a detectar si además del autoanticuerpo, hay presencia de aloanticuerpos en los pacientes que han presentado una PAD positiva. Si no existen antecedentes de transfusión o embarazo, es improbable que haya un aloanticuerpo en el suero. Dependiendo de si el paciente ha sido transfundido recientemente (en los últimos tres meses) o no, es el algoritmo que se sigue para el estudio (figura 29-2).

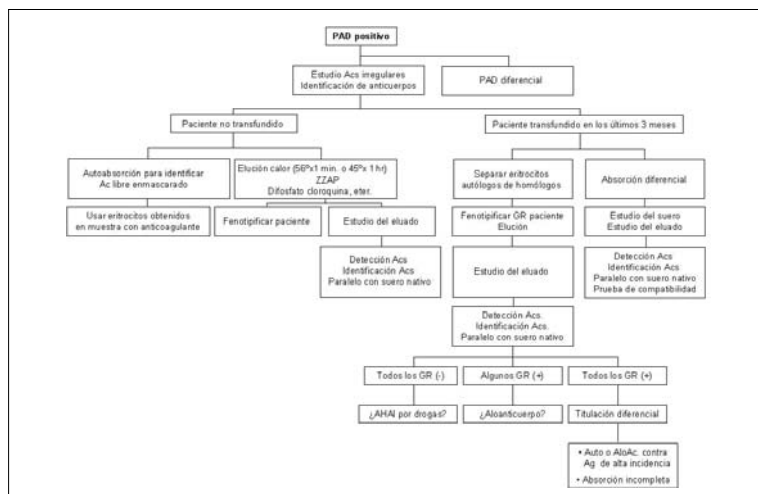


Figura 29-2: Estudio inmunohematológico en AHAI por anticuerpos calientes

En un paciente no transfundido recientemente, se realiza una autoabsorción (figura 29-3), con el propósito de detectar aloanticuerpos enmascarados, si los hay, deben ser identificados. En caso contrario no son necesarias pruebas adicionales y el suero autoabsorbido puede emplearse para las

pruebas de compatibilidad. A su vez, se debe realizar una elución a los hematíes para eliminar la IgG. Luego se comprueba que la PAD es negativa y se realiza fenotipificación de las células. El eluado puede usarse para identificación del autoanticuerpo.

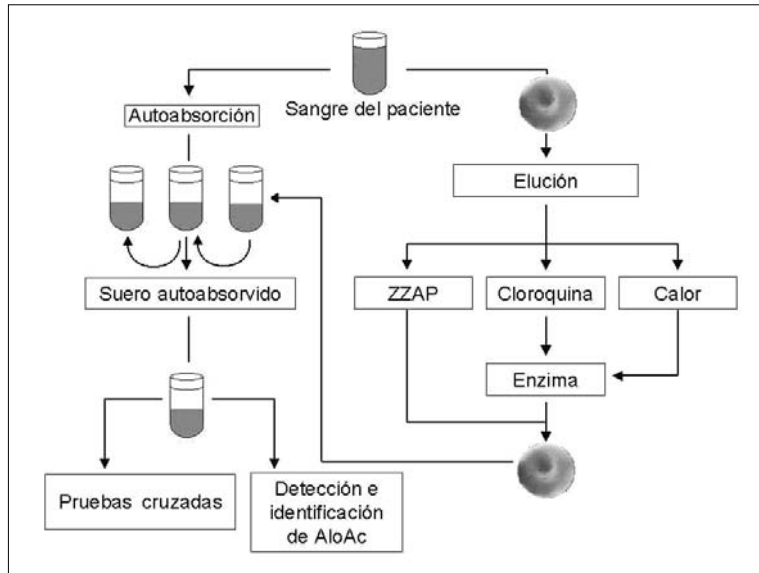


Figura 29-3: Autoabsorción en caliente para estudio de AHAI por anticuerpos.

Si el paciente ha recibido transfusiones en los últimos tres meses, se debe realizar una absorción diferencial (figura 29-4), teniendo cuidado en la interpretación de los resultados

de la absorción. Aloanticuerpos dirigidos contra antígenos de alta incidencia pueden ser eliminados. Se debe realizar una elución para luego estudiar el eluado (figura 29-2).

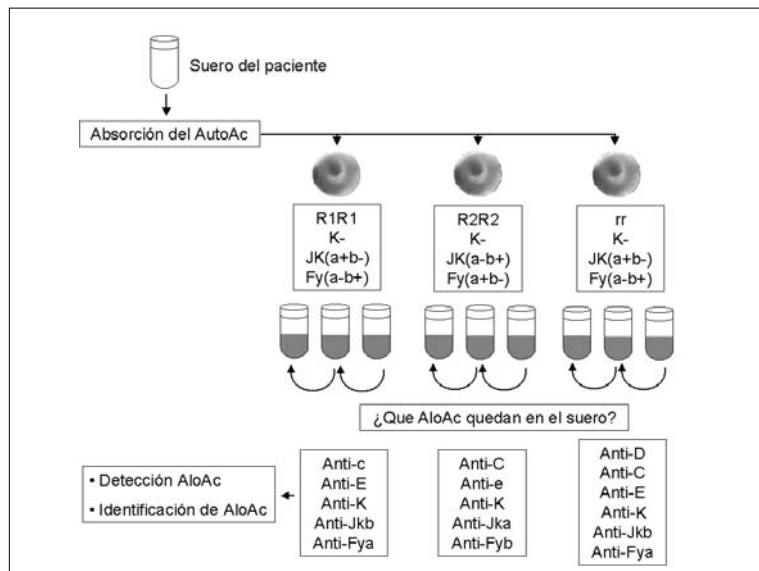


Figura 29-4: Absorción diferencial para estudio de aloanticuerpos en presencia de autoanticuerpos calientes.

b) AHAI por anticuerpos fríos

Los estudios inmunohematológicos en AHAI por anticuerpos fríos apuntan a determinar la amplitud térmica, el título y la especificidad del autoanticuerpo. Esta última carece de importancia en el manejo clínico o para la terapia transfusional del paciente. Se debe además estudiar la posible coexistencia con aloanticuerpos de importancia clínica, ya que éstos adquieren relevancia en una eventual transfusión.

El estudio se realiza a partir de muestras de sangre obtenidas con y sin anticoagulante, y mantenidas a temperatura de 37°C. Utilizando el suero o plasma se hará el estudio según algoritmo que se muestra en figura 29-5 para determinar el rango térmico, especificidad y título del autoanticuerpo. Para estudiar la coexistencia de un aloanticuerpo, se realiza autoabsorción usando los hematíes de la muestra anticoagulada (figura 29-6).

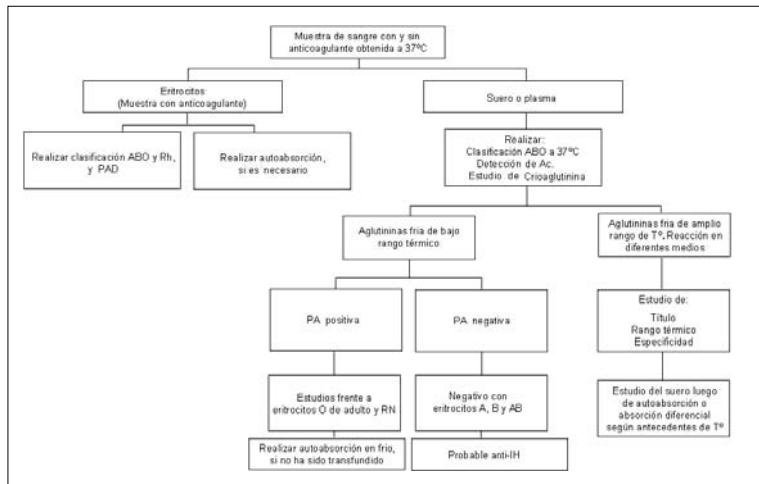


Figura 29-5: Estudio inmunohematológico en pacientes con AHAI por anticuerpos fríos.

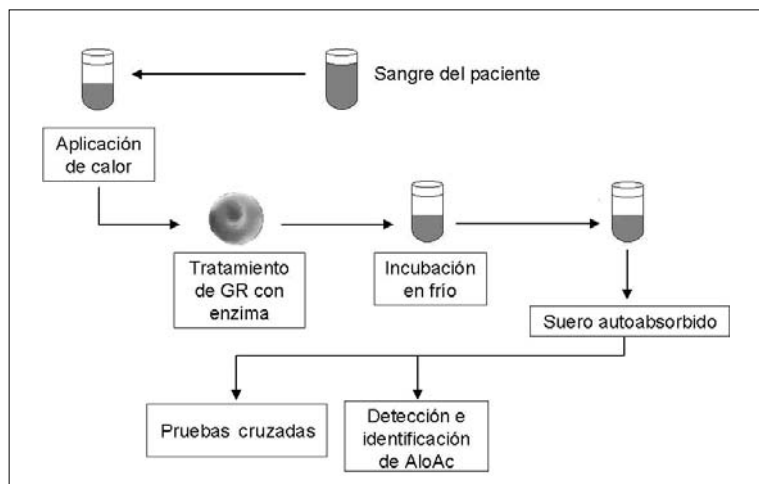


Figura 29-6: Autoabsorción en frío para estudio de AHAI por anticuerpos fríos.

Hemoglobinuria paroxística a frigore

La Hemoglobinuria paroxística a frigore (HPF) es la más infrecuente de las AHAI. Es causada por un anticuerpo clase IgG dirigido con

especificidad para el complejo antigénico P del hematíe; este tipo de anticuerpo fija el complemento sólo a bajas temperaturas (4°C) y al aumentar ésta a 37°C se activa el sistema del complemento provocando la lisis de los

hematíes (ver capítulo 8).

A esta hemolisina se denomina anticuerpo de Donath-Landsteiner. Su peculiar comportamiento hace que los estudios inmunohematológicos habituales sean casi siempre negativos, pues sólo durante la crisis hemolítica o poco después la PAD puede

resultar positiva para el componente C₃ del sistema del complemento. No obstante, la hemolisina bifásica es fácilmente detectable fuera de los episodios hemolíticos mediante la prueba de Donath-Landsteiner, que reproduce *in vitro* las condiciones fisiopatológicas de la enfermedad (figura 29-7).

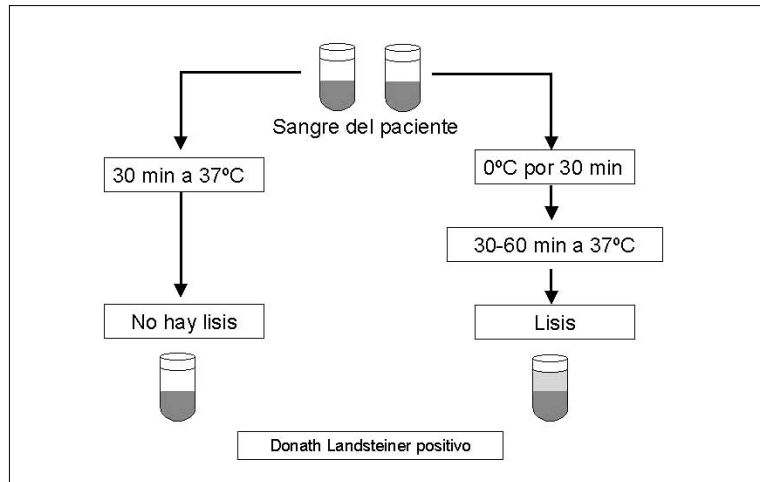


Figura 29-7: Prueba de Donath Landsteiner. Se utiliza en el estudio de Hemoglobinuria paroxística a frigore

AHAI inducida por drogas

Los mecanismos mediante los cuales las drogas pueden inducir a una AHAI han sido descritos previamente: adsorción de la droga, complejo inmune y autoanticuerpos (ver capítulo 8). El

diagnóstico diferencial entre cada uno de ellos, se basa en el cuadro clínico y los hallazgos serológicos. La tabla 29-3 muestra los mecanismos causantes de la PAD positiva, según clasificación.

Tabla 29-3. Mecanismos causantes de PAD positivas inducidas por drogas

Clasificación	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Adsorción de la droga	La PAD es fuertemente positiva debido a IgG, y a veces también con C3d. El suero y el eluado preparado a partir de los hematíes del paciente reaccionan sólo con hematíes recubiertos con la droga. En el suero se detecta un anticuerpo IgG potente.	Aproximadamente el 3% de los pacientes desarrolla una PAD positiva si están recibiendo dosis altas de la droga. Menos del 5% desarrolla anemia hemolítica. La hemólisis es extravascular.
Complejo inmune	Los hematíes generalmente están cubiertos sólo con complemento, en excepciones con IgG. El anticuerpo puede ser IgM o IgG. La droga debe incubarse con el suero y los hematíes para la prueba. El eluado es negativo.	Hemólisis intravascular aguda. Insuficiencia renal
Autoanticuerpos	La PAD es positiva debido a IgG, negativa por complemento, pero después de 3 a 6 meses con el medicamento. Los anticuerpos en el suero y el eluado provienen de los hematíes del paciente.	La PAD positiva ocurre en un 15% de los pacientes y es dosis dependiente. Menos del 1% de los pacientes desarrollan anemia hemolítica.

PAD, prueba de antiglobulina directa.

3.2. Anemias hemolíticas no inmunes

Las anemias hemolíticas extracorpúsculares no inmunes, generalmente se diagnostican asociadas a la enfermedad de base o por conocimiento del agente causal. Algunos ejemplos:

anemias hemolíticas de origen hepático, anemias hemolíticas de causa mecánica, hemólisis del ejercicio, hemólisis de origen cardíaco, anemias hemolíticas por tóxicos (infecciones, agentes físicos y químicos y venenos de serpientes o arañas).

LECTURAS SUGERIDAS

Enfermedad hemolítica del recién nacido. Disponible en: <http://www.aeped.es/protocolos/neonatología/hemolítica-rn.pdf>

Finning, K., Martin, P., Soothill, P., Avent, N. "Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service". *Transfusion*; 42:1079-1085, 2002.

Gamma Biologicals, Inc. Houston.Tx. Inmunoematology Methods. Appendix 2: 11-12, 15-16, 20-21. 1998.

Harmening, D. **Modern Blood Banking and Transfusion Practices**, 4ª edición. Chapter 20 and 21, 1999.

Lindenbaum, J. "Estudio de las anemias" En **Tratado de medicina interna**, Wyngaarden, J. B., Smith L.H., Bennet, J.C., ed. Cecil. 19ª edición. Filadelfia, W.B. Saunders Company, 1992, pp. 955-965.

Lo, Y., Corbetta, N., Chamberlain, P., Rai, V., Sargent, I., Redman, S., Wainscoat, J. "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum". *Lancet*; 350:485-487, 1997.

Lynn, K., Hoffstadter, P.J., De Christopher, J, Perkins, T., Berte, L.M. **Transfusion-Medicine**, Primera edición. ASCP press. 1992, pp. 110-24.

Palomo, I., Pereira, J., y Vasquez, M. "Citopenias inmunes" En **Fundamentos de inmunología básica y clínica**, Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Roseblatt, M., Vergara, U. (eds.), capítulo 26, Editorial Universidad de Talca, 2002.

Palomo, I, Pereira, J. **Fisiopatología de las citopenias inmunes**. Editorial Universidad de Talca, 1995.

Seltsam, A., Hallensleben, M., Kollmann, Burkhart, J., Blasczyk, R. "Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 by PCR screening reveals new ABO alleles". *Transfusion*; 43:428-439, 2003.

Sinsek, S., Faas, B., Bleeker, P., Overbeeke, M., Cuijpers, H., Van der Schoot, C., Von dem Borne, A. "Rapid Rh D genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA". *Blood*; 10:2975-2980, 1995.

St-Louis, M., Perreault, J., Lemieux, R. "Extended blood grouping of donors with automatable PCR-ELISA genotyping". *Transfusion*; 43:1126-1132, 2003.

Storry, J. "Molecular basis of erythrocyte blood group antigens and applications in transfusion medicine". *Vox Sanguinis*; 83 (Suppl. 1): 81-84, 2002.

Technical Manual, ed.12ª. American Association of Blood Banks, Bethesda, MD, 1997.

Vázquez, M., Fernández, J.L., Romero, Y., Morales, R. "Autoimmune hemolytic anemia due to biphasic hemolysin". *An Pediatr (Barc)* 2003; 59: 194 - 195

Vives Corrons, J.L. "Introducción al estudio de la anemia. Aspectos generales del diagnóstico" En: **Hematología Clínica**, Sans Sabrafen, C., Besses Raebel, J.L., Vives Corrons (eds). Barcelona, 2001, pp. 91-104.

ESTUDIO DE LABORATORIO DE ENFERMEDADES ONCOHEMATOLÓGICAS

María Eugenia Legues S., Concepción Risueño A., Juan Luis Castillo N.,
Elba Leiva M. e Iván Palomo G.

1. **Introducción**
2. **Citoquímica**
 - 2.1. Antecedentes generales
 - 2.2. Selección de métodos citoquímicos
 - 2.2.1. Peroxidasas
 - 2.2.2. Esterasas
 - 2.2.3. Fosfatasas ácidas
 - 2.2.4. Fosfatasas alcalinas de los neutrófilos
 - 2.2.5. Tinción de Perls para hierro
 - 2.3. Aspectos especiales
3. **Estudio citogenético**
 - 3.1. Citogenética clásica
 - 3.1.1. Antecedentes generales
 - 3.1.2. Análisis citogenético
 - a) Fotografía y cariotipo
 - b) Leucemia aguda
 - c) Síndromes mielodisplásicos
 - d) Anemia aplásica
 - e) Leucemia mieloide crónica y otros síndromes mieloproliferativos
 - f) Síndromes linfoproliferativos
 - 3.1.3. Aspectos prácticos
 - 3.2. Hibridación *in situ* con fluorescencia
 - 3.2.1. Antecedentes generales
 - 3.2.2. Aspectos metodológicos
 - 3.2.3. FISH interfásico
 - 3.2.4. FISH en el seguimiento de una enfermedad
 - 3.2.5. Avances relacionados con FISH
4. **Biología molecular**
 - 4.1. PCR y modificaciones
 - 4.1.1. PCR
 - 4.1.2. RT-PCR
 - 4.1.3. Q-PCR
 - 4.2. Aplicaciones de las PCR en oncohematología
 - 4.2.1. Leucemias Agudas
 - 4.2.2. Leucemia mieloide crónica
 - 4.2.3. Linfomas no Hodgkin
 - 4.3. Consideraciones
5. **Citometría de flujo**
 - 5.1. Generalidades
 - 5.2. Aplicaciones en el estudio de Leucemias, linfomas y gammopatías monoclonales
 - 5.2.1. Indicaciones médicas
 - 5.2.2. Toma de muestras para estudios inmunofenotípicos
 - 5.2.3. Almacenamiento y transporte de muestras para estudios inmunofenotípicos
 - 5.2.4. Preparación de la muestra para un estudio inmunofenotípico
 - 5.2.5. Análisis según cuadro clínico
 - 5.2.6. Informe de resultados
6. **Inmunoquímica aplicada a Gammopatías monoclonales**
 - 6.1. Pesquisa y estudio de la proteína monoclonal
 - 6.2. Viscosidad sérica
 - 6.3. Beta 2 microglobulinemia
 - 6.4. Inhibidor 1 del activador de Plasminógeno (PAI-1), Fibrinógeno, Proteína C reactiva (PCR) e Interleuquina 6 (IL-6).
 - 6.5. Nuevos marcadores

RESUMEN

En este capítulo se describe los fundamentos de varias metodologías que son utilizadas en el diagnóstico y control de evolución de enfermedades oncohematológicas: histoquímica, estudio citogenético, biología molecular, citometría de flujo, e inmunquímica aplicada a gammopatías monoclonales.

En cuanto a histoquímica se describen varios métodos citoquímicos: peroxidasas, esterasas, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina de los neutrófilos y tinción de Perls para hierro.

Respecto al estudio citogenético, se mencionan los aspectos metodológicos fundamentales y las aplicaciones de la citogenética clásica y de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

Sobre la biología molecular se describe el fundamento y las aplicaciones en leucemias agudas, leucemia mieloide crónica y linfomas no Hodgkin de la reacción de polimerasa en cadena (PCR) y sus modificaciones (RT-PCR y Q-PCR).

De citometría de flujo se indica sus fundamentos metodológicos y sus aplicaciones en el estudio de leucemias, linfomas y gammopatías monoclonales.

En cuanto a inmunquímica, solo se describe la que se aplica en el estudio de gammopatías monoclonales, destacando los métodos de pesquisa y estudio de la proteína monoclonal.

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, además de los aspectos clínicos (signos y síntomas), el diagnóstico de patologías oncohematológicas como las leucemias, los linfomas y las gammopatías malignas (ej. mieloma múltiple), radicaba fundamentalmente en el estudio citológico de sangre periférica y de médula ósea (hemograma y mielograma, respectivamente) y/o biopsia de médula ósea y/o ganglios linfáticos, según la enfermedad.

Actualmente, debido al avance en el conocimiento fisiopatológico de estas patologías, como también por los nuevos esquemas terapéuticos, se requiere, sin dejar de lado la citología y el estudio anatomopatológico, de varias otras metodologías como son: histoquímica, el estudio citogenético, la biología molecular, la citometría de flujo, y el estudio inmunquímico aplicado a las gammopatías monoclonales. Este capítulo trata sobre los fundamentos y aplicaciones de dichas metodologías, en el contexto de las enfermedades oncohematológicas.

2. CITOQUÍMICA

2.1. Antecedentes generales

En el campo de la hematología, el diagnóstico citológico de las leucemias y otras neoplasias

se ha basado en la aplicación de técnicas de tinción de tipo Romanowsky, que utilizan eosina y azul de metileno en solución para resaltar las estructuras celulares. Una de ellas es la tinción May Grünwald – Giemsa (MGG), desarrollada por Ehrlich en 1891.

A pesar de los avances en otras técnicas para precisar el diagnóstico de las neoplasias hematológicas como la citogenética, citometría de flujo y biología molecular, el examen microscópico detallado del frotis de sangre periférica y médula ósea teñidos con el método habitual de MGG siguen siendo fundamentales. La microscopía sola puede dar un diagnóstico definitivo de leucemia mieloide aguda (LMA) o de los síndromes mielodisplásicos (SMD) y un diagnóstico provisorio de leucemia linfática aguda (LLA) que requiere confirmación inmunofenotípica. La microscopía también es crucial en el diagnóstico de la leucemia mieloide crónica y es necesaria en el diagnóstico de otros síndromes mieloproliferativos (SMP). También es importante en los síndromes linfoproliferativos (SLP) pero puede ser insuficiente si no se complementa con el inmunofenotipo.

La primera técnica citoquímica – enzimática fue la reacción de peroxidasas basada en bencidina, introducida por Fischel en 1910. Él

observó que al analizar una población de blastos leucémicos, al menos una minoría de mieloblastos daba reacción positiva a las peroxidadas, en contraste con los linfoblastos.

Actualmente existe un amplio número de tests citoquímico enzimáticos e histoquímicos aplicados a la hematología y esto impide, a veces, comparar resultados obtenidos en diferentes laboratorios.

El empleo de varios métodos citoquímicos en la caracterización de las neoplasias hematológicas es laborioso y en ocasiones no resulta útil. Por esta razón el Comité de Estandarización en Hematología recomienda un número limitado de procedimientos esenciales. Las técnicas recomendadas incluyen la reacción de peroxidadas, fosfatasas alcalinas, fosfatasas ácidas, estearasas no específicas y cloroacetato estearasas, además de la tinción de Perls para estudiar las reservas de hierro.

En los laboratorios que disponen de citometría de flujo para el estudio inmunofenotípico, la citoquímica se emplea como complemento ocasional en los casos difíciles de clasificar.

2.2. Selección de métodos citoquímicos

A continuación se indican las características más importantes de cada uno de los métodos citoquímicos, especialmente su potencial uso clínico.

2.2.1. Peroxidadas

La reacción de peroxidadas en la médula ósea es fuertemente positiva en células de la serie granulocítica. La demostración de actividad peroxidásica, en al menos 3% de blastos leucémicos, establece el diagnóstico de LMA. En los subtipos M2, M3 y M4 de la clasificación Franco Americano Británica (FAB), habitualmente la mayoría de los blastos son peroxidasa positivos.

En monocitos la reacción es débilmente positiva. Los linfocitos y precursores eritroides son peroxidasa negativos.

Se ha reportado que los anticuerpos monoclonales anti-mieloperoxidasa son más sensibles que la reacción citoquímica.

2.2.2. Estearasas

Las tinciones de estearasas son útiles para

diferenciar células de la serie neutrófila y monocítica.

La Naftol AS-D cloroacetato estearasa está presente en células de la línea neutrófila y es débil o negativa en monocitos y sus precursores. El patrón de reacción va en paralelo al resultado de la peroxidasa pero es menos sensible porque la cloroacetato estearasa es débil en muchos blastos leucémicos. La reacción es más fuerte en células diferenciadas y es útil para demostrar la diferenciación promielocítica.

Las estearasas no específicas, como lo indica su nombre, son enzimas ubicuas presentes en varios tipos celulares, incluyendo monocitos, células T y megacariocitos. Las técnicas para su demostración pueden usar varios sustratos, incluyendo alfa Naftil acetato estearasa, Naftol AS-D acetato estearasa y alfa Naftil Butirato estearasa.

El patrón de tinción que se obtiene puede ayudar a distinguir los tipos celulares. Los monocitos tienen reactividad fuerte y difusa a través del citoplasma. En las células T (incluyendo linfoblastos T) y megacariocitos, el patrón es más focal (gránulos densos).

Aproximadamente un 25% de las leucemias agudas promielocíticas son positivas para las estearasas no específicas. Sin embargo, los eritroblastos en la leucemia tipo M5 también tienen positividad intensa difusa, que necesita diferenciarse de la que presentan los monocitos. En el procedimiento se agrega un paso de inhibición con fluoruro para hacerlas más específicas. La actividad de la enzima en células de la línea monocítica se inhibe con el fluoruro, en cambio, en la mayoría de las otras células, persiste.

2.2.3. Fosfatasas ácidas

La actividad de fosfatasas ácidas puede demostrarse hasta cierto grado en todas las líneas celulares. La utilidad de esta tinción en la evaluación diagnóstica de la leucemia aguda está limitada a los pacientes con LLA. La reacción positiva de tipo focal, paranuclear en los linfoblastos, es evidencia presuntiva de fenotipo T. Este examen está ampliamente superado por el estudio inmunofenotípico.

En la mayoría de los casos de leucemia de células velludas y en algunos de su forma variante, se observa una reacción positiva de fosfatasas ácidas que es resistente al tartrato.

Sin embargo, también se observan reacciones positivas resistentes en una minoría de casos de leucemia prolinfocítica B y en linfoma esplénico con linfocitos velludos.

2.2.4. Fosfatasas alcalinas de los neutrófilos

La obtención de un porcentaje bajo de positividad de fosfatasas alcalinas en los granulocitos neutrófilos es compatible con el diagnóstico de leucemia mieloide crónica (LMC), pero el examen es innecesario si se dispone del estudio citogenético o molecular para detectar el cromosoma Philadelphia.

En aproximadamente 5% de los casos de LMC en fase crónica el resultado de la reacción es normal. Esto puede llevar a una interpretación diagnóstica errónea. El valor también puede resultar bajo en la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y en el 30 a 50 % de casos de SMD.

2.2.5. Tinción de Perls para hierro

La tinción de azul de Prusia (Perls, 1867) es uno de los métodos histoquímicos más antiguos y se realiza hasta hoy prácticamente sin cambios desde su descripción original. Este es uno de los mejores métodos para conocer las reservas de hierro en la médula ósea, lo cual es fundamental para el diagnóstico de una variedad de condiciones asociadas a la anemia. Está indicada en todos los casos de sospecha de SMD para confirmar el diagnóstico y para la caracterización posterior de los casos de anemia refractaria o anemia refractaria con sideroblastos en anillo.

2.3. Aspectos especiales

Para no llegar a una interpretación errónea de las diferentes tinciones citoquímicas es necesario realizarlas en el contexto de las características clínicas, hematológicas y citológicas del caso particular. Antes de proceder a una tinción específica es importante haber designado el caso como perteneciente a uno de los siguientes grupos generales: leucemia aguda, SMD, SMP o SLP.

Algunos casos de LMA subtipo M1 pueden identificarse rápidamente con la citología básica, sobre todo si los blastos presentan bastones de Auer en su citoplasma, pero para identificar los restantes, es útil la reacción citoquímica de peroxidadas.

Las estearasas no específicas permiten identificar la mayoría de LMA subtipo M5, pero en una minoría de casos subtipo M5a las reacciones de peroxidadas y estearasas no específicas son negativas y el diagnóstico se basa en la citología, combinada con el inmunofenotipo.

La LMA subtipo M0 que presenta signos de diferenciación mieloide, no se puede detectar con la tinción de peroxidadas pues resulta negativa. La citoquímica no es útil en el diagnóstico de LMA subtipo M7.

3. ESTUDIO CITOGENÉTICO

3.1. Citogenética clásica

3.1.1. Antecedentes generales

El descubrimiento del cromosoma Philadelphia (Ph) en células de pacientes con LMC en el año 1960 señaló el principio de una nueva era en la genética del cáncer. El hallazgo de que se trataba de una translocación entre los cromosomas 9 y 22 marcó el inicio de un período de intenso estudio del cariotipo de las células leucémicas revelando muchas anomalías cromosómicas recurrentes.

Estas alteraciones comenzaron a tener importancia creciente como ayuda diagnóstica y como índice de pronóstico. Hoy día ningún estudio de leucemias a gran escala se consideraría completo sin la información cariotípica.

Las neoplasias hematológicas y tumores sólidos pueden tener una variedad de alteraciones cromosómicas visibles a nivel citogenético convencional, que incluyen cambios numéricos (aneuploidías) y estructurales (deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones).

Se ha demostrado que existe relación entre los sitios de algunas alteraciones y la posición de oncogenes celulares. A nivel genético, los eventos que se producen pueden desregular un gen intacto por interrupción o cambio de sus elementos adyacentes de control o crear un gen nuevo de fusión.

La citogenética del cáncer es una disciplina que evoluciona rápidamente como tantas en la biología actual y está viviendo cambios dinámicos en su tecnología y aplicaciones. En la década de los 80 se desarrollaron las técnicas

de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) que han permitido estudiar lugares específicos del genoma (ver punto 3.2)..

El estudio molecular de los genes adyacentes a los puntos de ruptura de translocaciones específicas y de la función de sus productos, han ayudado a clarificar las complejas interacciones que promueven la oncogénesis y perpetúan el fenotipo neoplásico (ver punto 4).

En los párrafos siguientes se explicarán los pasos esenciales del análisis citogenético y el rol que tiene actualmente en el estudio de laboratorio de las neoplasias hematológicas.

3.1.2. Análisis citogenético

El análisis citogenético de las neoplasias hematológicas se realiza en una muestra de médula ósea, único lugar donde se encuentran las células malignas en cantidad suficiente, conservando su naturaleza de división rápida y pueden ser acumuladas en metafase mediante un procedimiento directo o cultivo corto en medio líquido. En caso de dificultad en la obtención de médula se usa sangre periférica como sustituto.

El uso de colchicina permite cosechar un número suficiente de células metafásicas. Estas se tiñen con bandeado G, método basado en la acción de enzimas proteolíticas como la tripsina sobre los cromosomas y luego tinción con solución Giemsa con lo que se obtiene zonas claras y oscuras en las estructuras cromosómicas en un patrón que es específico para cada par cromosómico.

La labor más extensa en la citogenética es el análisis cromosómico al microscopio de campo claro. Aunque se haya puesto el mayor cuidado en los procedimientos, el índice mitótico obtenido en algunos casos es bajo y se necesita observar muchas preparaciones buscando metafases. Estas deben analizarse al azar, sin seleccionar las de mejor morfología que generalmente son normales.

a) Fotografía y cariotipo

El cariotipo define las características de los cromosomas de una célula observados al microscopio, fotografiados y ordenados según el ideograma estándar establecido en el "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN). Una muestra puede tener un cariotipo similar en todas sus células

o presentar dos o más líneas celulares diferentes (figura 30-1).

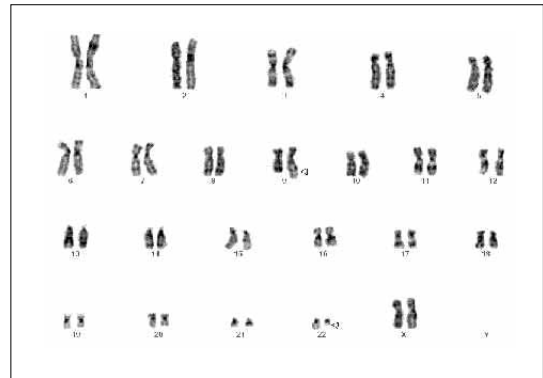


Figura 30-1. La imagen corresponde a un cariotipo 46,XX,t(9;22)(q34;q11.2) o cromosoma Philadelphia, en una célula de un paciente con Leucemia mieloide crónica.

La cantidad mínima adecuada de células analizadas, según normas internacionales, es 20 metafases bandeadas. De ese total, se fotografía y arma el cariotipo de un número variable de células en cada estudio, según la calidad de las metafases y la complejidad de las anomalías cromosómicas encontradas.

La descripción del cariotipo y sus alteraciones deben seguir las normas del ISCN. Este sistema contiene representaciones esquemáticas de los cromosomas con numeración de las bandas a lo largo de cada brazo cromosómico desde el centrómero hacia fuera. El brazo corto se designa p y el brazo largo q.

En el núcleo de una célula humana existen 46 cromosomas, 22 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales, X e Y. El cariotipo de una célula normal femenina es 46,XX y el de una normal masculina 46,XY.

Con entrenamiento se puede reconocer cada par cromosómico por su tamaño, ubicación del centrómero, forma y patrón de bandeado.

El citogenetista identifica cada par cromosómico y compara ambos homólogos para detectar diferencia en tamaño y bandas. Tales diferencias pueden indicar pérdida, ganancia o intercambio de material cromosómico, en definitiva de DNA.

b) Leucemia aguda

El estudio citogenético realizado en la médula ósea de un paciente con leucemia aguda en el

momento del diagnóstico, permite clasificarlo en alguno de los grupos pronósticos: favorable, intermedio o desfavorable (tablas 30-1 y 30-2). Sin embargo las alteraciones cromosómicas dan cuenta sólo parcialmente de lo variado del comportamiento clínico de las neoplasias. Pueden existir alteraciones genéticas no visibles a nivel cromosómico que empeoran el pronóstico, o que alteran la respuesta esperada al tratamiento.

Una anomalía cromosómica es un marcador clonal totalmente específico, utilizable para monitorizar la enfermedad en su remisión (enfermedad residual mínima) con métodos moleculares sensibles, por ejemplo la t(9;22), cuyo gen de fusión es BCR/ABL, puede detectarse por FISH y por PCR (particularmente PCR semi cuantitativo).

El estudio citogenético también es útil cuando el diagnóstico de LMA está en duda, pues el tipo de alteración observada podría aclararlo.

El hallazgo de la t(15;17)(q22;q11-12) en LMA subtipo M3 es relevante con respecto al tratamiento, por el rol específico que juega el ácido trans-retinoico (ATRA) que induce diferenciación de los promielocitos. Los pocos casos que presentan las variantes t(11;17)(q23;q11-12) o t(5;17)(q35;q11-12) no responden al tratamiento con ATRA.

En LLA, los casos Ph positivos o con t(4;11)(q21;q23) son de mal pronóstico y necesitan protocolos de tratamiento más intensivos o trasplante de médula ósea. A diferencia de ellos, los casos que presentan hiperdiploidía >50 cromosomas, o t(12;21)(p13;q22) requieren de tratamientos menos agresivos.

En LLA tipo Burkitt es importante la confirmación citogenética de la translocación característica t(8;14)(q24;q32) o sus variantes t(2;8)(p11.2;q24) y t(8;22)(q24;q11) dada la buena evolución que presentan con quimioterapias alternativas intensivas.

En la leucemia del recién nacido es importante la detección de la t(4;11)(q21;q23) que indica un pronóstico muy adverso.

El estudio citogenético no es recomendable para pacientes con leucemia aguda en remisión, ya que no es suficientemente sensible.

c) Síndromes mielodisplásicos

Cuando se sospecha SMD la demostración de una anomalía citogenética clonal confirma el diagnóstico, aunque se debe tener en mente que un resultado normal no lo excluye. Si la anomalía encontrada es una de las que se considera de mal pronóstico en LMA, es predictivo de transformación rápida a leucemia o muerte por complicaciones debidas a las citopenias.

d) Anemia aplásica

En la anemia aplásica no está indicado el estudio citogenético si el paciente no dispone de muchos recursos económicos, porque generalmente no se obtienen células en división y es raro que se detecte una alteración cromosómica. Sin embargo, el hallazgo de una alteración indica la existencia de un clon neoplásico, importante para el diagnóstico y elección del tratamiento. La aparición de caracteres displásicos en una anemia aplásica es sugerente de un clon neoplásico y por lo tanto es indicación de análisis citogenético.

e) Leucemia mieloide crónica y otros síndromes mieloproliferativos

En LMC es importante identificar el cromosoma Ph incluyendo sus variantes. Aunque hay poca evidencia de que difieran en cuanto al pronóstico de la clásica t(9;22)(q34;q11.2), su detección provee una base importante para seguir el curso de la enfermedad con tratamientos como interferón, imatinib o trasplante de médula ósea. Los métodos moleculares para detectar el gen quimérico BCR/ABL son más sensibles y sirven además en las LMC Ph negativas con cariotipo normal, complementando a la citogenética.

El hallazgo de anomalías cromosómicas adicionales al Ph en el momento del diagnóstico o su desarrollo en el curso de la enfermedad son indicadores de evolución clonal y pueden ser precursores de una fase acelerada o transformación blástica.

En síndromes mieloproliferativos con caracteres atípicos como basofilia marcada o blastos en sangre periférica, y en trombocitemia esencial, es importante detectar si son Ph positivos o si presentan otra alteración.

Tabla 30-1 Clasificación de LMA y SMD en grupos pronósticos según la citogenética

Citogenética	Genes de fusión	Otros factores modificantes
Citogenética favorable		
LMA		
t(8;21)(q22;q22)	AML1/ETO	FLT3 ITD ^a (9%) + del(9q), + alt. Complejas
inv(16)(p13q22)	CBFb/MYH11	FLT3 ITD (7%)
t(16;16)(p13;q22)		
t(15;17)(q21;q11)	PML/RARa	FLT3 ITD (37%)
Variantes:		
t(11;17)(q23;q11)	PLZF-RARa	
t(5;17)(q32;q11)	NPM-RARa	
t(11;17)(q13;q11)	NuMA-RARa	
SMD		
Normal		
del(5q) sólo		
del(20q) sólo		
Citogenética intermedia		
LMA		
+8		FLT3 ITD (28%)
Cariotipo normal		FLT3 ITD (34%) MLL ITD (10%)
Otras: -Y,+6		
Otros cariotipos no considerados favorables o desfavorables		FLT3 ITD (20-30%)
SMD		
+8		
Citogenética desfavorable		
LMA		
Anormalidades de 11q23	MLL	FLT3 ITD (0%)
Variantes comunes:		
t(4;11)(q21;q23) (Pediátricos)	MLL/AF4	
t(9;11)(p22;q23)	MLL/AF9	
t(11;19)(q23;p13.1)	MLL/ELL	
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL/ENL	
t(6;9)(p23;q34)	DEK/CAN	inv(3)(q21q26)
t(3;3)(q21;q26)	Riboforina/EVI1	FLT3 ITD (17%)
-5/del(5q)		Resistencia a drogas
-7/del(7q)		Resistencia a drogas
Otras: 20q, 21q, del(9q), t(9;22), Anorm. 17p, cariotipo complejo		FLT3 ITD (7%)
SMD		
-5		
-7/del(7q)		
inv(3)(q21q26)		
t(6;9)(p23;q34)	DEK/CAN	
Cariotipo complejo		

^a "internal tandem duplication"

Tabla 30-2. Clasificación de LLA en grupos pronósticos según la citogenética

Citogenética	Gen de fusión
Citogenética favorable Hiperdiploidía >50 cromosomas t(12;21)(p13;q22) ^a	TEL/AML1
Citogenética desfavorable LLA t(9;22)(q34;q11.2) t(4;11)(q21;q23) Hipodiploidía	BCR/ABL MLL/AF4

^a translocación criptica por citogenética, detectable por estudio molecular

f) Síndromes linfoproliferativos

En los SLP el estudio citogenético puede confirmar un diagnóstico provisorio: por ejemplo, el hallazgo de t(14;18)(q32;q11) confirma la sospecha de linfoma folicular, t(11;14)(q13;q32) lo hace respecto del linfoma del manto y una t(2;5)(p23;q35) la sospecha de linfoma de células grandes anaplásico de línea T. Sin embargo, muchas translocaciones no son totalmente específicas de una categoría histológica, de modo que el cariotipo debe interpretarse en el contexto de los hallazgos citológicos y clínicos. Por ejemplo, la t(11;14)(q13;q32) no sólo se detecta en el linfoma del manto, sino también en una proporción significativa de pacientes con linfoma esplénico con linfocitos vellosos, en algunos pacientes con leucemia prolinfocítica B y en mieloma múltiple.

En los SLP las alteraciones citogenéticas tienen importancia pronóstica sólo cuando se consideran en conjunto el diagnóstico preciso y el cariotipo.

En los pacientes con leucemia linfática crónica tipo B (LLC-B), el pronóstico y el curso clínico son muy variables. Algunos permanecen estables y otros desarrollan una progresión de la enfermedad, requiriendo tratamiento.

Estudios de citogenética convencional han detectado algunas anomalías cromosómicas en 40 – 50% de los pacientes. Estudios FISH han revelado anomalías no detectadas por la citogenética. Por citometría de flujo se ha analizado la expresión de CD38 encontrando positividad asociada a algún desbalance cromosómico y los estudios de mutaciones en

los genes de inmunoglobulinas han mostrado que el grupo de pacientes que tiene enfermedad estable o lenta progresión, presenta mutaciones somáticas, a diferencia del grupo que no las presenta. Sin embargo, se necesita más investigación para aclarar si alguna de las alteraciones encontradas tiene un rol en el cambio de curso de la enfermedad.

3.1.3. Aspectos prácticos

Para lograr resultados óptimos al tomar una muestra para análisis citogenético y evitar pérdida de tiempo y recursos valiosos, ésta debe transportarse de inmediato al laboratorio, acompañada de los detalles clínicos más relevantes y el diagnóstico probable. Debe consultarse los resultados del inmunofenotipo y del examen citológico de médula ósea, hasta completar la información necesaria. Por ejemplo, en un síndrome linfoproliferativo sólo es relevante seguir adelante con el estudio citogenético si se confirma la infiltración de la médula ósea por células neoplásicas.

3. 2. Hibridación *in situ* con fluorescencia

3.2.1. Antecedentes generales

A finales de la década de 1980 se desarrollaron varias técnicas basadas en FISH, las cuales han significado un gran avance en la citogenética. Estas técnicas utilizan secuencias de ácidos nucleicos como sondas para blancos específicos en el DNA. Virtualmente cualquier segmento del DNA genómico se puede usar como sonda para investigar una región problema cuyo fragmento está identificado previamente. Puede estudiarse tanto en cromosomas metafásicos como en células interfásicas y también analizarse varias

regiones simultáneamente usando diferentes fluorocromos para marcar las sondas.

Las aplicaciones de las técnicas de FISH son numerosas (tabla 30-3). Aunque algunas de sus aplicaciones permanecerán solamente como herramientas de investigación, esta tecnología y las sondas comerciales para muchas anomalías cromosómicas de relevancia diagnóstica, están hoy al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos.

Es importante contar con esta metodología en la identificación de translocaciones recurrentes en las leucemias, en los casos en que los estudios citogenéticos no resultan informativos ya sea por bajo índice mitótico, mala morfología de los cromosomas o en casos de reordenamientos muy complejos.

En los últimos años se ha desarrollado más aún, comenzando una nueva era para la citogenética molecular, con el FISH Múltiple, cariotipo multicolor o "Spectral karyotyping (SKY)", hibridación del genoma comparativo (CGH) y técnicas de "microarrays", que permiten identificar alteraciones no detectables por la citogenética convencional.

3.2.2. Aspectos metodológicos

El método se basa en la unión, en forma complementaria, de una secuencia de nucleótidos denominada sonda, a una secuencia blanco específica de DNA o RNA en la célula.

La sonda está marcada con un fluorocromo y los sitios donde se une, se visualizan en la observación al microscopio de fluorescencia. Se utilizan células fijadas, que han tenido un procedimiento de cosecha como para un estudio citogenético convencional y son goteadas sobre un portaobjetos. Se someten a denaturación del DNA con formamida y luego se dejan en contacto con la sonda específica (hibridación). Después de unas horas se observa las señales de fluorescencia esperadas.

Sondas de DNA. Existen distintos tipos de sondas que se pueden adquirir comercialmente. Las más usadas en Hematología son:

a) Centroméricas específicas para cada cromosoma. Detectan secuencias repetitivas tipo alfa o beta satélite, ubicadas en el centrómero del cromosoma; se usan para detectar anomalías cromosómicas numéricas.

b) Sondas que pintan todo el cromosoma. Son mezclas complejas de secuencias que cubren un cromosoma completo. Existen para cada uno de los cromosomas. Su utilidad se restringe al análisis metafásico. Se usan para aclarar mejor las alteraciones complejas encontradas con el estudio citogenético convencional.

c) Sondas *locus* específicas. Detectan alteraciones estructurales como translocaciones, inversiones y deleciones específicas.

Tabla 30-3. Aplicaciones de FISH en Hematología

- Identificación de anomalías numéricas y estructurales
- Caracterización de cromosomas marcadores
- Detección de enfermedad residual mínima
- Quimerismo de células después de trasplante de médula ósea
- Identificación de regiones de deleción o amplificación

3.2.3. FISH interfásico

El FISH interfásico ha facilitado grandes avances en el análisis citogenético por la habilidad de usar como blanco células que no están en división. Esto permite la observación de gran número de células, lo cual es una ventaja en

algunas neoplasias hematológicas en que la actividad proliferativa es baja, o cuando las células que se dividen *in vitro* no son las del clon neoplásico, como sucede en la LLC, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple. En estos casos, el FISH interfásico con sondas región específicas ha mostrado una alta frecuencia de deleciones

monoalélicas de los genes RB1 (cromosoma 13), p53 (cromosoma 17) y en la región crítica 11q 22-23, ayudando al diagnóstico y/o al seguimiento de la progresión de la neoplasia.

3.2.4. FISH en el seguimiento de una enfermedad

En los pacientes con translocaciones específicas como la t(9;22) o Ph en LMC, es importante detectar la presencia de células residuales Ph positivas después del trasplante alogeneico de médula ósea o tratamiento con interferón o imatinib. El método más sensible es el RT-PCR pero detecta mRNA (lo que se está expresando), en cambio FISH se refiere a porcentaje de células. FISH ofrece la posibilidad de analizar muestras de médula ósea o sangre periférica de los pacientes para una cuantificación rápida de células Ph positivas. En cada laboratorio debe establecerse el límite máximo de células positivas con fusión aparente en muestras normales, lo que se denomina "cut-off level" o valor de corte.

3.2.5. Avances relacionados con FISH

En un período relativamente corto, el método FISH ha tenido un gran impacto en el análisis citogenético, debido a la rapidez de ejecución, sensibilidad y flexibilidad de sus aplicaciones.

El FISH convencional sólo puede dar respuestas a preguntas precisas a investigar y generalmente requiere algún conocimiento previo del cariotipo. Con el advenimiento reciente del FISH multicolor que permite visualizar los 23 pares cromosómicos en diferentes colores, la citogenética alcanza una mejor definición del cariotipo. El beneficio mayor de este desarrollo será la identificación de nuevas alteraciones y su correlación con la clínica.

Muchas de las innovaciones recientes están relacionadas a la automatización. Los equipos de microscopio con cámaras y programas para captura y manipulación de imágenes harán disminuir los aspectos más laboriosos del análisis citogenético.

4. BIOLOGÍA MOLECULAR

La detección de cambios en el código DNA o RNA en una célula enferma frecuentemente provee información patológica útil para el

diagnóstico, pronóstico y manejo de la enfermedad. Los análisis relacionados con el DNA son el punto principal de la investigación en patología molecular. Los métodos para detectar estas alteraciones han evolucionado de la investigación al laboratorio de diagnóstico. Una de las técnicas más poderosas en esta nueva rama de la patología ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La utilización de la PCR en patología no sólo provee nuevas posibilidades diagnósticas, sino que también requiere adquirir experiencia en su manejo e interpretación para conseguir resultados confiables.

La base biológica de estas técnicas es que los tumores representan neoplasias clonales que derivan de una o pocas células progenitoras, que imparten esa relación clonal a todas las células hijas. Aparte de los análisis de clonalidad como marcadores de crecimiento neoplásico, la presencia o ausencia de ciertas anomalías cromosómicas primarias y el número y tipo de anomalías genéticas secundarias se hacen cada vez más importantes para establecer el grado biológico de agresividad.

Las leucemias y los linfomas son neoplasias monoclonales y los avances recientes sobre alteraciones como las translocaciones cromosómicas han permitido un mejoramiento en su clasificación. La técnica de PCR es útil para establecer diagnósticos, por ejemplo, la t(9;22) es considerada una característica definitiva de la LMC y la t(2;5) define un subtipo de linfomas anaplásticos de células grandes con características clínicas y biológicas únicas. Permite determinar la presencia de factores pronósticos en las leucemias, relacionado con la presencia o ausencia de determinadas alteraciones, así la detección de FLT3-ITD (duplicación interna en *tandem* del gen FLT3) en las leucemias mieloides agudas le confieren peor pronóstico. Además, permite evaluar la rapidez de la respuesta al tratamiento en el seguimiento de la enfermedad (estudio de enfermedad mínima residual, ERM).

Entre sus ventajas figuran su rapidez, bajo costo y gran sensibilidad. Entre sus limitaciones hay que nombrar que son técnicas aplicables en el laboratorio clínico rutinario sólo para la detección de determinadas alteraciones cromosómicas como los reordenamientos de genes y las translocaciones y el riesgo de falsos positivos por contaminación.

4.1. PCR y modificaciones

4.1.1. PCR

La PCR es una técnica *in vitro*, inventada por Kary Mullis en 1985, que produce múltiples copias de una secuencia de DNA seleccionada, si está presente en la muestra a estudiar. Su sensibilidad se debe a la posibilidad de amplificar millones de veces esa secuencia seleccionada (templado). Una propiedad importante de esta técnica desde el punto de vista diagnóstico es la habilidad de amplificar fragmentos de DNA de tejido fresco o congelado, pero también DNA degradado como el que se encuentra en las muestras embebidas en parafina.

4.1.2. RT-PCR

El análisis de la fusión de genes por PCR se basa en el diseño de partidores oligonucleótidos para los lados opuestos de la región de los puntos de ruptura fusionados, de tal forma que el producto de PCR contenga las secuencias específicas de la fusión presentes en el tumor. En la mayoría de las aberraciones cromosómicas con fusión de genes los puntos de ruptura en diferentes pacientes están repartidos en una zona de 10 kb o más, distancias difíciles de cubrir por PCR de DNA en forma rutinaria. Esto implicaría que la recombinación precisa de los puntos de fusión a nivel de DNA, para los diferentes genes de fusión, tendrían que ser determinadas para cada paciente en forma individual para poder realizar los análisis por PCR sensibles. Sin embargo, en muchas leucemias agudas la fusión de genes es transcrita en RNA mensajero (mRNA) de fusión, que pueden servir como blancos de PCR después de hacer una transcripción reversa (RT) que los convierte en DNA complementario (cDNA). La RT-PCR puede detectar transcritos de fusión génica con gran sensibilidad. Este método es útil para detectar ERM después de la quimioterapia o trasplante de médula ósea.

4.1.3. Q-PCR

Para hacer análisis cuantitativos se dispone de la técnica de PCR cuantitativo (Q-PCR). En el PCR clásico pequeñas variaciones en la eficiencia de la reacción pueden producir grandes cambios después de 30-35 ciclos de amplificación. La Q-PCR en cambio permite cuantificar durante la fase exponencial de la amplificación por PCR. En los análisis por PCR cuantitativo se genera un gráfico de amplificación y el ciclo en el cual

la señal de fluorescencia excede un cierto nivel de fluorescencia basal, es directamente proporcional a la cantidad de DNA o cDNA presente en la muestra. El número de copias de un transcrito en una muestra de médula ósea puede ser calculado por comparación con una curva de dilución de cantidades conocidas de plasmidios conteniendo el mismo transcrito.

4.2. Aplicaciones de las PCR en oncohematología

4.2.1. Leucemias agudas

Los genes involucrados en las aberraciones genéticas en las leucemias agudas (LA) juegan un papel en el desarrollo y función de las células linfoides y mieloides. Frecuentemente codifican para factores de transcripción pero también para reguladores del ciclo celular, transducción de señales, receptores y moléculas de inmunoglobulina Ig o receptores de células T (TCR). El diagnóstico de las LA es multidisciplinario, con citología, inmunofenotipo y citogenética como las metodologías más utilizadas. La PCR es una técnica complementaria que puede ayudar a confirmar o descartar un diagnóstico por la presencia o ausencia de determinadas alteraciones moleculares.

El inmunofenotipo y la citología no son en general técnicas pronósticas, mientras que la evaluación genética ha servido para definir el pronóstico de los pacientes. Los estudios clínicos han demostrado que las aberraciones cromosómicas en las leucemias linfática aguda (LLA) y mieloides aguda (LMA) pueden ser utilizadas como clasificación de grupos de riesgo (tablas 30-1 y 30-2). Así la presencia de t(9;22) y t(4;11) en LLA están asociadas con mal pronóstico, mientras que la t(12;21) en las LLA así como la t(8;21), t(15;17) e inv(16) en las LMA están asociadas a buen pronóstico. Adicionalmente a esta clasificación molecular de LA al diagnóstico, las aberraciones cromosómicas con genes de fusión específicos de leucemia pueden ser utilizados como blancos de PCR para la detección de ERM durante el seguimiento, con sensibilidades de 10^{-3} a 10^{-6} .

El estudio de los pacientes con leucemias agudas durante y después del tratamiento para descubrir la presencia de células leucémicas remanentes (enfermedad residual mínima ERM) ha mostrado ser importante para evaluar la efectividad del tratamiento. Particularmente la

medición semicuantitativa por Q-PCR de la disminución de las células leucémicas durante las primeras fases del tratamiento tiene un alto valor pronóstico.

Leucemia linfoblástica aguda

El diagnóstico de las LLA se hace esencialmente por estudios morfológicos e inmunofenotípicos. Los blastos de las LLA contienen mutaciones somáticas adquiridas que proporcionan datos sobre la patogenia y que influyen fuertemente en el pronóstico. Aproximadamente un tercio de las LLA presentan translocaciones cromosómicas, que pueden ser detectadas por RT-PCR, citogenética o FISH, y que constituyen factores pronósticos.

La definición clásica de remisión en LLA, basada

en la citomorfología de la médula ósea (MO), todavía permitía la presencia de hasta 5% de linfoblastos, por lo que es no es capaz de discriminar entre los pacientes con alta posibilidad de recaída y los pacientes con excelente pronóstico (tabla 30-4, figura 30-2). Diversos estudios han demostrado que el seguimiento de la ERM en pacientes con LLA tiene un valor pronóstico significativo. La respuesta inicial a la terapia de inducción de remisión es un de los factores pronósticos más importantes en la LLA que puede ser utilizado para mejorar la estratificación terapéutica. Los pacientes que responden lentamente tienen un alto riesgo de recaída, mientras que aquellos que fracasan en lograr una remisión completa (RC) a las 4-6 semanas de tratamiento tienen un particular mal pronóstico.

Tabla 30-4. Porcentajes de respuesta completa hematológica y molecular después del tratamiento de inducción en pacientes adultos con LLA^a.

Sensibilidad	RC hematológica ^b < 10 ⁻²	RC molecular ^c <10 ⁻⁴	RC molecular ^d <10 ⁻⁴ y negativo
Promedio	82%		
Riesgo estándar			
Línea B	88%	78%	41%
Línea T	87%	82%	63%
Riesgo alto	83%		
Ph/BCR-ABL	77%	18%	4%

RC, Remisión completa

a, Resultados de GMALL (Estudios multicéntricos alemanes para adultos con LLA).

b, Observación morfológica.

c, Niveles de ERM inferiores a <10⁻⁴, positivo o negativo (sensibilidad mínima 10⁻⁴).

d, ERM no detectable a sensibilidades inferiores a 10⁻⁴.

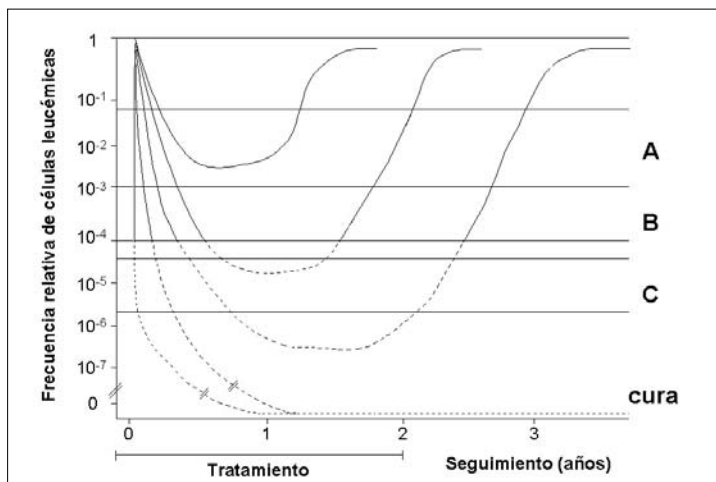


Figura 30-2. Gráfico hipotético que muestra la disminución de las células leucémicas y la recaída en pacientes con distintas LLA, durante y después del tratamiento. (A) Límite de detección por citomorfología. (B) Rango de detección límite por citometría de flujo. (C) Rango de detección por técnicas de PCR.

Actualmente, por su alta sensibilidad no alcanzada por las técnicas de citogenética y FISH, se utilizan tres técnicas para el estudio de ERM en pacientes con LLA: (a) RT-PCR para detectar translocaciones o expresiones aberrantes de genes, (b) PCR para detectar reordenamientos específicos de genes de inmunoglobulina (Ig) y de TCR, y (c) Citometría de flujo, para detectar inmunofenotipos aberrantes asociados a leucemia. Las características de estos métodos, con sus ventajas y desventajas, se resumen en la tabla 30-5. A continuación se describen los aspectos más relevantes de a y b. Aspectos sobre Citometría de flujo se describen en el punto 5.

a) Análisis por RT-PCR de aberraciones cromosómicas. Las aberraciones cromosómicas estructurales como las translocaciones y las inversiones son blancos específicos de leucemias, ideales para ser estudiados por RT-PCR. Estos blancos permanecen estables durante el curso de la enfermedad y pueden ser detectados con sensibilidades de 10^{-4} a 10^{-6} . En las LLA estos blancos de PCR son mayoritariamente transcritos de fusión de genes o transcritos específicos expresados en forma aberrante, que pueden ser detectados mediante RT-PCR (tabla 30-5).

Tabla 30-5. Características de las técnicas actualmente empleadas para la detección de ERM en LLA

	Citometría de flujo Inmunofenotipo	RT-PCR Transcritos de genes de fusión	PCR de genes Ig/TCR Región de unión específica
Sensibilidad	10^{-3} - 10^{-4}	10^{-4} - 10^{-6}	10^{-4} - 10^{-5}
Aplicabilidad			
LLA prec B	60-98%	40-45%*	90-95%
LLA-T	90-95%	15-35%**	90-95%
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> . Mayoría de pacientes . Costo mediano . Rápido: 1-2 días 	<ul style="list-style-type: none"> . Fácil y bajo costo . Sensible y específico . Alteración estable . Rápido: 2-3 días . Sirve para seguimiento de grupos uniformes de pacientes p.e. Ph+ 	<ul style="list-style-type: none"> . Casi todos los pacientes . Sensible . Paciente específico . Rápido en seguimiento : 2-3 días
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> . Sensibilidad limitada . Preferible 2 fenotipos aberrantes por paciente 	<ul style="list-style-type: none"> . Útil en pocos pacientes . Falsos positivos por contaminación 	<ul style="list-style-type: none"> . Lento al diagnóstico . Identificación de regiones de unión y test de sensibilidad . Costoso . Preferible 2 blancos de PCR por paciente por posibilidad de evolución clonal

*Se refiere particularmente en LLA de niños a t(12;21)(TEL-AML1) y en adultos a t(p;22)(BCR_ABL).

**Se refiere mayormente a del(1) con fusión SIL-TAL y t(5;14) con expresión aberrante de HOX11L2, que ocurren en conjunto en el 25-35% de las LLA de niños y en el 15-20% de las LLA de adultos.

Dos grandes desventajas limitan la aplicación de este tipo de PCR para el seguimiento de ERM: su aplicabilidad a una minoría de pacientes con

LLA y la posibilidad de falsos positivos por contaminación (tabla 30-6).

Tabla 30-6. Aberraciones cromosómicas en LLA como blancos de RT-PCR para ERM

Aberración	Blanco (DNA o mRNA) ^a	Frecuencia % ^b	
		Niños	Adultos
Precursor LLA-B			
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL (ARMM)	5-8	30-35
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1 (mRNA)	5-8	3-4
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4 (mRNA)	3-5 ^c	3-4
11 q23 aberraciones	MLL aberante (mRNA)	5-6 ^c	<5
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1 (mRNA)	30	1-3
TOTAL		40-45	40-45
LLA-T			
tAL1 delección	SIL-TAL1 (DNA/mRNA)	10-25	5-10
t(8;14)(q24;q11)	c-MYC-TCRA/D (DNA)	5-10	5-10
t(11;14)(p15;q11)	LMO1-TCRD (DNA)	5-10	5-10
t(11;14)(p13;q11)	LMO2-TCRD (DNA)	5-10	5-10
t(11;14)(p34;q11)	TAL1-TCRD (AND)	5-10	5-10
t(10;14)(q24;q11)	HOX11-TCRD (AND)	5-10	5-10
TOTAL		25-30	10-15

a, El límite de detección por PCR de aberraciones cromosómicas es 10^{-4} a 10^{-6} .

b, Los porcentajes indicados representan frecuencias de los grupos de precursores de LLA-B y LLA-T.

c, En las LLA infantiles la frecuencia de t(4;11) puede ser hasta del 50% y las aberraciones relacionadas a 11q23 hasta del 70%.

b) Análisis por PCR de reordenamientos de genes de Ig y TCR. Las regiones de unión de los genes reordenados Ig y TCR son secuencias tipo huellas dactilares, que difieren en la longitud y composición en cada linfocito o clon linfocitario y en consecuencia también en cada enfermedad linfocítica maligna, como las LLA. Estos blancos específicos pueden ser detectados por PCR en la mayoría de los precursores de LLA tipo B y de las LLA tipo T, con una sensibilidad cercana a 10^{-4} - 10^{-5} . La mayor desventaja de este estudio en el seguimiento de ERM es que siguen ocurriendo continuos reordenamientos durante el curso de la enfermedad, que pueden resultar en falsos negativos.

Leucemias mieloides agudas

El diagnóstico de las LMA se hace también por morfología e inmunofenotipo y al igual que en las LLA los factores pronósticos más importantes son la presencia o ausencia de anomalías cariotípicas específicas. Las técnicas de RT-PCR, citogenética o FISH pueden

ser utilizadas para detectar la presencia de las translocaciones que confieren un pronóstico favorable (tabla 30-1).

La detección de ERM post-terapia para identificar a los pacientes con mayor riesgo de recaída se realiza por PCR y citometría de flujo. El análisis de inmunofenotipo puede ser informativo en el 80-85% de los casos, mientras que el análisis molecular por PCR es útil en menos del 30% de los pacientes con LMA, pues sólo la minoría expresan marcadores moleculares que se pueden estudiar (AML1/ETO, PML/RAR, inv(16), y posiblemente mutaciones en FLT3). Los pacientes que logran RC después del primer ciclo de quimioterapia tienen mejor pronóstico que los que la alcanzan después del segundo ciclo, pero el significado de resultados positivos en ERM no siempre es claro y diferentes niveles de enfermedad residual parecen tener un significado distinto para diferentes tipos de LMA. En los pacientes con PML/RAR la remisión molecular está asociada con larga supervivencia libre de enfermedad, mientras que en los pacientes con

AML1/ETO la positividad molecular en remisión clínica no necesariamente implica recaída de la enfermedad.

4.2.2. Leucemia mieloide crónica

La LMC es un desorden hematopoyético caracterizado por la expansión de células progenitoras de la médula ósea. Su marca es la presencia de la translocación cromosómica t(9;22), conocida como cromosoma Philadelphia. El diagnóstico se hace por estudios morfológicos y las técnicas de citogenética. La FISH o la PCR permiten confirmar el diagnóstico y distinguirla de otros síndromes mieloproliferativos crónicos.

El seguimiento de los pacientes tratados con drogas como Imatinib se hace por FISH, RT-PCR

o Q-PCR. Los pacientes en fase crónica que alcanzan RC molecular (RT-PCR negativo) tienen un riesgo significativamente menor de progresión de la enfermedad en los siguientes 24 meses, que los que no lograron alcanzarla.

4.2.3. Linfomas no Hodgkin

Las técnicas moleculares tienen una importancia práctica creciente en el análisis de los Linfomas no Hodgkin (LNH), tanto para el diagnóstico como para el pronóstico (tabla 30-7). Adicionalmente las anomalías clonales proveen marcadores para la detección de ERM. Se necesita más investigación para evaluar la contribución de las técnicas de biología molecular respecto de las técnicas clásicas de morfología, inmunología y cariotipo.

Tabla 30-7. Anormalidades cromosómicas en LNH comunes

Subtipo de linfoma	Alteración cromosómica	%	Genes involucrados	Genes Ig	Análisis diagnóstico pronóstico
Linfoma linfoplasmacítico	t(9;14)(p13;q32)	50	PAX5/IgH	R, M	FISH
Linfoma folicular	t(14;18)(q32;q21)	90	BCL2/IgH	R, M, O	FISH, PCR
Linfoma del manto	t(11;14)(q13;q32)	70	Cyclina D1/IgH	R, U	FISH, PCR
Linfoma MALT	t(11;18)(q21;q21) t(11;14)(p22;q32)	50 raro	AP12/MLT1 BCL10/IgH	R, M, O R, M, O	FISH, PCR FISH, PCR
Linfoma difuso de células grandes	der(3)(q27)	35	BCL6	R, M	FISH
Linfoma de Burkitt	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(P11;Q24) t(8;22)(q24;q11)	80 15 5	c-MYC/IgH c-MYC/IgK c-MYC/IgL	R, M R, M R, M	FISH de c-MYC FISH de c-MYC FISH de c-MYC
Linfoma anaplásico de células T grandes	t(2;5)(p23;q35)	60	NPM/ALK		FISH, PCR

R, reordenado; M, mutado; U, no mutado; O, en proceso de mutación

La gran mayoría de los LNH han tenido reordenamiento clonal de las Ig o de los TCR. La identificación de estos reordenamientos por PCR (clonalidad linfoide) es ampliamente utilizada en el diagnóstico y en el seguimiento, y representa probablemente el análisis molecular más realizado en los LNH.

La detección de los reordenamientos Ig/TCR V(D)J se basa en que son clon específicos y altamente variable respecto a la longitud y el contenido de nucleótidos, al igual que en el estudio de las LLA. IgH representa el blanco genético más útil para la detección de clonalidad B y TCR γ representa el marcador molecular más

útil para clonalidad de células T. El análisis de la clonalidad linfoide es frecuentemente útil en la distinción entre linfadenopatías malignas *versus* reactivas en los casos en que los análisis morfológicos e inmunológicos no sean concluyentes; pero hay que tener en cuenta que clonalidad no es sinónimo de malignidad y que los resultados deben ser analizados en conjunto con aspectos clínicos, inmunológicos y citogenéticos.

En términos moleculares las anormalidades cromosómicas son de dos tipos en general: aquellas en las que el punto de ruptura tiene lugar en los genes involucrados, dando lugar a transcritos de fusión de RNA y a proteínas quiméricas, y los que representan errores de reordenamiento en los genes Ig/TCR.

Para propósitos diagnósticos es importante la detección de algunas anormalidades por PCR. Por ejemplo la translocación t(14;18) en los linfomas foliculares es detectada en el 75% de los casos solamente debido a la variación en los puntos de ruptura. La translocación t(11;14) está presente en el 40% de los linfomas del manto, pero puede tener lugar en otros desórdenes linfoproliferativos de tipo B con diferentes pronósticos y requerimientos terapéuticos, incluyendo linfomas del manto, mieloma múltiple, leucemia de células velludas, leucemia prolinfocítica y linfoma esplénico con linfocitos velludos. Finalmente la translocación t(2;5) se detecta en la casi totalidad de los linfomas anaplásicos de células grandes. Sin embargo la técnica más útil para detectar estas alteraciones al diagnóstico es FISH. El seguimiento de la enfermedad se puede realizar por PCR sólo si resultó positiva al diagnóstico por esta técnica.

4.3. Consideraciones

PCR y TR-PCR tienen una sensibilidad de 10^{-2} a 10^{-3} después del primer proceso de amplificación de 35 ciclos, por lo tanto las muestras al diagnóstico deben resultar positivas si tienen la alteración que se está estudiando.

PCR y TR-PCR tienen una sensibilidad de 10^{-4} a 10^{-6} después del segundo proceso de amplificación (reamplificación) de 30-35 ciclos. Las muestras para estudio de enfermedad residual (ej. pacientes durante y después del

tratamiento quimioterápico y antes y después de un trasplante de médula ósea) deben ser reamplificadas para alcanzar este nivel de sensibilidad, sólo si han resultado negativas en la primera fase de amplificación. Se denomina PCR anidado ("nested PCR") cuando se utilizan partidores externos en el primer PCR y partidores internos en el segundo PCR.

Q-PCR y TR-Q-PCR tienen una sensibilidad de 10^{-4} a 10^{-5} en amplificación de 35-45 ciclos. Pueden utilizarse tanto para la etapa de diagnóstico como para estudio de enfermedad residual.

Se considera recaída molecular cuando hay dos resultados positivos seguidos por PCR o RT-PCR, separados por al menos un mes.

Las muestras y los reactivos de TR y PCR deben ser manejados en un laboratorio separado del lugar donde están los termocicladores y de la zona donde se visualizan las muestras amplificadas.

Cuando se hace el estudio de una muestra hay que incluir controles positivos y negativos.

5. CITOMETRÍA DE FLUJO

Sin lugar a dudas, una de las herramientas técnicas de gran valor en el estudio de neoplasias hematológicas, lo constituye la citometría de flujo. Esta técnica permite analizar individualmente miles de células en un período muy corto de tiempo (segundos). El avance tecnológico en áreas tan diversas como la informática, electrónica, óptica y biotecnología (en especial la producción de anticuerpos monoclonales), han permitido el desarrollo de la citometría de flujo como una herramienta clínica de gran importancia. Es así como las aplicaciones clínicas de la citometría de flujo son cada vez más numerosas (tabla 30-8) y en especial en el estudio de leucemias y linfomas.

A continuación se revisarán los aspectos fundamentales de la citometría de flujo, la forma de presentar los datos obtenidos y los criterios de análisis de los mismos. Finalmente se abordarán algunos de los patrones inmunofenotípicos característicos de diversas leucemias, así como los diversos tipos de especímenes clínicos que se pueden analizar.

Tabla 30-8. Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo

Inmunofenotipificación	<ul style="list-style-type: none"> • Leucemias y linfomas • Detección de enfermedad mínima residual • Subpoblaciones linfoides CD3, CD4, CD8, CD19 y NK (inmunodeficiencias primarias y secundarias) • Razón linfocitos T CD4/CD8 (infección VIH-SIDA) • Poblaciones linfoides T y B (clonalidad en mucosas y ganglios, linfomas) • Macrófagos (enfermedad inflamatoria)
Cáncer	<ul style="list-style-type: none"> • Contenido de DNA (Ploidía de DNA) • Fases del ciclo celular • Proteínas del ciclo celular (ciclina, quinasas, etc.) • Oncogenes (p53, PCNA, ki-67, etc.)
Trasplantes	<ul style="list-style-type: none"> • Células progenitoras (CD34, CD117) • «Cross match»
Estudios funcionales	<ul style="list-style-type: none"> • Citocinas intracelulares • Fagocitosis • Estallido respiratorio • pH intracelular • Calcio intracelular • Potencial de membrana
Plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> • Glicoproteínas (Ej. tromboastenia de Glanzmann) • Fisiología plaquetaria • Inmunoglobulinas asociadas a plaquetas
Estudios de resistencia a drogas	<ul style="list-style-type: none"> • Fenotipo MDR: glicoproteína p, bombas de eflujo.
Cuantificación de moléculas	<ul style="list-style-type: none"> • Recuento absoluto de células • CD38 en linfocitos TCD8 (infección VIH-SIDA) • CD64 en granulocitos (infección) • Inmunoglobulinas asociadas a plaquetas (Púrpuras trombocitopénicas inmunes)
Detección de citoquinas solubles	<ul style="list-style-type: none"> • En base a partículas cubiertas con anticuerpos anti-citoquinas

5.1. Generalidades

Fundamentos básicos. La citometría de flujo es una tecnología que permite medir características físicas y químicas de células en suspensión. Entrega información sobre el tamaño celular, la granularidad o complejidad interna, así como también de la intensidad de fluorescencia relativa que posean las células en estudio.

El principio básico de la citometría de flujo (y de muchos contadores hematológicos), es la interacción de una fuente de luz, específicamente un rayo láser, con células en suspensión, las cuales son canalizadas e «interrogadas» individualmente por el láser, recogiendo la información obtenida

de dicha interacción. Existen equipos que cuentan con uno, dos o más rayos láser, siendo lo usual, la presencia de un láser que emita a 488 nm (láser de argón).

La interacción de una célula con la luz del láser («light scattering»), puede producir la desviación de esta última, en un ángulo menor a 10 grados, lo que se conoce como dispersión frontal o FSC («forward scatter») y su vez la desviación de la luz en más de 10 grados, pero en menos de 90, se conoce como dispersión lateral o SSC («side scatter»). Es así como FSC y SSC son parámetros intrínsecos a la célula. Si a la suspensión celular se agrega un fluorocromo que tenga afinidad por algún componente

celular y que además este fluorocromo sea excitable con el rayo láser en uso, se podrá detectar un cambio en la longitud de onda de emisión del fluorocromo; lo anterior se traducirá en formación de rangos o canales de fluorescencia, la cual es posteriormente detectada. Por ejemplo, la fluoresceína, fluorocromo ampliamente usado tanto en microscopía de fluorescencia como en citometría de flujo, tiene un espectro de excitación máxima de 494 nm, siendo su espectro de emisión de 518 nm. En los citómetros de flujo actuales, con aplicación en clínica, es posible detectar simultáneamente desde 1 hasta 4 rangos o canales de fluorescencia, lógicamente usando fluorocromos que emitan en diferente longitud de onda.

Anticuerpos conjugados con fluorocromos.

Dado que ciertos fluorocromos se pueden unir a proteínas, es posible disponer anticuerpos conjugados con diversos fluorocromos. Si a esto se le suma el explosivo desarrollo de la producción y comercialización de anticuerpos monoclonales, conjugados con diversos fluorocromos, las potencialidades son enormes. Es así como hoy se dispone de anticuerpos contra una infinidad de moléculas biológicas, lo que se ha traducido en un gran desarrollo de los estudios de caracterización inmunofenotípica de diversos tipos celulares, muchos de ellos con

una aplicación clínica concreta, como es el caso del estudio inmunofenotípico de enfermedades oncohematológicas (leucemias, linfomas, mieloma múltiple y otras).

Presentación de datos y análisis. Los citómetros de flujos, a pesar de tener un sistema de fluidos, un sistema óptico y un sistema electrónico, es un equipo controlado informáticamente, existiendo para ello, diversas plataformas (pc y macintosh principalmente), las cuales, mediante los programas adecuados permiten tanto la adquisición como el análisis de los datos obtenidos.

La acción de evaluar una suspensión de células en un citómetro de flujo, se llama adquisición (se adquiere la información de un determinado número de células en un tiempo determinado). Una vez adquirida la información sobre una suspensión celular, esta se almacena como un archivo, y éste es posible visualizarlo de diversas formas, dependiendo del programa de análisis que se use. Es así como los datos se pueden visualizar como gráficos de puntos, contorno, densidad, histogramas, tridimensional, etc., obteniéndose, en cada caso información numérica como por ejemplo: coeficiente de variación, media de intensidad de fluorescencia, mediana, media geométrica, etc. (figura 30-3).

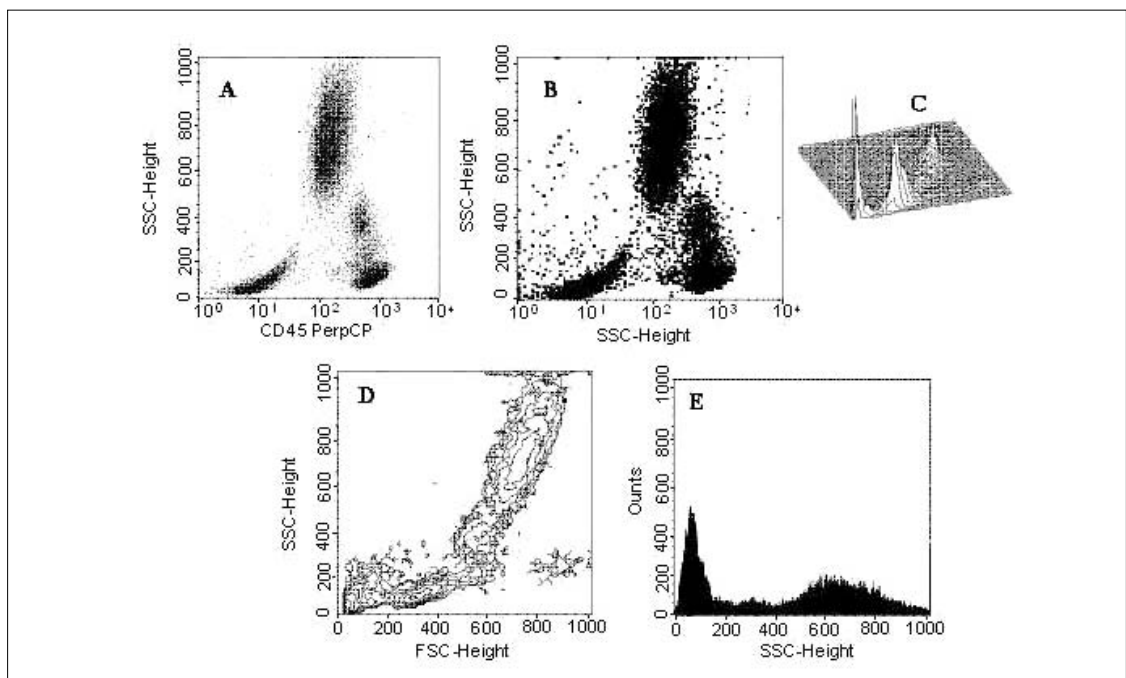


Figura 30-3. Distintas formas de presentar los datos en citometría de flujo: SSC (granularidad) y CD45 (antígeno leucocitario común). (A) gráfico de puntos; (B) gráfico de densidad; (C) gráfico tridimensional; (D) gráfico de contorno y (E) histograma (representa sólo SSC).

Un concepto fundamental al efectuar un análisis es la correcta selección de la región de interés a estudiar, la que se conoce como “gate” o ventana de análisis. Por ejemplo, si se han analizado leucocitos, se tiene información de las diversas poblaciones leucocitarias presentes, pero es posible acotar aún más el análisis, al seleccionar, por ejemplo, la población de linfocitos, para lo cual se dibuja una “gate”. Posteriormente, se puede obtener información específica sólo de la región de linfocitos, como por ejemplo la expresión o ausencia de diversas moléculas y presencia de células normales y anormales (figura 30-4). Es posible combinar varias regiones al momento de hacer un análisis, lo que se traduce en una gran capacidad y versatilidad en el manejo de la información.

5.2. Aplicaciones en el estudio de Leucemias, linfomas y gammapatías monoclonales

5.2.1. Indicaciones médicas

La inmunofenotipificación de leucemias, es útil clínicamente en el diagnóstico, clasificación, pronóstico y monitoreo de estas patologías (ver capítulo 12).

Si bien el inmunofenotipo no puede establecer un diagnóstico de leucemia aguda, sí es esencial para determinar si las células neoplásicas son de línea linfoide o mioelode. A su vez la subclasificación inmunológica de leucemias linfoblásticas agudas y la identificación de fenotipos mieloides con translocación t(15;17) son de valor pronóstico. Además el inmunofenotipo es útil en el monitoreo de leucemias linfoblásticas y mieloblásticas agudas.

En el caso de los síndromes linfoproliferativos crónicos, el inmunofenotipo es la modalidad diagnóstica primaria, teniendo un uso clínico en la subclasificación, evaluación pronóstica y seguimiento de estas patologías. De igual forma, el inmunofenotipo de gammapatías monoclonales, tiene valor diagnóstico, siendo útil en identificar células plasmáticas clonales residuales.

En los síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos, el inmunofenotipo es útil en la subclasificación y en la evaluación del seguimiento de estos síndromes.

5.2.2. Toma de muestras para estudios inmunofenotípicos

En el caso de médula ósea, se requiere un

mínimo de 1 mL (idealmente 3 mL), de médula usando EDTA como anticoagulante. No es infrecuente que la médula tienda a coagular, lo que no impide su estudio. En caso de sangre periférica, esta se debe obtener mediante punción venosa limpia, también usando EDTA como anticoagulante, requiriéndose un mínimo de 3 mL. El uso de EDTA permite una buena conservación de la morfología celular, pero impide la realización de estudios funcionales (pH intracelular, estallido respiratorio, producción de citoquinas, etc.), en cuyo caso se debe usar heparina como anticoagulante.

5.2.3. Almacenamiento y transporte de muestras para estudios inmunofenotípicos

La muestra obtenida, ya sea médula ósea o sangre periférica, se debe mantener a temperatura ambiente, no se debe refrigerar ni tampoco exponer al calor. En condiciones ideales la muestra debe ser procesada lo antes posible, con un tiempo máximo de 24 a 48 horas.

5.2.4. Preparación de las muestras para estudio inmunofenotípico

Si bien se puede utilizar la centrifugación en gradiente de densidad para aislar células mononucleares, se recomienda el uso de muestras totales (sangre, médula ósea) con la adición de un agente lisante de eritrocitos después de la marcación. En caso de médula ósea, es conveniente lavar la muestra con una solución salina isotónica (para eliminar inmunoglobulinas solubles) y luego filtrar (50 µm) a fin de eliminar restos estromales, grasas, etc.

Para detectar antígenos de superficie, las células se deben marcar; con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos luego se procede a lisar eritrocitos y posteriormente se fijan las células. Para detectar antígenos citoplasmáticos, las células se deben fijar, permeabilizar y luego marcar. Si se desea detectar simultáneamente antígenos de membrana y citoplasmáticos, se procede a marcar el antígeno de membrana, luego se lisan los eritrocitos, luego las células se fijan y permeabilizan, para luego marcar el antígeno citoplasmático.

Para detectar cadenas livianas o pesadas de inmunoglobulinas, se debe eliminar la inmunoglobulina citofílica, incubando 15 a 30 minutos a 37°C con una solución que contenga, por ejemplo suero fetal bovino.

5.2.5. Análisis según cuadro clínico

El número de anticuerpos y fluorocromos que se pueden combinar, estará limitado por la capacidad de cada instrumento, siendo usual combinar dos a tres tubos (en ocasiones cuatro). Con respecto a qué anticuerpos usar, se debe considerar que los dos objetivos principales del inmunofenotipo son establecer el linaje y la madurez de las células oncohematológicas.

En el caso de leucemias agudas, para definir

linaje, es recomendable evaluar antígenos de líneas linfocitoide B, linfocitoide T y mielocitoide. Para evaluar maduración son útiles los antígenos CD34, TdT (deoxinucleotidil transferasa terminal), CD10 (CALLA) y HLA-DR (tabla 30-9). El inmunofenotipo puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de una leucemia mielocitoide aguda, en especial del tipo M6 o eritroleucemia (glicoforina A), M7 o megacarioblástica (CD41, CD61) y para diferenciar M3 de M4, en especial M3 hipogranular (HLA-DR negativo).

Tabla 30-9. Anticuerpos para definir linaje y grado de madurez en leucemias agudas

Propósito	LLA-B	LLA-T	LMA
Definir linaje	CD19 CD20 CD79 α CD22	CD3c CD3m CD7 CD5 CD2	CD13 CD33 MPOc
Definir grado de madurez	CD34 CD117 TdT CD10 (CALLA) Ig cit. Ig sup.	CD34 CD117 TdT CD10 (CALLA) CD1a	CD34 HLA-DR CD15

LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; LLA-T, leucemia linfoblástica aguda de células T; LMA, leucemia mielocitoide aguda; CD3c, CD3 citoplasmático; CD3m, CD3 membrana; MPOc, mieloperoxidasa citoplasmática; TdT, deoxinucleotidil transferasa terminal; Ig cit, inmunoglobulina citoplasmática; Ig sup, inmunoglobulina de superficie.

En los síndromes linfoproliferativos, lo primordial es definir el linaje, y en base a esto,

completar el estudio clasificatorio (tabla 30-10).

Tabla 30-10. Anticuerpos para definir linaje y clasificar síndromes linfoproliferativos

Propósito	SLP-B	SLP-T	SLP-NK
Definir linaje	CD19 CD20 kappa lambda	CD3	CD3 CD16 CD56
Clasificación	CD5 CD22 CD23 CD11c CD19 CD25 CD103 FMC7	CD4 CD8 Razón CD4/CD8 TCR $\alpha\beta$ TCR $\gamma\delta$	CD2 CD5 CD8

SLP-B, síndrome linfoproliferativo de células B; SLP-T, síndrome linfoproliferativo de células T; SLP-NK, síndrome linfoproliferativo de células NK.

Frente a una gammapatía monoclonal, el mayor objetivo del inmunofenotipo es lograr la discriminación de células normales de aquellas células plasmáticas neoplásicas, siendo de gran valor en el diagnóstico diferencial de mieloma múltiple y gammapatías monoclonales de significado indeterminado. Como panel mínimo se recomienda el uso de CD38, CD19 y CD56, ya que las células plasmáticas neoplásicas muestran una débil expresión de CD38 (a diferencia de las células plasmáticas normales). A su vez, la presencia de CD19, es característica de células plasmáticas normales y la expresión de CD56 se encuentra en células plasmáticas neoplásicas.

5.2.6. Informe de resultados

El informe de un inmunofenotipo debe incluir la definición de la presencia o ausencia (positivo o negativo), de un antígeno determinado, en algunos casos su intensidad de expresión (“bright” o “dim”). Es importante describir la expresión de varios antígenos por parte de las células neoplásicas, ya que en ocasiones puede ser clave para clasificar una leucemia (por ejemplo, la coexpresión de CD19 con CD10, en leucemia linfoblástica aguda de línea B. (figura 30-4).

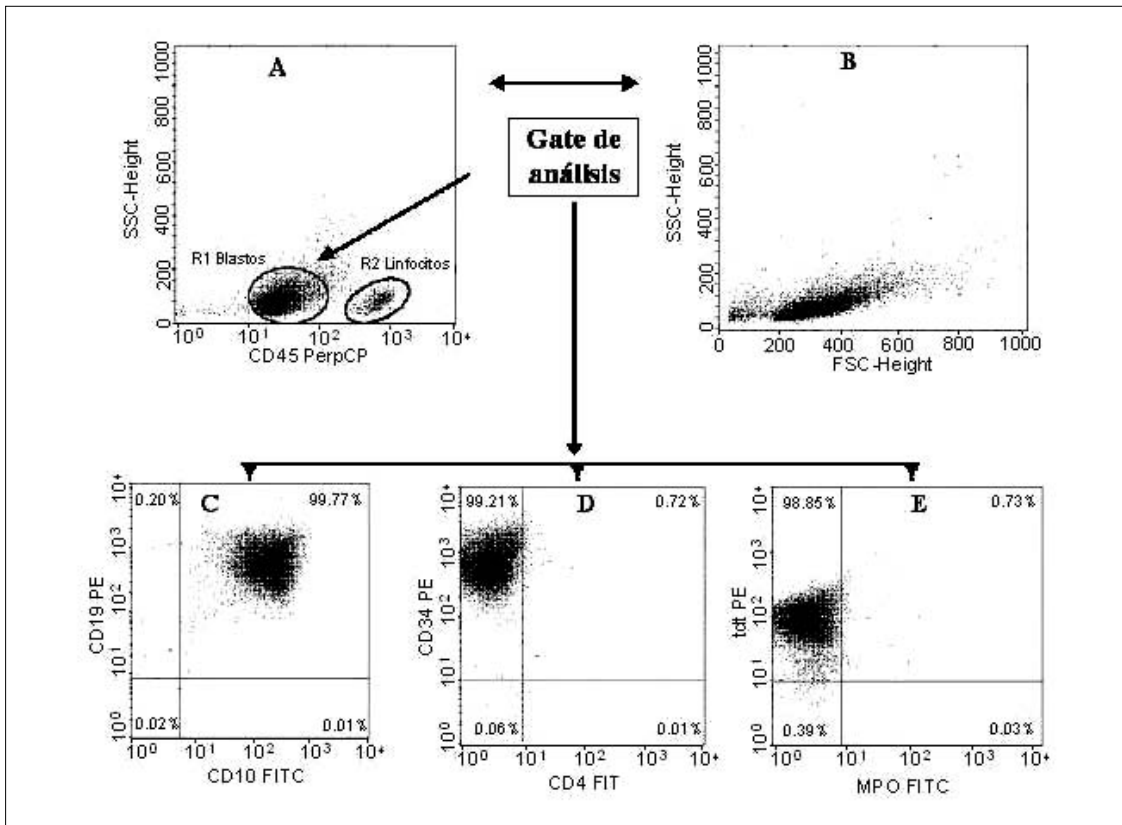


Figura 30-4. Concepto de “gate” o ventana de análisis en una muestra patológica de médula ósea. En (A) se identifican dos poblaciones celulares, correspondiendo la región 1 (R1) a blastos. R1 se representa en gráficos (C), (D) y (E). En gráfico (C), en cuadrante superior derecho, se puede observar la coexpresión de CD19 (linfocitos B) con CD10 (linfocito inmaduro). En (D) se destaca la expresión de CD34 (células progenitoras). En (E) destaca la expresión de Tdt (linfocito inmaduro) con ausencia de mieloperoxidasa. Diagnóstico: Leucemia linfoblástica aguda de línea B.

6. INMUNOQUÍMICA APLICADA A GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Las gammapatías monoclonales incluyen las enfermedades que se originan a partir del linfocito B, caracterizadas por la producción de moléculas o fragmentos de inmunoglobulinas

absolutamente idénticos entre sí y que se identifican en suero u orina en forma de una banda proteica llamada componente monoclonal. Se las conoce también como “discrasias” de células plasmáticas, inmunoglobulinopatías, paraproteinemias, disproteinemias y disglobulinemias. Las

inmunoglobulinas monoclonales producidas por las células patológicas suelen migrar en la fracción gamma (γ) cuando son sometidas a electroforesis de suero, motivo por el cual se denominan también como gammapatías monoclonales. Entre las patologías que cursan con gammapatías monoclonales se encuentra el Mieloma Múltiple, la Macroglobulinemia de Wälldenstrom, Amiloidosis y otras (ver capítulo 14)

En términos generales, las inmunoglobulinas monoclonales - al igual que las inmunoglobulinas normales - son glicoproteínas que migran en la región gamma en una electroforesis de suero y poseen actividad de anticuerpo, pero son producto de una o más mutaciones en los genes que codifican para la

síntesis de las inmunoglobulinas. Las proteínas monoclonales tienen por lo tanto una secuencia aminoacídica y una estructura anormal ya que la estructura tridimensional es anormal. Su alta concentración, se debe simplemente al hecho del gran número de células clonales que las origina. El isotipo de Inmunoglobulina varía de paciente en paciente, siendo el más común IgG y el más raro IgE. Cada isotipo está asociado a un patrón levemente diferente de la enfermedad; por ejemplo IgA está más comúnmente relacionado con enfermedad fuera del hueso, mientras que mieloma IgD está más comúnmente asociado con leucemia de células plasmáticas y daño renal. En la tabla 30-11 se muestran los porcentajes de los diferentes tipos de proteína monoclonal

Tabla 30-11. Tipos de proteína monoclonal

	% parcial	% total
Suero		
IgG	52	
IgA	21	
IgD	2	
IgE	< 0.01	75 %
Orina (Bence Jones o cadenas livianas solamente), tipo κ y λ		11 %
Dos o más paraproteínas monoclonales	< 1 %	
Cadenas pesadas solamente	< 1 %	
Paraproteína no monoclonal	< 1 %	2 %
IgM (Mieloma múltiple raro, típicamente asociada con Macroglobulinemia de Waldenstrom's)		12 %

La estructura y función de las inmunoglobulinas anormales tiene un gran número de consecuencias patológicas, tales como:

- Acumulación de las inmunoglobulinas debido a una falla en la regulación de la síntesis.
- Las moléculas anormales pueden adherirse unas a otras y/o con otros tejidos tales como células sanguíneas, pared de los vasos sanguíneos y otros compuestos de la sangre. Esto reduce el flujo sanguíneo y la circulación, causando el síndrome de hiperviscosidad.
- Aproximadamente el 30 % de las veces, se producen más cadenas livianas que las

necesarias para combinarse con las cadenas pesadas para formar una molécula entera de inmunoglobulina. Este exceso de cadenas livianas constituye la llamada Proteína de Bence-Jones. Esta proteína tiene un peso molecular de 22. KDa, lo que le permite atravesar la barrera glomerular y aparecer en la orina, resultando en la acumulación de proteína de 24 horas en la forma de un «peak» monoclonal de Bence-Jones. La proteína libre de Bence-Jones puede también adherirse unas a otras y/o con otros tejidos, de igual forma como lo puede hacer la inmunoglobulina entera, lo que puede llevar a Amiloidosis y Enfermedad de cadenas livianas.

- Las proteínas monoclonales anormales, pueden tener también un amplio rango de otras propiedades incluyendo: a) unión a factores de coagulación sanguínea lo que resulta en una tendencia al sangramiento y/o flebitis y b) unión a hormonas circulantes, lo que se traduce en una gran variedad de trastornos endocrinos o desórdenes metabólicos.

Además de la información que proporciona el hemograma, velocidad de sedimentación, mielograma y pruebas bioquímicas tales como calcemia, creatininemia y otras al diagnóstico y control de la evolución de enfermedades caracterizadas por gammopatías monoclonales, el aporte que los Laboratorios Clínicos pueden hacer al diagnóstico de estas patologías tiene por objetivo en primer lugar, pesquisar la proteína monoclonal, tanto en suero como en orina, identificarla y luego cuantificarla. Actualmente existen además otros marcadores moleculares que pueden aportar al diagnóstico y a establecer un valor pronóstico, tal es el caso de la medición de: β -2 microglobulina, proteína C-reactiva, interleuquina-6 (IL-6), factor de crecimiento hepático, excreción urinaria de retinol y anomalías genómicas asociadas a gammopatías monoclonales. A continuación se hará una breve descripción de cada uno de ellos

6.1 Pesquisa y estudio de la proteína monoclonal

a) Electroforesis de proteínas. La electroforesis de proteínas es el método de elección para la pesquisa de una fracción proteica de carácter monoclonal. Consiste en hacer migrar una alícuota de suero de un paciente en un campo eléctrico sobre diferentes soportes tales como, agarosa, acetato de celulosa y mezclas de acrilamida-bisacrilamida. Las más usadas son la agarosa y acetato de celulosa. Tal como se observa en la figura 30-5 inferior, la imagen consiste en una fracción proteica concentrada, de mayor o menor intensidad dependiendo de su concentración, con límites muy claros y migración desde las globulinas α_2 hasta las γ globulinas. El estudio densitométrico de la electroforesis, entrega un trazado en el que se aprecia la presencia de una banda homogénea, aguzada, elevada y de base estrecha. El componente monoclonal o componente M se produce por la expansión maligna de un clon de células plasmáticas productora de inmunoglobulinas idénticas, que se identifican en el electroforetograma por tener la misma carga eléctrica.

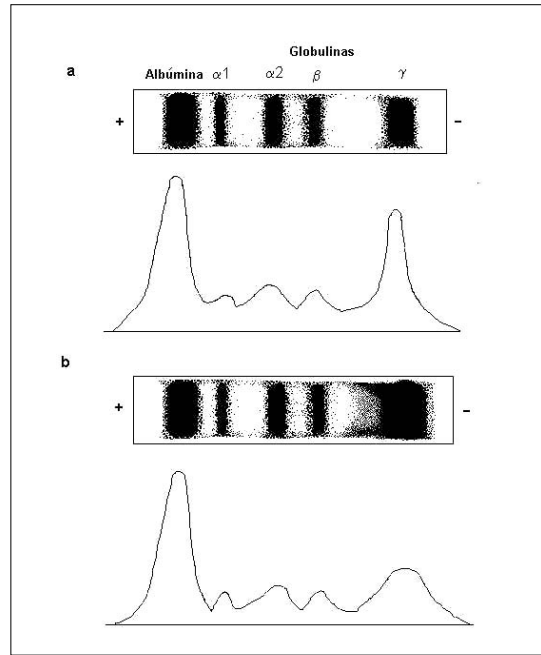


Figura 30-5. Electroforetograma de una gammopatía monoclonal (a) y de una gammopatía policlonal (b). En ambos casos, trazado electroforético y densitograma.

Mediante la electroforesis es posible distinguir los componentes monoclonales de los policlonales, correspondiendo estos últimos a una respuesta inmune fisiológica a estímulos antigénicos importantes como es el caso de infecciones de diversos orígenes. Es característico de las gammopatías policlonales un trazado electroforético en el que se observa en la región gamma una banda ancha aumentada, de densidad difusa y altura mediana que refleja el producto de diversos clones de células plasmáticas, cada una de las cuales sintetiza un tipo distinto de inmunoglobulinas (figura 30-6).

La presencia de un componente monoclonal en la electroforesis asociado a hipogammaglobulinemia, es un signo importante y característico de una gammopatía monoclonal maligna. Es posible que ocurra el fenómeno contrario, es decir que existiendo una neoplasia monoclonal de células plasmáticas, no aparezca el componente monoclonal en la electroforesis de proteínas séricas; esto puede observarse en la enfermedad de cadenas livianas, mieloma IgD, enfermedad de cadenas pesadas y en el mieloma no secretor. Este último se caracteriza por presentar un componente monoclonal indetectable en sangre y orina y solo es posible detectarlo en el

interior de las células plasmáticas de médula ósea por técnicas como la inmunofluorescencia directa.

Existen algunos factores de error que es importante tener en consideración al momento de informar una electroforesis, ya que suele suceder que se considera como componente monoclonal a ciertos artefactos tales como: (a) fibrina que puede quedar en sueros mal centrifugados o mal separados y que puede aparecer como una fracción concentrada entre las β y γ globulinas; (b) complejos de hemoglobina-haptoglobina característico de un suero hemolizado, que migran en la región de la β_2 globulinas; y (c) muestra en exceso que quede en el punto de aplicación de la misma.

b) Identificación y cuantificación de la proteína monoclonal. Si se detecta un componente monoclonal en una electroforesis de proteínas convencional, se debe proceder a la identificación y cuantificación mediante las técnicas de inmunoelectroforesis o inmunofijación, e inmunodifusión radial o nefelometría respectivamente. Su medición permite establecer un índice pronóstico, mantener un control evolutivo del tratamiento y detectar precozmente el inicio de una inmunodeficiencia

Inmunoelectroforesis : Esta técnica fue introducida en el año 1953 por Grabar y Williams y es muy útil para la identificación de una proteína monoclonal. Es un procedimiento que combina la electroforesis con la inmunodifusión. En una primera etapa, el antígeno es sometido a la electroforesis en un medio de agar o acetato de celulosa. En la segunda etapa, (inmunodifusión), la tira electroforética se cambia de cámara; se hacen unas incisiones en el agar en líneas paralelas al eje de la electroforesis original, y se inserta el antisuero. Se produce entonces la difusión del antisuero en dirección perpendicular a la depresión lineal hacia la zona de la electroforesis para reaccionar con el antígeno correspondiente. Cuando se ha alcanzado una concentración apropiada de anticuerpo y antígeno, aparece un arco de precipitación en la forma de una banda ancha con un fondo claro transparente de agar. Si se utiliza antisuero polivalente y suero fresco como antígeno, pueden verse alrededor de 20 zonas de precipitado

Inmunofijación La inmunofijación se utiliza principalmente para identificar y monitorear proteínas monoclonales (como las IgG, IgM, IgA, cadena ligera lambda y cadena ligera kappa)

como las que se presentan en el mieloma múltiple y en la macroglobulinemia de Waldenström. Esta técnica también ha sido empleada para estudiar el polimorfismo proteico (por ejemplo, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) y en la tipificación genética de alfa-1 antitripsina. La muestra a investigar debe colocarse en 6 pocillos diferentes en placas de agarosa para que sea sometida al proceso de electroforesis y las proteínas queden separadas de acuerdo a su carga neta. En una segunda etapa se aplican los anticuerpos monoespecíficos en 5 de los 6 trazados electroforéticos para que la fijación ocurra. La inmunofijación puede realizarse en suero, orina, líquido cefalorraquídeo etc. y posee una mayor sensibilidad y poder de resolución que la inmunoelectroforesis.

Inmunodifusión radial. En esta técnica se prepara un gel de agarosa conteniendo anticuerpos anti-IgG (-M o -A); en un pocillo realizado en el gel se agrega la muestra en estudio, generalmente suero. Si éste contiene el isotipo de inmunoglobulina para el cual tiene especificidad el anticuerpo incorporado en el gel, se forma un anillo de precipitación cuyo diámetro será proporcional a la concentración de la inmunoglobulina existente en la muestra.

Nefelometría Es una técnica de laboratorio que se utiliza para obtener una medición de la cantidad de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA de manera precisa y rápida. Esta prueba utiliza un instrumento especializado para medir el movimiento de partículas en una solución (turbiedad), causada por la interacción de inmunoglobulinas del suero con inmunoglobulinas anti IgG (-M, -A) que ha sido agregada al suero.

6.2. Viscosidad sérica

La hiperglobulinemia que experimentan los pacientes con Mieloma y más aún con macroglobulinemia los conduce a un estado de hiperviscosidad que puede complicarse con una hipercoagulabilidad sanguínea. La viscosidad relativa del plasma, con respecto a la del agua (1.0) es de 1.8 en condiciones normales. Los pacientes con Mieloma Múltiple pueden alcanzar valores de 5 a 6 veces superiores a lo normal.

6.3. Beta 2 microglobulinemia

Esta proteína forma parte de la estructura de las moléculas clase I del Sistema Principal de

Histocompatibilidad (cadena liviana del heterodímero) y se encuentra en la superficie de todas las células nucleadas. Puede medirse tanto en suero como en orina y constituye un valor pronóstico en los síndromes linfoproliferativos, especialmente en el mieloma múltiple. Las cifras elevadas se asocian con activación y destrucción de linfocitos. Los valores normales son 1.15 - 2.03 mg/l. Valores alterados pueden darse también en casos de insuficiencia renal debido a que se excreta por los riñones.

6.4. Inhibidor 1 del Activador de Plasminógeno (PAI-1), Fibrinógeno, Proteína C Reactiva (PCR) e Interleuquina 6 (IL-6)

La hipercoagulabilidad plasmática que predispone a eventos tromboembólicos es frecuente en pacientes con Mieloma Múltiple. Las causas de este fenómeno pueden agravarse frente a una gran variedad de agentes quimioterápicos en combinación con talidomida y dexametasona, utilizadas en el tratamiento del Mieloma múltiple, donde los eventos trombóticos venosos pueden alcanzar el 28% de frecuencia en los pacientes. Por otro lado, las características clínicas del Mieloma Múltiple predisponen a trombosis; dentro de ellas destaca la inmovilización, hiperviscosidad e hipercalcemia, amiloidosis, efectos protrombóticos derivados de un aumento en IL-6, niveles altos de fibrinógeno, aumento en la expresión del Factor Tisular, del factor VIII, del Factor von Willebrand, reducción de los niveles de Antitrombina y proteína S. Se ha demostrado que la capacidad fibrinolítica está disminuida en pacientes con Mieloma Múltiple, encontrándose una PAI-1, a la par con el aumento en los valores séricos de IL-6 y PCR. En resumen, fenómenos derivados de las características clínicas del Mieloma Múltiple, del incremento de IL-6, y de una disminución de la capacidad fibrinolítica, producen un cuadro de hipercoagulabilidad, cuya detección y evaluación sería útil para el tratamiento y pronóstico de pacientes con Mieloma Múltiple. En este sentido, los niveles séricos de PAI-1, fibrinógeno, PCR e IL-6 son de gran utilidad.

a) Interleuquina 6. Esta citoquina es el principal factor de crecimiento de la célula plasmática tumoral. Un aumento en los niveles séricos de ella se asocia como factor pronóstico en Mieloma Múltiple, ya que es el principal factor de crecimiento celular *in vitro* en esta enfermedad. Se produce en exceso en pacientes que están desarrollando Mieloma Múltiple. Su

producción puede ser potenciada por otras interleuquinas entre ellas, la interleuquina-1 beta, que actúa sobre las células del estroma y células óseas del medio ambiente tumoral, estimulando la producción de IL-6 (producción paracrina). También se ha demostrado que la célula de mieloma es capaz de producir su propia IL-6 (producción autocrina) bajo la influencia de IFN α y TNF α *in vitro*, además de otras citoquinas. Cantidades elevadas en suero de IL-6 se asocian a mal pronóstico. La medición sérica del llamado receptor soluble de IL-6 (sIL-6R), el cual favorece la acción de la IL-6, tendría similar valor pronóstico.

b) PCR. Esta proteína sérica de fase aguda aumenta sus niveles asociándose a un aumento en la producción de IL-6 y otras citoquinas en pacientes con Mieloma Múltiple. La producción de PCR por parte de los hepatocitos se estimula frente a un aumento de IL-6, IL-1, TNF α . No es un marcador específico pero sí bastante sensible. Su aumento sérico está asociado a mal pronóstico en Mieloma Múltiple.

6.5. Nuevos marcadores

a) Factor de crecimiento hepático (FCH). Es una citoquina que originalmente se identificó que promovía el crecimiento de la célula hepática. También es conocido como un factor mitogénico involucrado en la formación de vasos sanguíneos y como un promotor de proliferación celular e invasión que causa destrucción de uniones celulares. Es por esta razón que este factor se le conoce también como «factor dispersador». Además de su capacidad de promover la angiogénesis, FCH estimula la formación de osteoclastos de células precursoras hematopoyéticas y atrae osteoclastos al sitio de resorción ósea, los cuales en colaboración con osteoblastos, aumenta la tasa de resorción ósea. El receptor de FCH es una proteína transmembrana con actividad tirosinaquinasa codificado por el proto-oncogene *c-met* y se encuentra expresado tanto en líneas celulares de mieloma como en células frescas además de células de médula ósea. El FCH es liberado por células inflamatorias y producido por fibroblastos en respuesta a citoquinas inflamatorias tales como IL-6 y TNF- α . Células de mieloma pueden producir FCH y expresar el receptor para FCH. Se ha asociado a FCH como una citoquina destructora de hueso en mieloma y en diversos estudios se la ha asociado fuertemente con IL-6 y TNF- α los cuales son producidos localmente en el microentorno de la médula ósea. Algo similar

ocurre con β_2 microglobulinemia. La metodología utilizada para medir FCH es un ELISA en fase sólida.

b) Marcadores de metabolismo óseo. Debido a que las gammapatías monoclonales, entre las que se destaca al mieloma múltiple se ha asociado con varias manifestaciones clínicas tales como, osteolisis, anemia, hipercalcemia y disfunción renal asociadas a la producción de citoquinas producidas por células anormales, es importante medir los niveles en orina de ciertas moléculas que dan cuenta del metabolismo óseo, tales como Osteocalcina (OC), un telopéptido aminoterminal de colágeno tipo I (NTx) por técnicas de Enzimoimmunoensayo.

c) Estudio de anormalidades genéticas asociadas a gammapatías monoclonales. Recientemente, una serie de translocaciones cromosomales han sido relacionadas estrechamente a discracias de células plasmáticas. De hecho, translocaciones que afectan al gen responsable de la síntesis de cadenas pesadas de inmunoglobulinas IgH, y que favorecen la transformación de proto-oncogenes en oncogenes efectivos, se han identificado no sólo en Mieloma Múltiple, sino también en estadios más tempranos (pre-malignos) de esta enfermedad como son Gammapatía Monoclonal de Significado Indeterminado y Mieloma Indolente. El gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas o IgH, está ubicado en la banda 32 del brazo q del cromosoma 14 y las anormalidades cromosómicas que lo afectan están asociadas con la aparición de oncogenes tales como *ciclynD1/myeov(11q13)*, *c-maf(16q23)*, *FGFR3/MMSET(4p16.3)* y *MUM-1(6p25)* entre otros, siendo en su mayoría, genes promotores de la proliferación celular en células plasmáticas. A través de la técnica de fluorescencia con hibridación *in situ* conocida como FISH, se ha determinado una prevalencia para las translocaciones de IgH, cercana al 60% en pacientes con mieloma múltiple. La translocación más frecuentemente asociada tanto a mieloma múltiple como a gammapatía monoclonal de significado incierto es $t(11;14)(q13,q32)$, existiendo otras, entre el cromosoma 14 y el 4, y entre el 14 y el 16. También hay evidencias que la monosomía 13 ($\Delta 13$) está presente desde estadios muy tempranos del mieloma múltiple y de la gammapatía monoclonal de significado incierto, asociándose luego a $t(4;14)(p16.3;q32)$ ³. Además, en otras gammapatías monoclonales similares, como en Amiloidosis de Cadenas

Livianas se ha reportado la presencia de la translocación $t(11;14)(q13,q32)$ ⁴. Todos estos datos podrían servir en un futuro cercano para el diagnóstico y pronóstico en pacientes con discracias plasmáticas y vislumbrar algún tipo de terapia génica con el estudio de estas mutaciones cromosómicas y la aparición de oncogenes.

LECTURAS SUGERIDAS

Citoquímica y Estudio citogenético

Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., *et al* "Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia". *N Engl J Med* 343: 1910-6, 2000.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., *et al* "The World Health Organization Classification of Neoplasms of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting-Airlie House, Virginia, November 1997". *The Hematology Journal* 1:53-66, 2000.

Kearney, L. "The impact of the new FISH technologies on the Cytogenetics of Haematological malignancies", *British Journal of Haematology* 104 : 648-658, 1999.

Members of General Haematology Task Force of the BCSH. "The role of cytology, cytochemistry, immunophenotyping and cytogenetic analysis in the diagnosis of haematological neoplasms", *Clin Lab Haem* 18: 231-236, 1996.

Shibata, A., Bennett, J.M., Castoldi, G.L., *et al* "Recommended methods for cytological procedures in haematology. International Committee for Standardization in Haematology (ICSH)". *Clin Lab Haematol* 7:55-74, 1985.

Biología molecular en oncohematología

Braziel, R.M., Shipp, M.A., Feldman, A.L., Espina, V., Winters, M., Jaffe, E.S., Petricoin, E.F., **Molecular Diagnostic**. Liotta LA. American Society of Hematology Educational Book, 2003, pp. 279-293

Finbarr, E. (ed.) **Methods in Molecular Medicine: Molecular Diagnosis of Cancer**. Cotter, University of London, UK. Humana Press, Tootwa, New Jersey. 1996.

Giles, F.J., Kealing, A., Goldstone, A., Avivi, I., Willman, C.L., Kantarjais, H.M. **Acute Myeloid Leukemia**. American Society of Hematology Educational Book, 73-106, 2002.

Macyntire, E., Willerford, D., Morris, S.W. **Non Hodgkin's Lymphoma: Molecular Features of B Cell Lymphoma**. American Society of Hematology Educational Book, 2000, pp. 180-204.

Pui, C-H., Campana, D. "New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia". *Leukemia* 14, 183-785, 2000.

Van Dongen, J.J.M., Macintyre, E.A., Gabert, J.A., Delabasse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreire, A., Gamero, P., Gonzalez, Diaz, M., Malec, M., Langerak, A.W., San Miguel, J.F., Biondi, A., "Standardized RT-PCR analysis of fusion transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease". *Leukemia* 13, 1901-1920, 1999.

Citometría de flujo

Bauer, K., Duque R., Shankey, T.V. **Clinical Flow Cytometry. Principles and application**. Williams & Wilkins, 1993.

Braunwald, E., Fauci, A., Kasper D., Hauser, S., Longo, D., Jameson J.L. Harrison. **Principios de Medicina Interna**. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.U, 2001.

Repp, R., Schaekel, U., Helm, G., Thiede C., Soucek, S., Pascheberg, U. Wandt, H., Aulitzky, W., Bodenstein, H., Sonnen, R., Link, H., Ehninger, G., Gramatzki, M., AML-SHG Study Group. "Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML". *Cytometry Part B (Clinical cytometry)* 53B:11-19, 2003.

Ruiz-Argüelles, A., Duque, R.E., Orfao, A. "Report on the first Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Leukemia". *Cytometry*;34(1):39-42, 1998.

Ruiz-Argüelles, G., San Miguel, J. **Actualización en leucemias**. Editorial Médica Panamericana, S.A., 1996.

Shapiro, H. **Practical flow cytometry**. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2003.

Valet, G., Repp, R., Link, H., Ehninger, A., Gramatzki, M., SHG-AML study group. "Pretherapeutic identification of high-risk acute myeloid leukemia (AML) patients from immunophenotypic, cytogenetic, and clinical parameters". *Cytometry Part B (Clinical cytometry)* 53B:4-10, 2003.

Inmunoquímica en gammopatías monoclonales

Alexandrakis, M.G., Passam, F.H., Sfiridaki, A., Kandidaki, E., Rousou, P., Kyriakou, D.S "Elevated Serum Concentration of Hepatocyte Growth Factor in Patients with Multiple Myeloma: Correlation with Markers of Disease Activity". *American Journal of Hematology* 72: 229-233, 2003.

Bataille, R., Klein, B. "Cytokines and lymphoplasmocytic proliferations: essential role of interleukin 6". *Rev Prat.* 43(3):275-8, 1993. Brian, G.M., Durie, M.D. "Multiple Myeloma , Cancer of the Bone Marrow" Concise Review of the disease and treatment options. International Myeloma Foundation. Edition. Disponible en : www.myeloma.org, 2003.

Fonseca, R., Bailey, R.J., Ahmann, G.J., Rajkumar, S.V., Hoyer, J.D., Lust, J.A., Kyle, R.A., Gertz, M.A, Greipp, P.R., Dewald, G.W. "Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance". *Blood.* 100(4):1417-24, 2002.

Fonseca, R., Oken, M.M., Greipp, P.R. Eastern Cooperative Oncology Group Myeloma Group. "The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance". *Blood.* 15;98(4):1271-2, 2001.

Greipp, P.R., Witzig, T. "Biology and treatment of myeloma". *Current Opinion in Oncology* 8(1): 20-27, 1996.

Kerr, R., Stirling, D., Luudlam, C.A. "Interleukin 6 and haemostasis". *Br J Haematol* 2001; 115:3-12

Mahmoud, F.A., Rivera, N.I. "The role of C-reactive protein as a prognostic indicator in advanced cancer". *Curr Oncol Rep.* 4(3):250-5, 2002.

Malgeri, U., Baldini, L., Perfetti, V., et al. "Detection of t(4 ;14)(p16.3q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of IGH-MMSET fusion transcripts". *Cancer Res.* 60:4058-406, 2000.

Miura, K., Iida, S., Hanamura, I., Kato, M., Banno, S., Ishida, T., Kusumoto, S., Takeuchi, G., Miwa, H., Nitta, M., Inagaki, H., Eimoto, T., Nomura, K., Taniwaki, M., Ueda, R. "Frequent occurrence of CCND1 deregulation in patients with early stages of plasma cell dyscrasia". *Cancer Sci.* 94(4):350-4, 2003.

Silva, M., Oqueteaux M. "Gammapatías monoclonales" En **Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica**. Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Roseblatt, M., Vergara, U. (eds.) Capítulo 27. Editorial Universidad de Talca, 2002.

Yagci, M., Sucak, G.T., Haznedar, R. "Fibrinolytic Activity in Multiple Myeloma". *American Journal of Hematology* 74:231-237, 2003.

Zangari, M, Anaissie, E., Barlogie, B., *et al.* "Creased Risk of deep-vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving thalidomide and chemotherapy". *Blood* 98:1614-1615, 2001.

ESTUDIO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES HEMORRÁGICAS

Iván Palomo G., Blanca Muñoz V., Eduardo Retamales C., Patricia Hidalgo P., Olga Panes B., Carmen Gloria Artigas A. y Jaime Pereira G.

- 1. Introducción**
- 2. Estudio de alteraciones de la coagulación**
 - 2.1. Pruebas de coagulación
 - 2.1.1. Pruebas de "screening"
 - 2.1.2. Dosificación de factores
 - 2.2. Coagulómetros
 - 2.2.1. Tecnologías de coagulómetros
 - 2.3. Control de calidad interno en coagulación
 - 2.3.1. Fase pre-analítica
 - 2.3.2. Fase analítica
 - 2.3.3. Fase post-analítica
 - 2.4. Control de calidad externo
- 3. Estudio de la enfermedad de von Willebrand**
 - 3.1. Factor von Willebrand
 - 3.2. Estudio de laboratorio de la EvW
 - 3.2.1. Exámenes básicos de hemostasia
 - 3.2.2. Exámenes para identificar el tipo de EvW
 - 3.2.3. Exámenes para identificar el subtipo de EvW
 - 3.2.4. Exámenes adicionales
- 4. Estudio de laboratorio de las trombocitopenias inmunes**
 - 4.1. Métodos generales
 - 4.2. Métodos de pesquisa de Anticuerpos antiplaquetarios
 - 4.2.1. Métodos de fase I
 - 4.2.2. Métodos de fase II
 - 4.2.3. Métodos de fase III
 - 4.2.4. Métodos para estudiar las trombocitopenias inducidas por drogas
 - 4.3. Biología Molecular aplicada a la trombocitopenias inmunes
- 5. Estudio de la función plaquetaria**
 - 5.1. Principales disfunciones plaquetarias
 - 5.1.1. Desórdenes adquiridos
 - 5.1.2. Desórdenes hereditarios
 - 5.2. Estudios de laboratorio
 - 5.2.1. Pruebas de "screening"
 - 5.2.2. Estudios para determinar la causa de la alteración
 - 5.2.3. Estudio de agregación plaquetaria
 - 5.2.4. Estudio de secreción plaquetaria
 - 5.2.5. Estudio de glicoproteínas plaquetarias específicas

RESUMEN

El diagnóstico definitivo de las enfermedades hemorrágicas requiere de pruebas de laboratorio. En este capítulo se describen los aspectos fundamentales de las pruebas que se utilizan para estudiar las alteraciones de la coagulación, tanto a nivel global (pruebas de “screening”) como de aquellas utilizadas para la cuantificación de defectos específicos. En este contexto se describen las características de los coagulómetros y aspectos generales del control de calidad interno en coagulación.

También se aborda el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand (EvW) y de las trombocitopenias inmunes (pesquisa de anticuerpos antiplaquetarios y pruebas de biología molecular).

Finalmente, se describen las pruebas que permiten estudiar la función plaquetaria (agregación y secreción plaquetaria) y estudio de glicoproteínas plaquetarias.

1. INTRODUCCIÓN

La sangre circula a través de los vasos sanguíneos sin que se produzca activación plaquetaria o de la coagulación, ni hemorragia apreciable.

El sistema hemostático puede presentar dos tipos de alteraciones: hemorragia y trombosis; en ambos casos se pueden alterar los elementos plasmáticos y celulares.

La ruptura de un vaso sanguíneo desencadena el proceso hemostático, comenzando por la adhesión de las plaquetas al endotelio dañado o a estructuras subendoteliales expuestas (ver capítulo 19). Simultáneamente, factores de la coagulación (plasma) son activados por distintos mecanismos y se produce la coagulación (ver capítulo 20), cuyo fin es detener la extravasación de la sangre.

2. ESTUDIO DE ALTERACIONES DE LA COAGULACIÓN

Las pruebas generales (“screening”) de hemostasia incluyen: recuento de plaquetas, tiempo de sangría, tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), y en algunos casos tiempo de trombina (TT).

El estudio de laboratorio de la hemostasia secundaria (ver capítulo 20) comprende las pruebas de “screening” TP y TTPA, y según corresponda, el TT. Si una o más de estas pruebas de coagulación están prolongadas, se debe estudiar si la causa es debida a déficit de factor(es) o inhibidores de la coagulación.

2.1. Pruebas de coagulación

2.1.1. Pruebas de “screening”

a) Tiempo de Protrombina

Esta prueba evalúa la eficiencia del sistema extrínseco de la coagulación, midiendo la formación del coágulo plasmático, en presencia de un exceso de extractos tisulares. Es más sensible a los defectos de factores VII, X y V, que a la deficiencia de Factor II (Protrombina). No detecta disminuciones moderadas de fibrinógeno, pero si este último es muy bajo o existe un potente inhibidor de la reacción trombina-fibrinógeno, se obtiene un TP prolongado. La sensibilidad de la prueba es influenciada por el reactivo y técnica usada. El reactivo utilizado, tromboplastina, contiene factor tisular y fosfolípidos. Es importante interpretar la prueba con un rango de referencia establecido por el propio laboratorio.

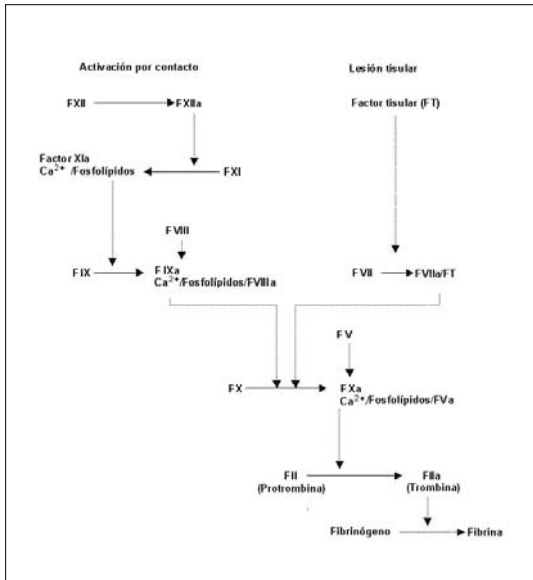


Figura 31-1. Vías intrínseca y extrínseca del sistema de la coagulación. Las vías intrínseca y extrínseca incluyen factores de la coagulación que son evaluados por el TTPA y TP, respectivamente.

El TP consiste en comparar los tiempos de coagulación del plasma en estudio con un “pool” de plasmas normales, en presencia de Tromboplastina cálcica. Los tiempos de coagulación expresados en las muestras en estudio se interpolan en una curva de calibración realizada con diluciones seriadas de un “pool” de plasmas normales y se informa en segundos, porcentaje de actividad de protrombina o en forma de razón (cuociente entre el TP del paciente y el TP del plasma normal).

Su sensibilidad para detectar defectos va a depender de la fuente y tipo de tromboplastina tisular. Es una prueba relativamente simple pero sujeto a variables (toma de la muestra, hemólisis, etc.) que afectan los resultados.

Control de tratamiento anticoagulante oral

El TP es el método más utilizado para el monitoreo del tratamiento anticoagulante oral.

Debido a la gran variabilidad en la sensibilidad de las diferentes tromboplastinas, es necesario estandarizar el control del tratamiento anticoagulante oral. El uso del porcentaje no se recomienda principalmente debido a que el cambio de actividad obtenido por dilución no refleja el que se produce cuando se administran anticoagulantes orales, ya que la dilución altera

todos los factores de la coagulación en igual forma, mientras que los anticoagulantes orales tienen un mayor efecto sobre algunos factores de la coagulación.

Un laboratorio de coagulación debe aplicar medidas de control de calidad internas y seguir normas de estandarización para realizar adecuadamente el control anticoagulante de los pacientes.

La escala universal para expresar el resultado de los TP que corresponden a un tratamiento anticoagulante oral se denomina INR (“International Normalized Ratio”).

La OMS implementó la estandarización del control de la anticoagulación oral mediante el uso de tromboplastinas de referencia, que permiten calibrar la actividad biológica de las preparaciones comerciales utilizadas para el control de los pacientes. Este proceso de calibración debe ser realizado por los fabricantes de cada tromboplastina, con un mínimo de 20 plasmas de donadores normales y 60 plasmas de pacientes bajo tratamiento anticoagulante oral estabilizado. Se grafican en escala doble logarítmica los TP de los plasmas normales y cumarinizados, expresados en segundos para ambas tromboplastinas (de referencia y a calibrar) y se estima la recta de ajuste por el método de regresión ortogonal. La pendiente de esa recta de calibración, expresa la sensibilidad de la tromboplastina a calibrar, en relación a la de referencia usada y se denomina ISI (Índice de Sensibilidad Internacional). Cada envase de reactivo debe tener registrado el ISI.

El ISI caracteriza la sensibilidad de la tromboplastina que se está calibrando; mientras más cerca de 1, más sensible es la tromboplastina. Con valores sobre 2 se considera muy poco sensible y no se recomienda su uso.

El INR es la única forma correcta de expresar resultados de TP cuando éstos corresponden a un control de tratamiento anticoagulante oral.

En primer lugar se obtiene la razón (“ratio”) TP paciente/TP “pool” normal, obtenida con la tromboplastina comercial usada en el laboratorio. El INR corresponde a la razón ¹⁵¹. El INR refleja el resultado que habría sido obtenido si la tromboplastina de referencia hubiese sido utilizada para realizar la prueba. Ejemplo: 25 seg/11 segundos = 2.27; la tromboplastina

utilizada tiene un ISI de 1.2; 2.27^{1,2} por tanto el INR = 2.67

b) Tiempo de tromboplastina parcial activado

El TTPA se basa en la medición del tiempo de coagulación del plasma, en presencia de una "tromboplastina parcial" (cefalina) que no contiene factor tisular, de un activador de factores de contacto (ej. kaolín, ácido elálgico) y calcio.

El TTPA refleja la integridad global del sistema intrínseco de la coagulación (figura 31-1), siendo especialmente importante su sensibilidad a los defectos de los factores VIII, IX y XI, ya que éstos están asociados con sangrado clínico.

También se encuentra prolongado en déficit de factor XII, Kininógeno de alto peso molecular, precalicreina, en deficiencias que involucran factores de la vía común (Factor V, X, II y fibrinógeno) y en presencia de inhibidores (Ej. anticoagulante lúpico).

Es la prueba más ampliamente usada para el control de la terapia anticoagulante con Heparina no fraccionada.

El TTPA se puede ver afectado por las siguientes variables: el tipo de activador, tiempo de incubación con el plasma, la presencia de "buffers" y el tipo de fosfolípidos utilizados.

Un reactivo de TTPA confiable debe ser capaz de detectar deficiencias de factores de 30% o menos y concentraciones bajas de heparina.

c) Tiempo de Trombina

El TT mide el tiempo que demora el fibrinógeno, presente en el plasma, en transformarse en fibrina por la adición de una cantidad estandarizada de trombina.

El TT se encuentra prolongado cuando el nivel de fibrinógeno es muy bajo, en presencia de anticoagulante tipo antitrombina, especialmente heparina y productos de degradación fibrinógeno/fibrina (PDF) y en presencia de fibrinógeno anormal, congénito o adquirido (disfibrinogenemia).

El TT se considera prolongado, cuando es 5 segundos superior al tiempo del "pool" control resulta mayor a 5 seg.

d) Estudio de mezclas

La realización de los estudios de mezclas es la 1ª etapa en la evaluación de un TP, TTPA y TT prolongado una vez que la contaminación con heparina ha sido descartada realizando un Tiempo de Trombina.

La mezcla de un volumen de plasma del paciente con un volumen de plasma normal constituye una forma rápida para diferenciar entre un déficit de factor(es) y un inhibidor de la coagulación. El plasma normal agregado a un plasma deficiente en uno o más factores de la coagulación, corrige la prueba. Si la prolongación de la prueba se debe a un inhibidor, el plasma normal no corregirá el valor.

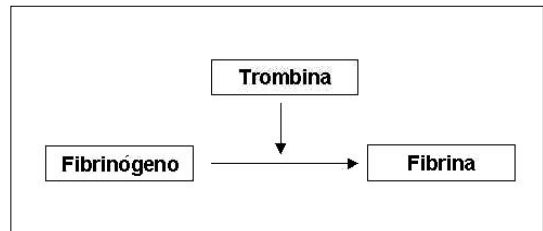


Figura 31-2. Etapa final de sistema de la coagulación. Esta etapa es evaluada por el tiempo de trombina.

e) Diagramas de flujo de las pruebas básicas de coagulación

A continuación se muestran cuatro diagramas de flujo, según resultados que se presenten en las pruebas básicas de coagulación: solo TP alargado, solo TTPA alargado, TP y TTPA alargado y solo TT alargado (figuras 31-3 a 31-6).

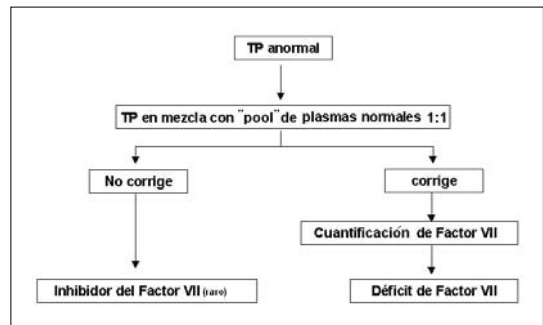


Figura 31-3. Diagrama de flujo en caso de prolongación del tiempo de protrombina (TP).

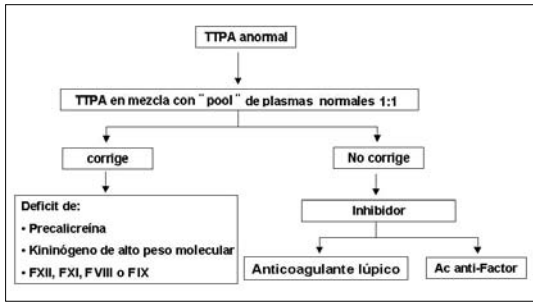


Figura 31-4. Diagrama de flujo en caso de prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA).

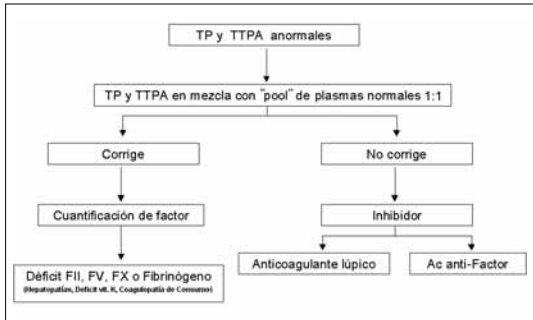


Figura 31-5. Diagrama de flujo en caso de prolongación, tanto del tiempo de protrombina (TP) como del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA).

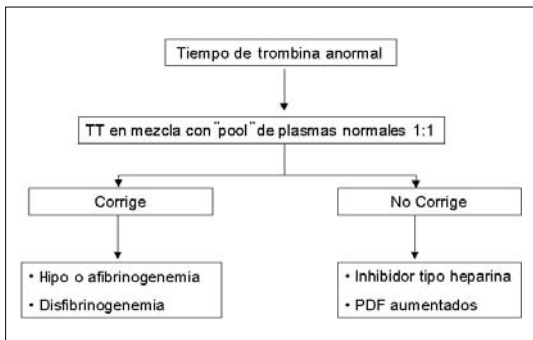


Figura 31-6. Diagrama de flujo en caso de prolongación solo del tiempo de trombina (TT).

2.1.2. Dosificación de factores

La dosificación de factores está indicada cuando en un estudio de coagulación, habiendo realizado las pruebas básicas (TP, TTPA y TT), y después de realizar el estudio de mezclas con plasma normal, según se indica en los diagramas de flujo (punto anterior) se concluye que la prolongación del tiempo se debe a déficit de uno o más factores de la coagulación.

Las pruebas permiten la cuantificación de los factores de la coagulación de forma individual. Para su medición se utilizan, principalmente,

métodos funcionales (coagulométricos).

Para cuantificar los factores II, V, VII y X se utiliza el método en una etapa basado en el TP, y para cuantificar los factores VIII, IX, XI y XII se realiza el método en una etapa basado en el TTPA.

El método en una etapa mide la actividad coagulante en un sistema que aporta todos los factores del mecanismo extrínseco o intrínseco (dependiendo del factor a cuantificar), excepto el factor que se desea medir. El tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la actividad coagulante del factor en estudio, en el plasma del paciente. El plasma de referencia usado en la prueba puede ser un "pool" de plasmas preparado por el propio laboratorio o un plasma comercial, en ambos casos debe ser calibrado con un estándar internacional.

2.2. Coagulómetros

2.2.1. Tecnologías de los coagulómetros

Cada vez más el método manual del tubo inclinado en baño termostático ha dado paso a los coagulómetros. Éstos son instrumentos que miden la formación de fibrina a través de diferentes metodologías. Las diferentes metodologías ofrecidas por el mercado presentan distinta tecnología para la detección del coágulo de punto final. A continuación se indican, brevemente, sus características fundamentales:

Tecnología óptica. Se basa en la emisión de un haz de luz blanca que detecta el inicio de la formación de la malla de fibrina al impedir el paso de la luz en la cubeta.

Tecnología mecánica. Usa un brazo con dos varillas que al formarse el coágulo detiene su desplazamiento.

Tecnología optomecánica. Combina la tecnología óptica con la mecánica, una lámpara de tungsteno está ajustada para entregar un voltaje constante desde los fotodiodos; al exceder el cambio de voltaje los límites determinados, la coagulación es registrada.

Tecnología electromagnética. Consiste en una barra que se desplaza en un campo electromagnético y se detiene al formarse la malla de fibrina.

Tecnología nefelométrica. Mide la luz dispersa al formarse la malla de fibrina. En todos los casos

los equipos disponen de sensores para detectar la aparición de la malla de fibrina y aplica un algoritmo computacional para entregar los resultados.

Algunos ejemplos de instrumentos, según la tecnología que utilizan son:

Óptico: ACL futura, Behnk Elektronik, MLA Electra 750 – 800, MLA Electra Automático, IL MCL-2, RAL Clot-1, Sysmex CA 1000 Automático-6000, BioMerieux Option 2 Plus - 4 Plus, Human Humalyzer Coag-2000, Teco Coatron, BCS (Dade Behring).

Mecánico: Amelung CS 190, AMAX, AMGA, Amelung KC-1, KC-4, KC-10, KC-40, BBL Fibrómetro.

Optomecánico: Behring Fibrintimer II-10-New, Behring Fibrintimer A – BCT, Trombotimer I Behnk Elecktronic.

Electromagnético: Stago ST2-ST4-Start-4, Stago STA compact, compact-CT.

Nefelométrico: ACL modelo 100 a 9000.

2.3. Control de calidad interno en coagulación

El laboratorio de coagulación cumple un rol fundamental en el diagnóstico y manejo de pacientes con enfermedades hemorrágicas o trombóticas, adquiridas o hereditaria. Así, por ejemplo, errores en la cuantificación de factor VIII o IX (ver punto 2.1.2.) o determinación del INR (ver punto 2.1., 1.a y capítulo 25) puede tener graves consecuencias clínicas debido a que se puede asociar a un error en el tratamiento de un paciente hemofílico o en el control de tratamiento anticoagulante, respectivamente.

Es necesario implementar una serie de medidas para garantizar que los procedimientos realizados en el laboratorio de coagulación permitan entregar resultados confiables y reproducibles.

Las características del control de calidad en el laboratorio de coagulación son las siguientes: (a) proceso dinámico que debe ir mejorando continuamente, (b) debe ser organizado, (c) con normas de funcionamiento escritas y claras, (d) vigilar el cumplimiento sistemático de las normas implementadas, (e) llevar registro de las acciones realizadas, (f) dar a conocer las medidas implementadas y (g) la gestión de

calidad para que sea efectiva, debe contar con la colaboración y el trabajo en equipo de todos los integrantes del laboratorio.

Los aspectos fundamentales a tener en consideración sobre control de calidad en coagulación serán descritos, aunque sin detalles, separados en tres fases: pre-analítica, analítica y post-analítica.

2.3.1. Fase pre-analítica

La toma de muestra es parte de la etapa pre-analítica y considera la obtención, procesamiento y almacenamiento de las muestras.

Para evitar errores en la etapa de identificación del paciente, se debe disponer de un formato, en el que además del nombre y apellidos, se identifique cada paciente mediante su número de historia clínica, así como al médico solicitante. En los laboratorios más complejos se utilizan fichas, en que la identificación del paciente se realiza mediante código de barras, lo cual elimina el error humano de la etapa pre-analítica.

La apropiada obtención de la muestra y la manipulación de la misma son relevantes; la probabilidad de error en esta etapa, en general, es mayor que el error que pueda ocurrir durante las determinaciones de laboratorio. Las variaciones intraindividuales incluyen el uso de medicamentos o drogas, la actividad física, el estrés emocional, la postura del paciente y variaciones diurnas. La actividad física es una causa conocida de variabilidad, que se debe tener en cuenta cuando se va a determinar la actividad del factor VIII y del factor von Willebrand (FVW). La principal causa de variación son los ritmos circadianos, que modifican los niveles de un parámetro a lo largo del día.

Durante la flebotomía, el torniquete debe aplicarse temporalmente (no más de un minuto), sólo utilizarlo para la punción venosa, pero no durante la extracción de la muestra. La mayoría de los laboratorios rechazan las muestras de sangre si se detecta algún signo de hemólisis. Existen evidencias de que la hemólisis no afecta al TP, siempre que la hemólisis no sea el resultado de una extracción traumática.

Los tubos para las pruebas de coagulación deben obtenerse después de los destinados a otros exámenes. Esta práctica es aceptable en

el caso que corresponda a una única prueba, con excepción del TTPA de pacientes tratados con heparina, ya que en estos casos entrega resultados un 20 % más corto con el primer tubo.

El citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$) es el anticoagulante de elección para las investigaciones de la hemostasia en concentraciones de 105 mMol/L (3,2 g/dL dihidratada), en una proporción de una parte de anticoagulante para nueve partes de sangre.

Si la cantidad de sangre en el tubo es menor que la requerida para mantener la proporción de 9:1 sangre / anticoagulante, el exceso de anticoagulante podría alterar la exactitud del resultado. Si el hematocrito es <20% o >55% también se pierde la relación del anticoagulante respecto a la cantidad de plasma (mayor cantidad en caso de anemia y menor cantidad si se trata de policitemia); para calcular la cantidad de citrato de sodio 3.2% a agregar se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen anticoagulante} = \frac{(100 \times \text{hematocrito})}{(595 \times \text{hematocrito})} \times \text{Volumen de sangre a anticoagular}$$

Respecto del transporte y conservación, en general, el TP es una prueba más estable que el TTPA y, las altas temperaturas conducen a acelerar la reducción (en porcentaje) o prolongación (en segundos) de ambas reacciones. La muestra puede ser mantenida a temperatura ambiente (18° - 24° C) hasta por dos horas. Ese tiempo podría extenderse para las muestras de tamizaje hasta 4 horas a 4 - 8 °C. El tubo debe mantenerse tapado para evitar los cambios en el pH y liberación de CO (ácidos volátiles). Para separar el plasma la muestra debe ser centrifugada a 2500 g por 15 a 20 minutos. Si la muestra no es procesada dentro de un tiempo determinado, se recomienda que sea alicuotada y congelada a -20°C para ser procesada dentro de 2 semanas. Si desea almacenar la muestra hasta por 1 año debería ser congelada a -70° C.

2.3.2. Fase analítica

Plasma control interno. Los controles internos de “pool” de plasma congelado o liofilizado, de producción del propio laboratorio de hemostasia y comerciales, respectivamente, permiten evaluar la precisión y reproducibilidad de los equipos. Deben ser ensayados previo al inicio de la rutina diaria de trabajo y ser graficados en cartas controles de Levey-Jennings, para identificar errores sistemáticos y al azar.

Para la preparación del “pool” de plasmas se deben seleccionar 20 o más voluntarios de ambos sexos, sanos, y sin medicamentos, incluidos estrógenos ni embarazo. Las muestras deben ser obtenidas y el plasma separado según

se estableció en el punto 2.3.1.

Para seleccionar los plasmas a incluir en el “pool”, se deben realizar un TP y TTPA a cada uno de los plasmas; serán utilizados sólo los que tengan resultados dentro de los rangos de referencia.

Los plasmas seleccionados son mezclados y se agrega HEPES al 0,6%. Luego se preparan alícuotas que se congelan -20 °C, el material es estable en estas condiciones durante 5 meses. Se debe efectuar una determinación en cada corrida o cada 20 muestras de pacientes y, si los resultados están dentro de las 2 desviaciones estándares se puede iniciar la rutina. Revisar la tendencia de la gráfica de Levey-Jenning y aplicar las reglas de Westgard.

Carta control. El objetivo del control de calidad interno es evaluar y verificar los diversas etapas analíticas que se realizan durante una prueba. Consisten en mantener una mejoría continua basada en la vigilancia de los procesos para decidir si son confiables sus resultados. El proceso debe buscar y detectar errores sistemáticos y por lo tanto, la precisión del análisis. Cuando el método analítico está fuera de control se deben determinar los tipos de errores: sistemático, al azar o ambos; basados en la transgresión de las reglas de control. Cuando no se cumple y presenta 1 punto fuera de ± 3 desviaciones estándar (DE) o R4 DE es más probable que se trate de un error al azar que sistemático. Si el error sistemático está presente es más probable detectarlo por no cumplimiento de las reglas de 2 puntos de ± 2 DE, 4 de ± 1 DE, o $10 \bar{x}$. La revisión de los datos

de un único control ayudará a detectar los errores de un rango de concentración particular (normal o prolongado). Las recomendaciones que se deben aplicar de acuerdo a las reglas de Shewhart son.

- Se acepta la corrida cuando un control está dentro de la $\bar{x} \pm 2 \text{ DE}$.
- Se descarta la corrida cuando un control excede la $\bar{x} \pm 3 \text{ DE}$. No se informan los resultados de pacientes.
- Se descarta la corrida cuando ambos controles (alto y bajo), exceden la misma desviación: $\bar{x} + 2 \text{ DE}$ o $\bar{x} - 2 \text{ D}$
- Se descarta cuando en una carta control, uno de los controles exceden $\bar{x} + 2 \text{ DE}$ y el otro excede a $\bar{x} - 2 \text{ DE}$ en la observación.
- Se descarta cuando a lo menos 4 controles consecutivos exceden en la $\bar{x} + 1 \text{ DE}$ o $\bar{x} - 1 \text{ DE}$ el mismo control.
- Se descarta cuando a lo menos 10 controles consecutivos caen hacia un mismo lado de la media.

Los factores que deben verificarse en el control de los equipos y reactivos son: fecha de vencimiento de los reactivos, estabilidad eléctrica, permeabilidad de los drenajes, indemidad de las tuberías y mantener niveles aceptables de reactivos y desechos. En este contexto, deben haber procedimientos claros de mantención de equipos estipulando la regularidad, fecha de visitas, tipo de intervención (mantención, corrección o reparación), reemplazo de repuestos y estado actual del equipo.

Valores de referencia. Se recomienda determinar los valores de referencia estableciendo rangos para cada técnica. El procedimiento requiere reclutar un mínimo de 20 individuos sanos, de ambos sexos que no estén recibiendo ningún medicamento. Se les debe medir el TP y TTPA, luego calcular la media y DE. Con estos datos calcular el rango de las 3 desviaciones estándar para eliminar los valores extremos. Se recalcula la media y DE y se obtiene el rango de referencia considerando el rango de las 2 DE tanto el valor de +2 DE y - 2DE. Este rango corresponde al 95% de la población muestreada. Esta es la media que debe ser utilizada como valor normal para calcular el INR, para el control de tratamiento con anticoagulantes orales.

2.3.3. Fase post-analítica

En esta etapa, tan importante como las

anteriores se debe evitar de cometer los siguientes errores: (a) de transcripción, (b) en los cálculos o en las unidades, (c) interpretación incorrecta.

Respecto a esto último el laboratorio debe proporcionar los valores de referencia de cada método. Adicionalmente el laboratorio debe tener una adecuada forma de registro de los resultados de los pacientes, de manera que puedan ser recuperados circunstancialmente.

En las distintas etapas del procesamiento de las muestras: preanalítica, analítica y post-analítica deben validarse los resultados antes de emitir un informe. Interrelacionar la condición clínica del paciente, contrastar con exámenes históricos, relacionar con otros exámenes solicitados en el mismo laboratorio y trazabilidad del control de calidad.

2.4. Control de calidad externo

Diferentes estudios de evaluación externa internacional como la Agencia Francesa y el CAP (Colegio de Patólogos Americanos) muestran coeficientes de variación para TP normales (en segundos) que varían desde 2,1 a 5,1 %, en el caso de plasmas prolongados la variación va desde 10,3 a 17,8 %. En el caso de los TTPA, en muestras normales el intervalo se encuentra entre 3,8 a 7,8 % y en plasmas prolongados entre 6,8 a 17,6 %. En la experiencia del Instituto de Salud Pública de Chile, los datos de TP varían para los normales desde 3,4 a 7,7 % y de 9,0 a 18,7 % para los plasmas prolongados, de la misma manera para TTPA varían en los plasmas normales desde 4,3 a 16,9 % y de 6,2 a 23,9% para los prolongados.

Se sabe que la composición de los fosfolípidos de los diferentes reactivos de tromboplastinas utilizadas para el TP varían considerablemente, e influyen de forma significativa en la sensibilidad del procedimiento. El tipo de activador utilizado en el caso de TTPA, es así mismo importante, y lo mismo ocurre con los diferentes tipos de coagulómetros, ya que ambos afectan el resultado obtenido. Esto se traduce en que los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios no sean siempre comparables. Además de los métodos antes citados, existe el cromogénico. Se ha observado que con este procedimiento se obtienen niveles más elevados que con los coagulativos.

3. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

3.1. Factor von Willebrand

El FVW se considera la glicoproteína adhesiva, multimérica, de mayor peso molecular presente en el plasma normal (500 a 10.000 kDa). El FVW está constituido por subunidades básicas (260 kDa) que se ensamblan para formar multímeros de diferentes tamaños. Una disminución o ausencia de multímeros de alto peso molecular producen alteraciones en la funcionalidad del FVW, traducándose en hemorragias mucocutáneas (ver capítulo 22).

3.2. Estudio de laboratorio de la EvW

3.2.1. Exámenes básicos de hemostasia

a) Recuento de plaquetas. Es generalmente normal, pero puede presentarse una trombocitopenia leve en la EvW tipo 2B. Un recuento disminuido de plaquetas puede orientar a una falla general de plaquetas relacionadas o no con la EvW, por lo que puede sugerir una falla cualitativa del FVW con aumento de la afinidad del FVW por la GPIb α de las plaquetas.

b) Tiempo de sangría (TS). A pesar de no ser un examen que presenta una alta exactitud y reproducibilidad, continúa siendo de ayuda en el estudio de la función plaquetaria *in vivo*. El TS suele presentarse prolongado en los casos severos de la EvW y en los casos moderados o leves puede estar normal, como ocurre en la EvW tipo 1. Últimamente la utilidad del TS ha sido cuestionada.

c) Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA). A diferencia del Tiempo de Protrombina (TP) que siempre se presenta normal en la EvW, el TTPA puede presentarse normal o con diferentes grados de prolongación dependiendo del nivel del FVIII:C. El TTPA comienza a prolongarse con una actividad del FVIII:C inferior al 25-30 UI/dL.

3.2.2. Exámenes para identificar el tipo de EvW

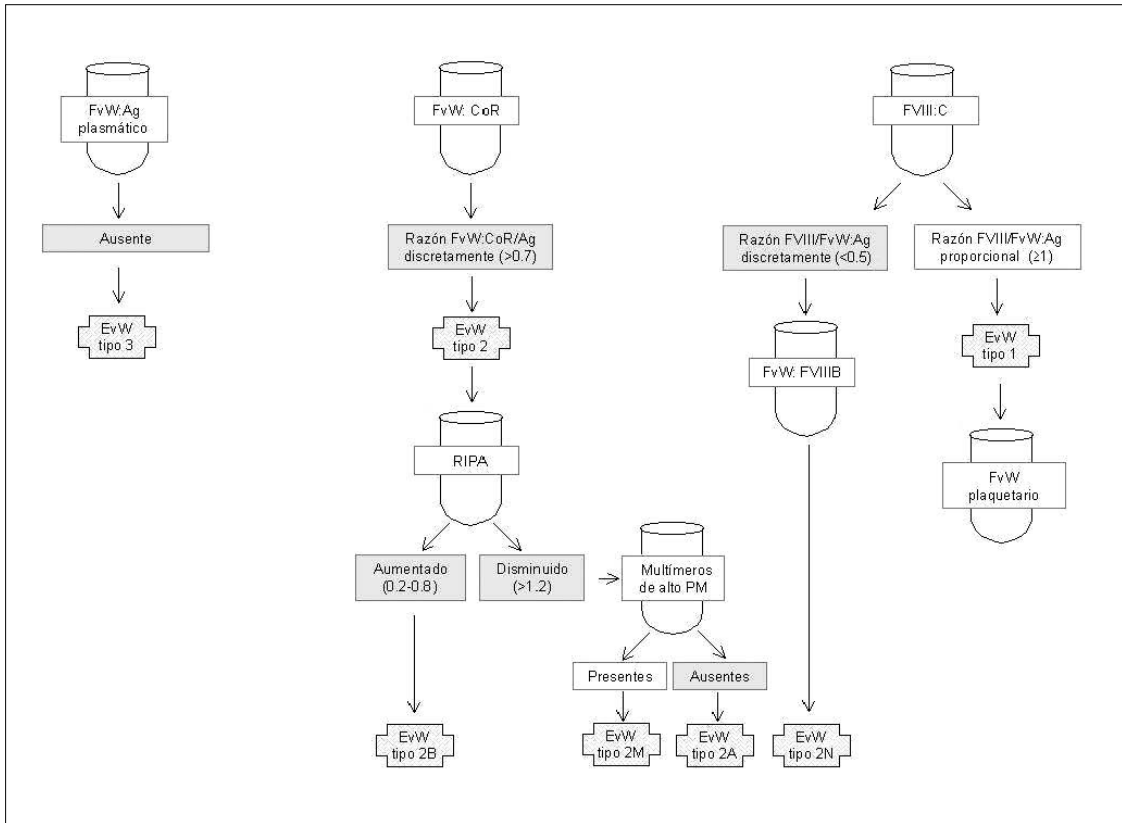
En la tabla 31-1 se presentan los principales exámenes de laboratorio que exploran la EvW y la forma de presentación en cada variante de la enfermedad. La figura 31-7 indica el flujograma para el diagnóstico de la EvW.

Tabla 31-1. Laboratorio en los distintos tipos de la Enfermedad de von Willebrand

EvW Tipo	TS (seg)	FVIII:C (UI/dL)	FVW:Ag (UI/dL)	FVW:Co R (UI/dL)	RIPA (mg/mL)	Multímeros de alto peso molecular
1	N / P	N / D	N / D	N / D	N	N
2A	P	N / D	N / D	D	D	A
2B	P	N / D	N / D	D	I	A
2M	P	N	N / D*	D	D	N
2N	N	D	N	N	N	N
3	P	D / A	D / A	D / A	D	D

N: normal; P: prolongado; D: disminuido; A: ausente; I: incrementado

* Variante Vicenza



31-7. Flujograma para el diagnóstico de la EvW. Si en el laboratorio se encuentran niveles de FVW:Ag extremadamente bajos o indetectables, orienta al diagnóstico de Tipo 3. Cuando la razón FVW:Ag está presente, se debe diferenciar entre tipo 1 y tipo 2 con el FVW:CoR y la razón FVW:CoR/Ag. Si la razón es >0.7 , se orienta al tipo 1 que se confirma con niveles de FVIII:C iguales o superiores al FVW:Ag o también con el contenido de FVW plaquetario. Si es <0.7 orienta al tipo 2. La caracterización del subtipo 2, se realiza con los valores de la RIPA. Si está aumentado, orienta al subtipo 2B. Si está disminuido, puede tratarse del tipo 2A o 2M, donde la ausencia o presencia de los multímeros de alto peso molecular darán el diagnóstico. El tipo 2N se caracteriza cuando los niveles de FVIII:C son menores que los del FVW:Ag y se confirma con el estudio de la afinidad FVW por el FVIII. (Adaptado de Federici *et al*, 2002)

a) Factor von Willebrand antigénico (FVW:Ag)

Puede ser medido en el plasma, mediante electroinmunoensayo, radioinmunoensayo o por ELISA. Se utiliza anticuerpo mono o policlonal anti FVW y plasma del paciente. En la EvW tipo 3 el FVW:Ag es indetectable, en el tipo 1 y en el tipo 2 puede estar bajo o normal.

b) Factor von Willebrand cofactor ristocetina (FVW:CoR)

Estudia la interacción del FVW con la GPIIb de las plaquetas. Es un método para medir la actividad funcional del FVW, que es propiedad fundamental de los multímeros de alto peso molecular. Se basa en la propiedad de la ristocetina (antibiótico), para inducir la aglutinación de las plaquetas normales fijadas

en formalina en presencia del FVW. En la EvW tipo 1, donde la estructura del FVW es normal, los valores de FVW:CoR son similares a los valores de FVW:Ag ($FVW:CoR/Ag >0.7$). Niveles de FVW:CoR más bajos que FVW:Ag son característicos de la EvW tipo 2 (radio $FVW:CoR/Ag <0.7$).

c) Factor VIII coagulante (FVIII:C)

Mide la actividad coagulante del FVIII. Habitualmente se realiza mediante el método clásico en una etapa, usando sustrato comercial deficiente en FVIII:C. La actividad puede estar disminuida en grado variable o normal en la EvW tipo 1 y tipo 2, sin embargo en el tipo 3, los valores están francamente disminuidos ($<1-5\%$), similares a los que se presentan en la Hemofilia A. El cálculo de la razón $FVIII/FVW:Ag$

es útil para distinguir entre EvW tipo 1 y tipo 2. En el tipo 1 generalmente es proporcional (≥ 1), a diferencia de la EvW tipo 2N donde se observan valores discrepantes entre FVIII y FVW:Ag (< 1).

3.3.3. Exámenes para identificar el subtipo de EvW

a) Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA)

Mide la aglutinación plaquetaria producida en plasma rico en plaquetas (PRP) a diferentes concentraciones de ristocetina en un agregómetro. Los resultados expresan la concentración de ristocetina (mg/dL) capaz de inducir un 30% de agregación. Este examen tiene valor diagnóstico cuando el FVW está muy disminuido o presenta una función deteriorada, sin embargo tiene una baja sensibilidad en los casos de las formas moderadas de EvW. Es útil para distinguir los subtipos de la EvW tipo 2. El tipo 2A y 2M se caracterizan por una hiporrespuesta a la ristocetina, presentándose valores > 1.2 mg/dL. Excepcionalmente en el tipo 2B, existe una alta respuesta a la ristocetina, debido a una afinidad mayor que la normal del FVW plasmático por la GPIba plaquetaria, observándose valores de ristocetina capaces de inducir aglutinación plaquetaria < 0.8 mg/dL.

b) Análisis de la composición multimérica del FVW

Los multímeros del FVW se separan en geles de agarosa según su peso molecular, visualizándose por autorradiografía luego de una incubación con anticuerpo policlonal anti FVW inmunopurificado y marcado con ^{125}I . Se pueden distinguir los multímeros del FVW de alto, mediano y bajo peso molecular. Esta técnica es útil para distinguir entre la EvW tipo 1 y 2. En la EvW tipo 1 está presente todo el "pattern" de multímeros. En la EvW tipo 2, los multímeros pueden estar presentes en el tipo 2M y 2N, y los multímeros de alto y mediano peso molecular pueden estar ausentes en el tipo 2A y 2B.

c) FVW plaquetario

El FVW plaquetario juega un importante rol en la hemostasia primaria, ya que al ser liberado desde los gránulos alfa actúa directamente en el sitio de la injuria vascular. Los métodos han sido ideados para estudiar la relación del FVW plaquetario desde el punto de vista cuantitativo

(ELISA) y cualitativo (análisis multimérico). Útil para determinar la severidad de la EvW tipo 1; los pacientes que tienen disminuido el FVW plaquetario presentan un tiempo de sangría más prolongado y tienen manifestaciones hemorrágicas más severas. Sobre la base de esta medición, la EvW tipo 1 puede ser clasificada en 3 subtipos: (a) tipo 1 con FVW plaquetario normal, (b) tipo 1 con FVW con plaquetario disminuido, y (c) tipo 1 con FVW plaquetario discordante.

d) Capacidad de unión al FVIII (FVW:FVIII)

Mide la afinidad del FVW por el FVIII. Esta técnica se realiza cuando la razón FVIII/FVW es $< 0,5$ para distinguir la EvW tipo 2N de una Hemofilia A moderada. La determinación se realiza por ELISA según diversos métodos. Se utiliza anticuerpo policlonal anti FVW, plasma en estudio y FVIII recombinante (rFVIII).

3.3.4. Exámenes adicionales

Capacidad del FVW de unión al Colágeno (FVW:CBA)

Se ha planteado como un examen alternativo a la medición de la actividad del FVW:CoR; sin embargo es capaz de detectar en mejor forma que el FVW:CoR, la ausencia de multímeros de alto y mediano peso molecular.

4. ESTUDIO DE LABORATORIO DE LAS TROMBOCITOPENIAS INMUNES

Las plaquetas son elementos celulares anucleados que se originan por fragmentación del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea, desde donde pasan a circulación permaneciendo en ella durante 8 a 10 días antes de ser removidas por el sistema fagocítico mononuclear. Tienen entre 1,5 a 3 μm de diámetro y en reposo presentan forma discoide (ver capítulo 19).

Las trombocitopenias se pueden presentar por uno de los siguientes mecanismos: (a) producción deficiente, (b) distribución anormal y, (c) destrucción acelerada (ver capítulo 21). Respecto a este último mecanismo se conoce, la participación de auto y alo anticuerpos (trombocitopenias inmunes) y se han desarrollado métodos para su pesquisa.

En el diagnóstico de laboratorio de las trombocitopenias inmunes, se utilizan pruebas comunes a toda trombocitopenia y métodos

para estudiar el carácter inmune de su patogenicidad.

4.1. Métodos generales

En general, al iniciar el estudio de las trombocitopenias se utilizan las siguientes pruebas:

- **Recuento de plaquetas.** Se realiza para establecer si el síndrome hemorrágico; particularmente la presencia de petequias, equimosis y hematomas, se debe a la disminución en el número de plaquetas.
- **Mielograma.** Permite establecer si se está frente a una trombocitopenia megacariocítica o amegacariocítica.
- **Estudio de sobrevida plaquetaria:** Este método consiste en transfundir plaquetas marcadas con ^{59}Cr o ^{111}In a un paciente. Con ^{111}In , además de observar el acortamiento de la sobrevida plaquetaria, se puede determinar, por medio de radioactividad externa, el lugar del secuestro. Este método no se utiliza en clínica.

4.2. Métodos de pesquisa de Anticuerpos antiplaquetarios

Los métodos de pesquisa de anticuerpos antiplaquetarios se han clasificado en fase I, II y III. A continuación se describen las características más importantes de estos métodos.

4.2.1. Métodos de fase I

Los métodos de fase I o de punto final, mezclan suero o plasma del paciente con plaquetas normales y miden algunas reacciones dependientes de plaquetas. Entre otros métodos se puede mencionar agregación plaquetaria, disminución del contenido granular, exposición a sustancias procoagulantes o inhibición de la migración de plaquetas.

Los métodos de fase I presentan baja sensibilidad y especificidad, razón por la cual ya no se utilizan. La baja sensibilidad se explica porque no todos los anticuerpos son capaces de activar o alterar las plaquetas, y la baja especificidad se debe a que factores inmunológicos y no inmunológicos, pueden activar las plaquetas y producir falsos positivos.

4.2.2. Métodos de fase II

Los métodos de fase II o métodos para estudio serológico inicial son los más usados, permiten medir la IgG asociada a plaquetas (PAIgG) y los anticuerpos antiplaquetarios circulantes (AcAPc). Pueden cuantificar en algunos casos, el número de moléculas de IgG unida a las plaquetas, sin considerar su especificidad.

PAIgG. Se puede medir la PAIgG total y la PAIgG de superficie. En el primer uso se mide la cantidad de IgG en un lisado plaquetario, por lo que la IgG cuantificada corresponde a la IgG de superficie y a la liberada por las plaquetas. Esta última fracción representa la mayor parte de la IgG plaquetaria. La medición directa de la PAIgG (de superficie) es la más utilizada. En su pesquisa se utiliza anticuerpos anti-IgG humana marcados con radioisótopos, enzimas o fluorocromos (figura 31-8):

- **Anticuerpo monoclonal marcado con ^{125}I .** Este método utiliza un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana radiomarcado, el cual se une a la IgG antiplaquetaria fijada en la membrana en proporción 1:1, permitiendo así la cuantificación de las moléculas de IgG. La forma indirecta de este método, es decir la cuantificación de moléculas de IgG sobre plaquetas previamente sensibilizadas por un suero en estudio, es útil en la pesquisa de AcAPc.
- **Microscopía de Inmunofluorescencia.** El uso de anticuerpos anti-IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es otra forma de evidenciar la presencia de anticuerpos antiplaquetarios, sean estos unidos directamente a la membrana plaquetaria (inmunofluorescencia directa, para pesquisa de PAIgG) o se encuentren en circulación. En este último caso se hace necesaria la incubación previa del plasma o suero con plaquetas normales sobre la cual se fije la IgG (inmunofluorescencia indirecta). La principal desventaja de este método es lo subjetivo de su interpretación.
- **Citometría de flujo.** La citometría de flujo permite cuantificar la cantidad de anticuerpo monoclonal fluorescente unido a cada célula en forma individual, facilitando la identificación y tipificación de subpoblaciones celulares con alta sensibilidad, especificidad y rapidez. Brevemente algunos aspectos de tipo metodológico. La muestra de sangre puede

ser anticoagulada con EDTA (Ácido etilendiaminotetra-acético) o citrato de sodio. Las plaquetas pueden ser estudiadas en sangre total, plasma rico en plaquetas (PRP) y plaquetas lavadas en tampón fosfato salino (PBS) más algún antiagregante plaquetario (EDTA, Prostaglandina PGE₁). Las plaquetas pueden ser fijadas (con paraformaldehído o formaldehído), antes o después de marcarlas con el anticuerpo monoclonal conjugado con el fluorocromo. Si bien las plaquetas generalmente pueden ser identificadas usando la información que proporcionan el SSC («Side Scatter Colección») y el FSC («Forward Scatter Colección»), para asegurar su reconocimiento y así no confundirlas con los restos celulares («debris») se aconseja marcar las células con un anticuerpo dirigido contra una glicoproteína de membrana plaquetaria (ej. GPIIb/IIIa=CD61). El fluorocromo conjugado con este anticuerpo debe ser diferente al que se usa en el estudio propiamente tal. Los resultados se expresan en igual forma que en otras células: (i) intensidad media de fluorescencia, (ii) porcentaje de células marcadas (que emiten fluorescencia) y (iii) número de moléculas en estudio por cada plaqueta. Esta última es de uso infrecuente. El tratamiento de las plaquetas para estudio por microscopía de inmunofluorescencia y por citometría de flujo, en lo fundamental, es el mismo, la diferencia está en la lectura (microscopio citómetro de flujo). Este último determina la subpoblación, de plaquetas que presentan fluorescencia, respecto al control de isotipo, y la intensidad de dicha fluorescencia. Se puede determinar tanto PAIgG como AcAPc.

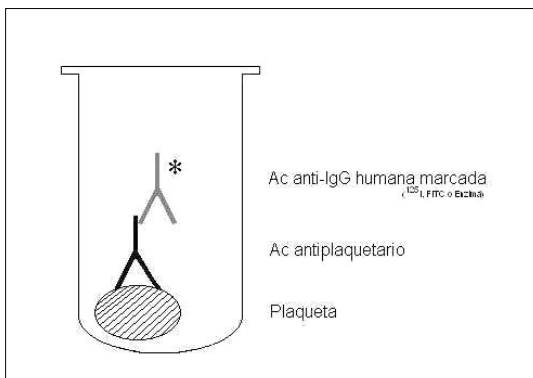


Figura 31-8. Esquema de métodos para estudiar Inmunoglobulina G asociada a plaquetas (PAIgG) .

ELISA de membranas plaquetarias. Para pesquisar AcAPc, el suero en estudio se hace

reaccionar con membranas plaquetarias inmovilizadas en placas de microtitulación. La IgG antiplaquetaria unida, se revela con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con una enzima, generalmente fosfatasa alcalina. El color desarrollado luego de agregar el sustrato de la enzima (para fosfatasa alcalina: p-nitrofenilfosfato), es proporcional a la cantidad de IgG antiplaquetaria existente del suero en estudio (figura 31-9). Se considera que una muestra es positiva para la pesquisa de anticuerpos cuando su densidad óptica (DO) es mayor a la absorbancia promedio de tres sueros normales más tres DE.

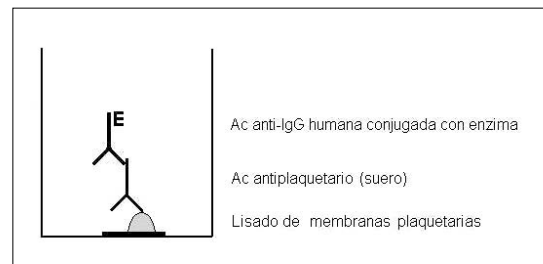


Figura 31-9. Pesquisa de anticuerpos antiplaquetarios por ELISA.

4.2.3. Métodos de fase III

Los métodos de fase III son para determinar la especificidad antigénica de los anticuerpos antiplaquetarios. Miden la IgG unida a glicoproteínas (GP) plaquetarias específicas superando los problemas de la unión no específica de la IgG a la superficie plaquetaria. Los métodos de fase III son capaces de identificar la glicoproteína específica a la cual el anticuerpo antiplaquetario se une, mas no miden la cantidad de IgG unida. Se han descrito varios métodos de esta fase: «Westernblot» o «Inmunoblot», ELISA con antígeno capturado (EAC), ELISA con antígeno capturado modificado (EACM), Inmovilización de antígeno plaquetario por anticuerpos monoclonales específicos (MAIPA).

ELISA con antígeno capturado (EAC). El lisado plaquetario es inmovilizado sobre placas de microtitulación cubiertas con anticuerpo monoclonal (Ac Mo) dirigido contra las GP mayores de membrana plaquetaria (IIb-IIIa, Ia-IIa, Ib-IX). Sobre este lisado se hace reaccionar el plasma o eluido plaquetario del paciente. La IgG humana capturada en la placa es revelada, posteriormente, por incubación con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina.

Este método prácticamente ya no es utilizado pues se ha establecido que el lisar previamente las plaquetas altera algunos epítomos de GP plaquetarios.

ELISA con antígeno capturado modificado (MACE). En este ELISA las plaquetas son lisadas después de reaccionar con el suero en estudio. Esto da una mayor sensibilidad al ensayo, ya que pueden ser pesquizados anticuerpos que dependan de la conformación de epítomos de GP plaquetarias. Luego de la lisis plaquetaria, los complejos inmunes son incubados en una placa de microtitulación cubierta con Ac Mo, anti GP y revelados por incubación con Ac anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (figura 31-10).

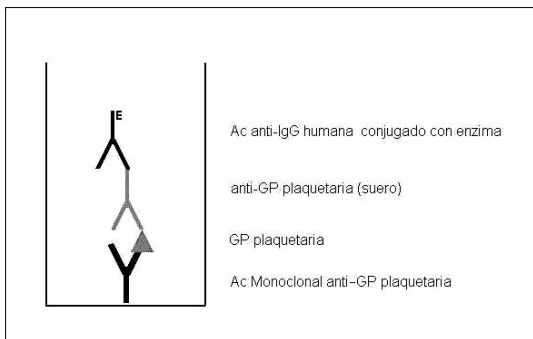


Figura 31-10. Esquema de ELISA con antígeno capturado modificado (MACE).

Inmovilización de antígenos plaquetarios por anticuerpos monoclonales específicos (MAIPA). En este método el complejo Ac Mo anti-GP plaquetaria específica - GP - Ac APc es capturado por Ac anti-IgG de ratón fijados en la microplaca. El revelado de la reacción se realiza igual que en el MACE, es decir con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina y el respectivo sustrato (figura 31-11).

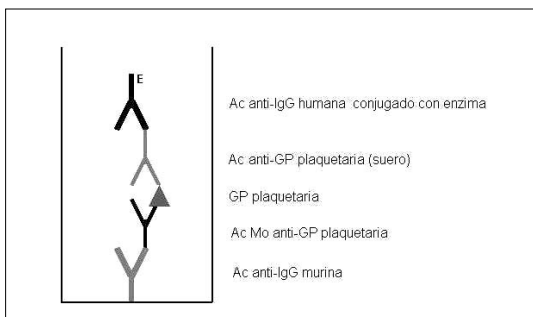


Figura 31-11. Esquema de ELISA Inmovilización de antígenos plaquetarios por anticuerpos monoclonales específicos (MAIPA).

4.2.4. Métodos para estudiar las trombocitopenias inducidas por drogas

Cualquiera de los métodos, antes mencionados y que se utilizan en la pesquisa de anticuerpos antiplaquetarios, pueden ser útiles para el estudio de anticuerpos cuyo mecanismo de acción en las trombocitopenias es dependiente de algún fármaco. Los ensayos que se utilicen deben incluir la incorporación de la droga en todo el procedimiento de detección para permitir la acción del anticuerpo. Se entiende que el paciente presenta un anticuerpo antiplaquetario dependiente de un fármaco determinado, cuando hay reacción positiva con la muestra en presencia de droga, pero no en ausencia de la misma. Un suero normal debe ser negativo para la pesquisa, ya sea en ausencia o presencia de droga. La trombocitopenia inducida por fármacos más característica es la Trombocitopenia inducida por Heparina (TIH).

Trombocitopenia inducida por Heparina

La TIH es una importante complicación de la terapia con heparina, presentándose en el 5-10% de los pacientes en tratamiento con este anticoagulante. Esta patología está asociada a heparina no fraccionada, pero también se observa, con menos frecuencia, en pacientes tratados con heparina de bajo peso molecular. Clínicamente se presenta como trombocitopenia ($<100 \times 10^3$ plaquetas/ μ l) o reducción del recuento plaquetario en 30-50% respecto al valor base, complicación que se presenta entre 5 a 15 días después de iniciado el tratamiento; en pacientes expuestos previamente a heparina, ésta se desarrolla dentro de horas a pocos días. El 20-50% de los casos de TIH se asocia a trombosis venosa y algunas veces a trombosis arterial (Trombocitopenia-Trombosis Inducida por Heparina, TTIH).

La TIH está relacionada a la presencia de AclH, que se desarrolla en un grupo de pacientes tratados con heparina. Éstos presentan especificidad por el complejo PF4-H. La presencia de AclH no necesariamente se asocia a TIH, existiendo por tanto individuos asintomáticos.

El diagnóstico de TIH se apoya en dos tipos de pruebas de laboratorio: funcionales e inmunológicas. Ninguno de los dos tipos de pruebas permite hacer diagnóstico de TIH en el 100% de los casos, observándose resultados discrepantes en el 10-20% de los pacientes.

Pruebas funcionales

Los ensayos de este tipo más usados, son los que estudian la capacidad de los AclH IgG para activar plaquetas. Tanto en la prueba de Liberación de ^{14}C -serotonina (figura 31-12) como en el ensayo de Agregación plaquetaria, plaquetas normales de un donante son incubadas con plasma en estudio (y plasma normal como control). En el primer caso, una prueba altamente sensible (<90%), ^{14}C -serotonina que se incorpora a los gránulos densos de las plaquetas desde donde es liberada cuando éstas son activadas. Ambos ensayos se pueden optimizar usando plaquetas lavadas y una adecuada concentración de heparina (0.1-1 UI/ml); esto considerando que en ausencia de heparina y en presencia de alta concentración de ésta (100 UI/mL) no se presenta reactividad. Se debe incubar un suero control positivo y controles negativos (suero normal y reacciones sin heparina y con alta concentración de la misma 100 UI/mL). En estas condiciones la especificidad es superior al 90%.

Otras pruebas funcionales son la activación plaquetaria inducida por heparina, ensayos luminiscentes que evalúan la activación plaquetaria por liberación de ADP o ATP, y generación de micropartículas utilizando citometría de flujo.

Pruebas inmunológicas

La identificación de PF4 como el principal antígeno para los AclH, en presencia de heparina, ha permitido el desarrollo de ELISA anti-PF4-H. Esta prueba requiere un equipo de uso más frecuente en los laboratorios, respecto a lo requerido para las pruebas funcionales. Éste es un ELISA de fase sólida en que PF4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) junto con heparina convencional (0.5 UI/ml) se unen a pocillos de placa de microtitulación. Posteriormente se agrega el suero en estudio que podría presentar AclH; luego se adiciona un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con enzima (generalmente fosfatasa alcalina) y finalmente se revela con el sustrato apropiado. Como en todo ELISA debe incluirse blancos, controles negativos y positivos. Presenta una sensibilidad de 80-90%. IgG es el isotipo más frecuente encontrado en pacientes con TIH (80%).

El ELISA PF4-H puede detectar anticuerpos débiles que no son evidenciados por pruebas funcionales (Ej. IgM e IgA, por ello ahora no son estudiados). Por su parte, estas últimas

pueden pesquisar especificidades diferentes a PF4 (Ej. anti-IL-8). Dada la alta sensibilidad de ambos tipos de pruebas, y no habiéndose resuelto aún la superioridad de una sobre la otra, se puede utilizar cualquiera de ellas para la pesquisa rutinaria. Se puede incluir una segunda prueba (ELISA PF4-H o Liberación de ^{14}C -serotonina, según la que use habitualmente el laboratorio), para aquellos casos en que el cuadro clínico sea compatible con TIH, y los AclH no fueron pesquisados por la prueba utilizada inicialmente. Debido a que existen pacientes que desarrollan AclH y no presentan complicaciones no se recomienda realizar como "screening" alguna de las pruebas para pesquisar AclH en todos los pacientes que son tratados con heparina.

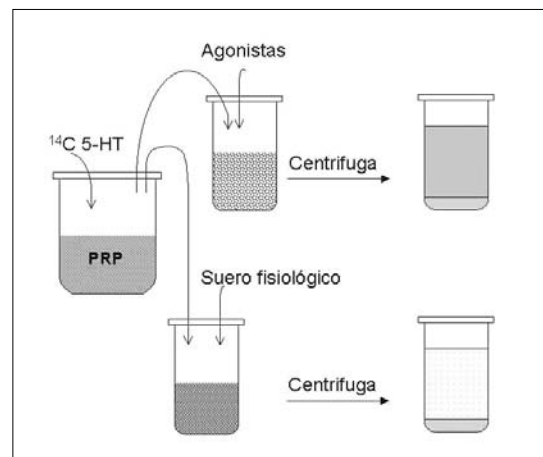


Figura 31-12. Secreción de serotonina- ^{14}C

4.3. Biología molecular aplicada al estudio de las trombocitopenias inmunes

Tres condiciones clínicas pueden resultar de una aloinmunización contra antígenos plaquetarios específicos: Púrpura aloimmune neonatal (PAN), Púrpura post-transfusional (PPT) y refractariedad a la transfusión de plaquetas (RTP). En estas situaciones se requiere de una rápida y precisa tipificación de los sistemas antigénicos plaquetarios (HPA: "Human platelets antigens") de los pacientes y donantes. Además en el caso del PAN, los padres pueden ser aconsejados acerca de futuros embarazos. La serotipificación utilizando los métodos de fase III antes descritos pueden presentar dos problemas: trombocitopenia marcada y ausencia de sueros controles positivos para ciertas especificidades antigénicas, lo que hace que los procedimientos de serotipificación sean limitados.

En contraste, la genotipificación HPA puede ser realizada con DNA genómico de material celular conveniente y usando reactivos comercialmente disponibles. Las bases moleculares están descritas para la gran parte de los antígenos específicos de plaquetas y la diferencia entre dos alelos se basa en un nucleótido lo que origina como resultado el cambio de un aminoácido. Una variedad de técnicas basadas en PCR han sido utilizadas para la genotipificación HPA, pero la más utilizada es la **PCR alelo específica**. Este método utiliza un partidor único de consenso para el extremo 5' y un partidor específico para el extremo 3' de cada alelo. La amplificación del alelo en estudio, estará condicionada de acuerdo a la especificidad de la secuencia del extremo 3' del partidor usado (figura 31-13). Para validar la reacción de amplificación, se realiza una amplificación paralela de un gen independiente del sistema antigénico estudiado, por ejemplo el gen de la Hormona de crecimiento. Los productos amplificados son analizados electroforéticamente en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio y visualizados posteriormente con luz UV.

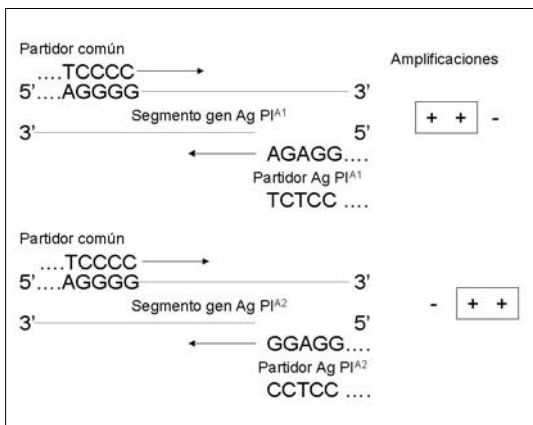


Figura 31-13. Esquema de la PCR alelo específica.

5. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

La participación de las plaquetas en el proceso de la hemostasis es fundamental. Las reacciones en las que participan son: adhesión a la zona lesionada, extensión de las plaquetas sobre la superficie expuesta, secreción de sus gránulos y aceleración del proceso de coagulación por exposición de superficie adecuada para la activación de los factores de coagulación. El resultado es la formación de una malla de fibrina, que refuerza el tapón plaquetario (ver capítulo 19).

Existen numerosas patologías (adquiridas y hereditarias) asociadas a disfunciones plaquetarias, que comprometen las distintas fases en que éstas participan. Estas patologías se expresan, generalmente, como sangrados que varían ampliamente en su gravedad.

La función plaquetaria se ve afectada por defectos producidos por: falta de receptores esenciales para la adhesión y agregación, daños en la señalización interna, que provocan alteraciones en la secreción plaquetaria y/o defecto en la exposición de fosfolípidos cargados negativamente en la membrana.

En el laboratorio clínico el estudio de la función plaquetaria comprende, esencialmente, el estudio de agregación plaquetaria y secreción plaquetaria.

En este capítulo se describe, la forma habitual en que se realiza el estudio de función plaquetaria en el laboratorio clínico.

5.1. Principales disfunciones plaquetarias

5.1.1. Desórdenes adquiridos

Las alteraciones adquiridas de la función plaquetaria son complejas; se han asociado a múltiples patologías y no infrecuentemente al uso de fármacos que interfieren con la función de las plaquetas. Entre las drogas antiplaquetarias más comunes se encuentra el ácido acetil salicílico (aspirina) que inhibe la enzima ciclooxigenasa que convierte ácido araquidónico en tromboxano A₂, potente agonista plaquetario y mediador de la liberación del contenido granular; este efecto es irreversible por lo que se necesita un recambio total de las plaquetas para que su efecto desaparezca. Otras drogas que afectan la función plaquetaria son los antiinflamatorios no esteroideos; afectan la función plaquetaria por inhibición de la formación de prostaglandinas y debido a su reversibilidad el efecto dura mientras esté presente el fármaco.

5.1.2. Desórdenes hereditarios

Las formas heredadas incluyen un heterogéneo grupo de deficiencias; existen alteraciones tanto en la adhesión por deficiencia de los receptores involucrados o en la secreción por defecto en las vías de señalización interna, que tienen como resultado la expulsión del contenido granular.

Los defectos de adhesión pueden ser dados por

defecto en los receptores de colágeno (GPVI, Ia/IIa), fibrinógeno (GPIIb/IIIa) o FVW (GPIb) y los de secreción por falta de contenido granular o movilización de su contenido.

Los síndromes más caracterizados incluyen síndrome de Bernard Soullier, en que falta el receptor para FVW y la Trombastenia de Glanzmann, que se caracteriza por ausencia del receptor para fibrinógeno. En cuanto a defectos de la secreción plaquetaria el más caracterizado es el síndrome de “Storage Pool Disease” en el cual se observa la ausencia de gránulos densos en las plaquetas.

5.2. Estudios de laboratorio

Cuando se sospecha algún síndrome hemorrágico es necesario realizar diferentes pruebas de laboratorio. El estudio de la función plaquetaria se inicia por una etapa de “screening” (Tiempo de sangría o PFA-100) y se continúa con otros estudios más especializados (Agregación y secreción plaquetaria).

5.2.1. Pruebas de “screening”

Tiempo de sangría

El tiempo de sangría mide la integridad vascular, número de plaquetas y su función (hemostasia primaria). Adquiere real importancia diagnóstica cuando se ha descartado trombocitopenia.

El tiempo de sangría consiste en provocar una pequeña incisión al paciente y tomar el tiempo requerido para que forme el tapón plaquetario y cese el flujo de sangre. Se debe minimizar la variabilidad dependiente del operador, para lo cual el método de Ivy utiliza una lanceta estandarizada, en cuanto a longitud del corte y profundidad. El lugar de la incisión debe ser el antebrazo y se debe fijar una presión de 40 mm Hg.

La duración del sangrado, debe estar dentro de un rango normal establecido, por el laboratorio; generalmente es hasta 7 u 8 minutos. El tiempo de sangría se ve alterado, por disminución en el recuento plaquetario, alteraciones en la función plaquetaria y EvW como causas más frecuentes y también por el uso de fármacos como el ácido acetilsalicílico.

PFA-100

Una medición alternativa al tiempo de sangría

es la utilización de nuevo equipo llamado PFA –100 (PFA = “Platelet Function Analyser”) el cual permite evaluar la hemostasia primaria *in vitro* en que están involucradas tanto las plaquetas como el FVW.

La medición consiste en hacer pasar sangre completa, anticoagulada con citrato de sodio, por un capilar que contiene una membrana recubierta con agonistas (colágeno/ADP o colágeno/epinefrina) a una velocidad de flujo estándar para emular las condiciones de flujo en circulación normal. Las plaquetas normales al pasar por la membrana son activadas por los agonistas antes nombrados y tapan el paso de sangre cerrando el capilar, lo que se conoce como tiempo de oclusión.

Un tiempo de oclusión prolongado indica que se encuentra frente a alteraciones, ya sea de las plaquetas o de FVW. Este método de medición permite determinar las alteraciones mencionadas de una forma menos invasiva, más rápida y más reproducible. Sin embargo, su utilidad diagnóstica aún está en proceso de ensayo.

5.2.2. Estudios para determinar la causa de la alteración

Una vez establecida la alteración en la hemostasia primaria por una de las pruebas de “screening”, el siguiente paso es determinar la causa de esta alteración. Para ello se debe proseguir estudiando, en primera instancia, las enfermedades que lo alteran en forma más frecuente como son EvW (ver punto 3) y las disfunciones plaquetarias (trombocitopatías).

Para determinar alteraciones de la función plaquetaria se realiza el estudio de agregación y secreción plaquetaria.

5.2.3. Estudio de agregación plaquetaria

Este estudio consiste en enfrentar a las plaquetas a diferentes agonistas que dan cuenta del funcionamiento de receptores o de estructuras internas.

Los agonistas utilizados más frecuentemente son araquidonato de sodio, ADP, epinefrina, colágeno y ristocetina, utilizándose para este ensayo un equipo llamado agregómetro. En términos simples el funcionamiento de este equipo consiste en hacer incidir un haz de luz de una longitud de onda fija, a través de una celda que contiene un plasma rico en plaquetas

(PRP), el que es sometido a la acción de alguno de los agonistas mencionados, al producirse la agregación de plaquetas, éstas permiten un mayor paso de luz a través de la solución. Este

aumento de paso de luz es detectado por un sistema detector y expresada como un aumento de transmitancia de la solución que luego es graficado (figura 31-14).

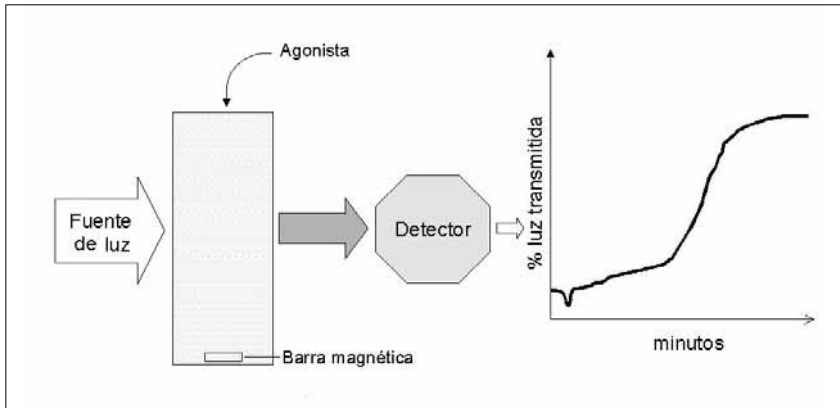


Figura 31-14. Esquema funcional de un agregómetro.

En la figura 31-15 se muestran algunos registros de agregación plaquetaria característicos.

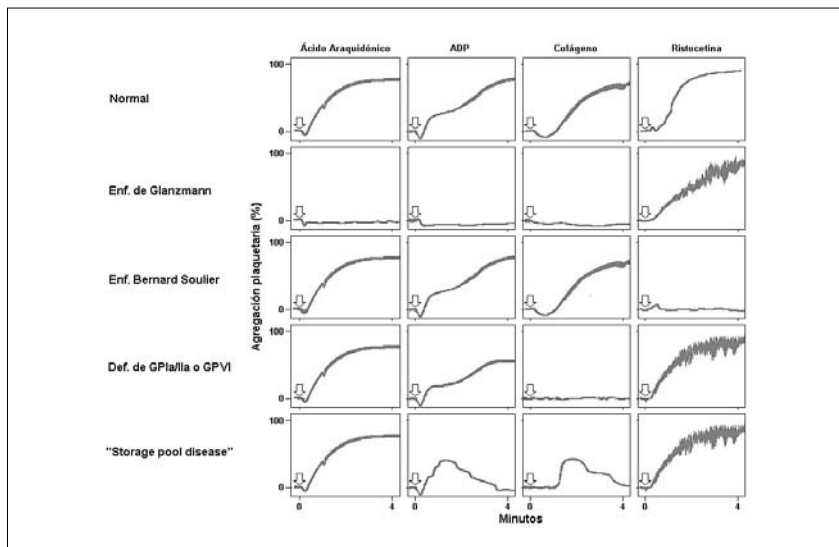


Figura 31-15. Registro obtenido en agregómetro de la agregación plaquetaria con tres agonistas (ADP, colágeno y ristocetina).

El empleo de un conjunto de agonistas permite tener una visión amplia del funcionamiento de los receptores más importantes, así como del funcionamiento interno de las plaquetas, estableciéndose las posibles causas de disfunción plaquetaria.

El **araquidonato de sodio** permite determinar si existe alguna alteración en las vías de señalización interna de la plaqueta, que termina

con la expresión de receptores para fibrinógeno y la expulsión del contenido granular.

Esta vía se ve fuertemente inhibida por el ácido acetilsalicílico, el cual actúa sobre la ciclooxigenasa, enzima encargada de transformar el ácido araquidónico en tromboxano A_2 , potente agregante plaquetario que difunde por la membrana y actúa sobre su receptor produciendo un efecto reverberante

en la activación plaquetaria.

La inhibición de la ciclooxigenasa provoca una incapacidad de la plaqueta de secretar su contenido granular y por lo tanto, inhibe el reclutamiento de nuevas plaquetas al agregado plaquetario.

El **ADP** es un agonista débil plaquetario que posee 3 tipos diferentes de receptores en las plaquetas (P2Y1, P2Y12, P2X1). Participa en conjunto con otros receptores como epinefrina. Su actividad está asociada a la fase de consolidación del tampón plaquetario y a un efecto de retroalimentación.

La activación de la plaqueta provoca una liberación de ADP de los depósitos internos lo que provoca una mayor activación plaquetaria.

El **colágeno** actúa sobre las plaquetas por unión a FVW que se une a su receptor plaquetario, la GPIIb-IX, lo que provocaría el fenómeno de adhesión plaquetaria. Además el colágeno posee otros receptores como GPIa-IIa, y GPVI, las cuales lo unen directamente provocando la activación plaquetaria.

La **ristocetina** se utiliza en el laboratorio para evaluar la función de FVW, actuando como un cofactor. La ristocetina permite que el FVW sea capaz de unirse a su receptor y produzca uniones entre plaquetas haciendo de puente entre una y otra, lo que se conoce como aglutinación plaquetaria.

5.2.4. Estudio de secreción plaquetaria

Este estudio consiste en cargar plaquetas con serotonina marcada con carbono (^{14}C). La serotonina es incorporada en la plaqueta por medio de difusión facilitada a través de transportadores y almacenada en los gránulos densos.

Una vez que la plaqueta es cargada con la serotonina, las plaquetas son estimuladas con diferentes agonistas y se registra la agregación plaquetaria en un agregómetro, según se describió en el punto 5.2.3. Posteriormente la alícuota de PRP se fija, se separan los agregados plaquetarios del plasma por centrifugación y se determina la cantidad de serotonina ^{14}C liberada al medio, mediante la medición de la radioactividad de ^{14}C con un contador de centelleo.

El estudio de secreción plaquetaria puede verse alterado por la ingesta de fármacos que inhiben la recaptación de serotonina como ocurre con algunos antidepresivos.

5.2.5. Estudio de glicoproteínas plaquetarias específicas

Como se indicó antes (punto 5.1.2.) un tipo de trombocitopatías hereditarias se explica por ausencia o disminución de glicoproteínas específicas plaquetarias: GPIIb-IIIa (Enfermedad de Glanzmann) y GPIb-IX (Enfermedad de Bernard Soulier). Si bien éstas se expresan en alteraciones en los patrones de los registros de agregación plaquetaria, la detección de la ausencia o disminución de la glicoproteína de membrana se realiza preferentemente por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (ver punto 4.2.1.b).

LECTURAS SUGERIDAS

Estudio de alteraciones de la coagulación

Bakhshi, S., Arya, L.S. "Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation". *Indian Pediatr.*; 40(8):721-30, 2003.

Barthels, M. "Diagnostic of blood coagulation". *Hamostaseologie*; 24(2):123-34, 2004.

Eckman, M.H., Erban, J.K., Singh, S.K., Kao, G.S. "Screening for the risk for bleeding or thrombosis". *Ann Intern Med.*; 138(3):W15-24, 2003.

Horstkotte, D., Piper, C. "Improvement of oral anticoagulation therapy by INR self-management". *J Heart Valve Dis.*; 13(3):335-8, 2004.

Mwanda, O.W. "Lupus anticoagulants: pathophysiology, clinical and laboratory associations: a review". *East Afr Med J.*; 80(11):564-8, 2003.

Rick, M.E., Walsh, C.E., Key, N.S. "Congenital bleeding disorders". *Hematology* 559-74, 2003.

Stepanian, A., Biron-Andreani, C. "Primary hemostasis exploration". *Ann Biol Clin (Paris)*; 59(6):725-35, 2001.

Estudio de la Enfermedad de von Willebrand

Budde, U., Drewke, E., Mainusch, K., Schneppenheim, R. "Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease". *Semin Thromb Hemost* 2002; 28(2): 173-189.

Ginsburg, D. "Molecular genetics of von Willebrand disease". *Thromb Haemost* 1999; 82(2): 585-591.

Ruan, C. "Molecular diagnosis of von willebrand disease". *Int J Hematol* 2002; 76: 145-148.

Sadler, J.E. "von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease". *Blood* 2003; 101:2089-93.

White, G., Montgomery, R. "Clinical aspect of and therapy for von Willebrand disease" In: **Hematology: Basic Principles and Practice**, Hoffman (ed.). Third edition. Editorial Churchill Livingstone 2000. pp 1946-1955.

Coagulómetros

Automation in Coagulation Testing. Journal of the IFCC. Coagulation update 1996: Vol.8 N° 3.

Guías Técnico-Methodológicas laboratorios Clínicos. Series Minsal 03 DISAP: 1998; Vol I: p. 23.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) H3-A3: Procedures for the collection of diagnostic blood specimen by venipuncture. Approved standard. Villanova PA. NCCLS. (ISBN 1-56238-108-3;1991).

Estudio de trombocitopenias inmunes

Amiral, J., Bridey, F., Drefus, M., Vissac, A.M., Fressinaud, E., Wolf, M., Meyer, D. "Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin induced thrombocytopenia". *Thromb Haemost*; 68:95-96, 1992.

Arepally, G., Reynolds, C., Tomaski, A., Amiral, J., Poncz, M., Cines, D.B. "Comparison of PF4/heparin ELISA assay with the 14C-serotonin release assay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia". *Am J Clin Pathol*; 104: 648-654, 1995.

Chong, B., Eisbacher, M. "Pathophysiology and laboratory testing of Heparin-Induced Thrombocytopenia". *Sem Hematol*; 35: 3-8, 1998.

Grinacher, A., Amiral, J., Dummel, V., Vissac., Kiefel, V., Muller-Eckhardt, C. "Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4 / heparin enzyme-linked immunosorbent assay". *Transfusion*; 34:381-385, 1994.

Hurd, C., Cavanagh, G., Schuh, A., Ouwehand, W., Metcalfe, P. "Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms". *Vox Sanguinis*. (83): 1-12, 2002.

Lee, R., Foerster, J., Lukeris, J., Paraskavas, F., Greer, J., Rodgers, G. **Wintrob's clinical hematology**. Tenth edition. Baltimore, USA. Ed. Lippincott. Chapter 61, 2001.

Osorio, G. **Hematología, diagnóstico y terapéutica**. Segunda edición. Santiago, Chile. Ed. Mediterráneo. Capítulo 32, 1997.

Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C. Rossemblatt, M., Vergara, U. **Fundamentos de inmunología básica y clínica**. Talca, Chile. Ed. Universidad de Talca. Capítulo 40, 2002.

Palomo, I., Pereira, J. **Fisiopatología de las citopenias inmunes**. Talca, Chile. Ed. Universidad de Talca. Capítulo 3, 1995.

Palomo, I., Pereira, J. **Métodos diagnósticos de las trombocitopenias inmunes**. Universidad de Talca, 1994.

Palomo, I., Pereira, J., Alarcón, M., Quiroga, G., Díaz, G., Vásquez, M., Mezzano, D. "Anticuerpos antiplaquetarios inducidos por heparina: prevalencia en pacientes portadores de Insuficiencia renal crónica en hemodiálisis". *Rev Chil Cancerología y Hematología*; 8:73-78,1998.

Quinley, E. **Immunohematology, principles and practice**. Second edition. Philadelphia, USA. Ed. Lippincott. Glosary, 1998.

Sell, S. **Immunology, immunopathology and immunity**. Fifth edition. Stanford, USA. Ed. Appleton & Lange. Chapter 12, 1996.

Stiene-Martin, E., Lotspeich-Steininger, D., Koepke, J. **Clinical hematology, principles, procedures, correlations**. Second edition. Philadelphia, USA. Ed. Lippincott. Chapter 57, 2000.

Visentin, G.P., Ford, S.E., Scott, J.P., Aster, R.H. "Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells". *J Clin Invest*; 93:81-88, 1994.

Warkentin, T.E. "Heparin-induced thrombocytopenia: a ten-year retrospective". *Annu Rev Med*; 50: 129-147, 1999.

Ziporen, L., Li, Z.Q., Park, K.S., Sabnekar, P., Liu, W.Y., Arepally, G., Shoenfeld, Y., Kieber-Emmons, T., Cines, D.B., Poncz, M. "Defining an antigenic epitope on platelet factor 4 associated with heparin-induced thrombocytopenia". *Blood*; 92:3250-3259, 1998.

Estudio de la función plaquetaria

Andrews, R.K., Berndt, M.C. "Platelet physiology and thrombosis". *Thromb Res*; 114(5-6): 447-53, 2004.

Mezzano, D., Pereira, J. **Fisiología de la Sangre**. Segunda edición. Editorial Universidad Católica, 2000.

Ofofu, F.A. "The blood platelet as a model for regulating blood coagulation on cell surfaces and its consequences". *Biochemistry (Mosc)*; 67(1):47-55, 2002.

Woulfe, D., Yang, J., Brass, L. "ADP and platelets: the end of the beginning". *J Clin Invest*; 107(12):1503-5, 2001.

ESTUDIO DE LABORATORIO DE LAS TROMBOFILIAS

Iván Palomo G., Ricardo Forastiero V., Silvia Pierangeli y Jaime Pereira G.

1. Introducción

2. Trombofilias hereditarias

- 2.1. Principios de la metodología aplicada al estudio de trombofilias
 - 2.1.1. Ensayos funcionales
 - 2.1.2. Ensayos inmunológicos
 - 2.1.3. Ensayos genéticos por PCR
- 2.2. Trombofilias hereditarias
 - 2.2.1. Antitrombina III
 - 2.2.2. Proteína C
 - 2.2.3. Proteína S
 - 2.2.4. Resistencia a la PC activada
 - 2.2.5. Factor V Leiden
 - 2.2.6. Polimorfismo G20210A del gen de la protrombina
 - 2.2.7. Homocisteína plasmática

3. Anticuerpos antifosfolípidos

- 3.1. Anticuerpos anticardiolipina
- 3.2. Anticoagulante lúpico
- 3.3. Otras pruebas de laboratorio

RESUMEN

Las trombosis, incluidas las enfermedades cardiovasculares (ECV), son una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad. Varios factores de riesgo de trombosis venosas (TV), o arteriales (TA) son conocidos; algunos son modificables, entre ellos los factores de riesgo clásicos asociados a TA como hipertensión arterial, diabetes, hipercolesterolemia, obesidad, tabaquismo y sedentarismo. También entre los factores de riesgo clásicos se encuentran los preferentemente asociados a TV (anticonceptivos orales, inmovilización y cáncer), y la edad que se asocia a ambos tipos de trombosis. Otro grupo de factores de riesgo de ECV son las **trombofilias**, tanto hereditarias (Ej. Deficiencia del Sistema de la Proteína C, Deficiencia de Antitrombina III, Factor V Leiden y Mutación de la Protrombina G20210A) como adquiridas (Ej. Anticuerpos antifosfolípidos).

Este capítulo revisa los principios fundamentales de los métodos de laboratorio, que permiten estudiar las trombofilias más importantes, tanto hereditarias como adquiridas.

1. INTRODUCCIÓN

La trombosis venosa o arterial es un fenómeno relativamente frecuente de observar, tanto en sujetos aparentemente sanos, como en otros que presentan factores de riesgo conocido. Un porcentaje importante de eventos trombóticos no son explicados por los factores de riesgo clásicos, a modo de ejemplo, para trombosis arterial: dislipidemias, hipertensión arterial, diabetes, tabaquismo; para trombosis venosa: postoperatorio, traumatismo, cáncer, embarazo, síndrome nefrótico; para ambos tipos de trombosis: edad, anticonceptivos orales, obesidad.

Se denomina **trombofilias** al estado de mayor propensión a trombosis, sin factores de riesgo conocido. Se conocen trombofilias hereditarias y adquiridas. Entre las primeras se han descrito varias pero sólo algunas están suficientemente reconocidas: Factor V Leiden, Mutación G20210A de la protrombina, Déficit de Antitrombina III, Déficit de Proteínas C y S, Hiperhomocisteinemia (ver capítulo 24). Entre las trombofilias adquiridas están los Anticuerpos antifosfolípidos que actúan por mecanismos inmuno mediados.

En este capítulo se describirán brevemente los métodos más usados para estudiar, tanto las trombofilias hereditarias como las adquiridas.

2. TROMBOFILIAS HEREDITARIAS

2.1. Principios de la metodología aplicada al estudio de trombofilias

2.1.1. Ensayos funcionales

Los métodos funcionales permiten evaluar la actividad de la proteína en estudio y están diseñados en base al mecanismo fisiológico de la hemostasia en la cual intervienen. Por este motivo son ensayos de primera línea en hemostasia.

Coagulantes: son técnicas en donde se determina la actividad de las proteínas que intervienen en las diferentes etapas de la hemostasia, usando la formación del coágulo de fibrina como punto final de la reacción.

Cromogénicos: están basados en la actividad enzimática de las proteínas al actuar sobre sustratos cromogénicos que son péptidos de 2 a 4 aminoácidos combinados con un cromóforo. Las proteasas (proteínas con actividad enzimática) causan la escisión del péptido y liberan el cromóforo (generalmente par-nitroanilina), generando cambios en la absorbancia a 405nm. Los cambios en la densidad óptica pueden ser evaluados durante los primeros minutos de la reacción (técnica cinética) o al término de un tiempo prefijado

(técnica de punto final). Los métodos pueden ser directos o indirectos. Los directos miden la actividad de la proteína en estudio al transformarla, por acción de activadores, en enzima que actuará directamente sobre el sustrato cromogénico y la concentración de para-nitroanilina liberada es proporcional a la cantidad de enzima o de proteína en estudio. Los indirectos se usan para los inhibidores fisiológicos y el fundamento base es incubar, por un determinado tiempo, al inhibidor en estudio con un exceso de la enzima que inhibe. Luego de la formación del complejo enzima-inhibidor se evalúa la cantidad de enzima residual y de esta manera la concentración de para-nitroanilina es inversamente proporcional a la concentración del inhibidor o proteína en estudio.

2.1.2. Ensayos inmunológicos

Son ampliamente usados para identificar y cuantificar las proteínas plasmáticas relacionadas al sistema hemostático. En el estudio de trombofilia son considerados de segunda línea y son recomendados utilizar solamente cuando la actividad funcional de la proteína está disminuida y se quiere discernir entre disminución de síntesis o síntesis de una proteína disfuncional.

Estas técnicas evalúan la interacción entre antígeno (proteína en estudio) y el anticuerpo que reconoce específicamente un determinante antigénico sobre la proteína. La formación de los complejos antígeno-anticuerpo se manifiesta, visiblemente, en la reacción como precipitación, floculación o aglutinación, o a través de marcadores que cuantifican al antígeno o al anticuerpo del complejo mediante enzimas, radioisótopos o compuestos luminiscentes. Entre los métodos más utilizados actualmente en los estudios de trombofilias se encuentran:

Inmunoturbidimétrico. Está basado en la utilización de micropartículas de látex sobre las cuales se fijan, por uniones no covalentes, anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína en estudio. Estas soluciones de micropartículas no absorben luz por tener un diámetro menor que la longitud de onda incidente (590nm). Al formarse los complejos entre el antígeno y los anticuerpos fijados a las partículas, aumenta la absorbancia de luz, la cual es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra en estudio. La concentración antigénica puede calcularse por

análisis de punto final, a partir de una curva de calibración o por métodos cinéticos.

Electroinmunodifusión (Laurell). El antígeno contenido en la muestra en estudio es colocado en pequeños círculos u orificios y se lo hace migrar por electroforesis en un medio de soporte (agar o acetato de celulosa) que contiene el antisuero o anticuerpo policlonal específico en exceso. En el punto de equivalencia (concentración óptima de antígeno-anticuerpo) se produce un pico de precipitación (“rocket”), cuya altura es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. La concentración se obtiene por comparación de las alturas de los picos obtenidos con una curva de referencia que debe colocarse en ambos extremos del soporte.

Enzimoimmunoanálisis (EIA). Utiliza una enzima como marcador de la interacción primaria entre el antígeno y el anticuerpo. Las enzimas más usadas son la fosfatasa alcalina (sustrato cromogénico: para-nitro-fenilfosfato a 405nm) y la peroxidasa (sustratos cromogénicos: orto-fenilendiamina a 492 nm o tetrametilbenzidina a 450nm). En los EIA no competitivos se cuantifica el antígeno y el reactivo contiene el mismo antígeno, pero acoplado químicamente a la enzima marcadora. Se fija el anticuerpo sobre una fase sólida (placa de poliestireno) y se agregan simultáneamente la muestra y el reactivo para que compitan por unirse al anticuerpo de la placa. Luego de lavar las placas para eliminar los antígenos no unidos, la intensidad del color desarrollado será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra. Entre los EIA no competitivos, el ELISA es el más usado en hemostasia. Se utilizan microplacas recubiertas con antígeno (para medir anticuerpos) o con anticuerpos (para medir antígenos). Luego de incubar las muestras a dosar, se lavan las proteínas no unidas a la placa y se detectan los complejos con antisueros específicos unidos a la enzima (segundo anticuerpo). La intensidad del color desarrollado será directamente proporcional a la concentración de antígeno o de anticuerpo en la muestra analizada.

2.1.3. Ensayos genéticos por PCR

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite generar, in vitro, millones de copias de material genético a partir de una secuencia específica de DNA. La técnica se basa en la repetición secuencial de los siguientes pasos: 1) desnaturalización o

separación de las dos hebras de DNA por acción del calor (a 91-96°C durante 1-2 min), 2) hibridización de los partidores (“primers”) específicos a la zona molde de interés (a 37-68°C durante 1-2 min) y 3) elongación de los partidores por acción de la enzima Taq polimerasa (a 72°C durante 1-2 min). Los partidores forman parte de las nuevas hebras de DNA y la Taq polimerasa sintetiza la hebra complementaria dando como producto final de la reacción la generación de DNA de doble cadena conteniendo la secuencia de interés. Repitiendo el proceso por varios ciclos (25-40) se generarán múltiples copias de la secuencia genética que interesa estudiar. Es un método simple, sensible y específico, pero se necesita conocer la secuencia que interesa amplificar al seleccionar los primers y las condiciones del ensayo.

Luego de la amplificación de la secuencia genética se utilizan diferentes métodos para evaluar las mutaciones o polimorfismos genéticos, pero aquí sólo mencionaremos los dos más usados:

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. Está basado en usar enzimas aisladas de bacterias que reconocen una determinada secuencia de 4 a 8 nucleótidos y producen un corte en la doble cadena de DNA. Si existe una mutación (cambio de una sola base nucleotídica) que genera o destruye un sitio específico para una enzima de restricción, podemos estudiar la presencia de estas mutaciones por la longitud de los fragmentos obtenidos al digerir el DNA generado por la PCR con las enzimas de restricción.

PCR-alelo específica. Se basa en la utilización de partidores específicos para el alelo normal y para el alelo mutado, aprovechando la incapacidad de la taq polimerasa para amplificar el DNA cuando existe no complementariedad a nivel del extremo 3'. Se realiza una reacción de PCR con los partidores normales y otra con los mutados y se determina el estado normal, heterocigoto u homocigoto mutado en base a la amplificación obtenida.

2.2. Trombofilias hereditarias

2.2.1. Antitrombina III (ATIII)

Métodos funcionales. El más utilizado es un ensayo cromogénico indirecto en presencia de heparina (cofactor de la actividad de ATIII). Se basa en la capacidad de la ATIII de inhibir las

enzimas trombina o factor Xa en presencia de heparina en el medio de reacción. Luego se cuantifica la cantidad de trombina o factor Xa residual mediante el sustrato cromogénico específico para trombina o factor Xa. La técnica más recomendada es aquella que evalúa la inhibición de factor Xa, porque ofrece la ventaja de ser más específica para ATIII. El ensayo con trombina tiene la desventaja que puede sobreestimar los resultados como consecuencia de la presencia en el plasma del cofactor II de heparina, que también inhibe trombina.

Métodos inmunológicos. Se utilizan el de Laurell y el inmunoturbidimétrico. La ventaja de este último es su rapidez (menos de 60 minutos) y reproducibilidad cuando se utilizan equipos comerciales.

El rango de referencia es de 80-120%, tanto para su actividad funcional como concentración antigénica. Los niveles disminuidos de ATIII se pueden hallar en deficiencias congénitas del inhibidor, pero también en hepatopatías, coagulación intravascular diseminada, síndrome nefrótico, pacientes quemados, tratamiento con heparina no fraccionada, tratamientos hormonales y tratamiento con L-asparaginasa. Siempre se realiza la determinación por métodos funcionales y la concentración antigénica se evalúa solamente en casos de valores funcionales disminuidos para categorizar la deficiencia como del tipo I o II.

2.2.2. Proteína C (PC)

Métodos funcionales. El ensayo cromogénico directo utiliza un activador específico de la PC derivado del veneno de la víbora “Agkistrodon contortrix” y la cantidad de enzima producida se determina por su acción sobre el sustrato cromogénico específico para PC activada. El ensayo coagulante se basa en la prolongación del TTPA causado por la inactivación de los factores V y VIII activados por acción de la PC presente en el plasma en estudio y que es activada previamente por acción de venenos de víbora específicos. Por su mayor reproducibilidad el método de preferencia es el cromogénico.

Métodos inmunológicos. Se utilizan el de Laurell y el ELISA. La ventaja de este último es su mayor rapidez y reproducibilidad cuando se utilizan equipos comerciales.

El rango de referencia en adultos es de 65-130%, tanto para su actividad funcional como

concentración antigénica y es independiente del sexo y la edad. Los neonatos tienen valores disminuidos de PC (<30%) por la inmadurez hepática, llegando a los valores del adulto alrededor de los 10 años de edad. Los niveles disminuidos de PC se presentan en deficiencias congénitas de la proteína y más frecuentemente por causas adquiridas. Entre ellas están las alteraciones hepáticas, coagulación intravascular diseminada, tratamiento con anticoagulantes orales y déficit nutricional de vitamina K. La determinación de elección es mediante métodos funcionales y la concentración antigénica solamente en casos de valores funcionales disminuidos para categorizar la deficiencia como del tipo I o II.

2.2.3. Proteína S

Métodos funcionales. El ensayo coagulante se basa en la determinación de la actividad de la proteína (PS), actuando como cofactor de la PC activada, en la inhibición del factor Va. En un medio en exceso de PC activada y factor Va, la inhibición de éste y por lo tanto la prolongación del TTPA, dependerá de la cantidad de PS libre, presente en el plasma en estudio. Este ensayo es insensible a niveles de heparina en sangre inferiores a 1 U/ml, pero concentraciones mayores pueden producir sobreestimación de la tasa de PS.

Métodos inmunológicos. Los más usados son Laurell, inmunturbidimetría y ELISA. En el caso del ensayo de Laurell y de inmunturbidimetría se debe hacer un tratamiento previo de las muestras con polietilenglicol con el objetivo de separar la fracción libre de PS de aquella unida al C4bBP. Luego se realiza el ensayo elegido con la muestra sin tratar para dosar PS total y con la muestra tratada para cuantificar PS libre. Existen actualmente equipos comerciales para PS libre que utilizan las técnicas de ELISA o de inmunturbidimetría en muestras de plasmas sin tratar. En estos métodos nuevos se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos específicos de la PS libre. La ventaja de estos últimos es su mayor rapidez y reproducibilidad y además que eliminan los pasos de pretratamiento de las muestras que son difíciles de estandarizar.

El rango de referencia en adultos del sexo masculino es de 60-130% y en mujeres de 50-120%. La actividad funcional y la concentración antigénica es, por lo tanto, dependiente del sexo y aumenta con la edad en mujeres. Desde el nacimiento hasta los 10 años, los niveles de PS

se encuentran disminuidos en un 30-50% respecto a los valores del adulto. Los niveles disminuidos de PS se presentan en deficiencias congénitas de la proteína y también por causas adquiridas. Entre ellas están las enfermedades hepáticas, coagulación intravascular diseminada, tratamiento con anticoagulantes orales, déficit nutricional de vitamina K, tratamientos hormonales, embarazo y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos. Los métodos de elección son el funcional coagulante y/o los inmunológicos, que miden directamente la concentración de PS libre.

2.2.4. Resistencia a la PC activada

Técnica original. El ensayo funcional coagulante para pesquisar la resistencia en la PC activada (APCR) se basa en la determinación del TTPA en el plasma problema en presencia o ausencia de PC activada. El principio de la técnica es la prolongación del TTPA en el ensayo realizado en presencia de PC activada como resultado de la degradación de los factores V y VIII activados. Los resultados se expresan en forma de razón entre los tiempos en segundos del TTPA con PC activada respecto al TTPA basal sin PC activada.

Técnicas modificadas. Existen varios métodos que surgieron luego del original. El más usado es aquel que utiliza el mismo principio del ensayo original pero las muestras son prediluidas en un plasma deficiente en factor V. De esta manera el ensayo se hace más específico para la evaluación del fenotipo del FVL. Los resultados se expresan como se mencionó en la técnica original. Otra de las técnicas modificadas es aquella que utiliza la respuesta al añadido de PC activada, pero se mide el grado de prolongación del tiempo de coagulación inducido por el veneno de la víbora Russell en vez de la cefalina del TTPA. En otro método se evalúa la respuesta a la PC activada pero activando el plasma con reactivo diluido de tromboplastina (reactivo base del tiempo de protrombina). Existe además un método cromogénico que evalúa el grado de inactivación del factor VIII promovido por la PC activada. El método más nuevo es uno que evalúa el grado de inactivación del factor Va en muestras de plasmas prediluidas en plasma deficiente en factor V y usando como activador de la PC al veneno de la víbora "Agkistrodon contortrix".

Se considera APCR anormal cuando las razones de tiempos del TTPA con el ensayo original o el

modificado son menores de 2. Sin embargo cada laboratorio debe establecer su propio punto de corte, ya que el mismo depende del reactivo y del instrumento de detección (coagulómetro) utilizado. En el caso de usar el método modificado con activador de PC (víbora "Agkistrodon contortrix") se considera anormal cuando el resultado del test de coagulación es menor de 120 segundos. El ensayo original da resultados alterados en pacientes con FVL pero también ante muchas causas adquiridas. Entre ellas están los anticuerpos antifosfolípidos, niveles disminuidos de PS, niveles aumentados de factor VIII, embarazo, ingesta de anticonceptivos orales, tratamiento con anticoagulantes orales o heparina y presencia de inhibidores específicos de factores de la coagulación. Con el método de TTPA modificado o con el que usa al activador de PC (víbora "Agkistrodon contortrix") se elimina la interferencia de la mayoría de las causas de una APCR adquirida. De esta manera estos dos últimos ensayos son más sensibles y específicos para la detección de pacientes portadores del FVL. Sin embargo, los pacientes con anticuerpos antifosfolípidos pueden presentar una APCR alterada aún usando estos métodos modificados.

2.2.5. Factor V Leiden

El Factor V Leiden (FVL) se origina como consecuencia de una mutación puntual en el exón 10 del gen del factor V donde se sustituye una guanina (G) en la posición 1691 por una adenina (A). Como resultado de la sustitución nucleotídica la proteína del factor V presenta una glutamina en la posición 506, donde normalmente existe el aminoácido arginina.

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. El método por PCR realiza la amplificación de un fragmento genómico de 267 pares de bases (pb) que incluye el nucleótido 1691. Luego se realiza la digestión del DNA amplificado con la enzima de restricción Mnl I y se evalúan los fragmentos generados por electroforesis en gel de agarosa.

La figura 32-1 muestra el patrón de bandas obtenido con el método de PCR seguido de digestión con enzima de restricción. El individuo normal que no tiene FVL presenta 3 bandas (163pb-67pb-37pb), el heterocigoto de la mutación 4 bandas (200pb-163pb-67pb-37pb) y el homocigoto para el FVL dos bandas (200pb-67pb).

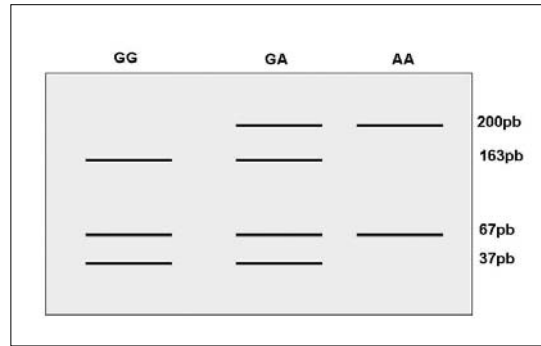


Figura 32-1. Esquema de las bandas observadas en el método con enzima de restricción para FVLeiden.

2.2.6. Polimorfismo G20210A del gen de la protrombina

El gen completo de la protrombina presenta 14 exones, 13 intrones, una región 5' no traducida y una región 3' no traducida. El polimorfismo G20210A del gen de la protrombina (PT-G20210A) se asocia con niveles aumentados de protrombina y resulta de una variante genética en la región 3' no traducida donde una G es sustituida por una A en la posición 20210 del gen.

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. En este método se realiza la amplificación de un fragmento genómico de 345pb que incluye al nucleótido 20210. Luego se realiza la digestión del DNA amplificado con la enzima de restricción Hind III y se evalúan los fragmentos generados por electroforesis en gel de agarosa.

PCR alelo específica. Se realizan dos PCR para cada muestra. En la PCR-1 uno de los partidores presenta en el final de su cadena el alelo A y en la PCR-2 uno de los partidores lleva el alelo G al final de la secuencia.

La figura 32-2 muestra el patrón de bandas obtenido con los dos métodos de PCR más utilizados. En el ensayo con enzima de restricción, el individuo normal PT-20210GG presenta 1 única banda de 345pb, el heterocigoto PT-20210GA muestra 2 bandas (345pb-322pb) y el homocigoto PT-20210AA 1 sola banda de 322pb. En el método alelo específico el patrón de bandas es el siguiente: homocigota normal PT-20210GG (1 fragmento de 270pb en la PCR-1 y 2 fragmentos de 270pb y 148pb en la PCR-2), heterocigota PT-20210GA (2 fragmentos de 270pb y 148pb en ambas PCR-

1 y PCR-2) y homocigota alterado PT-20210AA (2 fragmentos de 270pb y 148pb en la PCR-1 y 1 fragmento de 270pb en la PCR-2).

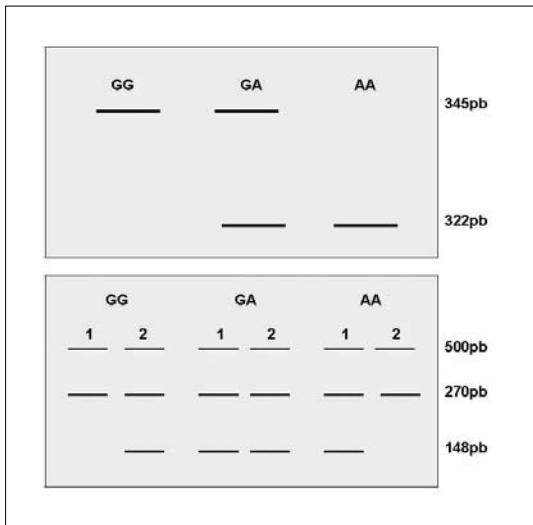


Figura 32-2. Esquema de las bandas observadas en el estudio del gen de la protrombina por el método de PCR con enzima de restricción (arriba) o con el ensayo de PCR alelo-específico (abajo).

2.2.7. Homocisteína plasmática

Se han desarrollado varios métodos para el análisis cuantitativo de la homocisteína plasmática Hcy presente en plasma, suero u orina. Entre ellos se encuentran ensayos radioenzimáticos, cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masa, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia, ultravioleta o electroquímica y los inmunoensayos. Con la excepción de este último grupo de técnicas (inmunoensayos), todos los demás son métodos que se caracterizan por ser procesos muy laboriosos y por requerir instrumentos de muy alto costo. Por este motivo se mencionarán aquí solamente los inmunoensayos que poseen alta precisión, excelente correlación con el método de referencia de HPLC y un uso más difundido en los laboratorios de hemostasia.

Inmunoensayos. La primera etapa en estas técnicas consiste en reducir la Hcy total de la muestra y convertirla enzimáticamente a S-adenosil-homocisteína (SAH). Posteriormente se realiza un ensayo de EIA competitivo entre la SAH de la muestra y la SAH unida a la placa de poliestireno en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-SAH. La concentración de Hcy en la muestra en estudio es inversamente

proporcional al color desarrollado. Existe también un inmunoensayo de fluorescencia polarizada (FPIA) que tiene el mismo principio que el EIA.

Los niveles normales de Hcy deben definirse en poblaciones sanas y con nivel vitamínico óptimo. El rango normal más aceptado es de 5-15 μM . Se debe tener en cuenta que los niveles de Hcy aumentan con la edad y es mayor en hombres que en mujeres (antes de la menopausia). La concentración de Hcy es influenciada por diversos factores adquiridos y congénitos. Las causas adquiridas de aumento de Hcy en plasma pueden ser deficiencias de folatos y de vitaminas B₁₂ y B₆; consumo excesivo de alcohol, café y cigarrillo; falla renal, hipotiroidismo, psoriasis, neoplasias, enfermedades gastrointestinales y tratamientos con metotrexate, fenitoína, teofilina, niacina e isoniazida. Las causas genéticas se relacionan a polimorfismos moleculares en las enzimas involucradas en el metabolismo de la Hcy (metilentetrahidrofolato reductasa y cistationina β -sintetasa).

3. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

Los anticuerpos antifosfolípidos (aFLs) son un grupo heterogéneo de anticuerpos que se presentan en el Síndrome Antifosfolípido (SAF) primario y secundario; en este último caso principalmente asociados a enfermedades del tejido conectivo, como Lupus eritematoso sistémico. También se han descrito en infecciones y asociados al uso de ciertos fármacos (ver capítulo 24).

El diagnóstico de SAF se establece cuando el paciente presenta junto a alguna de las manifestaciones clínicas propias del síndrome (trombosis venosa o arterial, abortos espontáneos a repetición, o trombocitopenia), anticuerpos anticardiolipina (aCL) en título de moderado a alto y/o una prueba positiva para Anticoagulante lúpico (AL), al menos en dos ocasiones separadas por alrededor de un mes y medio a dos meses.

Los aFLs clínicamente más importantes son los aCL y AL. Más recientemente se ha incorporado el estudio de ensayos más específicos como el ELISA para anti- $\beta_2\text{GPI}$ y anti-protrombina (aPT). Los aCL, anti- $\beta_2\text{GPI}$ y aPT pueden ser de clase IgG, IgM e IgA, teniendo mayor significación clínica los dos primeros. La pesquisa de aCL, anti- $\beta_2\text{GPI}$ y aPT se realiza por ELISA y el AL

por pruebas de coagulación.

A continuación se describirán los principales métodos para pesquisar los aFLs. Los aFLs se pueden detectar mediante ensayos de fase sólida (aCL) o por medio de pruebas de coagulación que detectan la prolongación de reacciones de la coagulación en las que los fosfolípidos aniónicos actúan como catalizadores, y que no pueden ser corregidas con plasma normal (AL).

3.1. Anticuerpos anticardiolipina

Los aCL fueron identificados por primera vez en la década de los ochenta. En 1990 tres grupos independientes describieron que la unión de los aCL a su antígeno depende de un cofactor plasmático, que fue identificado como la β 2-glicoproteína (β_2 GPI). La dependencia β_2 GPI permite distinguir dos subpoblaciones de aCL: los dependientes del cofactor, que se asocian a manifestaciones clínicas del SAF y los no dependientes de β_2 GPI, que se asocian a infecciones. Se ha establecido que los anticuerpos dependientes del β_2 GPI no reconocen la molécula cardiolipina, sino que están dirigidos contra un neopéptido que aparece en la molécula β_2 GPI cuando ésta se une a la cardiolipina. Aproximadamente 20-30% de los pacientes que presentan aCL sufren trombosis; si el análisis se limita a los pacientes portadores de Lupus eritematoso sistémico (LES) que presentan aCL, el porcentaje aumenta aproximadamente a un 40%

En clínica hay dos formas de pesquisar los aFLs: ELISA para aCL y actividad AL, existiendo una concordancia parcial entre ambos métodos. Inicialmente la detección de aCL se realizó por radioinmunoensayo (RIA). Actualmente se determina por una técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) fase sólida. El antígeno que se emplea para la detección es la cardiolipina, la que se fija a los pocillos de las microplacas. Es necesario que la β_2 GPI esté presente en el medio mientras se realiza el ensayo. Ésta se aporta mediante la adición de suero bovino adulto o fetal. Sin describir los procesos de lavado del ELISA aCL, básicamente tiene las siguientes etapas: Unión de CL a la microplaca (etapa no requerida en los "kits"), bloqueo con solución que contenga suero bovino, incubación con suero en estudio (además de calibradores), incubación con segundo anticuerpo (anti-IgG, -IgM, -IgA humana) conjugado con enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa), incubación con el sustrato

que corresponda y lectura de la absorbancia en un lector de microplacas (figura 32-3). La concentración se expresa en unidades internacionales: GPL (IgG), MPL (IgM) e APL (IgA).

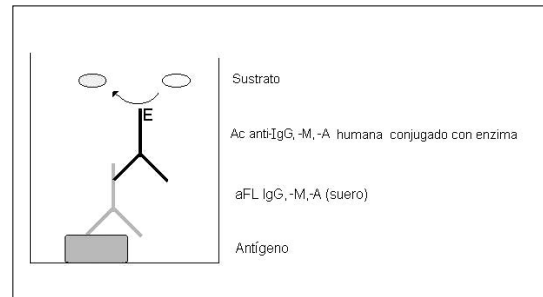


Figura 32-3. Estructura básica de ELISAs para pesquisa de anticuerpos antifosfolípidos.

Los aCL también pueden determinarse por citometría de flujo. En este ensayo se emplean partículas de poliestireno recubiertas de fosfolípidos. Estas partículas se incuban con el suero en estudio y los anticuerpos se revelan con un anticuerpo anti-Ig humana marcado con un fluorocromo, que luego es leído en un citómetro de flujo.

Como se indicó antes, los anticuerpos aCL constituyen un criterio de laboratorio para el diagnóstico del síndrome. Se requiere que el título de los anticuerpos (preferentemente IgG e IgM) sea medio (>40-80 GPL o MPL, según se trate de IgG o IgM, respectivamente) o alto (>80 GPL o MPL) y que las determinaciones se encuentren positivas en dos ocasiones con una separación entre ellas de, por lo menos, seis semanas.

3.2. Anticoagulante lúpico

Inicialmente se observó prolongación de las pruebas de la coagulación que no se corregían con la adición de plasma normal. A comienzo de la década de los setenta se introdujo el término Anticoagulante lúpico (AL) debido a la frecuente asociación de estos anticoagulantes circulantes con el Lupus eritematoso sistémico.

El principio general de las pruebas que permiten pesquisar actividad AL, es la prolongación del tiempo de coagulación en pruebas dependientes de fosfolípidos. Los anticuerpos con actividad AL constituyen un grupo heterogéneo de anticuerpos (IgG e IgM) cuya acción depende, fundamentalmente, de la

inhibición del llamado complejo protrombinasa, constituido por el factor X activado, el factor V activado y los fosfolípidos aniónicos en presencia de calcio. A través de la interferencia con el complejo protrombinasa, el AL inhibe la conversión de la protrombina en trombina, por la acción de dicho complejo, por lo que se prolongan las pruebas de coagulación.

Al igual que los aCL, para el diagnóstico de SAF, se requiere la identificación de AL en, por lo menos, 2 ocasiones con una separación entre ellas de, al menos, 6 semanas.

El AL se identifica mediante pruebas de coagulación. Para su identificación de requiere: (a) evidenciar la prolongación de al menos una prueba de coagulación dependiente de fosfolípidos, (b) que la prolongación observada en (a) no se corrija por la adición de plasma normal y (c) que se confirme la naturaleza dependiente de fosfolípidos del inhibidor con una prueba específica.

a) Prolongación de prueba de coagulación dependiente de fosfolípidos. En esta etapa se pueden emplear diversas pruebas como Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA), Tiempo de Protrombina diluida (TPd), Tiempo de coagulación con Caolín (KCT), test de Veneno de Víbora de Russell diluido (dRVVT), tiempo de textarin y tiempo de veneno de Taipan. Se recomienda usar dos pruebas de distinta fase (Ej. vía intrínseca: KCT y vía extrínseca: TPd).

b) Identificación del inhibidor. Si alguna de las pruebas descritas en el punto anterior está prolongada, se debe proceder a realizar las pruebas de mezclas. Para ello se repite la misma prueba que daba resultados prolongados y se mezcla el plasma del paciente con plasma normal. Si la adición del plasma normal no corrige el resultado, indica la presencia de un inhibidor plasmático.

c) Confirmación. La ausencia de corrección del tiempo de coagulación en la etapa anterior puede deberse a la presencia de un inhibidor específico de un factor de la coagulación o a AL. Para confirmar la presencia de AL el plasma en estudio se mezcla con fosfolípidos procedentes de lisado plaquetario o sintéticos, en exceso. Luego se repite la prueba de coagulación que se presentó prolongada. La adición de fosfolípidos debe corregir la

alteración de la prueba de coagulación, si el plasma tiene AL.

Varios estudios han mostrado que el AL es más específico para SAF que los aCL.

3.3. Otras pruebas de laboratorio

a) Anticuerpos anti- β_2 GPI

La β_2 GPI es la principal proteína blanco de los aFLs clínicamente importantes. Es una glicoproteína de aproximadamente 50 kDa, que presenta 5 dominios.

Estudios que han utilizado β_2 GPI como antígeno, particularmente cuando está unidas a placas de poliestireno oxidadas, han demostrado que el ensayo es más específico que aCL para la detección de anticuerpos presentes en pacientes con SAF. Brevemente; el suero en estudio y controles se incuban en las placas irradiadas cubiertas con β_2 GPI. Después de lavar la placa se agrega e incuba el segundo anticuerpo anti-IgG (-IgM, -IgA) conjugado con una enzima, generalmente fosfatasa alcalina. Finalmente, después de lavar la microplaca se incuba con el sustrato adecuado, en el caso de la enzima mencionada se utiliza par-nitrofenilfosfato de sodio (PNPP) (figura 32-3). Luego, en un lector de microplacas, se lee la absorbancia que es proporcional a la concentración de anticuerpos anti- β_2 GPI. Actualmente la concentración se expresa en unidades SGU (IgG) y SMU (IgM).

b) Anticuerpos anti-Protrombina

Otra de las proteínas blanco descritas para los aFLs es la protrombina. Su importancia clínica no está tan estudiada como ocurre con los ELISA aCL y anti- β_2 GPI. Esto se debe, fundamentalmente, al hecho que el método no está suficientemente estandarizado. Básicamente, el ELISA tiene la estructura del método descrito para anti- β_2 GPI, pero utilizando protrombina como proteína que se une a la microplaca en lugar de β_2 GPI (figura 32-3).

No está suficientemente claro si la positividad de las diferentes pruebas de laboratorio se relaciona con la ocurrencia de eventos trombóticos. Sin embargo, se han propuesto como factores de riesgo de trombosis los siguientes hallazgos: (a) pesquisar AL, (b) detectar aCL IgG de título alto y dependiente

de β_2 GPI, (c) la coexistencia de aCL y AL y (d) que los aFLs se mantengan en el tiempo.

LECTURAS SUGERIDAS

Trombofilias hereditarias

Amiral, J., Grosley, M., Boyer-Neumann, C., Marfaing-Koka, A., Peynaud-Debayle, E., Wolf, M., Meyer, D. "New direct assay of free protein S antigen using distinct monoclonal antibodies specific for the free form". *Blood Coag Fibrinolysis*; 5: 179-186, 1994.

Bertina, R.M., Koeleman, B.P.C., Koster, T., Rosendaal, F.R., Dirven, R.J., de Ronde, H., van der Velden, P.A., Reitsma, P.H. "Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C". *Nature*; 369: 64-67, 1994.

De Stefano, V., Rossi, E., Paciaroni, K., Leone, G. "Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications". *Haematologica*; 87: 1095-1108, 2002.

Iglesias Varela, M.L., Adamczuk, Y.P., Forastiero, R.R., Martinuzzo, M.E., Cerrato, G.S., Pombo, P., Carreras, L.O. "Major and potential prothrombotic genotypes in a cohort of patients with venous thromboembolism". *Thromb Res*; 104: 317-324, 2001.

Kordich, L., Blanco, A., Cerrato, G., Quintana, I., Vazquez, A., Vizcargüenaga, M.I. (eds.), **Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia**. Editorial Grupo CAHT, Argentina 2003.

Poort, S.W., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H., Bertina, R.M. "A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis". *Blood*; 88: 3698-3703, 1996.

Quintana, I., Freeman, D., Galarza, C., Murúa, A., Spence, J.D., Kordich, L. "Validation of an enzyme immunoassay for the determination of total homocysteine in plasma". *Blood Coag Fibrinolysis*; 11: 235-238, 2000.

Ueland, P.M., Refsum, H., Stabler, S., Malinow, M.R., Andersson, A., Allen, R.H. "Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications". *Clin Chem*; 39: 1764-1779, 1993.

Anticuerpos antifosfolípidos

Arvieux, J., Darnige, L., Reber, G., Bensa, J., Colomb, M. "Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants". *Thromb Haemost*; 74: 1120-1125, 1995.

Brandt, J.T., Barna, L.K., Triplett, D.A. "Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants / Antiphospholipid Antibodies of the ISTH". *Thromb Haemost*; 74: 1597-1603, 1995.

Exner, T. "Diagnostic methodologies for circulating anticoagulants". *Thromb Haemost*; 74: 338-344, 1995.

Harris, E.N., Gharavi, A.E., Boey, M.L., Patel, B.M., Mackworth-Young, C.G., Loizou, S., Hughes, G.R. "Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus". *Lancet*; 2: 1211-1214, 1983.

Harris, E., Pierangeli, S., Birch, D. "Anticardiolipin wet workshop report". *Am J Clin Pathol* 1994;101: 616-124.

Harris, E.N., Pierangeli, S.S. "A more specific ELISA assay for the detection of antiphospholipid". *Clin Immunol Newsletter*; 15: 26-28, 1995.

Martinuzzo, M., Forastiero, R.R., Carreras, L.O. "Anti-b glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis". *Br J Haematol*; 89: 397-402, 1995.

Palomo, I., Pereira, J., Alarcón, M., Vásquez, M. "Anticuerpos asociados a trombosis". *Rev Chil Cancerol Hematol*; 10: 69-78, 2000.

Palomo, I., Cabral, A., Pierangeli, S., Forastiero, R. "Síndrome Antifosfolípido" En: **Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica**. Palomo G., I., Ferreira V., A., Sepúlveda C., C., Roseblatt S., M., Vergara C., U. (eds.) Capítulo 25. Editorial Universidad de Talca, 2002.

Palomo, I., Pereira, J., Alarcón, M., Larrain, A.M., Pinochet, C., Vasquez, M., Velez, M.T., Leon, M., Espinola, R., Pierangeli, S. "Antiphospholipid antibodies in Chilean patients with systemic lupus erythematosus". *J Lab Clin Med*; 140: 336-341, 2002.

Palomo, I., Pereira, J. "Anticuerpos antifosfolípidos. β 2-Glicoproteína I, su principal proteína blanco". *Rev Chil Tecnol Méd*; 17: 790-796, 1988.

Pierangeli, S., Stewart, M., Silva, L.K., Harris, E.N. "Report of an anticardiolipin wet workshop during the VIIth International Symposium on antiphospholipid antibodies". *J Rheumatol*; 25: 156-162, 1998.

Pierangeli, S.S., Gharavi, A.E., Harris, E.N. "Testing for antiphospholipid antibodies: problems and solutions". *Clin Obstet Gynecol*; 44: 48-57, 2001.

Pierangeli, S.S., Silvia, L.K., Harris, E.N. "A flow cytometric assay for the detection of antiphospholipid antibodies". *Am Clin Lab*; 18:18-19, 1999.

Reverter, J.C., Taséis, D., Espinoza, G. "Determinación de los Anticuerpos antifosfolípidos" En: **Lupus Eritematoso sistémico**. Font, J., Khamashta, M., Vilardell, M. (eds). Capítulo XXIV. Editorial mra ediciones, 2002.

Roubey, R. "Immunology of the antiphospholipid syndrome: Antibodies, antigens, and autoimmune response". *Thromb Haemost*; 82: 656-661, 1999.

ÍNDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS

A

- Acenocumarol 637
- Ácido
 - fólico 170
 - gammacarboxiglutámico 498
 - tranexámico 571
- Aclorhidria 167
- Actividad cofactor ristocetina (FvW CoRis) 754
- Adenopatía 336, 339
- Aglutinación de las plaquetas inducidas por ristocetina (APIR) 755
- Agregación plaquetaria 761
- Alfa talasemias 201
- Alotrasplante 407
- Alteraciones
 - citogenéticas 720
 - de la quimiotaxis 289
- Amiloidosis 382
- Anemia
 - aplástica (AA) 115
 - de Blackfan Diamond 129
 - de enfermedad crónica 151
 - de Fanconi 126
 - ferropriva 141
 - hemolítica 175
 - extra corpuscular 213
 - autoinmune 221
 - por aglutininas frías 223
 - intra corpuscular 181
 - Enzimopatías 188
 - Globinopatías 194
 - Membranopatías 181
 - megaloblástica 161
- Clasificación 111
 - hipocromas 111
 - normocíticas 111
 - macrocíticas 111
- Anillos de Cabot 163
- Anticoagulante lúpico 774
- Anticoagulantes orales 635
- Antifibrinolíticos 571
- Aplasia medular 115
- Aspirina 628
- Antitrombina-III 507
- Autotrasplante 407

B

- Betatalasemia 197
- Binet e International 336
- Biopsia de médula ósea 655

C

- Células
 - de Langerhans 445
 - de Reed Sternberg 340
 - troncales 9, 406, 418
- Citometría de flujo 732
- Citoquímica 718
- Coagulación intravascular diseminada 586
- Crioprecipitado 569, 577
- Crisis blástica 324
- Cuerpos
 - de Heinz 193
 - de Howell-Jolly 163

D

- Deficiencia
 - de ATIII 603
 - de G₆PD 191
 - de proteína C 604
 - de vitamina B₁₂ 165
 - de piruvatoquinasa 189
 - de factor VIII 565
- Dímero D 591
- Disgranulopoyesis 393
- Dismegacariocitopoyesis 393
- Displasia eritrocítica 393

E

- Enfermedad
 - de Hodgkin 340
 - de injerto contra huésped (EICH) 410
 - de von Willebrand 571
 - de Waldenström 382
 - granulomatosa crónica 290
 - residual mínima 726
- Eritropoyetina 60

Eritropoyesis ineficaz 163
Esferocitosis hereditaria 182
Esplenectomía 524

F

Factor

estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) 54
estimulador de colonias de granulocitos (GM-CSF) 54
intrínseco (FI) 163
tisular (FT) 501
von Willebrand (FVW) 502, 753
VIII coagulante 565, 754
IX 565

Fagocitosis 260
Ferremia 143
Ferritina sérica 143, 696
Fibrinógeno 504
Fibrinopéptidos A y B 504
Folato sérico 698
Fosfatasa alcalinas de los granulocitos (FAG) 326

G

Gammapatía monoclonal 372
Gen PML «promyelocytic leukemia» 312
Glicoproteína
IIb-IIIa 463
Ib-IX 465
Glóbulo rojo 82
Granulocitos 258
basófilos 258
eosinófilos 264
neutrófilos 258
Granulopoyesis 58
Gránulos primarios 259
Gránulos secundarios

H

Haptoglobina 178
Hemartrosis 568
Hematomas 566
Hemofilia
A 565
B 565
Hemoglobina 88
Hemoglobinopatías 194
Hemoglobinuria paroxística nocturna 186
Hemograma 664
Hemólisis
extravascular 177
intravascular 178

Hemorragia 238
Hemostasia 460
Heparina 632
Hiperhomocistinemia 620, 773
Histiocitosis 443

I

Inhibidores naturales de la coagulación 507
Inmunodeficiencia 294
INR «International Normalized Ratio» 643

J

K

Kalicleína 498
Kininógeno de Alto Peso Molecular 498

L

Leucemia
aguda (LA) 299
linfática o linfoblástica (LLA) 300
Mieloblástica (LMA) 310
linfática crónica (LLC) 334
mieloide crónica (LMC) 323

Leucocitos
defectos cuantitativos 276
deficiencias cualitativas 288

Linfocitosis reactiva 285
Linfoma
de Hodgkin 340
no Hodgkin 348, 366

M

Macrocitosis 163, 667
Macroglobulinemia de Waldenström 382
Médula ósea 6, 689
Megaloblastosis 163
Mielograma 655, 680
Mieloma múltiple 376
Mieloperoxidasas 719
Mononucleosis infecciosa 287

N

NADPH oxidasa 264
Neutrófilos hiper o polisegmentados 697

Neutropenia
aloimmune 280
autoimmune 280
cíclica 281

O

P

PAIgG 756
PCR (reacción de polimerasa en cadena) 727
Plaquetas 462
Plasma fresco congelado 569
Plasmaféresis 382
Plasmina 512
Policitemia vera 325
Productos de degradación de fibrinógeno y fibrina (PDF) 512, 590
Proteínas de Bence Jones 382
Protoporfirina libre eritrocitaria 143, 693
Prueba
de antiglobulina humana directa 218, 710
de Schilling 698
Púrpura trombocitopénica
autoimmune 521, 522
trombótica (PTT) 528

Q

Quimioterapia 306, 318
Quimiotaxis 260

R

Remisión 306, 318

S

Sideroblastos en anillo 152
Síndrome
antifosfolípido 610
hemolítico 176
urémico 588
mielodisplásticos (SMD) 389

T

Tiempo
de tromboplastina parcial activa (TTPA) 748

de protrombina (TP) 746
de sangría 761
de trombina (TT) 748
Tinción
de esterasas 719
de mieloperoxidasa 719
Tinciones citoquímicas 718
Translocación
9;22 323
15;17 312
Trasplante de progenitores
hematopoyéticos 405, 417
Trombocitopatía 531
Trombocitopenia 516
Trombofilia 601

U

Unidades formadoras de colonias (CFU's) 54

V

Valores normales 659
Vasopresina (DDAVP) 571
Vitamina
B₁₂ (VB₁₂) 163
K 499
Volumen corpuscular medio 665

W

Waldenström 382
Warfarina 637, 638

X

Y

Z

Z, proteína 510

Este libro se terminó de imprimir en
Impresora Gutenberg ® Talca, en una tirada de
500 ejemplares en Abril de 2005.