



MEDICINA
TRANSFUSIONAL
PERINATAL

DR. JORGE DECARO



MEDICINA TRANSFUSIONAL
PERINATAL

DR. JORGE DECARO

Dedicado:

- *A todas las mujeres e hijos.*
- *A todas las que aún no lo son.*
- *A las 530.000 mujeres que fallecen anualmente por causas obstetricas. Se estima que en el mundo mueren por año 140.000 mujeres, una cada cuatro minutos, por causa de hemorragias relacionadas a la gestación.*

ÍNDICE

Introducción	Pág. 9
Cap. 1 Medicina transfusional perinatal.....	Pág. 13
Cap. 2 Transfusión de glóbulos rojos	Pág. 29
Cap. 3 Policitemia e hiperviscosidad sanguínea.....	Pág. 49
Cap. 4 Enfermedad Hemolítica Perinatal	
4.1 Introducción	Pág. 55
4.2 Fisiopatología.....	Pág. 63
4.3 Diagnóstico prenatal	Pág. 79
4.4 Tratamiento prenatal	Pág. 107
4.5 Diagnóstico y tratamiento postnatal.....	Pág. 117
Cap. 5 Prevención de la inmunización anti-D	
5.1 Lo que ya fue	Pág. 131
5.2 Inmunoprofilaxis	Pág. 139
5.3 Lo que vendrá.....	Pág. 160
Cap. 6 Trombocitopenias inmunes neonatales	Pág. 167
Cap. 7 Síndromes hemorragíparos neonatales	Pág. 173
Cap. 8 Transfusión de leucocitos.....	Pág. 197
Cap. 9 Riesgo de transmisión de agentes infecciosos por la transfusión de hemocomponentes: ¿Son seguras las transfusiones perinatales?.....	Pág. 207
Cap. 10 Síndromes hemorragíparos de la gestación, parto y puerperio.....	Pág. 231
Cap. 11 Transplante de células de cordón umbilical.....	Pág. 257

INTRODUCCIÓN

“Cuando yo trabajo en investigar y descubrir lo que la naturaleza encierra no siento ni frío ni calor, ni hambre ni sueño”.

Prof. Dr. Roberto Caldeyro Barcia.

Los rápidos y profundos cambios científicos tecnológicos en el área de la salud, los cambios demográficos y epidemiológicos, el aumento de las demandas de la población, la modificación de los roles de los médicos en los actuales sistemas asistenciales, entre otros cambios, hace imprescindible la formación continua de todos los integrantes del equipo de salud, en especial de los médicos. La educación médica curricular de grado y postgrado, no garantiza la competencia en forma indefinida. Considerando la responsabilidad y los riesgos intrínsecos del trabajo médico, son necesarios mecanismos que aseguren al usuario la competencia de los profesionales y una mejor calidad asistencial.

Esta publicación, **la Medicina Transfusional Perinatal**, tiene como objetivo primordial la docencia para estudiantes de grado, médicos de postgrado y para la tercera etapa, la más larga del aprendizaje profesional, la educación médica continua que se define como la educación en el trabajo, por el trabajo y para el trabajo en los servicios y cuya finalidad es mejorar la salud de la población sobretodo para médicos con multiempleos y alejados de los centros docentes. Por ello, en esta obra se ha priorizado la discusión temática aplicada a la medicina clínica recopilando la mayor experiencia nacional e internacional, seleccionando la abundante bibliografía y discutiendo casos clínicos reales que ocurrieron tanto en instituciones públicas como privadas de Montevideo o el interior del país, no con fines críticos a los profesionales que actuaron sino por su alto contenido docente. No queremos con esta publicación enseñar medicina sino aprender a razonar en medicina para aplicar correctos diagnósticos clínicos y tratamientos basados en la fisiopatología de la enfermedad con medicina basada en evidencia. En este mecanismo de razonamiento no debemos saltar etapas fundamentales como la historia clínica y el examen físico herramientas primordiales para el encare diagnóstico. Solicitar la paraclínica para confirmar el diagnóstico clínico positivo o los posibles diagnósticos diferenciales. Estamos observando en nuestra práctica profesional y docente una inversión en las prioridades diagnósticas donde se solicitan cada vez más estudios paraclínicos aun antes de realizar una correcta historia clínica o tocar al paciente. Se etiquetan patologías a pacientes por los resultados de estudios de laboratorio pero sin clínica no teniéndose en cuenta los errores preanalíticos, analíticos o postanalíticos que pueden ocurrir. A su vez cuando existe un diagnóstico clínico bien establecido se solicita un trata-

miento que no tiene justificación fisiopatológica lo cual demuestra el desconocimiento de la patología a tratar. Por ejemplo, hemos recibido varios pedidos de administrar inmunoglobulina anti-D al recién nacido (RN) para el tratamiento de la Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP) cuando este tipo de inmunoglobulina se inyecta a la púerpera RhD negativa para evitar la inmunización anti-D. La inmunoglobulina que se utiliza en el RN para el tratamiento de la EHP es la polivalente de uso intravenoso. Por el contrario, ante la duda, se toman decisiones apresuradas en lugar de establecer la consulta especializada. Por ejemplo cuando el RN tiene una prueba de Coombs directa positiva no se indica la inmunoprofilaxis anti-D a pesar de que esto no es contraindicación para no hacerla. El médico debe aprender a trabajar en un equipo multidisciplinario para el beneficio del paciente. Se debe priorizar la consulta personalizada de manera que el médico tratante presente la historia clínica al médico consultante y el objetivo de la consulta. Actualmente se solicitan consultas sin datos clínicos, el médico consultante debe revisar sólo toda la historia clínica a veces con letra ilegible y contestar también por escrito, sin intercambio de ideas, lo que a su juicio fue el motivo de consulta. Al día siguiente probablemente el médico tratante encuentre en la historia clínica una recomendación diagnóstica y/o terapéutica para la cual el no solicitó la consulta.

He tratado de introducir en esta obra mi modesta experiencia clínica desarrollada durante 35 años de trabajo en una Unidad de Perinatología pública y la experiencia docente, de investigación y de extensión universitaria en la Cátedra de Medicina Transfusional desde el año 1978. Además hemos tratado de aportar conceptos incorporados a través del amplio intercambio científico logrado al integrar equipos de trabajo, a lo largo de todos estos años, con integrantes de las Cátedras de Obstetricia y Ginecología, los Servicios de Neonatología y del Centro Latinoamericano de Perinatología (CLAP). A su vez en los últimos 13 años hemos logrado una experiencia clínica y científica importante que también tratamos de incorporar en esta obra, al integrar el equipo multidisciplinario de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de la Asociación Española, tanto en pacientes adultos como pediátricos y con más de 400 procedimientos realizados.

Pero, como dijo John Lennon “la vida es eso que pasa mientras se hacen planes” desde la Cátedra de Medicina Transfusional estamos desarrollando dos proyectos multidisciplinarios e interinstitucionales que están directamente vinculados con el desarrollo futuro de la Medicina Transfusional Perinatal. En primer lugar, junto con el Departamento Básico de Medicina, el Instituto de Donación y Trasplante (INDT) y a otros servicios clínicos hemos presentado un proyecto para la creación de una Unidad de Terapia Celular en el Hospital de Clínicas con el objetivo de realizar medicina regenerativa utilizando como fuente células madres adultas obtenidas de médula ósea, sangre periférica o cordón umbilical. Dicho proyecto fue acepta-

do para su desarrollo por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República y contamos con el asesoramiento internacional del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona.

En segundo lugar, se ha presentado un proyecto entre la Cátedra de Medicina Transfusional, el Servicio de Hemoterapia del Hospital Pereira Rossell y el Instituto Pasteur de Montevideo para desarrollar una unidad de biología molecular para su aplicación en inmunohematología (determinación del antígeno D de células fetales en plasma materno) y en coagulopatías congénitas como la hemofilia el cual se encuentra en estudio por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Pero como dijo Octavio Paz “una sociedad se define no sólo por su actitud hacia el futuro sino ante el pasado, sus recuerdos no son menos reveladores que sus proyectos”. Por ello, hemos tratado de recopilar los avances y esfuerzos más importantes en el desarrollo de la Medicina Transfusional Perinatal en el Uruguay, sobre todo para las nuevas generaciones que no han vivido dichos acontecimientos de una manera directa.

No hemos encontrado a nivel nacional ni Latinoamericano una publicación en idioma español que reúna a todas las disciplinas que intervienen en la Medicina Transfusional Perinatal a pesar que nuestro país ha sido uno de los pioneros en el desarrollo de esta especialidad.

Dentro de las alteraciones de la hemostasis, nos referimos en esta publicación, a los síndromes hemorrágicos tanto de la gestación, parto y puerperio como a los que se producen en el período neonatal. Sin embargo, no nos hemos detenido, de ex profeso, en desarrollar temas de trombosis como los estadios trombofílicos, congénitos o adquiridos, que se pueden producir por la gestación o en el neonato dado que, estos son tratados en una reciente publicación editada por la Dra. Ana María Otero titulada “Hemostasis y Trombosis” segunda edición Latinoamericana 2006/2007, y que como dice la editora, tiene muchos autores que pertenecen, en su mayoría, al Grupo Latinoamericano de Hemostasis y Trombosis (GLAHT). Por tanto, no nos pareció correcto duplicar esfuerzos y conocimientos que por otra parte están muy bien explicitados en los distintos capítulos de dicha publicación y que nos han servido de referencia bibliográfica.

“Nunca dejes de leer, actualiza tus conocimientos y razonamientos, camina junto al tiempo, no te detengas.”

Prof. Dr. Jorge Decaro

CAPÍTULO 1 - MEDICINA TRANSFUSIONAL PERINATAL

La medicina perinatal o del binomio materno-fetal se ocupa, por definición, de lo que se encuentra “alrededor del nacimiento”, es decir, embarazo, parto, puerperio y lactancia.

En nuestro país y en América Latina hubieron dos pioneros de la medicina perinatal: el Prof Dr. Roberto Caldeyro Barcia y el Prof Dr. Hermógenes Alvarez quienes en 1947 comenzaron a medir la presión intruterina lo cual trajo como consecuencia el desarrollo del monitoreo fetal electrónico y avances en la fisiología del trabajo de parto (1). Este método, original en el mundo, les permitió analizar y definir en forma cuantitativa la exacta contractilidad uterina durante el embarazo y el parto, la intensidad y frecuencia de las contracciones, el tono y la actividad uterina. Esta última se mide en “unidades Montevideo”. El empleo de este método se fue extendiendo y actualmente se emplea en todo el mundo.

En 1958 el Profesor Caldeyro Barcia presentó y publicó en el III Congreso Latinoamericano de Obstetricia y Ginecología, realizado en México, un trabajo titulado “Estudio de la hipoxia fetal mediante el registro continuo de la frecuencia cardíaca fetal”. Este método, también original, demostró ser de gran utilidad para diagnosticar precozmente la asfixia fetal durante el parto. A partir de este trabajo se definieron los descensos de la frecuencia cardíaca fetal por debajo de la línea de base denominados desaceleraciones, DIPS o bradicardias siendo los DIPS I precoces y los DIPS II tardíos. A partir de esta fecha el Dr. Caldeyro Barcia y sus colaboradores utilizaron los dos métodos simultáneamente: el registro de la presión intrauterina y la frecuencia cardíaca fetal pudiendo documentar así el efecto de cada contracción uterina sobre el feto. Este método es la base de la tecnología denominada actualmente “cardiotocografía” o monitoreo fetal que hoy se emplea mundialmente para evaluar la salud o enfermedad del feto durante el embarazo.

En 1970 la Universidad de la República (UDELAR) junto con el Ministerio de salud Pública (MSP) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) fundan en Montevideo-Uruguay, el Centro Latinoamericano de Perinatología (CLAP) que se instala en el piso 16 del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” siendo el primer Centro de Perinatología con tal título que se creó en el mundo y donde han recibido entrenamiento una gran cantidad de becarios de todos los países de Latinoamérica.

La medicina transfusional es una medicina también clínica, es decir atenta a la correcta asistencia no empírica, ni institucional ni transcrita, sino basada en un conocimiento profundo, tanto teórico como práctico, como praxis de la cuestión a tratar.

El 12 de noviembre de 1942 se inaugura el primer Banco de Sangre del

país que se denomina Central de Sangre y Plasma. Comienza a funcionar en el Instituto de Patología de la Facultad de Medicina siendo sus fundadores los Dres. Dinor Invernizzi, Raul Canzani y Silio Yanicelli. En 1947, la Central de Sangre y Plasma realizó un curso de Hemoterapia el cual fue auspiciado por la Comisión del Interior de la Facultad de Medicina cuyo presidente era el Prof. Domingo Prat. El objetivo era divulgar y enseñar el conocimiento de los adelantos de la hemoterapia y la plasmoterapia en forma teórico-práctica principalmente para médicos y técnicos del interior del país ya que la Central de Sangre y Plasma había colaborado en todo lo que pudo en instalar los servicios de transfusiones en Salto, Trinidad, San José así como el que se deseaba realizar por esa fecha en Melo. Los temas tratados fueron publicados en un libro “Curso de Hemoterapia” publicado en marzo de 1947 por la imprenta Rosgal de Montevideo.

El primer capítulo sobre los sistemas de grupos sanguíneos ABO, MN y P fue escrito por el Dr. Hector Mazzela nuestro querido profesor de Fisiología cuando ingresamos a la Facultad de Medicina en 1970. El Prof. Roberto Caldeyro Barcia escribe dos capítulos de este libro, uno sobre las soluciones anticoagulantes y otro sobre la conservación del plasma. El Dr. Euclides Peluffo Prof. Agregado de Pediatría relata el capítulo sobre Eritroblastosis Perinatales término que sugiere sustituir por el de Enfermedad Hemolítica Congénita (EHC). Describe las formas clínicas y establece que en varias oportunidades han realizado recambios parciales de sangre del niño de 40 o 50 cc, una o dos veces por día, durante varios días según la gravedad del cuadro clínico. El Dr. Silio Yanicelli es autor del capítulo sobre la Isoinmunización materna por factores Rh-Hr y ABO en las eritroblastosis perinatales donde describe las características, constitución, genética, nomenclatura y aplicación del factor Rh descubierto por Landsteiner y Wiener siete años antes en 1940. A su vez, establece el mecanismo fisiopatológico de la EHC basado en los conceptos de Levine y Stetsson sobre la inmunización materna causada por antígenos fetales y ausentes en ella. En lo esencial establece que la fisiopatología de la EHC involucra un problema de inmunología clínica. Se plantean como tratamientos neonatales las transfusiones de sangre Rh negativas o las exsanguinotransfusiones parciales o totales. Como medidas preventivas se propone evitar las transfusiones en mujeres en edad procreativa e incluso en niñas y en el sentido de eliminar las aglutininas residuales antes del nuevo embarazo se ensayan sangrías terapéuticas.

Por último, el Dr. Ramón Guerra, Prof. Agregado de Pediatría escribe el capítulo sobre Hemo y Plasmoterapia en el Lactante (sangre y sus derivados principales) estableciendo cuando, que, cuanto y como se debe transfundir.

En 1952 se resuelve integrar la Central de Sangre y Plasma al Hospital de Clínicas siendo el primer servicio médico del hospital. Un año después, con el ingreso de los primeros pacientes a la Clínica Semiológica del piso 8 del Prof. Pablo Purriel pasa a denominarse Servicio de Transfusio-

nes ocupando la planta física donde funciona actualmente, la Cátedra de Hemoterapia primero y de Medicina Transfusional después, a partir de su creación en 1978.

Hasta ahora, una de las más apasionantes historias en medicina perinatal es la Enfermedad Hemolítica Perinatal producida por el antígeno D del sistema Rh.

Desde su primera descripción clínica en el año 1609 en la prensa de París (2) muchas generaciones de médicos se vieron enfrentados a una de las más misteriosas y devastadoras enfermedades que era la responsable de una de las cinco más frecuentes causas de muerte perinatal. Durante años fue imposible realizar un diagnóstico y un tratamiento adecuado y la consecuencia eran niños severamente afectados o muertos. Ambas condiciones clínicas, el hidrops y el kernicterus, no fueron asociadas hasta que en 1932 Diamond llega a la conclusión de que constituyen diferentes aspectos de una misma patología: una severa hemólisis que desarrolla focos de eritropoyesis extramedular y libera a la sangre células nucleadas inmaduras de la serie roja (Erythroblastosis Fetalis) (3). Pero, hasta ese momento no se tenía idea de la causa de esta hemólisis fetal.

En 1938, Ruth Darrow, patóloga de Chicago, quien tuvo un recién nacido que fallece luego por kernicterus, establece la teoría que la causa de la hemólisis fetal se debe a anticuerpos maternos que cruzan la placenta produciendo la destrucción de los eritrocitos fetales (4). Si bien Darrow describe correctamente la fisiopatología de hemólisis fetal piensa erróneamente que el antígeno causante de la respuesta inmune materna es la hemoglobina.

El descubrimiento del sistema Rh en 1940 por Landsteiner y Wiener sirve de base para que en 1941 Levine establezca que el antígeno D es el factor patogénico de la enfermedad hemolítica fetal (5). En 1945, el veterinario Robert Coombs junto con los Dres Arthur Mourant y Rob Race describen el método para la detección de anticuerpos “incompletos” luego denominado test de Coombs (6).

Antes de 1945, el 50% de todos los fetos con enfermedad hemolítica fallecían por hidrops o kernicterus (7). Con la introducción de la exsanguinotransfusión por Wallerstein (8) se erradicó el kernicterus y se redujo la mortalidad perinatal al 25%. Luego, el estudio de la espectrofotometría del líquido amniótico y la realización de la primera transfusión intrauterina por William Liley en Nueva Zelandia en 1963, la inducción del parto prematuro, la cordocentesis y la transfusión fetal intravascular disminuyeron la mortalidad perinatal al 2,3% en equipos de trabajo expertos en esta patología .

En nuestro país, en 1981, un grupo de médicos del Hospital de Clínicas y del CLAP, bajo el asesoramiento e impulso del Prof Caldeyro Barcia, decidieron realizar una monografía sobre la “Enfermedad Hemolítica Perinatal por Aloinmunización anti-Rh (D). La cual recibió el premio “El País” otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay en 1982.

Mediante este premio se logró la publicación del libro y su distribución en forma gratuita (9).

Este mismo grupo de médicos, decidió que además de lograr la difusión de los conocimientos de la Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP) debía pautar el seguimiento de esta patología tanto en el período prenatal como postnatal, para lo cual se propusieron las “Normas de Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la EHP por conflicto Rh (D) a las que se les otorgó el primer premio de la Asociación Médica del Uruguay en 1982. Luego fueron adoptadas como normas nacionales por el MSP (10).

También en 1982, en el Hospital de Clínicas, se presenta el primer caso en el Uruguay de un recién nacido vivo, obtenido por cesárea a las 32 semanas de gestación, luego de que se le practicaran a la madre, durante la gestación, procedimientos de recambios plasmáticos intensivos mediante un separador celular con el fin de disminuir los anticuerpos anti-D maternos y por consiguiente la hemólisis fetal (9).

En 1984, Junto con el Prof. Caldeyro Barcia presentamos un trabajo sobre la “Incidencia de individuos Rh (D) negativos en algunas poblaciones del Uruguay” (11) el cual demostró que el porcentaje de gestantes Rh negativas en nuestro país es del 12%.

En 1994, realizamos por primera vez, la administración de altas dosis de inmunoglobulina polivalente en los vasos umbilicales del feto mediante cordocentesis lo cual fue publicado en el Journal of Perinatal Medicine (12) y constituyó una prioridad mundial. Cinco años más tarde, en 1999, autores austríacos publican en la revista Transfusión de la American Association of Blood Bank (AABB) 13 casos de infusión de inmunoglobulina en el cordón umbilical de fetos afectados por EHP (13). Tecnología que aún se realiza en el momento actual con buenos resultados.

En el Uruguay, muchos médicos se interesaron por la EHP y de algunos aspectos en particular como el Prof. Daniel Fonseca quien se preocupó por el seguimiento de los niños con hiperbilirrubinemia al nacer para establecer déficits neurosensoriales como la sordera y la lesión cerebral mínima que se traduce por trastornos de adecuación motora. Ya en el año 1971 establecía que “un valor aislado de bilirrubina puede no tener o no tiene valor absoluto. En cambio un valor comparado, sabiendo exactamente las horas que pasan entre una toma y otra, eso si tiene gran valor” (45), incremento horario que hasta el día de hoy seguimos aplicando y recomendando en nuestra práctica clínica.

El Dr. Obes Polleri desarrolló el método de la fototerapia quien lo presentó en New York en 1964. Hoy en todo el mundo manejan la fototerapia en forma rutinaria para el tratamiento de la hiperbilirrubinemia neonatal.

En el año 2003, veinte años después de la primera publicación nacional sobre EHP, decidimos realizar una revisión bibliográfica no sólo de la EHP producida por el anti-D del sistema Rh sino también sobre el resto de los antígenos eritrocitarios que pueden producirla. Los objetivos de esa publi-

cación (14), que también igual que en 1982 se distribuyó en forma gratuita, fueron por un lado cambiar el esquema de diagnóstico y seguimiento inmunohematológico de la gestación y por otro lado, aplicar la nueva tecnología en la prevención, diagnóstico y tratamiento de esta patología perinatal.

La finalidad, como aprendimos en 1982, fue que se elaboraran por un equipo multidisciplinario de expertos pautas de prevención, diagnóstico y tratamiento.

Así, en el año 2005, se publica en los Archivos de Ginecología y Obstetricia (15) el consenso sobre esta patología el cual fue presentado al Programa Prioritario de Salud y Género del MSP para su aprobación como normas nacionales.

La mayoría de las enfermedades hematológicas que se adquieren “in útero” se prolonga su incidencia hasta después del nacimiento por lo cual el campo de la hematología es uno de los cuales la Perinatología adquiere gran valor.

El fin es proveer la mejor atención perinatal posible de forma multidisciplinaria, integrada, de alta calidad y actualizada. La medicina fetal procura realizar una rápida y precisa evaluación diagnóstica a fin de evaluar las posibles conductas y seleccionar las mejores alternativas para los intereses de la madre y el niño al nacer.

El desarrollo de la medicina perinatal necesita además de científicos y profesionales perinatales, de especialistas para la asistencia primaria y de profesionales de otras disciplinas lo cual mejorará el cuidado obstétrico y llevará a lograr mejores resultados perinatales en las poblaciones latinoamericanas (1).

El día 4 de marzo de 1908 se realizó en un hospital de New York la primera transfusión de sangre a un recién nacido, una niña de 3660 g que había nacido de padres sanos (16).

Al nacer, salvo la marca del forceps en su mejilla, aparecía sana. A las 12 horas de vida desarrolló un hematoma de lengua y esa tarde comenzó con fiebre de 39 grados C. Ella lucía pálida, con desasosiego y lloraba continuamente. Un hematoma subcutáneo detrás del oído izquierdo fue hallado, el cual se extendió hacia el cuello en las siguientes 36 horas. Tuvo luego una deposición oscura de meconio con sangre. Se le diagnosticó infección intestinal la cual fue tratada con aceite de castor y lactato de calcio. Su condición clínica empeoró durante los próximos tres días y al cuarto estaba desahuciada. Tenía un sangrado nasal continuo. Su piel era de un color blanco cera, las mucosas hipocoloreadas y el pulso débil. En ese momento, era claro que la niña necesitaba una transfusión de sangre pero nunca antes se había realizado en un recién nacido. Los médicos tratantes consideraron realizarle una “transfusión directa” y le preguntaron al padre si quería ser el donante. El estuvo de acuerdo y el cirujano francés Alexis Carrel realizó una anastomosis entre la arterial radial del padre y la vena poplítea del

recién nacido. Ni el padre ni la hija recibieron anestesia. No se establece la cantidad de sangre infundida pero una cantidad “suficiente” para que el color del RN cambiara de la palidez al rojo brillante y llorara vigorosamente. Luego, cuando ella estuvo exhausta durmió plácidamente. Una semana más tarde se le otorgó el alta y a los dos meses ella se encontraba con buen estado de salud.

Sobre esta historia es difícil realizar un diagnóstico retrospectivo pero el diagnóstico más probable sería la “enfermedad hemorrágica del recién nacido” que puede explicar la completa recuperación mediante la transfusión de sangre directa. Esta patología hemorrágica se produce por un descenso de los factores de la coagulación vitamina K dependientes.

No figura en el trabajo original que se haya realizado la determinación de los grupos sanguíneos o pruebas cruzadas de compatibilidad a pesar de que en 1900 el bacteriólogo austriaco Karl Landsteiner había descubierto los grupos A, B y C (luego llamado 0). En 1912 el Dr. Alexis Carrel recibe el Premio Nobel de Medicina por sus investigaciones pioneras en la cirugía vascular. En 1930 Landsteiner recibe también el Premio Nobel por el descubrimiento de los primeros grupos sanguíneos humanos.

En 1923, Sidbury trata con éxito un shock hipovolémico y un síndrome hemorrágico en un recién nacido mediante la realización de una transfusión con sangre del padre a través de la vena umbilical y determina que la sangre total actúa como un tratamiento específico de la enfermedad hemorrágica del recién nacido (32). Así, hasta 1940 el tratamiento estándar o la profilaxis de esta patología se realizaba mediante la administración intramuscular de sangre adulta generalmente obtenida del padre. Dado que esta medida se realizó antes del descubrimiento del factor RhD muchas niñas se inmunizaron y presentaron EHP en sus gestaciones.

En 1929, Henrik Dam en Dinamarca descubrió que los pollos alimentados sin grasas en la dieta desarrollaban una enfermedad hemorrágica que corregía administrando un extracto lipídico de alfalfa. Luego, se aisló y caracterizó el compuesto activo, la filoquinona, que se conoció como la vitamina de la coagulación. Debido a que el término en danés se escribe con k (koagulations vitamin) se denominó, como hoy se conoce, vitamina K (33)(34).

Por su parte, Edward Doisy de USA, demostró que además de las plantas verdes numerosas bacterias sintetizaban vitamina K (35). A ambos investigadores se les concedió el premio Nobel en 1941 por el descubrimiento de esta vitamina liposoluble.

La naturaleza hemorrágica de la deficiencia de la vitamina K fue localizada en una alteración del complejo protrombina lo cual explicaba la enfermedad hemorrágica neonatal que se producía en recién nacidos normales (36) (37), sobretudo alimentados a pecho dado que la leche materna contiene muy poca vitamina K comparada con la leche de vaca.

En 1937, Waddel y colaboradores demostraron que la enfermedad hemo-

rrágica del recién nacido podía prevenirse con la administración de vitamina K (38)

La síntesis de esta vitamina se logró por Almquist y Close en 1939 (39) y su uso profiláctico rutinario en recién nacidos fue recomendada por la Academia Americana de Pediatría (AAP) en 1961 (40).

Actualmente, el síndrome hemorrágico del recién nacido por deficiencia de vitamina K ha desaparecido con la administración de vitamina K al nacer. Algunos casos pueden ocurrir en recién nacidos alimentados con leche materna que no recibieron la profilaxis al nacer o que la madre haya recibido fármacos como la difenilhidantoína o la rifampicina durante la gestación que interfieren con la acción de la vitamina K (41)(42).

Tanto la “enfermedad hemolítica perinatal” como la “enfermedad hemorrágica del recién nacido” son entonces, dos historias que muestran claramente los progresos de la medicina desde el reconocimiento del cuadro clínico y su descripción, la definición del mecanismo patogénico hasta el tratamiento y la prevención

Un gran número de enfermedades, entre ellas las hematológicas, se producen durante la gestación y se extienden al feto y recién nacido. A su vez, muchas de las patologías crónicas del adulto tienen la raíz en la infancia. Es decir en el período neonatal se gestan las bases para una mejor o peor salud futura. Por ello, el “gasto precoz” en prevención perinatal se amortiza con creces ya que la estadística establece un ahorro sanitario del 400% a lo largo de la vida del individuo. Aunque muchos países cuentan con sistemas de salud perinatales excelentes, otros tienen sistemas que están mucho menos desarrollados. En muchos casos la causa es la falta de fondos económicos. Algunos países tienen la necesidad de compartir la información y experiencia para mejorar el cuidado perinatal. Con este fin la Asociación Mundial de Medicina Perinatal (World Association of Perinatal Medicine -WAPM) sirve como una organización de países alrededor del mundo. El compromiso es de todos los que trabajamos en salud y del resto de la sociedad. Para cerrar este concepto nada mejor que la frase del presidente de la Asociación Española de Neonatología : “la forma que una sociedad trata a sus individuos más vulnerables refleja la medida y nivel de los estándares humanos de esa sociedad”. En nuestro país, en 1985 se crea la Cátedra de Neonatología siendo el Dr. José Luis Peña el primer profesor de la misma. Junto a él, realizamos en el Uruguay las primeras transfusiones de leucocitos en recién nacidos con sepsis bacteriana.

En los últimos años, han adquirido gran desarrollo en la medicina perinatal disciplinas como la genética, la biología molecular y la biotecnología.

En 1983 publicamos el primer estudio en Uruguay de asesoramiento genético para mujeres portadoras de hemofilia A (17). En el 2008 se realizó un estudio molecular de una familia de portadoras sintomáticas de hemofilia B de San Gregorio de Polanco en la Academia Nacional de Medicina de

Buenos Aires “Instituto Mariano Castex” por ser el laboratorio de referencia regional para la Federación Mundial de Hemofilia (WFH). Se halló una mutación c.835G-A asociada al cambio missense p.233Ala-Thr del factor IX por la técnica de polymerase Chain reaction (PCR-CSGE).

Mediante muestras obtenidas de vellosidad coriónica o amniocentesis y más recientemente de sangre materna se puede determinar el fenotipo RhD fetal lo cual tiene dos aplicaciones fundamentales. Primero, gestantes no inmunizadas Rh negativas con fetos D negativos no deben recibir inmunoprofilaxis prenatal o postnatal. En un trabajo científico reciente se determinó que aproximadamente un tercio de las gestantes RhD negativas no inmunizadas tienen un feto RhD negativo por lo cual sería innecesaria la administración de inmunoglobulina anti-D prenatal (27). Segundo, mujeres Rh negativas aloinmunizadas con anti-D con fetos D negativos no desarrollarán EHP con lo cual se evitaría la realización de métodos invasivos de diagnóstico y tratamiento fetal (18).

La Cátedra de Medicina Transfusional, conjuntamente con el servicio de Hemoterapia del Hospital Pereira Rosell han desarrollado un proyecto de una Unidad Docente Asociada (UDA) para la creación de una unidad de biología molecular para su aplicación precisamente en coagulopatías congénitas e inmunohematología. En una primera etapa, se trabajará en forma asociada con el Instituto Pasteur de Montevideo.

Los adelantos más sobresalientes en el seguimiento de la EHP en los últimos años han sido el desarrollo de dos métodos no invasivos para la determinación de probable afectación fetal: uno, la determinación del fenotipo fetal RhD por PCR en tiempo real a partir de muestras de plasma materno y otro, la determinación de la anemia fetal por la medición de la velocidad del flujo sanguíneo mediante Doppler de la arteria cerebral media (28).

Como ya vimos a principios del siglo XX se descubrieron los grupos sanguíneos por la técnica de aglutinación, en 1945 el suero antiglobulina humano (Coombs) y en 1975 los anticuerpos monoclonales todos los cuales se siguen utilizando actualmente para el fenotipaje de los distintos sistemas de grupo sanguíneo. Sin embargo, los comienzos del siglo XXI han catapultado a la biología molecular con el desarrollo de técnicas basadas en los ácidos nucleicos. Actualmente se está utilizando en la Comunidad Europea (CE) un **chip de ADN como diagnóstico del genotipaje de sistemas de grupo sanguíneo** (19). Permite determinar en una sola prueba más de 60 fenotipos de grupos sanguíneos eritrocitarios abarcando inclusive las variantes más significativas de los distintos grupos étnicos. Minimiza los costos ya que sólo se realiza una sola vez en la vida tanto para el donante como para el receptor. La compatibilidad entre ambos se establecerá en una computadora y no en el laboratorio por lo cual creo que un futuro cercano diremos “good bye agglutination”. El estudio de los grupos sanguíneos a través del ADN aumenta la seguridad del receptor de transfusiones a través de una mejora de la compatibilidad. Se estima que se puede evitar entre el

80 y 90% de los casos de aloinmunización lo cual es de particular importancia para las mujeres en edad reproductiva activa dado que, a diferencia del D donde se puede realizar inmunoprofilaxis, el resto de los antígenos eritrocitarios pueden ser inmunizantes a través de transfusiones, trasplantes o drogadicción intravenosa.

La posibilidad de comprobar si un embrión es normal o no, desde el punto de vista genético, antes de ser transferido al útero es un concepto esencial para la prevención primaria de enfermedades y para conseguir un éxito en una pareja estéril. Así, el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se presenta como una técnica capaz de prevenir embarazos con embriones anómalos.

La genética y la biología molecular unen sus estrategias para diagnosticar enfermedades, bien mediante el estudio de los cromosomas en el embrión o bien mediante la detección de mutaciones en los genes que originan enfermedades monogénicas. A través de técnicas de micromanipulación, se realiza una biopsia de cada embrión, por la que se extraen 1 o 2 de sus células. Una vez extraídas se analizan los núcleos marcando sus cromosomas con sondas fluorescentes o se amplifica el ADN de estas blastómeras y se analiza para la búsqueda de distintas mutaciones mientras el resto del embrión sigue en cultivo para ser transferido cuando se conozca el diagnóstico.

Actualmente mediante DGP se pueden detectar más de 30 enfermedades de origen monogénico y dentro de ellas enfermedades hematológicas como la hemofilia (43) y la beta talasemia (44).

Cuando una pareja es portadora o afecta de una genopatía como la hemofilia la fecundación in vitro es el tratamiento de elección porque es el único que puede disponer de embriones in vitro para analizarlos genéticamente. El estudio citogenético del embrión en la hemofilia permite marcando con distintos colores cada uno de los cromosomas sexuales saber si en el embrión hay una dotación XX o XY lo cual será de utilidad para seleccionar los embriones de acuerdo a la situación de los padres con respecto a la enfermedad. En el caso de padre hemofílico y madre sana por ejemplo, se pueden seleccionar varones sanos e interrumpir la cadena de transmisión de la enfermedad.

El estudio molecular indirecto también es de utilidad cuando el gen amplificado en la genopatía es muy grande para poder ser secuenciado con éxito y las mutaciones o alteraciones posibles de su secuencia nucleotídica son muchas. La hemofilia A es uno de estos casos como lo es también la fibrosis quística con más de 700 mutaciones descritas.

Recientemente, en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla-España se obtuvo un recién nacido sano por DGP hijo de padres portadores de beta talasemia y que ya tenían un hijo enfermo de esta patología que para sobrevivir necesita recibir transfusiones de eritrocitos cada 15 días. A su vez, este nuevo ser engendrado por fertilización in vitro es 100% histocom-

patible con su hermano mayor enfermo. Por tanto, al nacer se tomaron células progenitoras hematopoyéticas (CPH) del cordón umbilical (CU) y se guardaron congeladas en nitrógeno líquido (-180° centígrados). Luego, se realizó el descongelado e infusión a 37° centígrados de estas CPH de CU al hermano enfermo. Con este tipo de trasplante se obtiene entre un 70 y 90% de éxitos.

Según los médicos que estudiaron el caso, de los 18 millones de donantes de médula ósea posibles para el paciente de seis años no se encontró ninguno compatible por lo cual se consideró ético tener un hijo sano para salvar la vida de un hermano dado que no existía otra posibilidad.

El DGP en mujeres RhD negativas inmunizadas al antígeno D pero con un compañero RhD positivo heterocigoto, es una buena opción para evitar la Enfermedad hemolítica Perinatal (EHP). Seeho y colaboradores, de Australia, fueron los primeros en reportar en el año 2005 el caso de una gestación no afectada de EHP usando DGP para realizar el nacimiento de una niña RhD negativa (51).

Aunque la fiabilidad del DGP se sitúa por encima del 95% pueden existir algunos errores diagnósticos. El tiempo de los estudios genéticos y moleculares puede durar entre 3 y 6 meses. Tiene un costo elevado pero en los países donde la interrupción de un embarazo afectado genéticamente es ilegal, el gasto que se debe afrontar para un DGP seguramente es mucho menor que si se compara con el que se afrontaría con el mantenimiento de un niño afectado. La calidad de vida es el eje central del DGP.

En los centros en que se utiliza, ofrece resultados alentadores pero en determinadas cromosomopatías y en la mayoría de las enfermedades monogénicas debe ser considerada aún una técnica experimental y todas las gestaciones que han pasado por DGP deben someterse a un diagnóstico prenatal.

Hasta hace algunos años el **cordón umbilical** y la placenta eran un material biológico de descarte. En los últimos años, la sangre obtenida por punción del cordón umbilical (CU) es muy valiosa por la presencia de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Fue en 1988 que se utilizó por primera vez las CPH de CU para realizar un trasplante en un niño de 8 años con una anemia de Fanconi. Este procedimiento exitoso fue realizado en París y permitió la curación del paciente.

En 1991 se crea el primer banco de sangre de CU en New York lo que permite realizar en 1993 el primer trasplante de CPH obtenidas de CU a partir de un donante no relacionado. Actualmente existen en el mundo más de 60 bancos de CU sin fines de lucro. Los Bancos públicos almacenan sangre de CU para cualquier persona que la necesite (uso alogénico). En España por ejemplo existen seis bancos de CU públicos (Barcelona, Valencia, Málaga, Madrid, Galicia y Tenerife) con 20.000 cordones almacenados lo cual constituye el 10% de todos los CU depositados en todo el mundo siendo el segundo país en números absolutos sólo superados por EE.UU.

La fundación Netcord, a los 10 años desde su creación agrupa a 25 bancos de sangre de cordón con más de 150.000 unidades de sangre de cordón almacenadas. Más de 200 equipos de trasplante en el mundo utilizan estas células umbilicales y de ellas más del 50% se han utilizado en pacientes adultos.

En nuestro país, hemos realizado en niños trasplantes alogénicos no relacionados de CU histocompatibles pero obtenidos de bancos de sangre de cordón de la CE o EE.UU para el tratamiento de enfermedades hematológicas.

Recientemente, en la Argentina, se ha inaugurado un banco de CU público en el hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.

Los bancos privados de CU almacenan la sangre obtenida para ser utilizada en forma autóloga o a familiares por lo cual el beneficiario debe abonar por la recolección, congelación y almacenamiento durante años. Sin embargo, no existen evidencias en que estas células puedan ser utilizadas en seres humanos para tratar enfermedades que pueden surgir a lo largo de la vida. La probabilidad de que un niño necesite de estas células en los primeros años de vida es bajísima. No es correcto que quienes puedan hacerse cargo económicamente adquieran este beneficio teórico y quienes no puedan pagar queden excluidos. A la población que se le ofrece el servicio es altamente vulnerable por la condición de la gestación de un nuevo ser y además por lo general no se les explica que en caso de realizarse un trasplante en un futuro deben hacerse cargo de los gastos dado que esta posibilidad no está cubierta por el sistema asistencial público o privado ni los IMAE.

Los bancos públicos, por el contrario, son de todos y para todos, la sangre de CU es de la comunidad y debe volver a ella cuando algún individuo la necesite. Los bancos de sangre de CU sólo la colectan, procesan y almacenan en condiciones seguras hasta que sea requerida. La donación voluntaria y anónima es un ejercicio necesario para el desarrollo de una sociedad moderna.

La utilización de CPH para el tratamiento de distintas enfermedades degenerativas de origen neurológico, cardíaco, diabetes entre otras ha llevado a considerar a las células de CU como una posible alternativa terapéutica. Este futuro atractivo de la **terapia celular y medicina regenerativa** con células de cordón se basa en que el número de CPH- CD34+ es de 0,1 a 0,8% similar al que se encuentra en la médula ósea (MO) pero las células de CU tienen un potencial proliferativo in vitro mucho mayor que las células de la MO. Esto determina que la reconstitución medular luego de un régimen mieloablativo ocurra con la décima parte de células de CU con respecto a MO (29). El CU además de las CPH contiene células estimuladoras de la angiogénesis (células progenitoras endoteliales CD4+ CD133+) en una concentración aproximada de 10 veces mayor que en la MO (30). Las células mesenquimales también presentes en el CU al igual que en la MO han demostrado poder diferenciarse en una variedad

de tejidos *in vitro* como ser cardíaco, osteoblastos, hepático y nervioso. Un estudio reciente compara las células mesenquimales obtenidas de MO, CU y tejido adiposo concluyendo que las células mesenquimales de CU tienen una capacidad de expansión de 20 veces, la del tejido adiposo de 8 veces y las de la MO de 5 (31). Los linfocitos presentes en el CU, en contraste con los que se encuentran en la sangre del adulto, son generalmente inmaduros y no secretan citoquinas inflamatorias. El uso de sangre de cordón umbilical para transfusiones o trasplante no ha producido por ejemplo enfermedad de injerto versus huésped en el receptor por lo cual se concluye que la infusión de sangre de CU es un procedimiento seguro que no se asocia con consecuencias inmunológicas.

En el año 2008, la Cátedra de Medicina Transfusional conjuntamente con el Departamento Básico de Medicina y otras cátedras y servicios de la Facultad de Medicina a presentado un proyecto para la creación de una unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa en el Hospital de Clínicas que fue aprobado, en su primera etapa, por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República. Hemos recibido el asesoramiento en esta primera etapa del Dr. Joan García, Jefe de la Unidad de Terapia Celular del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona y presidente en ejercicio de Netcord que nuclea a 15 bancos de células de cordón a nivel mundial.

La hemofilia es una patología atractiva para la terapia celular y génica dado que manteniendo niveles del factor de la coagulación entre 1 y 5% se disminuyen los riesgos de sangrados espontáneos. El papel fisiológico del hígado en la producción del FVIII ha sido confirmado con la normalización permanente del nivel del factor en sangre luego de un trasplante hepático en un paciente hemofílico (46). El estudio liderado por el Dr. Sanjeev Gupta de la Facultad de Medicina Albert Einstein de la Universidad de Yeshiva en New York (47) muestra como las células endoteliales de ratones no hemofílicos al ser inyectadas en la vena porta del hígado de ratones con hemofilia A, permanecen en dicho órgano, proliferan y sintetizan activamente FVIII corrigiendo la coagulopatía en el 87% de los casos manteniendo un nivel en plasma entre el 14 y 25%.

La tendencia de investigación actual es utilizar células madres del propio paciente, modificarlas genéticamente mediante vectores no virales tras la apropiada expansión *in vitro* para evitar los problemas inmunológicos de un trasplante alogénico. Un modelo interesante de terapia génica *ex vivo* para hemofilia es la utilización de vectores no virales en células madres mesenquimales obtenidas de tejido adiposo (48).

El trasplante de CPH intrauterino es una alternativa en desarrollo para el tratamiento de enfermedades congénitas que pueden ser diagnosticadas precozmente en la gestación y pueden ser tratadas con células madres adultas (20).

Los problemas frecuentes que se observan en los trasplantes de la vida extrauterina como la variabilidad antigénica de los leucocitos, la enfermedad de injerto versus huésped, la mieloablación previa o la demora en la reconstitución inmunológica no se observan en el feto pues existe el fenómeno de tolerancia inmunológica. La fuente de trasplante más utilizada es la médula ósea del padre, una vez realizada la depleción de las células T mediante inmunoselección. Hasta ahora los únicos casos exitosos han sido en el tratamiento de inmunodeficiencias (21).

En 1998 se desarrolló un modelo “*in vitro*” para la producción de glóbulos rojos humanos a partir de CPH obtenidas de médula ósea, cordón umbilical o sangre periférica (25).

En 2004 un grupo de investigadores franceses describen la producción *ex vivo* en gran escala de glóbulos rojos maduros a partir de CPH CD34+ obtenidas de cordón umbilical (26) lo cual tiene implicancias directas sobre la terapia génica, la medicina transfusional y la medicina tropical. En caso que se pueda estandarizar e industrializar dicha técnica, lo cual constituiría un gran avance en biología celular con varias aplicaciones terapéuticas. En primer lugar, la posibilidad de obtener eritrocitos autólogos del paciente sobre todo en pacientes anémicos dado que las técnicas actuales de donación de predepósito no lo permiten. A su vez en las transfusiones alogénicas se evitaría la necesidad de obtener donantes previamente al igual que en las transfusiones de grupos “raros”. A su vez, la población de eritrocitos obtenidos por hematopoyesis *ex vivo* tendrán todos una edad de 120 días mientras que los tranfundidos a partir de donantes de sangre tienen distintas edades expresadas en una curva de Gauss por lo cual la sobrevida *in vivo* será menor. Este nuevo modelo de producción de eritrocitos *ex vivo* serviría además para revertir vía terapia génica las anormalidades congénitas de los eritrocitos como talasemias, anemia falciforme, hemoglobinuria paroxística nocturna entre otras.

En la revista *Blood* de la American Society of Hematology (ASH) del 1 de diciembre del 2008, Lu y colaboradores describen un nuevo método para diferenciar *in vitro* células madres embrionarias (CME) humanas en grandes cantidades de glóbulos rojos maduros (49). Las ventajas de esta producción de células rojas serían que evitaría la necesidad de donantes de sangre así como el costoso proceso de preparación de hemocomponentes. Se evitaría la transmisión de agentes infecciosos, inclusive los patógenos emergentes, sin necesidad de realizar costosos métodos de inactivación. Se podrían obtener eritrocitos de grupos sanguíneos menos frecuentes como 0 RhD negativo en gran escala.

Sin embargo, algunos problemas deben ser solucionados antes de que comience la producción industrial *in vitro* de eritrocitos a partir de CME. El primero, es el número de células que se pueden obtener por este método dado que el número que existe en cada unidad de glóbulos rojos (220 ml) para transfusión es considerable (dos trillones de eritrocitos). Lu y colabo-

radore producen más de 10 billones e inclusive varios de los pasos del protocolo en el procedimiento se pueden expandir. Por tanto, se debe alcanzar un número suficiente de células in vitro con fines transfusionales antes de iniciar la producción industrial.

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

Además de la cantidad, un segundo punto a considerar es que los eritrocitos producidos in vitro deben tener una funcionalidad normal in vivo. En el método descrito por Lu y colaboradores se obtienen glóbulos rojos con un fenotipo fetal como los que se producen en los períodos iniciales de la gestación. Que estos eritrocitos pueden ser usados para transfusión es un aspecto que aún queda por resolver debido a los múltiples pasos de diferenciación que ocurren entre los eritrocitos fetales y adultos. Lu y colaboradores crean un 95% de glóbulos rojos nucleados de un tamaño mayor (10 micras) y el 65% contienen hemoglobina fetal. Las curvas de equilibrio de oxígeno son comparables a los eritrocitos adultos y responden a los cambios de pH y de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG). Sin embargo, la obtención de eritrocitos adultos a partir de CME es un proceso que aún queda por resolver.

De forma interesante, el análisis del fenotipo por PCR muestra que 2 de las 20 líneas de CME estudiadas son RhD negativas (MA99 y MA133) es decir, no expresan el antígeno D. El estudio inmunológico de los eritrocitos generados por la línea celular MA99 no expresan el antígeno D mientras que los obtenidos de la línea MA01 son RhD positivos.

Con respecto al sistema ABO, las células MA01 expresan el antígeno A, las MA99 el antígeno B y las WA01 no expresan los antígenos A ni B por lo cual corresponden al grupo 0. De esta manera se puede manipular la producción in vitro de glóbulos rojos por ejemplo del grupo 0 RhD negativo que en la población del Uruguay es tan sólo del 5% lo cual genera un stock insuficiente para el tratamiento de receptores de este grupo sobretodo en hemorragias masivas y particularmente en mujeres en edad reproductiva activa lo cual evitaría la inmunización anti-D y sus consecuencias en la gestación.

Sin embargo, algunas preguntas quedan por responder como cual es la vida media, la inmunogenicidad y la eliminación de células indiferenciadas que pueden provocar el desarrollo de tumores en el futuro (50). Pero, el saltar dichos obstáculos en el proceso de generación in vitro de eritrocitos a partir de CME puede allanar el camino para la producción de otros tipos de células sanguíneas en un futuro cercano.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Belizan JM. Letter to the Editor. Quo Vadis-Perinatal Medicine. *Obstetrics and Gynecology* 2002;99:175-176.
- 2- Bourgeois L. Onservation diverses sur la sterilité, perte de fruit, fecondite accouchements et maladies des femmes et enfant nouveaux naiz. Paris prene 1609.
- 3- Diamond LK, Blackfan KD, Bary JM. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J Pediatr* 1932;1:269-309.
- 4- Darrow RR. Icterus gravis (erythroblastosis neonatorum, examination of etiologic considerations). *Arch Patol* 1938;25:378-417.
- 5- Levine P, Katzin EM, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy: its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis. *JAMA* 1931;116:825-827.
- 6- Coombs RR, Mourant AE, Race RR. Detection of weak and "incomplete" Rh agglutinin: a new test. *Lancet* 1945; 246:15-16.
- 7- Bowman J. Rh-immunoglobulin: Rh prophylaxis. *Best Practice and Clinical Haematology* 2006;19:27-34.
- 8- Wallerstein H. Treatment of severe erythroblastosis by simultaneous removal and replacement of blood of the newborn. *Science* 1946;103:583-584.
- 9- Scasso JC, Decaro J, Cuadro JC, Lieutier G, Alonso J, Varela S. Enfermedad hemolítica Perinatal por aloimmunización Rh(D). Premio "El País" de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed. De la Plaza. Montevideo-Uruguay. 1983.
- 10- Cuadro JC, Scasso JC, Decaro J, Gutierrez C, Alonso J, Varela S, Miller A. Normas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica por conflicto Rh. Primer premio 1982 otorgado por la Asociación Médica del Uruguay. Ed Delta. Montevideo Uruguay 1982.
- 11- Decaro J, Caldeyro-Barcia R. Incidencia de individuos Rh(D) negativos en algunas poblaciones del Uruguay. Presentado en la IX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana. Campinas-Brasil. Noviembre 1984.
- 12- Alonso J, Decaro J, Marrero A, Lavalle E, Martell M, Cuadro JC. Repeated direct fetal intravascular high-dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh hemolytic disease. *J Perinat Med* 1994;22:415-419.
- 13- Ulm B, Kirchner L, Svolba G, Jilma B, Deutinger J, Bernaschek G, Panzer S. Immunoglobulin administration of fetuses with anemia due to alloimmunization to D. *Transfusion* 1999;39:1235-1238.
- 14- Decaro J. Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP). Ed. Rimarco. Mayo 2003. Montevideo-Uruguay.
- 15- Recomendaciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica feto-neonatal en la gestación y para la inmunoprofilaxis anti-D. Consenso 2005. *Archivos de Ginecología y Obstetricia* 2005;43:169-176.
- 16- Lambert SW. Melena neonatorum with report of a case cured by transfusion. *Med Rec* 1908;73:885-887.
- 17- Novoa JE, Scholnic C, Decaro J, Cuadrelli R, Nieto F, Rodriguez A, De Bellis R. Asesoramiento genético : Determinación de portadoras de hemofilia A. *Rev. Arg. Transf.* 1983; IX: 291-294.
- 18- Queenan J. Noninvasive Fetal Rh genotyping. *Obstetrics and Gynecology* 2005;106: 682-683.
- 19- Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, Reid M. Integrating molecular technologies for red cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusions services. *Transfus Med Rev* 2008;22:117-132.
- 20- Hayashi S, Flake AW. In utero hematopoietic stem cell therapy. *Yonsei Med J* 2001;42:615-629.
- 21- Flake AW, Roncarolo MG, Puck JM et al. Treatment of X-linked severe combined immunodeficiency by in utero transplantation of paternal bone marrow. *N Engl J Med.* 1996;335:1806-1810.
- 22- Surbeck DV, Holzgreve W, Nicolaides KH. Haematopoietic stem cell transplantation and gene therapy in the fetus: ready for clinical use?. *Human Reprod Update* 2001;7:85-91.
- 23- Attar R, Attar E. Use the hematopoietic stem cells in obstetrics and gynecology. *Transfusion and Apheresis Science* 2008;38:245-251.
- 24- Geijsen N, Horoschak M, Kim K et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004;427:148-154.
- 25- Malik P, Fisher T, Barsky L et al. An In vitro model of human red blood cell production

- from hematopoietic progenitors cells. *Blood* 1998;91:2664-2671.
- 26- Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature Biotechnology* 2004;10:1038-1047. www.nature.com
- 27- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;336:816-818.
- 28- Mari G, Deter RI, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise K, Dorman K, Ludomirsky A, Gonzalez R, Gomez R, Oz U, Detti L, Copel J, Bahadio-Singh R, Berry S, Martinez-Poyer J, Blackwell S. Noninvasive diagnosis by doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med* 2000;342:9-14.
- 29- Riordan NH, Chan K, Marleau AM, Ichim TE. Cord blood in regenerative medicine: do we need immune suppression?. *Journal of Translational Medicine* 2007;5:1-9.
- 30- Salven P, Mustjoki S, Alitalo K, Rafii S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003;101:168-172.
- 31- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells* 2006.
- 32- Sidbury JB. Transfusion through the umbilical vein in hemorrhage of the newborn. *Am J Dis Child* 1923;25:290-296.
- 33- Dam H., Dyggve H, Larsen H et al. Cholesterolfstoffwechsel in Huhnieren Huhnchen. *Biochem Z* 1929;215:475-492.
- 34- Dam H, Schonheyder F, Tage-Hansen E. Studies on the mode of action of vitamin K. *Biochem J* 1935;215:1273-1279.
- 35- Doisy EA, Binkley SB, Thayer SA. Vitamin K. *Chem Rev* 1941;28:477-517.
- 36- Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED. Plasma protein level in normal infancy and in hemorrhagic disease of the newborn. *Am J Med Sci* 1937;193:475-480.
- 37- Dam H, Dyggve H, Larsen H et al. The relationship of vitamin K deficiency to hemorrhagic disease of the newborn. *Adv Pediatr* 1952;5:129-153.
- 38- Waddell WW Jr, Guerry DP, Bray WE, Kelly OR. Possible effect of vitamin K on prothrombin and clotting time in newly born infants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937;40:432-434.
- 39- Almquist HJ, Close AA. Synthetic and natural antihemorrhagic compounds. *Am J Chem Soc* 1939;61:2557-2558.
- 40- Committee on Nutrition of the American Academy of Pediatrics. Vitamin K in the newborn. *Pediatrics* 1951;28:501-507.
- 41- Hey E. Effect of maternal anticonvulsant treatment on neonatal blood coagulation. *Arch Dis Child* 1999;81:F208-210.
- 42- Ribes C, Rossich R, Aramburo A, Danés I, Bernat M, Castillo F. Sangrado de riesgo vital en un recién nacido hijo de madre tratada con rifampicina. *An Pediatr (Barc)* 2006;65:629-630.
- 43- Michaelides K, Tuddenham EG, Turner C et al. Live birth following the first mutation specific pre-implantation genetic diagnosis for haemophilia A. *Thromb Haemost* 2006;95:373-379.
- 44- Jiao Z, Zhou C, Li J, et al. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of beta-thalassemia by whole-genome amplification. *Prenat Diagn* 2003; 23:646-651.
- 45- Fonseca D. Interpretación de resultados por el clínico. *Revista del Hospital Pedro Visca* 1971;2:19-23.
- 46- Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ et al. Liver transplantation in hemophilia A. *Blood* 1987;69:1721-1724.
- 47- Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest* 2008;118:935-945.
- 48- Liras A. Tratamiento de la hemofilia: hacia un futuro. *Revista de la Federación Española de Hemofilia (FedHemo)* número 48 de diciembre 2008.
- 49- Lu SJ, FENA Q, Park Js, Vida L, Lee BS et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008;112:4475-4484.
- 50- Bouhassira EE. Toward the manufacture of red blood cells?. *Blood* 2008;112:4362-4363.
- 51- Seeho SK, Burton G, Leigh D et al. The role of preimplantation genetic diagnosis in the management of severe rhesus alloimmunization: first unaffected pregnancy: a case report. *Hum Reprod* 2005;20:697-701.

CAPÍTULO 2 - TRANSFUSIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

En el **período fetal**, la principal indicación de la transfusión de eritrocitos intrauterina (TIU) es la anemia causada por la presencia de aloanticuerpos maternos del tipo inmunoglobulina G (IgG) que pasan hacia el feto y si los glóbulos rojos de éste poseen el antígeno correspondiente, producen hemólisis extravascular. El principal factor patogénico en la vida fetal es la anemia que puede desencadenar cuadros clínicos severos como el hidrops e inclusive la muerte intrauterina. Si bien el uso de inmunoglobulina anti-D ha disminuido la incidencia de la enfermedad hemolítica perinatal (EHP) por este anticuerpo han surgido otros, diferentes al D, que pueden producir EHP severa. Se ha demostrado que los aloanticuerpos maternos que requieren más TIU son el anti-D, el anti-c y el anti-Kell (1). El tratamiento de esta patología se desarrolla en los capítulos siguientes.

Otras causas de anemia fetal, aunque menos frecuentes, incluyen la infección por el parvovirus B19, la hemorragia fetomaterna severa, la transfusión feto-fetal en gestaciones gemelares monocoriales biamnióticas y en la alfa-talasemia homocigota. En todos estos casos la intensidad de la anemia puede desarrollar hidrops fetal por causa no inmunológica. En el capítulo de enfermedades transmisibles por la sangre se describe un caso clínico de hidrops por parvovirus B19 y se realiza una revisión del diagnóstico y tratamiento de esta patología feto-neonatal.

Tanto en el caso de la anemia de causa inmune como en la producida por la infección del parvovirus B19 se asocia a la TIU intravascular realizada por los vasos sanguíneos del cordón mediante cordocentesis, la infusión de inmunoglobulina polivalente intravenosa a altas dosis (400 mg/kg peso).

En la anemia de causa inmune para bloquear los receptores Fc de los macrófagos principalmente del bazo fetal con el fin de disminuir la hemólisis (2). En la infección por parvovirus B19 porque la mayoría de las preparaciones comerciales de inmunoglobulina polivalente existen anticuerpos anti-parvovirus que son neutralizantes y que pueden curar la infección feto-neonatal (3).

El síndrome de transfusión feto-fetal (TFF) se presenta aproximadamente en el 15% de los embarazos gemelares monocoriales biamnióticos. Es una patología placentaria con fetos normales. No es una afección heredada o genética. Sin embargo, las anastomosis arterio-venosas placentarias son una grave complicación del embarazo monocoriónico que causan una mortalidad fetal mayor del 90%.

En el gemelo donante se produce anemia, hipovolemia, retardo del crecimiento intrauterino, menos orina que lo normal por lo cual es posible que no se observe la vejiga en la ecografía y oligohidramnios. En el gemelo receptor grande, por el contrario, se presenta poliglobulia, hipervolemia y sobrecarga cardíaca. Para reducir el volumen de sangre el feto receptor

aumenta la cantidad de orina que produce por lo cual se observa una vejiga grande en la ecografía y aumento de la cantidad de líquido amniótico. El polihidramnios severo que acompaña a este cuadro clínico generalmente condiciona el parto prematuro lo cual agrava aún más la condición clínica y deteriorada de ambos gemelos (4). En el momento actual los mejores tratamientos para mejorar la condición prenatal son el amniodrenaje seriado y la cirugía endoscópica con láser. Sin embargo, el amniodrenaje es un tratamiento sintomático que trata de disminuir la presión intrauterina, mejorar la perfusión placentaria y prolongar el embarazo (5), pero no mejora la causa que son las anastomosis placentarias. En cambio, la cirugía láser endoscópica directamente trata la causa produciendo la coagulación de los vasos comunicantes placentarios por lo cual no necesita, por lo general, la repetición del procedimiento(6). En un trabajo randomizado reciente (7), se comparan ambos tratamientos y se demuestra que los fetos tratados con cirugía láser tuvieron una supervivencia del 76% comparado con el 56% de la amnioreducción.

Al nacer es probable que el neonato receptor poliglobulico e hipervolemico necesite un procedimiento de hemodilución por cateterismo umbilical mientras que el gemelo donante anémico una transfusión de eritrocitos. Para tal fin, en el caso de gemelos monocigóticos (idénticos) se puede utilizar los glóbulos rojos que se obtienen de las sangrías del gemelo receptor para transfundir directamente al gemelo donante (transfusión singénica). El gemelo donante al nacer puede presentar, dada la intensidad de la anemia, focos de eritropoyesis cutáneos de forma similar a los casos graves de enfermedad hemolítica perinatal inmune.

Cuando existen gestantes aloimmunizadas con embarazos gemelares puede ocurrir EHP en ambos fetos (8) o por el contrario, cuando son dicigóticos, dicoriónicos y diamnióticos y el padre es heterocigoto para el antígeno correspondiente se puede presentar EHP en un feto y en el otro no (9).

Todas estas patologías que se pueden presentar en embarazos múltiples deben ser tenidas en cuenta dado que en los últimos años se han incrementado sensiblemente este tipo de gestaciones (epidemia moderna?) debido a la aplicación de técnicas de reproducción asistida.

Por ejemplo, en Australia la tasa de nacimientos múltiples se incrementó de 12 a 17 por mil nacimientos entre 1986 y 1997 (10) de manera similar a Gran Bretaña (11) y USA (12). El parto de pretérmino es el principal efecto adverso del embarazo múltiple y está relacionado directamente con el número de fetos (10). Una de las consecuencias de la prematuridad será la mayor prevalencia de anemia neonatal y una mayor necesidad de transfusiones de eritrocitos.

Un método no invasivo, que se utiliza en el momento actual, para el diagnóstico de la anemia fetal independiente de la causa que la origina es medir la velocidad del flujo sanguíneo en el pico sistólico de la arteria cerebral media mediante Doppler (13). Cuando existe anemia fetal aumenta la ve-

locidad del flujo sanguíneo debido al aumento del gasto cardíaco y a la disminución de la viscosidad lo cual es proporcional a la intensidad de la masa globular. Una elevación de la velocidad mayor a 1.5 de la media es indicador de cordocentesis y TIU en gestantes aloimmunizadas (14). Esta tecnología doppler es también de utilidad para diagnosticar anemia fetal producida por otras patologías como infección por parvovirus B19, hemorragia fetomaterna, transfusión feto-fetal y alfa talasemia por ejemplo. Típicamente en los casos de transfusión feto-fetal el feto donante tendrá una velocidad del flujo sanguíneo de la arteria cerebral media aumentada por encima de 1.5 veces el valor promedio para la edad gestacional mientras que el feto receptor la tendrá disminuida. El tratamiento con TIU del feto receptor en los casos severos luego de la cirugía láser ha sido útil para prolongar la gestación en algunos casos (15) por lo cual se recomienda el seguimiento semanal con Doppler luego de la coagulación de las anastomosis placentarias en los casos severos.

Sin embargo, el valor predictivo de la medición de la velocidad del flujo sanguíneo en el pico sistólico de la arteria cerebral media fetal disminuye luego que se ha realizado la primera TIU lo cual debe ser tenido en cuenta cuando se extiende esta técnica para decidir la frecuencia de las subsecuentes TIU (12). Una explicación de este hecho puede ser que con la TIU se aportan eritrocitos con hemoglobina A (HbA) lo cual determina que los glóbulos rojos adultos sean más rígidos que los fetales cambiando las condiciones reológicas de la circulación fetal. A su vez, la TIU aumenta el hematocrito fetal con el consiguiente aumento de la viscosidad sanguínea. Ambos elementos disminuyen la velocidad del flujo sanguíneo. La rápida elevación de la Hb producida por la TIU produce una inhibición de la eritropoyesis fetal lo cual se incrementa con las TIU subsecuentes. En los casos de EHP los eritrocitos infundidos por cordocentesis circulan libremente porque carecen del o los antígenos a los cuales está dirigido el anticuerpo materno y los macrófagos carecen de receptores para antígenos de grupos sanguíneos. La disminución de la eritropoyesis fetal y la mayor supervivencia de los eritrocitos infundidos hace que la mayoría de los glóbulos rojos circulantes tengan HbA. Se establece en esta etapa una quimera artificial (16). Por ello, debemos realizar la determinación del grupo sanguíneo fetal y el test de Coombs directo con la muestra de sangre de la primera cordocentesis. Luego existirá una doble población de eritrocitos adultos y fetales que se traducirá en las pruebas diagnósticas lo cual puede llevar a falsas interpretaciones. Inclusive, al nacer, el grupo sanguíneo del neonato puede ser el de los eritrocitos transfundidos y el test de Coombs directo resultar negativo a pesar de que en la muestra de la primera cordocentesis era francamente positivo (ver historia clínica del capítulo diagnóstico prenatal).

Generalmente la segunda TIU se realiza a los 7 días de la primera y luego cada dos semanas en forma empírica. Una prueba de compatibilidad ma-

yor entre el suero o plasma materno y los eritrocitos a transfundir debe ser realizada previamente a cada TIU porque aproximadamente el 25% de las embarazadas que reciben TIU desarrollan anticuerpos adicionales particularmente cuando la punción se realiza transplacentaria (17). Los leucocitos contaminantes deben ser removidos del producto a infundir mediante filtración principalmente para evitar la infección por citomegalovirus (CMV) (18). Los eritrocitos utilizados para TIU por lo general tienen menos de 5 días de extraídos por lo cual tienen una larga supervivencia in vivo y menos alteraciones producidas por el almacenamiento in vitro a temperaturas de 2 a 8° centígrados. Para evitar la reacción de injerto versus huésped que se puede producir por los linfocitos adultos infundidos se debe irradiar el concentrado de eritrocitos con irradiación gamma a una dosis de 25Gy. Es recomendable que la irradiación, que inhibe la capacidad mitótica de los linfocitos, se realice poco tiempo antes de la infusión dado que la irradiación gamma produce hiperkalemia. La centrifugación para mejorar el hematocrito del producto también produce aumento del potasio en el plasma sobrenadante.

El lavado de los eritrocitos, con menos de cinco días de extraídos, con suero fisiológico para extraer el plasma remanente con un almacenamiento posterior de hasta 4 horas mantuvo el potasio con niveles inferiores a 12 mmol/l lo cual es considerado un nivel seguro para realizar TIU. La mayoría acepta un intervalo de hasta 24 horas entre el procesamiento e irradiación del producto y la TIU (20).

Una fuente alternativa de obtención de eritrocitos para realizar TIU son los glóbulos rojos maternos. Generalmente y de ser posible, este procedimiento se reserva cuando no se pueden encontrar eritrocitos alogénicos compatibles con el plasma materno. Esto ocurre principalmente cuando hay anticuerpos maternos múltiples o el anticuerpo está dirigido hacia un antígeno público de alta frecuencia en la población (ver historia clínica del capítulo diagnóstico prenatal). Los eritrocitos maternos a transfundir deben ser lavados para extraer el o los anticuerpos e irradiados por provenir de un familiar directo.

En algunos centros se combinan TIU intravasculares por cordocentesis con TIU intraperitoneales. Esta combinación tiene como objetivo realizar un tandem de eritrocitos dado que los de la TIU intravascular ingresan inmediatamente a la circulación sanguínea mientras que los administrados en el peritoneo fetal se absorben lentamente a través del sistema linfático que los vuelca a la sangre. En casos de afectación severa la TIU por vía intracardíaca puede ser realizada teniendo como precaución la temperatura de la sangre (37° centígrados), el nivel de potasio y la velocidad de infusión.

La sobrecarga de hierro producidas por las TIU y por la hemólisis puede repercutir en el período neonatal produciendo colestasis y hepatitis (21).

También los casos de hidrops fetales producidos por anticuerpos anti-D o Kell pueden acompañarse de trombocitopenias fetales o neonatales con

recuentos inferiores a 50.000 plaquetas por mm³ lo cual puede agravarse pues por lo general son pretérminos que tienen un riesgo aumentado de hemorragia (20).

En el feto la hematopoyesis está regulada por el incremento gradual de los niveles de eritropoyetina (EPO) estimulado por la baja tensión de oxígeno durante la vida intrauterina. Los eritrocitos fetales que contienen hemoglobina F (HbF) tienen alta afinidad por el oxígeno por lo cual facilitan el intercambio de los glóbulos rojos maternos hacia los fetales durante la gestación. El cambio de HbF a HbA comienza aproximadamente a las 32 semanas de gestación y al nacer la HbF constituye el 60 al 80 % de la hemoglobina del recién nacido. Por lo tanto, los pretérminos tienen niveles más elevados de HbF que los de término. Los valores normales de Hb según la edad serían: a las 28 semanas de gestación 14,5 g/dl, 32 semanas 15 g/dl, al término 16,5 g/dl, 1 a 3 días 18,5 g/dl y a las dos semanas 16,6 g/dl (22).

En los recién nacidos de término, el aumento de la oxigenación que ocurre con la respiración pulmonar luego del nacimiento hace que se produzca un aumento abrupto del nivel de oxígeno tisular lo cual establece un “feedback” negativo sobre la producción de EPO y por ende de la eritropoyesis. Esta reducción de la eritropoyesis así como la vida media eritrocitaria de 60 a 70 días comparada con los 120 días del adulto, hacen que se produzca una caída fisiológica de la Hb en las próximas semanas de vida que luego aumenta lentamente a partir del cuarto a sexto mes de vida. Este fenómeno que se denomina “anemia fisiológica del recién nacido de término” por lo general es normocítica y normocrómica y no requiere de una extensiva evaluación o tratamiento. Usualmente el valor de Hb no desciende por debajo de 9,5 g/dl.

El mismo mecanismo fisiológico causa anemia en el pretérmino pero con una menor producción de EPO, una vida media eritrocitaria de 35 a 50 días y flebotomías más frecuentes que en el recién nacido de término. Esto hace que la anemia fisiológica del pretermino pueda alcanzar valores más bajos de Hb (8 g/dl en los prematuros de 1000 a 1500g y 7g/dl en los menores de 1000g). La anemia se considera fisiológica porque es autolimitada, en general se tolera sin inconvenientes y no se asocia a ninguna alteración.

La volemia de los recién nacidos (RN) de término es de aproximadamente de 85ml/Kg y en los prematuros de bajo peso de 100ml/Kg. Los RN no compensan la hipovolemia como lo hacen los adultos. Cuando la volemia disminuye el 10% el RN reduce el gasto cardíaco sin incrementar la frecuencia cardíaca. Para preservar la presión arterial sistémica produce una vasoconstricción que junto a la disminución del volumen minuto provoca un deterioro de la perfusión tisular con baja oxigenación de los tejidos y acidosis metabólica.

La anemia neonatal que puede requerir transfusión de eritrocitos puede

producirse por: pérdidas sanguíneas, disminución de la producción o por aumento de la destrucción (hemólisis).

La anemia puede ser **causada por una hemorragia** que ocurre prenatal, en el momento del parto o postnatal. Las causadas por pérdidas sanguíneas crónicas son mejor toleradas y pueden ser compensadas fisiológicamente por lo cual los neonatos son más estables clínicamente que cuando se produce una anemia aguda. La circulación feto-placentaria tiene un volumen aproximado de 110 ml/Kg por lo cual pequeñas hemorragias pueden representar una proporción importante del volumen fetal. Una pérdida sanguínea aguda tan sólo de 15 a 20 ml puede resultar en anemia. La hemorragia puede ser de causa obstétrica por placenta previa, desprendimiento placentario, trauma a la placenta o al cordón umbilical en el momento del parto o la ruptura de vasos placentarios anómalos. A pesar de que en la mayoría de los casos de hematoma retroplacentario o placenta previa se produce un sangrado materno, una hemorragia fetal también puede ocurrir. Los procedimientos diagnósticos prenatales como amniocentesis, muestra de velloidad coriónica y/o cordocentesis pueden ser causa de hemorragia. Cuando hay una hemorragia aguda, típicamente el neonato se presenta pálido, hipotenso e hipovolémico pero sin hiperbilirrubinemia por lo cual debe ser tratado con reposición hidroelectrolítica y/o transfusión de eritrocitos.

En la mayoría de las gestaciones menos de 2 ml de sangre fetal circula en la sangre materna pero en el 0,3% de los casos el volumen excede los 30ml lo que equivale en un neonato de 3 Kg al 10% de la volemia. Además de producirse anemia del RN cuando la gestante es RhD negativa con fetos RhD positivos la dosis de inmunoglobulina anti-D estándar de 300 mcg i/m o 120 mcg i/v no es suficiente para prevenir la inmunización materna por lo cual se debe realizar una dosis mayor o adicional.

Hay un riesgo aumentado de hemorragia feto materna (HFM) en los casos de complicaciones durante la gestación o el parto, maniobras invasivas, aborto, pre-eclampsia y cesárea.

La transfusión feto-fetal en gestaciones gemelares monocoriónicas como ya vimos puede ser causa de anemia en uno de los fetos. Al nacer puede existir una hemorragia feto-placentaria cuando se coloca al RN por encima del nivel placentario con una oclusión parcial o tardía del cordón umbilical. Las maniobras obstétricas pueden causar cefalohematoma o más raramente hemorragias internas por rotura de hígado o bazo. En los RN de pretérmino es más frecuente la aparición de una hemorragia intraventricular. Sin embargo, la causa más frecuente de anemia y de transfusión, sobretudo en pretérminos, es la pérdida sanguínea iatrogénica producida por las frecuentes sangrías utilizadas para realizar estudios de laboratorio (20).

La enfermedad hemorrágica del RN por deficiencia de los factores de la coagulación vitamina K dependientes se puede presentar en los primeros días de vida y puede ser también causa de anemia.

La anemia neonatal puede producirse cuando la **destrucción de los eri-**

trocitosis (hemólisis) supera a la producción. La causa puede ser por alteraciones intracorpúsculares hereditarias poco frecuentes como defectos de la membrana (esferocitosis, eliptocitosis), enzimáticos (glucosa-6-fosfato, piruvato-kinasa) o hemoglobinopatías (anemia falciforme, talasemias alfa o beta). Las causas extracorpúsculares, más frecuentes, pueden ser de causa inmune (incompatibilidad de grupos sanguíneos o por medicamentos) o no inmunes (infección, déficit de vitamina E). La anemia hemolítica de causa inmune debido al pasaje de anticuerpos maternos hacia el feto será analizada en los capítulos siguientes.

La hemólisis se define por un acortamiento de la vida media del eritrocito. En los neonatos de término, la vida media fisiológica es de 80 a 100 días y en los prematuros de 60 a 80 días sensiblemente menor a los 120 días de los glóbulos rojos del adulto. La crisis hemolítica se establece cuando hay un aumento de la velocidad de destrucción ya sea por el mecanismo patogénico o por un factor desencadenante.

Típicamente la hemólisis extravascular se traduce en un descenso de la Hb y un aumento de la bilirrubina indirecta (BI). La anemia estimula la eritropoyesis lo que se refleja en un aumento de la reticulocitosis y en la aparición en sangre periférica de elementos nucleados de la serie roja (eritroblastos) pero, esto no es patognomónico de hemólisis dado que pueden estar presentes en la hipoxia neonatal en ausencia de anemia.

La observación de una lámina de sangre periférica puede revelarnos cambios morfológicos de los eritrocitos que nos pueden sugerir el mecanismo hemolítico como por ejemplo esferocitosis o eliptocitosis hereditarias o anemia de causa microangiopática (presencia de eritrocitos fragmentados o esquistocitos).

En los seres humanos se genera monóxido de carbono cuando se degrada el hem de la hemoglobina. Este monóxido de carbono es transportado en la sangre como carboxihemoglobina. La medición de los niveles de carboxihemoglobina puede ser usado como un marcador de hemólisis.

En la hemólisis intravascular aparece rápidamente hemoglobinemia y hemoglobinuria. El diagnóstico se puede realizar también rápidamente observando macroscópicamente el aspecto del suero y la orina.

El aumento de la concentración de la enzima lácticodeshidrogenasa (LDH) en sangre sugiere una hemólisis dado que esta enzima es intracelular pues participa del metabolismo del eritrocito.

La Hb libre tiene un peso molecular de 32.000 Daltons por lo cual atraviesa el glomérulo renal hacia la orina. Para evitar la pérdida de esta importante molécula el organismo del adulto presenta dos mecanismos. En primer lugar, una glicoproteína sérica la haptoglobina forma un complejo irreversible con la Hb libre aumentando su peso molecular y evitando su escape por la orina. Este complejo es captado por los macrófagos del sistema retículo endotelial, principalmente del hígado, que tienen un receptor específico CD163. Esto explicaría porqué en las hemólisis intravasculares también

puede producirse un aumento de la BI.

Sin embargo, en los neonatos los niveles de haptoglobina son bajos y los niveles del adulto se adquieren recién después de varios meses por lo cual el nivel de esta glicoproteína en suero no es un parámetro adecuado para medir el nivel de hemólisis en los RN.

En segundo lugar, la Hb libre en el plasma se puede oxidar a metahemoglobina que se disocia fácilmente en hem y globina. El hem libre e insoluble a pH fisiológico se une a otra glicoproteína plasmática la hemopexina. Este complejo también es metabolizado en el parénquima hepático. Pero, al igual que la haptoglobina, la síntesis de la hemopexina está reducida en el RN por lo tanto no es un buen indicador de la hemólisis neonatal al contrario de lo que sucede en el adulto.

Sin embargo, la hemólisis intravascular es mucho menos frecuente en el RN que en el adulto dado que por ejemplo en las anemias hemolíticas de causa inmune los anticuerpos de origen materno son del tipo IgG que producen hemólisis extravascular. Tampoco se plantean en el RN las hemólisis intravasculares producidas por válvulas mecánicas, venenos de serpientes o arañas o intoxicación por gas arsénico. Algunos episodios accidentales como la infusión de soluciones hipotónicas o el calefaccionar los eritrocitos a transfundir por encima de 41° centígrados pueden producir hemólisis intravascular. Los glóbulos rojos a transfundir deben ser calentados a 37° centígrados con calefactores de calor húmedo o seco, con registro visible de temperatura y alarma. Nunca se deben calefaccionar con lámparas de luz, estufa, agua caliente o fototerapia.

Si bien la hemólisis extravascular produce un aumento de la BI que en el RN puede causar, con valores elevados o incrementos acelerados, daño neurológico, la hemólisis intravascular se presenta con un cuadro clínico más severo que se puede acompañar de shock, CID y/o insuficiencia renal con necrosis tubular aguda.

Las principales causas de la falla renal aguda y la necrosis tubular son la isquemia y el descenso del óxido nítrico (NO). El principal productor de NO es la célula endotelial pero el principal reservorio es el eritrocito dado que el NO circula unido a la Hb de manera similar al O₂ y CO₂ por lo cual se denominó el tercer gas. Cuando se produce hemólisis intravascular el NO libre rápidamente es oxidado a nitrato (NO₃) que es un metabolito inactivo. A su vez del glóbulo rojo roto se libera una enzima intracelular (arginasa) transformando la L-arginasa (sustrato para la producción de NO) en ornitina. El rápido descenso del NO produce vasoconstricción y agregación plaquetaria lo que contribuye a la formación de microtrombos que explicarían la isquemia y la necrosis tubular. Este mecanismo explicaría también las crisis hemolíticas que se producen en la anemia falciforme sin embargo este tipo de hemoglobinopatía no se presenta clínicamente en el período neonatal (50).

Recientemente se ha demostrado la presencia de receptores de EPO en

varias células renales (48). La administración sistémica de EPO atenuaría la muerte celular y estimularía la regeneración epitelial luego de la isquemia. Este efecto es dosis dependiente (5000 UI/Kg) y es mayor cuando se administra previamente al inicio de la necrosis tubular aguda o minutos después (49).

Tanto para la hemólisis intravascular como extravascular los tratamientos de elección son la terapéutica de la causa que produce la hemólisis, la transfusión de eritrocitos y/o la exsanguinotransfusión además de una buena hidratación y terapias de sostén.

Por último, la anemia neonatal puede producirse por una **disminución de la producción** de los eritrocitos por defectos congénitos raros como Diamond-Blackfan y anemia de Fanconi o deficiencias adquiridas más frecuentes como infecciones, nutricionales, medicamentos (anticonvulsivantes, antibióticos o sulfas) o descenso de eritropoyetina (EPO).

Infecciones como el parvovirus B19, rubéola, sífilis, citomegalovirus, HIV, adenovirus o sepsis bacteriana pueden producir anemia neonatal. Sin embargo, las deficiencias nutricionales de hierro, cobre, folatos, vitamina E y B12 pueden causar anemia en los primeros meses de vida pero generalmente no al nacimiento.

La respuesta a la EPO de los RN difiere a la que se observa en niños mayores y adultos en los cuales los sensores renales de oxígeno reconocen un descenso del mismo en la circulación y liberan EPO la cual actúa estimulando la eritropoyesis medular. En el feto, el sensor de oxígeno se encontraría en el hígado el cual parece estar programado para el entorno intrauterino hipóxico. La respuesta atenuada a la hipoxia protege al feto de la policitemia. Con el avance de la gestación la producción de EPO se trasladaría progresivamente del hígado al riñón operando a partir del término por tanto, los lactantes más inmaduros o prematuros, son los que producen menos EPO (**anemia del pretérmino**). A su vez, en los que reciben transfusiones reiteradas después del nacimiento, tienen una mayor concentración de HbA que de HbF por lo cual se favorece la liberación de oxígeno tisular pero descienden los niveles de EPO.

Un mecanismo adicional contribuye a disminuir los niveles de EPO en plasma en los prematuros que es el aumento del catabolismo. En suma, la anemia del pretérmino se produce por disminución de la concentración de la EPO plasmática (por disminución de su producción y por aumento de su catabolismo) y por las repetidas sangrías para análisis de laboratorio. Para prevenir este último factor se han diseñado micrométodos o procesadores en línea que toman la muestra de sangre, realizan los estudios analíticos y luego la reinfunden ya analizada evitando la necesidad de transfusiones (22)(23). Hasta que estos dispositivos sean probados más extensamente y demuestren ser efectivos y seguros, el reemplazo de las pérdidas sanguíneas por análisis de laboratorio seguirá siendo un factor remanente y crítico en la necesidad de transfusiones para los neonatos de las unidades

de cuidados intensivos.

El reconocimiento de niveles plasmáticos de EPO descendidos con una adecuada eritropoyesis medular en los prematuros provee una base racional para considerar, en el tratamiento de esta anemia, el **uso de EPO recombinante (rEPO)**. Sin embargo, la utilización de rEPO no es totalmente aceptada en el manejo clínico neonatal dado que su eficacia es incompleta. Por un lado, los progenitores eritropoyéticos de neonatos responden bien a la rEPO in vitro. A su vez, la rEPO más hierro efectivamente estimulan la eritropoyesis in vivo lo cual se evidencia por un aumento de los reticulocitos y de los eritrocitos circulantes. La dosis óptima sería 750 U/Kg por semana de EPO que se puede dividir en tres dosis de 250U/Kg por vía subcutánea más sulfato ferroso 2 a 12 mg/Kg día por vía oral (27).

Por otro lado, cuando el objetivo primario de la administración de rEPO es eliminar las transfusiones eritrocitarias, la rEPO ha fallado. Muchos estudios realizados con este fin han tenido resultados inconsistentes (24).

Un meta-análisis ha sido realizado con estudios clínicos publicados entre 1990 y 1999. Del análisis surgen como conclusiones que es imposible establecer una recomendación firme para el uso clínico de la rEPO en el tratamiento de la anemia del prematuro y que cuando la rEPO fue eficaz en reducir la necesidad de transfusiones eritrocitarias, su efecto fue relativamente modesto y de cuestionable importancia clínica (25).

En una reciente revisión Cochrane (26) se concluye que no existe un beneficio demostrable cuando se compara la administración precoz de EPO con la tardía en reducir el uso de transfusiones de eritrocitos en los pretérminos y/o de bajo peso al nacer. La administración precoz de EPO inclusive aumenta los riesgos de retinopatía.

En suma, el uso rutinario de rEPO para el tratamiento de todos los neonatos de pretérmino no se correlaciona con medicina basada en evidencia (24).

Una de las indicaciones de EPO sería en neonatos cuyos padres son testigos de Jehová (51).

En la actualidad, se han desarrollado EPO de tercera generación llamadas activadores continuos de los receptores de eritropoyetina (Continuous Erythropoiesis Receptor Activator, CERA) que tienen como ventajas que su activación es continua, una mayor actividad in vivo y su vida media es más prolongada. La vida media de eliminación de CERA tras la administración intravenosa o subcutánea es similar. Los estudios con animales in vivo han demostrado que CERA es más eficaz que las anteriores EPO en la estimulación de la eritropoyesis en cuanto a la magnitud y duración de la respuesta (32). La administración de CERA una vez al mes, por vía intravenosa o subcutánea, ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de la anemia en los pacientes con enfermedad renal crónica dializados o sin dializar independientemente de la edad, sexo o comorbilidades de los pacientes (33). Sin embargo, todavía no existen ensayos clínicos que recomienden su uso para el tratamiento de la anemia en neonatos o pretérminos.

Las **transfusiones de eritrocitos** utilizadas para el tratamiento de la anemia del prematuro tienen como objetivo mantener la concentración de hemoglobina a un nivel determinado para la condición clínica del neonato.

En pretérminos con una enfermedad respiratoria severa es aconsejable mantener una Hb entre 13 y 14 g/dl y un Hto entre 40 a 45 %. Similarmente se debe mantener un Hto por encima del 40% cuando existen enfermedades cardiovasculares congénitas. En cambio, un Hto entre 30 y 35% sería suficiente cuando existen patologías cardiopulmonares moderadas. Recientemente, The Guidelines for neonates and older children establecidas por el British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force (BCSH) (www.bcsghguidelines) recomienda mantener una Hb superior a 12 g/l en los neonatos que requieren internación en unidad de cuidados intensivos por enfermedades pulmonares severas, enfermedades cardíacas cianóticas o falla cardíaca. Se aconseja transfundir a los neonatos que han sufrido una pérdida sanguínea superior al 10% de la volemia. En los neonatos clínicamente estables se transfunden sólo con Hb inferior a 7 g/l y en aquellos que tienen una dependencia crónica de oxígeno se recomienda mantener una Hb superior a 11 g/l.

Para una cirugía mayor se debe mantener un Hto superior al 30% mientras que para una cirugía menor no se requiere este nivel de Hto pero siempre la posibilidad de una hemorragia debe ser considerada.

En general los neonatos con una anemia modesta, clínicamente estables, no requieren transfusiones salvo que se presenten problemas clínicos atribuibles a la presencia de la anemia o alteraciones que puedan ser corregidas por la transfusión de eritrocitos. Como ejemplos de esto último, son la utilización de las transfusiones para tratar alteraciones de los ritmos cardiopulmonares. El descenso de la Hb contribuye a la presencia de taquipnea, disnea, apnea y taquicardia o bradicardia debido a la disminución de la liberación de oxígeno a nivel del centro respiratorio del cerebro. Las transfusiones de eritrocitos disminuirían la incidencia de los períodos de apnea al mejorar la liberación de oxígeno tisular principalmente a nivel cerebral. Sin embargo, los estudios científicos en este punto son contradictorios (24). Otra indicación controvertida de la transfusión de eritrocitos es para ganar peso cuando el Hto es inferior a 25% pero el neonato no presenta otros signos de distress como taquicardia, dificultad respiratoria, succión o llanto débil o disminución de la reactividad. Los estudios clínicos realizados tampoco recomiendan esta práctica transfusional (28).

La decisión de transfundir o no debe estar basada en un balance riesgo beneficio de acuerdo a la situación clínica del neonato. Algunos, establecen que este criterio clínico es muy impreciso por lo cual aconsejan evaluar parámetros fisiológicos como criterios de transfusión como el volumen de eritrocitos circulantes, la masa celular o la liberación de oxígeno. Sin embargo, las mediciones de estos parámetros no están disponibles rutinariamente en la mayoría de los centros asistenciales por lo cual se vuelven

no prácticos.

Otra importante controversia en prescribir transfusiones neonatales es basarse en un **criterio restrictivo o liberal**. Dos trabajos randomizados han sido realizados para comparar ambas indicaciones. En uno, se encuentra un aumento de las apneas, hemorragia intraventricular y leucomalacia cerebral en los neonatos dentro del grupo del protocolo restrictivo (29). En el otro, no se encuentran diferencias entre ambos protocolos (30). De acuerdo a estos resultados es recomendable, hasta que haya más información disponible, transfundir a los pretérminos con un protocolo convencional relativamente liberal para no someter a los neonatos a riesgos adicionales como los producidos por el protocolo restrictivo.

En un estudio reciente (34), se estudian 637 pacientes pediátricos con edades entre 3 días y 14 años que fueron admitidos en una unidad de cuidados intensivos y que presentaron una hemoglobina inferior a 9,5 g/dl pero con una condición clínica estable. De estos, 320 pacientes fueron tratados con un protocolo transfusional restrictivo recibiendo eritrocitos con un umbral de Hb 7g/dl y 317 con un protocolo liberal con un umbral de 9,5g/dl. Se demostró que en pacientes pediátricos críticos con una condición clínica estable el protocolo restrictivo disminuyó el número de transfusiones de eritrocitos sin aumentar efectos adversos en la evolución. Sin embargo, este protocolo restrictivo no es aplicable a pretérminos, adultos añosos, pacientes con enfermedad coronaria, o niños con severa hipoxemia, inestables hemodinámicamente, con hemorragias o enfermedades cardiovasculares cianóticas.

Otro punto práctico de interés es determinar **como deben ser los eritrocitos a transfundir**. Dado que los RN y lactantes pequeños son inmaduros desde el punto de vista inmunológico, la aloinmunización a los antígenos eritrocitarios en el período neonatal es excepcional. Como no se produce aloinmunización y las evaluaciones reiteradas incrementan la pérdida sanguínea iatrogénica se recomienda no realizar pruebas serológicas pretransfusionales en lactantes menores de cuatro meses. Por ello, en algunos servicios se transfunde a todos los RN con glóbulos de grupo 0 con el fin de no realizar pruebas serológicas, evitar el conflicto ABO y tener alícuotas leucoreducidas para neonatos sólo de este grupo sanguíneo con lo cual se reducen sensiblemente los costos (35). Si el suero materno contiene anticuerpos el RN debe recibir glóbulos rojos sin el o los antígenos correspondientes. Puede realizarse una prueba cruzada mayor entre los eritrocitos a transfundir y el plasma o suero materno. En caso de no poder obtener una muestra de sangre materna se harán los estudios inmunohematológicos con la sangre obtenida del RN.

El uso tradicional de transfundir a los RN con eritrocitos de menos de cinco días ha sido sustituido en algunos centros por la transfusión de alícuotas o partes de una misma unidad de glóbulos rojos mantenidas hasta 42 días, mediante el uso de soluciones aditivas como el Sagman (Sodio, Adenina,

Glucosa y Manitol) que se utiliza en nuestro medio, con lo cual se disminuye el número de donantes a los que se expone el RN.

Se ha demostrado que la transfusión de eritrocitos con soluciones aditivas en los RN que requieren volúmenes pequeños (10 a 20 ml/Kg) con una velocidad de infusión entre dos a cuatro horas no produce efectos adversos (31). Estas alícuotas presentan un hematocrito de 55 a 60%. En estos casos, una unidad de sangre desplasmatizada con solución aditiva es dividida en cuatro o cinco unidades más pequeñas (pedipack) que son reservadas para uno o dos neonatos. Para la realización de esta técnica es necesario contar con un equipo de conexión estéril y su vez, las fracciones eritrocitarias deben ser leucoreducidas por filtración antes de su conservación en heladera (36). En un estudio reciente, donde se analizaron los cambios metabólicos que pueden producir las transfusiones de eritrocitos en 61 neonatos de menos de 31 semanas internados en una unidad de cuidados intensivos, se determinó que las transfusiones eritrocitarias fueron efectivas para corregir la anemia y sólo produjeron cambios metabólicos leves, aumentando el pH y PO₂ y disminuyendo la glicemia y la calcemia, pero sin significación clínica relevante (52). La disminución de la calcemia fue muy leve en las transfusiones unitarias pero fue más marcada en aquellos RN que recibieron varias unidades. Se debe realizar calcio preventivo en los casos de transfusiones masivas como la EST. Con respecto al potasio, los autores recomiendan su monitoreo sólo cuando los RN tienen riesgos adicionales de hiperkalemia como la insuficiencia renal.

La leucoreducción se realiza con el objetivo principal de reducir la transmisión del CMV. Por ello, se recomienda su uso universal en todas las transfusiones neonatales de eritrocitos y/o plaquetas (36).

Tiene como ventajas adicionales la disminución de la transmisión de otros agentes infecciosos como los virus linfotrópicos humanos tipo I y II (HTLV-I II), el virus Epstein Barr (EBV) y ciertas bacterias como la *Yersinia enterocolitica*. Sin embargo el resto de las reacciones adversas transfusionales prevenibles por leucoreducción en el adulto como las reacciones febriles no hemolíticas, la insuficiencia respiratoria aguda asociada a transfusión (TRALI producido por leucocitos del donante y anticuerpos en el receptor) o la aloinmunización plaquetaria son excepcionales en el RN dada la inmadurez de su sistema inmune (37).

Cuando el RN ha recibido previamente TIU o la sangre proviene de familiares directos de primer o segundo grado de parentesco, los productos celulares a transfundir deben ser irradiados previamente con 25 Gy de **radiación gamma** con el fin de prevenir la reacción de injerto versus huésped que pueden producir los linfocitos del producto. La radiación gamma inhibe la capacidad mitótica de las células nucleadas. Como los eritrocitos y las plaquetas son células que carecen de núcleo no se ven afectados. Las unidades irradiadas deben ser transfundidas a RN dentro de las 24 horas posteriores a la irradiación dado que esta aumenta la concentración del

potasio extracelular. Si se transfunde luego, se debe realizar previamente un lavado de los eritrocitos (38). En suma las indicaciones de irradiación serían las TIU, las transfusiones o exsanguinotransfusiones (EST) en RN que han recibido TIU, cuando la sangre es de familiares directos o cuando existe diagnóstico o sospecha de inmunodeficiencia (39).

Muchas personas piensan que las **transfusiones dirigidas** de familiares o amigos son más seguras que las de donantes al azar. No existe evidencia médica que las donaciones dirigidas tengan menos riesgo de transmitir infecciones que las obtenidas de donantes voluntarios. En algunos casos inclusive pueden ser menos seguras dado que los donantes que conocen al paciente o sus familiares no revelan sus conductas de riesgo y piensan que las pruebas que se realizan a la sangre pueden detectar cualquier enfermedad transmisible. Además las transfusiones realizadas entre familiares directos deben ser obligatoriamente irradiadas previamente con radiación gamma para evitar la reacción de injerto versus huésped. A su vez, las transfusiones entre familiares directos pueden, en el futuro, entorpecer trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas alogénicas.

El plasma materno puede contener anticuerpos dirigidos contra antígenos paternos de los eritrocitos, plaquetas y leucocitos que se pueden expresar en las células fetales. La infusión de este plasma que contiene anticuerpos teóricamente puede producir hemólisis, trombocitopenia o TRALI por transferencia pasiva de anticuerpos. Estos anticuerpos maternos pueden estar dirigidos contra antígenos presentes en los hemocomponentes transfundidos originando reacciones transfusionales agudas como reacciones pulmonares, hemólisis y trombocitopenia postransfusional.

El TRALI que se puede producir por los anticuerpos maternos pasivos y los leucocitos transfundidos se evita con la leucoreducción. Por el contrario, el TRALI que se produce por la transferencia pasiva de anticuerpos del donante no se evita con leucoreducción. Este cuadro de insuficiencia respiratoria aguda postransfusional generalmente está sub-diagnosticado dado que se mimetiza con el síndrome de distress respiratorio agudo neonatal.

Por otro lado, los anticuerpos que pueden estar presentes en el plasma materno pueden estar dirigidos contra antígenos paternos de eritrocitos, plaquetas y leucocitos pero que no se expresan en las células fetales por lo cual no se producirá una reacción antígeno-anticuerpo feto-neonatal in vivo. Pero, en caso de transfusiones dirigidas paternas, las células transfundidas contienen los antígenos específicos para los anticuerpos maternos y se produce una reacción antígeno-anticuerpo neonatal por transferencia materna de anticuerpos y transferencia pasiva de células paternas.

Por último, deben tener una compatibilidad de grupo sanguíneo con el receptor y deben cumplir con todos los requisitos clínicos y paraclínicos de los donantes voluntarios por lo cual muchas veces no están disponibles en caso de urgencias.

Si bien los métodos de **transfusión autóloga** que se practican en el adulto y en niños mayores como la donación de predepósito, la hemodilución normovolémica y la recuperación de sangre del campo quirúrgico no son aplicables en los RN, existen algunas posibilidades para disminuir el número de transfusiones alogénicas. La placenta contiene entre 75 y 125 ml de sangre al nacimiento. Este volumen teóricamente se puede transfundir al neonato para compensar las pérdidas sanguíneas o mejorar la anemia de la prematuridad evitando además la trasmisión de infecciones y la enfermedad de injerto versus huésped. Los intentos de transfundir al RN desde la placenta mediante una ligadura tardía del cordón umbilical puede entrar en conflicto con una necesidad de reanimación que por lo general se realiza lejos de la madre. Las ventajas del **clampeo tardío** serían una menor dificultad respiratoria y una necesidad menor de transfusiones. Como desventajas el retraso en la reanimación, la hipotermia, la policitemia y la necesidad de tratamiento de la hiperbilirrubinemia.

En una revisión Cochrane (40) donde se compara el clampeo precoz con el clampeo tardío del cordón umbilical en prematuros se concluye que el clampeo tardío de cordón, con un retraso de 30 a 120 segundos, parece estar asociado con una menor necesidad de transfusiones y una menor incidencia de hemorragias intraventriculares. En un estudio posterior realizado en 105 neonatos nacidos entre las 30 y 36 semanas de gestación que no requirieron resucitación inmediata, se documentó un aumento de la masa eritrocitaria y del Hto en los que se realizó un clampeo tardío de cordón (41). Sin embargo, la elevación del Hto no se tradujo en una disminución significativa de los requerimientos transfusionales ni tuvo efecto en el score de Apgar al minuto y a los cinco minutos. Tampoco hubo diferencia significativa en la prevalencia de hemorragia intracranéica.

No se observaron, con el clampeo luego de 60 segundos, efectos adversos clínicamente significativos como poliglobulia, hiperviscosidad o hiperbilirrubinemia. Los prematuros de menos de 30 semanas no pudieron incluirse en este estudio de clampeo tardío por dificultades técnicas como la necesidad de reanimación inmediata.

Otra posibilidad es que se realice el clampeo precoz del cordón y se obtenga sangre en una bolsa por punción del cordón mientras se realiza el alumbramiento. En un estudio (42) se obtuvo sangre de cordón en 290 neonatos de término y prematuros. De los 52 prematuros, 30 recibieron transfusión de sangre de cordón por anemia de la prematuridad y los otros por cirugía inmediatamente del nacimiento o dentro del mes de vida.

La cantidad de sangre obtenida de cordón fue suficiente para cubrir el 40% las necesidades transfusionales de los RN con un peso entre 1000 y 2500 g y todos los RN con menos de 1000 g necesitaron transfusiones alogénicas adicionales. Los autores concluyen que para los RN de término que requerirán una cirugía inmediata luego del nacimiento o los de pretérmino mayores de 1000g y menores 35 semanas de gestación, la sangre autóloga

de cordón es una alternativa válida frente a los productos alogénicos. Sin embargo, se encontraron problemas técnicos y una contaminación bacteriana del 8,6% cuando se realizó la extracción de sangre de cordón en prematuros de bajo peso con obtención de menos de 30 ml (20).

En aquellos RN donde la transfusión de sangre de cordón fue posible hubo una elevación de la Hb y el Hto similar a la producida por las transfusiones de donantes al azar (43). En prematuros de menos de 32 semanas el producto autólogo de cordón pudo ser viable tan sólo en el 27% de los RN que requirieron transfusión (20).

La principal indicación de realizar una **exsanguinotransfusión (EST)** en el RN es el tratamiento de la hiperbilirrubinemia indirecta. Los eritrocitos a utilizar serán compatibles con el suero materno y el RN, pueden ser reconstituidos a sangre total con plasma AB carente de aglutininas alfa y beta del sistema ABO, de anticuerpos inmunes y de donantes hombres que carecen de anticuerpos anti-leucocitarios y no producen reacciones pulmonares agudas. Deben tener menos de cinco días de extraídos, serán leucoreducidos y en algunos casos irradiados con radiación gamma como por ejemplo cuando el RN ha recibido TIU. La sangre para la EST contiene por un lado altos niveles de glucosa y sodio pero ha perdido el calcio ionizado. Por ello, la velocidad de recambio máxima es de 2 ml/Kg por minuto y se debe monitorizar la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca así como las respiraciones y la saturación de oxígeno. Durante la EST puede ser necesaria la administración lenta de gluconato de calcio diluido. Luego de la EST se puede producir una hipoglicemia por rebote dado que el anticoagulante tiene niveles altos de glucosa que produce una hiperinsulinemia. También la EST reduce el nivel de plaquetas circulantes en un 50% por lo cual es importante mantener los niveles de plaquetas por encima de 50.000 por mm^3 sobre todo en prematuros por el riesgo de desarrollar hemorragia intraventricular. Otro elemento a tener en cuenta en una EST para evitar complicaciones vitales es la hipotermia. En los RN el stress por frío produce efectos exagerados de hipoglicemia, acidosis metabólica y tendencia a los episodios apneicos que pueden llevar a la hipoxia, hipotensión y paro cardíaco. Por tanto, debemos calefaccionar el ambiente, al RN y la sangre para realizar la EST.

Para calefaccionar la sangre se utilizan calefactores en línea por calor húmedo o seco con control de temperatura a 37° centígrados dado que los eritrocitos a 41° centígrados se hemolisan.

No deben emplearse calefacciones radiantes y cuando el RN se encuentra en fototerapia tener cuidado que los eritrocitos no se espongan a la radiación. Las alícuotas de hemocomponentes colocados en jeringas no deben ser calefaccionadas en baños de agua por el riesgo de contaminación. Es aconsejable calefaccionar la bolsa del hemocomponente o su fracción en los banos de agua a 37° centígrados con una bolsa protectora 30 minutos antes de la transfusión y luego adicionar a la jeringa para la infusión tien-

do cuidado que esta no quede expuesta a radiación solar directa o luminosa como la fototerapia. En el otro extremo, el frío extremo a 0 centígrados puede también producir la lisis de los eritrocitos. Por ello, los eritrocitos para transfusión deben ser almacenados en heladera entre 2 a 8 centígrados pero con un monitoreo estricto de la temperatura dado que el margen inferior es tan sólo de dos grados. Las consecuencias de una hemólisis por almacenamiento pueden ser transferidas pasivamente al RN confundiendo un cuadro clínico por hemólisis aguda, no se elevará el nivel de Hb y se aportarán estromas celulares inmunogénicos innecesariamente sin el efecto terapéutico deseado. Es aconsejable siempre realizar una inspección óptica del sobrenadante del hemocomponente y/o realizar una prueba de hemólisis previa a la infusión .

Todos los hemocomponentes deben ser infundidos a través de una guía que contenga un filtro de 170 micras. No se pueden utilizar tubuladuras para sueros que carecen de filtros. Las alícuotas en jeringas deben ser retiradas de la guía de infusión luego de la filtración. La mayoría de los neonatos se transfunden para corregir la anemia en dosis de 10 a 20 ml/Kg de peso de eritrocitos concentrados.

Aquellos RN que reciben TIU y/o EST pueden presentar además de la anemia precoz fetal o neonatal una **anemia tardía** hasta los tres meses de vida. La anemia tardía hiporegenerativa con niveles bajos de reticulocitos y EPO es la principal complicación de neonatos con EHP debido al “feedback” negativo sobre la médula ósea que se produce por el rápido aumento de la Hb A por una TIU o EST. Otro factor causal es la reducción de la vida media de los eritrocitos transfundidos. La incidencia de anemia tardía en neonatos con EHP tratados con TIU y/o EST es de 71 al 83% (44). Este tipo de anemia usualmente se resuelve a los tres meses de vida. Mientras tanto controles clínico y paraclínicos semanales deben ser realizados. Los neonatos de término serán tratados con transfusiones de eritrocitos cuando la hemoglobina sea menor a 8 g/dl en neonatos estables clínicamente o cuando la Hb sea menor a 9.5 g/dl pero con síntomas de anemia presentes como taquicardia, taquipnea, se prende menos a pecho, hiporeactivo, etc. Tanto la EPO como la suplementación con ácido fólico o hierro no estarían recomendadas (45) (46) (47).

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Van Kamp IL, Klumper FJ, Bakkum RS et al. The severity of immune fetal hidrops is predictive of fetal outcome after intrauterine treatment. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:668-673.
- 2- Alonso JG, Decaro J, Marrero A, Lavalle E, Martell M, Cuadro JC. Repeated direct fetal intravascular high-dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh hemolytic disease. *J Perinat Med*. 1994;22:415-419.
- 3- Xu J, Raff T, Muallem NS, Neubert G. Hydrops fetalis secondary to Parvovirus B19 infections. *J Am Board Fam Pract* 2003;16:63-68.
- 4- Sepúlveda W, Corral E, Dezerega V, Devoto JC, Schnapp C, Alcalde JL. Transfusión feto-fetal: Resultado perinatal exitoso con cirugía endoscópica láser. *Revista Chilena de Ultrasonografía* 2003;6:126-129.
- 5- Denbow ML, Sepúlveda W, Ridout D, Fisk NM. Relationship between change in amniotic fluid index and volume of fluid removed at amnioreduction. *Obstet Gynecol* 1997;90:529-532.
- 6- Ville y, Hyett J, Hecher K, Nicolaidis K. Preliminary experience with endoscopic laser surgery for severe twin-twin transfusion syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:224-227.
- 7- Senat MV, Deprest J, Boulvain M, Paupe A, Winer N, Ville y. Endoscopic laser surgery versus serial amnioreduction for severe twin-to-twin transfusion syndrome. *N Engl J Med* 2004;351:136-144.
- 8- Trevett T, Moise K. Twin pregnancy complicated by severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-G anti-C. *Obstetrics and Gynecology* 2005;106:1178-1180.
- 9- Scasso JC, Decaro J, Lieutier G, Mautone M. Embarazo gemelar Rh negativo sensibilizado con afectación de un sólo feto. *Arch Ginec y Obstet* 1981;30: 243.
- 10- Umstad MP, Gronow MJ. Multiple pregnancy: a modern epidemic?. *MJA* 2003;178:613-615.
- 11- Taylor MJO, Fisk NM. Multiple pregnancy. *The Obstetrician and Gynecologist* 2000;2:4-10.
- 12- Kiely JL, Kiely M. Epidemiological trends in multiple births in the United States, 1971-1988. *Twin Res* 2001;4:131-133.
- 13- Moise K. The usefulness of middle cerebral artery Doppler assessment in the treatment of the fetus at risk of anemia. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:161e1- 161e4.
- 14- Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise K, Dorman K, Ludomirsky A, Gonzalez R, Gomez R, Oz U, Detti L, Copel J, Bahadio-Singh R, Berry S, Martinez-Poyer J, Blackwell S. Noninvasive diagnosis by doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med* 2000;342:9-14.
- 15- Robyr R, Lewi L, Salomon LJ et al. Prevalence and management of late fetal complications following successful selective laser coagulation of chorionic plate anastomoses in twin-to-twin transfusion syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:796-803.
- 16- Van Dijk BA, Boomsma DI, de Man AJM. Blood group chimerism in human multiple births is not rare. *American Journal of Medical Genetics* 1996;61:264-268.
- 17- Schonewille H, Klumper FJ, van de Watering LM, Kanhai HH, Brand A. High additional maternal red cell alloimmunization after Rhesus-and K-matched intrauterine intravascular transfusions for hemolytic disease of the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:143-146.
- 18- American Association of Blood Banks (AABB) Manual Técnico 15ed. En español capítulo 24 página 587. Ed AAHI Buenos Aires-Argentina 2007
- 19- Gibson BE, Todd A, Roberts I et al. Transfusion guidelines for neonates and older children. *Br J Haematol* 2004;124:433-453.
- 20- Von Lindern JS, Brand A. The use of blood products in perinatal medicine. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2008;13:272-281.
- 21- Lasker MR, Eddleman K, Toor AH. Neonatal hepatitis and excessive hepatic iron deposition following intrauterine blood transfusion. *Am J Perinatol* 1995;12:14-17.
- 22- Widness JA, Madan A, Grindeanu LA, Zimmerman MB, Wong DK, Stevenson DK. Reduction in red blood cell transfusion among preterm infants: results of a randomized trial with an in-line blood gas and chemistry monitor. *Pediatrics* 2005;115:1299-1306.
- 23- Madan A, Kumar R, Adam MM, Benitz WE, Geaghan SM, Widness JA. Reduction in red cell transfusions using a bedside analyzer in extremely low birth weight infants. *J Perinatol* 2005;25:21-25.
- 24- Strauss RG. How I transfuse red blood cells and platelets to infants with the anemia and

- thrombocytopenia of prematurity. *Transfusion* 2008;48:209-217.
- 25- Vamvakas EC, Strauss RG. Meta-analysis of controlled clinical trials studying the efficacy of recombinant human erythropoietin in reducing blood transfusions in the anemia of prematurity. *Transfusion* 2001;41:406-415.
- 26- Aher SM, Ohlsson A. Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3 Art. No. CD004865.
- 27- De la Torre MJ, Gascón FJ, Zapatero M, Guzmán J, Muñoz D, Ruiz D, Jaraba P. Profilaxis de la anemia de la prematuridad con eritropoyetina. Estudio caso-control. *An Esp Pediatr* 2000;53:243-248.
- 28- Ramasethu J, Luban NL. Red blood cell transfusions in the newborn. *Semin Neonatol* 1999;4:5-16.
- 29- Bell EF, Strauss RG, Widness JA, Mahoney LT, Mock DM et al. Randomized trial of liberal versus restrictive guidelines for red blood cell transfusions in preterm infants. *Pediatrics* 2005;115:1685-1691.
- 30- Kirpalani H, Whyte RK, Andersen C et al. The Premature Infants in Need of Transfusion (PINT) study: a randomized, controlled trial of a restrictive (low) versus liberal (high) transfusion threshold for extremely low birth infants. *J Pediatr* 2006;149:301-307.
- 31- Strauss RG. Data-driven blood banking practices for neonatal blood transfusions. *Transfusion* 2000;40:1528-1540.
- 32- Tare N, Pill J, Haselbeck A. Preclinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of CERA (continuous erythropoiesis receptor activator) a new erythropoietic agent for anaemia management in patients with kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(suppl 4):166 (abstract M526).
- 33- Sulowicz W, Locatelli F, Tychelynck JP, Balla J, Csilyk B, Harris K, Ehrhard P, Beyer U; on behalf of the PROTOS Study investigators. Once-monthly subcutaneous CERA maintains stable hemoglobin control in patients with chronic kidney disease on dialysis converted directly from epoetin one to three times weekly. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:637-646.
- 34- Lacroix J, Hebert PC, Hutchison JS et al. Transfusion strategies for patients in pediatric intensive care units. *N Engl J Med* 2007;356:1609-1619.
- 35- Greaves S, Ramirez A, Woodfield DG. Pediatrics packs for neonatal blood transfusions. *Journal of Pediatrics and Child Health* 2008;18:202-204.
- 36- Strauss RG. Data-driven blood banking practices for neonatal RBC transfusions. *Transfusion* 2000;40:1528-1540.
- 37- Pisciotto PT. Blood transfusion in children: pediatric transfusion practices beyond the neonatal period. *Transfusion* 2008;48:8-9.
- 38- Red blood cell transfusions in newborn infants: Revised guidelines. Fetus and Newborn Committee, Canadian Pediatric Society (CPS) *Pediatrics and Child Health* 2002;7:553-558.
- 39- Transfusion guidelines for neonates and older children. *BJH* 2004;124:433-453.
- 40- Rabe H, Reynolds G, Diaz-Rosello J. Clampeo precoz versus clampeo tardío del cordón umbilical en prematuros. *Cochrane Database Systemic Review* 2006 Nro 2.
- 41- Strauss RG, Mock DM, Johnson KJ, Cress GA, Burmeister LF, Zimmerman MB, Bell EF, Rijhsinghani A. A randomized clinical trial comparing immediate versus delayed clamping of the umbilical cord in preterm infants: short-term clinical and laboratory endpoints. *Transfusion* 2008;48:658-665.
- 42- Brune T, Garritsen H, Johnson KJ et al. Autologous placental blood transfusion for the therapy of anaemic neonates. *Biol Neonate* 2002;81:236-243.
- 43- Eichler H, Schaible T, Richter E et al. Cord Blood as a source of autologous RBCs for transfusion to preterm infants. *Transfusion* 2000;40:1111-1117.
- 44- Smits-Wintjens VEHI, Walther FJ, Lopriore E. Rhesus haemolytic disease of the newborn: Postnatal management, associated morbidity and long term outcome. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2008;13:265-271.
- 45- Aher SM, Ohlson A. Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Systemic Review* 2006;3. CD 004865.

- 46- Yilmaz S, Duman N, Ozer E et al. A case of rhesus hemolytic disease with hemophagocytosis and severe iron overload due a multiple transfusions. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28:290-292.
- 47- Koenig JM, Ashton RD, De Vore GR, Christensen RD. Late hyporegenerative anemia in Rh hemolytic disease. *J Pediatr* 1989;115:315-318.
- 48- Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:348-355.
- 49- Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Helder Mota P, Sheaff M, et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2115-2124.
- 50- Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med* 2008;359:2254-2265.
- 51- International Forum: Neonatal Transfusions. *Vox Sanguinis* 2009;96:62-85
- 52- Dani C, Perugi S, Benuzi A, Corsini I, Bertini G, Pratesi S, Rubaltelli F. Effects of red blood cell transfusions during the first week of life on acid-base, glucose, and electrolytes in preterm neonates. *Transfusion* 2008;48:23022307.

CAPÍTULO 3 - POLICITEMIA PERINATAL E HIPERVISCOSIDAD

Un aumento de la masa eritrocitaria del recién nacido (RN) que se traduce por una elevación del hematocrito puede producir un incremento de la viscosidad sanguínea y un síndrome por disfunción orgánica.

La viscosidad sanguínea es influenciada por varios factores celulares, plasmáticos y vasculares. La masa eritrocitaria es el factor más importante en los neonatos dado que la deformabilidad de los glóbulos rojos del RN es mayor que en el adulto. Las otras células sanguíneas casi no influyen en la hiperviscosidad sanguínea neonatal salvo en los casos de leucemias congénitas. Hay un aumento de la viscosidad en los vasos de pequeño calibre mientras que en los grandes vasos como la aorta el flujo sanguíneo es mayor. La viscosidad plasmática depende casi exclusivamente de la concentración de las proteínas plasmáticas pero las causas de paraproteinemia (IgM monoclonal) más frecuentes del adulto como la macroglobulinemia de Waldstrom o el mieloma múltiple no se presentan en el período neonatal. El fibrinógeno tiene en el RN una concentración descendida con respecto al adulto por lo cual tampoco influye sobre la viscosidad sanguínea neonatal. En suma, en el RN la hiperviscosidad sanguínea depende casi directamente de la policitemia y quizá por ello muchos las usan como sinónimos aunque fisiopatológicamente no lo son.

Se define la policitemia neonatal como el aumento anormal de la masa eritrocitaria con un hematocrito (Hto) venoso mayor a 65% o una hemoglobina (Hb) superior a 22 g/dl en la primer semana de vida.

El Hto capilar es significativamente mayor que el venoso e influenciado por las variaciones del flujo sanguíneo por lo cual la policitemia debe confirmarse siempre por un Hto venoso (1).

La incidencia de la policitemia es de 1,5 a 4% de todos los nacimientos (2) pero, los pretérminos de menos de 34 semanas raramente desarrollan policitemia (3).

Los términos de policitemia e hiperviscosidad son tomados muchas veces como equivalentes y sin embargo sólo el 47% de los neonatos con policitemia presentan hiperviscosidad y el 24% de los neonatos con hiperviscosidad presentan policitemia.

Los síntomas y signos principales de la policitemia son la rubicundez, dificultad para prenderse al pecho materno y letargia. El diagnóstico es clínico y paraclínico por el aumento del Hto.

Los principales síntomas y signos del síndrome de hiperviscosidad sanguínea son cianosis, ictericia, taquipnea y falla renal. Dado que las mediciones de la viscosidad sanguínea habitualmente no están disponibles el diagnóstico de hiperviscosidad por lo general es clínico y asociado a una policitemia.

La policitemia puede ser secundaria, en primer lugar, a una transfusión

fetal o neonatal por clampeo tardío del cordón umbilical, por transfusión feto-fetal o por transfusión materno fetal por ejemplo al colocar el RN debajo del nivel placentario antes de ligar el cordón.

En segundo lugar, la policitemia se puede producir como mecanismo compensador de una hipoxia fetal o asfixia perinatal como en el retardo de crecimiento intrauterino, hipertensión gestacional, diabetes materna, enfermedad cardíaca cianótica materna, postmadurez, gestante fumadora.

En los hijos de madres diabéticas el 29% presentaba policitemia mientras que los RN de madres no diabéticas ocurría en el 6% (17). La infusión de insulina causa aumento de la masa eritrocitaria en animales (18) y la concentración de eritropoyetina (EPO) fetal se correlaciona con los niveles de insulina (19). A su vez, estos neonatos tienen un riesgo aumentado de trombosis especialmente de la vena renal (20).

También en los hijos de madres fumadoras hay un aumento de la EPO en el cordón umbilical (21) y este valor está en relación con el número de cigarrillos consumidos dado que la EPO no atraviesa la placenta.

Por último, la policitemia se puede deber al aumento de la altitud sobre el nivel del mar o a causas fetales como hiperplasia adrenal congénita, síndrome de Beckwith-Weiderman, trisomías del 13, 18 y 21 e hipertiroidismo.

En un estudio realizado en la División Neonatología del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá de Buenos Aires sobre un total de 31447 registros analizados del Sistema Informático Perinatal (SIP) desde 1996 al 2000 la prevalencia de policitemia neonatal fue del 1,6% (4). Se observó una asociación estadísticamente muy significativa entre riesgo aumentado de policitemia en presencia de hipertensión arterial, preeclampsia, eclampsia, embarazo múltiple y diabetes gestacional. A su vez, la frecuencia de policitemia supera la media de la población (1,6%) en presencia de bajo peso y alto peso para la edad gestacional.

Los síntomas y signos y parámetros de laboratorio de la policitemia con síndrome de hiperviscosidad son: rechazo al alimento, succión débil, vómitos, letargia, hipotonía, apnea, temblores, convulsiones, trombosis venosa cerebral, robicundez, cianosis, taquicardia, taquipnea, soplo cardíaco, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomegalia, resistencia pulmonar aumentada, disminución de la filtración glomerular, disminución de la excreción de sodio, trombosis de la vena renal, hematuria, proteinuria, trombocitopenia, ictericia, hipoglicemia, hipocalcemia, reticulocitosis, normoeritroblastos, enteritis necrotizante.

En un estudio realizado en Chile (14), se encontró que el 2,4% de los RN presentaban poliglobulia neonatal de los cuales 13,9% tenían antecedentes de hipertensión gestacional, 6,65% retardo de crecimiento intrauterino, 6,43% diabetes gestacional, 43% fueron pequeños para la edad gestacional y 22,8% grandes para la edad gestacional. Cinco RN presentaron síndrome de Down. 29,5% presentaron síntomas siendo el 64,2% metabólicos, el

20,1% del sistema nervioso central y el 6,9% robicundez. Se concluye que la poliglobulia neonatal afecta principalmente a RN de término, pequeños y grandes para la edad gestacional, con antecedentes de hipoxia intrauterina.

La viscosidad sanguínea aumenta en forma exponencial cuando el volumen de los eritrocitos neonatales excede el 65% en el Hto.

Como causa de aumento del Hto siempre se debe descartar una deshidratación que produce policitemia relativa.

Los neonatos con policitemia verdadera se pueden clasificar clínicamente en sintomáticos con Hto superiores al 65% o asintomáticos. Los sintomáticos deben ser tratados con hemodilución o exsanguinotransfusión parcial (PET). En los asintomáticos con Hto superior a 65% se deben monitorear para la aparición de sintomatología y considerar la hidratación (1). El objetivo de la PET es llevar el Hto a 55% para disminuir la hiperviscosidad con el fin de mejorar la sintomatología pero manteniendo el volumen sanguíneo. La hemodilución normovolémica debe realizarse con extracciones de sangre en alícuotas de 5ml/Kg con reemplazo de igual volumen de solución salina fisiológica 0,9%. En un estudio (5), se demuestra que tanto la albúmina al 5% como la solución salina isotónica son igualmente efectivos cuando se utilizan como fluidos de reemplazo en la PET. Dos revisiones sistemáticas (6)(7) llegaron a la misma conclusión que las soluciones cristaloides son tan efectivas como las coloidales para la realización de PET. La solución salina tiene como ventajas que no transmite infecciones, no produce anafilaxia, está rápidamente disponible en forma universal y es menos costosa.

Los neonatos con policitemia pueden presentar vómitos y rechazo por el alimento (8) pero también se sugiere la asociación entre policitemia y enterocolitis necrotizante (NEC) (9). En un estudio randomizado (10), se observó que el 6% de los neonatos policitémicos no tratados tenían síntomas gastrointestinales mientras que el 51% de los que se trataron con PET mostraban síntomas gastrointestinales severos incluyendo NEC.

Este estudio sugiere que el factor de riesgo más importante para desarrollar NEC es la PET y no la policitemia. Aquellos que reciben plasma fresco (PF) como fluido de reemplazo son los de mayor riesgo.

El plasma de donantes adultos aumenta la viscosidad sanguínea cuando se mezcla con eritrocitos fetales (1).

En una reciente revisión (11), se muestra que la PET realizada por los vasos umbilicales puede asociarse a un riesgo incrementado de NEC.

Sin embargo, la asociación no es siempre sinónimo de causa. Recientemente se ha publicado un caso de NEC luego de transfusión intrauterina (TIU) sin embargo no hubo una asociación significativa entre NEC y TIU en el resto de los casos estudiados (15).

No existe hasta el momento evidencia científica consistente que muestre una asociación entre la NEC y la transfusión de hemocomponentes (16).

En algunos centros se suspende la alimentación del RN durante algunas horas mientras dure la transfusión de hemocomponentes. Si bien esto puede tener beneficios teóricos no existe evidencia científica que fundamente esta práctica (16).

El volumen total a intercambiar en la PET se calcula multiplicando la volemia (80-90 ml/Kg para RN de término y 90-100 ml/Kg para prematuros) por la diferencia entre el HTO hallado y el que se quiere alcanzar y dividido por el valor del Hto hallado. En un RN de término de tres kilos por ejemplo con un Hto de 70% que se desea llevar a un 55% la ecuación anterior determina un volumen total para la PET de 58cc.

Una regla rápida puede ser la de 20 ml/Kg.

La PET revierte las alteraciones fisiológicas asociadas con la policitemia e hiperviscosidad. Mejora la percusión capilar, el flujo sanguíneo cerebral y la función cardíaca.

Comparado con el adulto, los neonatos tienen prolongados los tiempos de coagulación como el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de trombo-plastina parcial activado (APTT) con niveles reducidos de factores procoagulantes y anticoagulantes excepto los cofactores (FVIII y FV) y la alfa2-macroglobulina. A veces, se plantea la realización de PET con plasma fresco para corregir los valores de los test de coagulación.

Los neonatos tienen disminuida la síntesis de los factores procoagulantes que prolongan el PT y APTT. Sin embargo, los neonatos tienen una hemostasis normal después de un trauma o cirugía e inclusive pueden desarrollar trombosis (12). La concomitante reducción en los niveles de los anticoagulantes naturales que se produce en los neonatos juega un rol determinante en el mantenimiento del equilibrio hemostático entre la hemorragia y la trombosis. Estudios recientes realizados en neonatos utilizando pruebas de generación de trombina (TG) que exploran el sistema anticoagulante han contribuido a desarrollar el concepto que la reducción de los niveles de factores procoagulantes es compensado por un descenso de los anticoagulantes naturales (13). Estos hallazgos estarían contraindicando el uso de plasma en la PET aun en neonatos con PT o APTT prolongados. En suma, el balance hemostático in vivo en los neonatos es mantenido por el concomitante descenso de los factores pro-coagulantes y anticoagulantes naturales. Este balance debe ser estudiado in vitro por test de generación de trombina con trombomodulina y no por los test convencionales como el PT o APTT (13).

No se ha demostrado que la PET realizada en neonatos policitémicos asintomáticos tenga un efecto beneficioso en un seguimiento a largo plazo (11) (14).

En suma, la PET es un tratamiento recomendado para los neonatos con policitemia e hiperviscosidad sintomáticos. No existe justificación para usar otro fluido de reemplazo que nos sea la solución salina fisiológica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Jeevasankar M, Agarwal R, Chawla D, Paul VK, Deorari AK. Polycythemia in the newborn. *Indian Journal of Pediatrics* 2008;75:68-72.
- 2- Stevens K, Wirth FH. Incidence of neonatal hyperviscosity at sea level. *Pediatrics* 1980;97:118.
- 3- Sarkar S, Rosenkrantz TS. Neonatal Polycythemia and hyperviscosity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2008;13:248-255.
- 4- Enriquez D, Grandi C, Largaía M. Factores de riesgo para la policitemia neonatal. Nuevo enfoque. *Rev Hosp. Mat Inf Ramón Serdá* 2002;21:114-116.
- 5- Wong W, Fok TF, Lee CH, Ng PC, So RW, Ou Y, Cheung KL. Randomised controlled trial: comparison of colloid or crystalloid for partial exchange transfusion for treatment of neonatal polycythaemia. *Archives of Disease in Childhood* 1997;77:F115-F118.
- 6- De Waal KA, Baerts W, Offringa M. Systematic review of the optimal fluid for dilutional exchange transfusion in neonatal polycythemia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91:F7-F10.
- 7- Dempsey EM, Barrington K. Crystalloid or colloid for partial exchange transfusion in neonatal polycythemia: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr* 2005;94:1650-1655.
- 8- Host A, Ulrich M. Late prognosis in untreated neonatal polycythemia with minor or no symptoms. *Acta Paediatr Scand* 1982;71:629-633.
- 9- Hakanson DO, Oh W. Necrotizing enterocolitis and hyperviscosity in the newborn infant. *J Pediatr* 1977;90:458-461.
- 10- Black VD, Rumack CM, Lubchenko LO et al. Gastrointestinal injury in polycythemic term infants. *Pediatrics* 1985;76:225-231.
- 11- Dempsey EM, Barrington K. Short and long term outcome following partial exchange transfusion in polycythaemic newborn: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91:F2-F6
- 12- Nowak-Gottl U, Kosch A, Schlegel N. Neonatal thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:227-234.
- 13- Tripodi A, Ramenghi LA, Chantarangkul V, De Carli A, Clerici M, Groppo M, Mosca F, Mannucci PM. Normal thrombin generation in neonates in spite of prolonged conventional coagulation test. *Haematologica* 2008;93:1256-1259.
- 14- Sehlke P, Muhlhausen M. Revisión de 451 casos de poliglobulia neonatal. *Rev Chil Pediatr* 2003;74:417-420.
- 15- Rao SC, Patote SK, Dickinson JE, Reid KP, Doherty DA. Neonatal necrotizing enterocolitis following intrauterine transfusions: is there an association?. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;16:51-54.
- 16- Agwu JC, Narchi H. In a preterm infant, does blood transfusions increase the risk of necrotizing enterocolitis?. *Arch Dis Child* 2004;10:102-103.
- 17- Mimouni E, Miodovnik M, Siddiqi Ta et al. Neonatal polycythemia in infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Obstet Gynecol* 1986;68:370-372.
- 18- Stonestreet BS, Goldstein M, Widness JA. Effects of prolonged hyperinsulinemia on erythropoiesis in fetal sheep. *Am J Physiol* 1989;257:R1119-R1204.
- 19- Widness JA, Susa JB, Garcia JE et al. Increased erythropoiesis and elevated erythropoietin in infants born to diabetic mothers and in hyperinsulinemic rhesus fetuses. *J Clin Invest* 1981; 67:637-642.
- 20- Cowett RM, Schwartz R. The infant of the diabetic mother. *Pediatr Clin North Am* 1982;29:1213-1231.
- 21- Varvarigou A, Beratis NG, Makri M, Vagenakis AG. Increased levels and positive correlation between erythropoietin and hemoglobin concentrations in newborn children of mothers who are smokers. *J Pediatr* 1994;124:480-482.

CAPÍTULO 4 – ENFERMEDAD HEMOLÍTICA PERINATAL

4.1 - INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemolítica perinatal (EHP) fue descrita clínicamente por primera vez en 1609 en un embarazo gemelar de una madre francesa. El primer gemelar tuvo un hidrops y fallece y el segundo desarrolló una ictericia falleciendo luego por un cuadro que actualmente conocemos como kernicterus. Recién en 1932 Diamond et al. (1) demostraron que los dos cuadros clínicos, el hidrops fetal y el kernicterus postnatal eran dos aspectos de la misma patología, la hemólisis de los glóbulos rojos del feto y el neonato. Esta EHP producía eritropoyesis extramedular, hepatoesplenomegalia y la liberación a la circulación de eritroblastos como forma de compensar la anemia producida por la hemólisis de ahí el término de Eritroblastosis Fetalis que se utilizó para denominar a este cuadro clínico. La identificación de la causa de la EHP no ocurre hasta 1940 cuando se descubre el sistema Rh demostrándose que la hemólisis ocurría en un feto Rh(D) positivo en una madre Rh(D) negativa que había sido previamente inmunizada por embarazos anteriores (2). En Canadá, en 1940 la tasa de mortalidad perinatal era de 40 por 1000 nacimientos. El 10% de estas muertes se debían a EHP (3). La introducción en 1946 de la exsanguinotransfusión (EST) (4), mediante la cual las células Rh(D) positivas del neonato eran reemplazadas por glóbulos rojos Rh(D) negativos de un donante, redujo las muertes por esta patología a la mitad y previno la hemólisis y el kernicterus que se producía por el depósito de bilirrubina no conjugada en el cerebro. Un problema remanente fue el hidrops fetalis dado que el diagnóstico en útero de la EHP era casi nulo y la mitad de los hidrops ocurrían antes de las 34 semanas de gestación. La inducción del trabajo de parto o la realización de cesárea desde la semana 32 de gestación disminuyó los riesgos de hidrops pero aumentó los riesgos por prematuridad. Así, se obtenían neonatos sin afectación o moderadamente afectados que morían por prematuridad. En 1961, se introduce la medición de la bilirrubina en el líquido amniótico mediante espectrofotometría como forma de estimar la severidad de la hemólisis fetal, método diagnóstico que se utiliza hasta el momento actual. En 1964, la tasa de muerte por EHP en Manitoba-Canadá se redujo del 25% al 16% de todos los afectados. Se introduce luego, como método terapéutico antenatal la transfusión intrauterina en la cavidad peritoneal del feto de glóbulos rojos Rh(D) negativos para combatir la anemia fetal y prevenir el hidrops (5). El desarrollo posterior de la ecografía, la obtención de muestras de sangre fetal por cordocentesis y la transfusión intrauterina intravascular (6) hicieron que la tasa de mortalidad en Manitoba descendiera al 2 % en el período comprendido entre 1986 y 1995 (3).

En 1993 JT Queenan y colaboradores (7) establecen un nuevo gráfico para representar los valores de densidad óptica de las embarazadas aloimmunizadas. Se proponen 4 zonas en lugar de tres del gráfico de Liley para diferenciar a los fetos afectados y no afectados comenzando además en la semana 14 de gestación lo cual permite realizar amniocentesis precoces alrededor de la semana 18 a 20 de gestación límite en el cual comienzan a pasar los anticuerpos maternos hacia el feto.

En nuestro país, en 1982, un grupo de médicos del Hospital de Clínicas y del Centro Latinoamericano de Perinatología (CLAP) **escribía un libro donde se describían todos los métodos de diagnóstico así como los tratamientos pre y postnatales utilizados en la EHP por aloimmunización anti-D**. También se determinaba en que la única forma de eliminar las muertes producidas por la EHP era realizar una correcta profilaxis mediante la administración de inmunoglobulina anti-D post parto, post aborto, post amniocentesis, etc. Dicho esfuerzo comunitario fue premiado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay con el premio “EL País” con lo cual se logró la publicación del libro y su distribución en forma gratuita (8). Los autores tuvimos el honor de que el prólogo y el prefacio de la edición fueran escritos por dos académicos, los profesores Fernando Herrera Ramos y Roberto Caldeyro Barcia quienes lucharon incansablemente para vencer esta patología. Recordamos las palabras del Prof Herrera Ramos quien nos dijo “quien haya visto como yo un niño con kernicterus no se olvida nunca mas”.

El mismo grupo de médicos pensó que además de lograr la difusión de los conocimientos de la EHP debía pautar el seguimiento de esta patología tanto en el período prenatal como en el postnatal para lo cual propusieron las “**Normas de prevención, diagnóstico y tratamiento de la EHP por conflicto Rh(D)**” a las que se les otorgó el primer premio de la Asociación Medica del Uruguay (9) y luego fueron adoptadas como normas nacionales por el Ministerio de Salud Pública.

También en 1982 se presenta el **primer caso en el Uruguay** de un recién nacido vivo obtenido por cesárea a las 32 semanas de gestación luego que se le practicaran a la madre procedimientos de recambios plasmáticos intensivos mediante un separador celular con el fin de disminuir la concentración de anticuerpos maternos y por ende la hemólisis fetal. La madre de 40 años de edad, sin hijos vivos, con antecedentes de muertes intrauterinas producidas por EHP, había sido inmunizada por transfusiones de sangre Rh(D) positivas en un episodio de hemorragia digestiva previo a las gestaciones (8).

En 1994, publicamos el **primer caso mundial** de administración de inmunoglobulina a altas dosis en los vasos umbilicales del feto mediante cordocentesis como forma de prevenir la hemólisis fetal producida por EHP. Ya se había demostrado que altas dosis de inmunoglobulina administrada intravenosa a neonatos disminuía la hemólisis por bloqueo de los receptores Fc de los macrófagos reduciendo la necesidad de exsanguinotransfusiones en los recién nacidos afectados por EHP (10). Por ello, planteamos

la hipótesis que altas dosis de inmunoglobulina administrada intravascular en el feto debía reducir la hemólisis y por ende la necesidad de transfusiones intrauterinas ya que el mecanismo fisiopatológico es similar en el feto y en el neonato.

En el caso clínico publicado el feto presentaba a las 28 semanas de gestación una afectación severa determinada por el incremento de la densidad óptica con un alto riesgo de desarrollar hidrops y/o muerte intrauterina. Mediante cordocentesis (punción de los vasos umbilicales bajo seguimiento ecográfico) se realizan 4 infusiones de inmunoglobulina a altas dosis consiguiendo un aumento del hematocrito fetal y un descenso de la densidad óptica del líquido amniótico sin necesidad de transfusiones intrauterinas. Cinco años mas tarde, en 1999 autores austríacos publican en la revista Transfusión de la American Association of Blood Bank (AABB) 13 casos de administración de inmunoglobulina en el cordón umbilical de fetos afectados por EHP (11). En 1990 se publica el **método de inmunoprecipitación en gel** por Lapierre y colaboradores (12) el cual nace en el Centro Regional de Transfusión sanguínea de Lyon-Francia.

Este método diagnóstico es utilizado por nosotros a partir del año 1995 para determinar el grupo sanguíneo y la búsqueda de anticuerpos inmunes en recién nacidos, embarazadas, donantes de sangre y/o pacientes. Es una microtécnica que permite una macrolectura, con reactivos ya incorporados lo cual disminuye el error técnico, con lector automático en un sistema computarizado que transcribe directamente los resultados evitando de esta manera el error administrativo. La mayor sensibilidad del método comparado con la técnica en tubo utilizada hasta ese momento queda demostrada por los siguientes hechos:

- a) la mayoría de los recién nacidos (RN) con conflictos por grupo ABO tenían un test de Coombs directo (TCD) negativo con la tradicional técnica en tubo a pesar de presentar síntomas y signos de EHP. Con la técnica en gel la mayoría de los RN con conflicto ABO presentan TCD positivo.
- b) Las embarazadas Rh negativas que reciben inmunoprofilaxis durante la gestación deben esperar mas de 8 semanas para repetir los estudios inmunohematológicos dado que la técnica en gel detecta los anticuerpos anti-D pasivos administrados con la inyección i/m de 300 microgramos inmunoglobulina.
- c) Dos trabajos científicos recientes (13) (14) concluyen que la técnica de inmunoprecipitación en gel es superior a la técnica en tubo para el diagnóstico en la incompatibilidad feto materna y en la realización del test de Coombs directo para detectar anticuerpos y/o fracciones del complemento adheridos a los glóbulos rojos.

La aplicación de esta técnica ha traído un cambio fundamental en el seguimiento de la EHP. En 1982 proponíamos que en la primera consulta se le realizara a la embarazada la determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh (D). Si era Rh(D) positivo no se le realizaban mas controles durante la

gestación. Si era Rh(D) negativa se le investigaba la presencia de anticuerpos anti-D (aglutininas). Si las aglutininas eran negativas se repetían cada 4 semanas hasta el final de la gestación. Si eran positivas se titulaban y de acuerdo al título se tomaban conductas diagnósticas y/o terapéuticas.

Con el transcurrir de los años se demostró que los títulos del anticuerpo materno no debían ser utilizados como diagnóstico de severidad fetal (15) y menos aún como indicadores de conductas terapéuticas dado que existían afectaciones fetales leves con títulos altos de anticuerpos y por el contrario afectaciones fetales severas con títulos relativamente bajos.

A su vez que la madre tenga anticuerpos circulantes no significa que exista EHP. Para ello se deben dar dos condiciones más, una que el anticuerpo sea del tipo IgG que atraviesa la placenta hacia el feto y dos que el feto posea el antígeno correspondiente. Así pueden existir títulos crecientes de anticuerpos anti-D en mujeres con fetos Rh(D) negativos dado que el embarazo es un estímulo inespecífico del sistema inmunitario.

Por otro lado, se observó que se producían muertes intrauterinas o nacían recién nacidos afectados con EHP en madres Rh (D) positivas por la presencia de otros anticuerpos IgG diferentes a los ABO o anti-D.

Muchos de estos anticuerpos eran producidos por embarazos anteriores, transfusiones de sangre generalmente innecesarias y últimamente por drogadicción intravenosa. En un intento por disminuir el número de transfusiones alogénicas que se realizan a las mujeres en edad genital activa publicamos en 1999 el “Manual de Medicina Transfusional” (16), Premio El País 1997 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay, donde se realiza una revisión de las indicaciones de transfusión de hemocomponentes.

Actualmente proponemos como **esquema de seguimiento inmunohematológico de la gestación** la búsqueda de anticuerpos inmunes en el primer trimestre por la técnica de inmunoprecipitación en gel. Si la investigación da un resultado negativo y la embarazada es Rh(D) positiva no se debe realizar más controles serológicos durante la gestación. Si es Rh(D) negativa con anticuerpos negativos se debe realizar un nuevo control a las 25 semanas de la gestación en lugar de los controles cada 4 semanas propuesto en 1982.

Si la investigación de anticuerpos es positiva para lo cual se utilizan 3 paneles de glóbulos rojos con fenotipo conocido, independiente del grupo sanguíneo de la embarazada, se realiza la identificación del o los anticuerpos también por la técnica de inmunoprecipitación en gel. Según el tipo de anticuerpo encontrado existirá o no la posibilidad de desarrollar EHP. De los anticuerpos que pueden producir EHP los del sistema ABO son los más frecuentes pero no se realiza investigación prenatal dado que no producen afectación fetal sino solo postnatal. En orden de frecuencia le sigue el anticuerpo anti-D del sistema Rh, luego anticuerpos del sistema Rh como el C, E, c y e seguidos de otros anticuerpos de grupo sanguíneos como el Kell, Duffy, etc (17).

En un estudio de seguimiento de cinco años (01/01/2001 al 31/12/2005) aplicando el esquema prenatal propuesto, con la técnica en gel, en 14860

embarazadas que se atendieron en los servicios asistenciales del BPS se encontraron 157 (1,05%) que tenían anticuerpos circulantes contra antígenos de glóbulos rojos. De los 157 anticuerpos hallados 153 eran aloanticuerpos de los cuales 84 (55%) se hallaron en mujeres RhD positivas y 69 (45%) en RhD negativas. En las Rh (D) negativas, 55 (80%) tenían un anticuerpo anti-D.

En las Rh (D) positivas 36 (42,8%) presentaban aloanticuerpos con una especificidad capaz de producir EHP mientras que en las mujeres RhD negativas 66 (95,6%) eran capaces de producir EHP. En total, se hallaron 104 aloanticuerpos capaces de causar EHP, 98 de los cuales correspondían al sistema RH y Kell representando el 94% de los anticuerpos hallados del tipo IgG. En cuatro casos de los 157 se comprobaron autoanticuerpos con test de Coombs indirecto y directo positivos los cuales fueron identificados como anticuerpos antifosfolípidos. En suma, en las 14860 gestantes estudiadas se encontraron 157 anticuerpos antieritrocitarios de los cuales 153 eran aloanticuerpos y 4 autoanticuerpos. De los aloanticuerpos 104 eran capaces de producir EHP por ser del tipo IgG que atraviesan la placenta hacia el feto y de ellos el 94% pertenecían a los sistemas Rh y Kell. Por el contrario, 49 aloanticuerpos hallados no producirían EHP por ser del tipo IgM (sistemas Lewis, P, HI, etc) pero es de importancia su diagnóstico precoz pues pueden provocar reacciones transfusionales en la gestante.

Si se hubiera aplicado el esquema de 1982, como se hace aún en muchos servicios asistenciales del país, los 84 aloanticuerpos hallados en gestantes RhD positivas hubieran pasado inadvertidos produciendo quizá reacciones transfusionales severas y/o muertes intrauterinas o neonatos afectados.

Este esquema de seguimiento inmunohematológico de la gestación que nosotros estamos aplicando desde 1996 en nuestro país para evitar complicaciones sobre la madre y/o el feto ha sido normatizado en algunos países del primer mundo como Holanda desde 1998 (18). La American Association of Blood Bank (AABB) también recientemente establece las “Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited” publicadas en la revista Transfusion (19).

Con el esquema de seguimiento propuesto y con las técnicas actuales podemos determinar la presencia de anticuerpos maternos y si son del tipo IgG o IgM pero nos queda por determinar la tercera condición para que se produzca EHP que es **demostrar la presencia del antígeno correspondiente en los glóbulos rojos fetales**. El grupo sanguíneo del padre nos proporciona un diagnóstico de probabilidad pero no de certeza. Si el padre carece del antígeno correspondiente el feto carecerá del mismo siempre y cuando se confirme la paternidad. Si lo posee puede ser heterocigoto con lo cual tendrá el feto 50% de probabilidades de heredar el antígeno.

El estudio de la densidad óptica del líquido amniótico (LA) obtenido por amniocentesis según la gráfica de Queenan o la obtención de sangre fetal por cordocentesis son métodos más precisos pero invasivos.

En dos trabajos publicados en el New England Journal of Medicine recién

temente se propone en uno un método no invasivo para determinar el Rh del feto analizando el DNA en el plasma materno por Polymerase Chain Reaction (PCR) (20) y en el otro, un método no invasivo para determinar la anemia fetal que ocurre en la EHP mediante la medición de la velocidad del flujo sanguíneo de la arteria cerebral media mediante ecodoppler (21). Pero, no solo es necesario para obtener un correcto seguimiento inmunohematológico de la gestación aplicar el esquema propuesto sino **interpretar correctamente los resultados de la paraclínica con los datos de la historia clínica**. Por ejemplo, una embarazada Rh negativa presenta un estudio de anticuerpos positivo por la técnica de inmunoprecipitación en gel que es identificado como un anti-D. Si nos guiamos exclusivamente por la paraclínica haremos el diagnóstico de aloinmunización lo cual puede llevar a realizar procedimientos invasivos de diagnóstico como la amniocentesis. Si analizamos la historia clínica vemos que la señora ha recibido inmunoglobulina anti-D hace un mes durante la gestación a una dosis de 300 microgramos administrados por vía intramuscular.

Valorando la clínica y la paraclínica haremos el diagnóstico de inmunización pasiva producida por los anticuerpos anti-D de la inmunoglobulina recibida. Se deben dejar pasar más de 8 semanas luego de la administración de inmunoglobulina anti-D para repetir los estudios inmunohematológicos de la gestación. En 1982 proponíamos como condiciones de la inmunoprofilaxis anti-D postparto que la madre debía ser Rh(D) negativa sin anticuerpos anti-D y el recién nacido Rh(D) positivo con un test de Coombs directo negativo. Similarmente, si nos guiamos exclusivamente por los resultados de la paraclínica dejaremos de administrar incorrectamente la inmunoprofilaxis postparto en tres condiciones clínicas diferentes. En primer lugar, una embarazada O Rh negativa sin anticuerpos detectados durante la gestación puede tener un recién nacido A Rh positivo con test de Coombs directo positivo. Como está fuera de las condiciones propuestas no se administraría inmunoglobulina anti-D post parto. Sin embargo, el test de Coombs directo positivo se puede deber a un conflicto ABO y si no realizamos inmunoprofilaxis se producirá una aloinmunización anti-D en la madre. En segundo lugar una embarazada Rh negativa puede tener un anticuerpo anti-Kell y dar a luz un recién nacido Rh positivo con test de Coombs directo positivo. Como está fuera de las condiciones propuestas tampoco aquí se administraría inmunoglobulina anti-D postparto. Sin embargo, debe administrarse pues la señora carece de anticuerpos anti-D y el test de Coombs directo positivo del RN se debe a los anticuerpos anti-Kell. Si no lo hacemos, en un futuro embarazo tendremos casi seguramente además del anticuerpo anti-Kell un anti-D.

En tercer lugar, una embarazada Rh negativa puede haber recibido inmunoglobulina anti-D durante la gestación y tener un RN RhD positivo con test de Coombs directo positivo pues los anticuerpos administrados intramuscular a la madre pasan la placenta hacia el feto uniéndose a los glóbulos rojos fetales que tienen el antígeno D. Si no realizamos la inmunoprofilaxis postparto la madre

se inmunizará al antígeno D con la consecuencia para futuros embarazos y estaríamos malgastando la inmunoprofilaxis que se realizó durante la gestación. Estas tres situaciones clínicas presentadas constituyen una de las causas más frecuentes de falta de indicación de inmunoprofilaxis postparto por parte del médico tratante de ahí la importancia de recalcar una correcta interpretación de los resultados de laboratorio relacionándolos siempre a la situación clínica.

En 1982 (8) los doctores Santiago Varela y Antonio Grasso al escribir el capítulo 2 sobre la historia de los progresos en la enfermedad hemolítica decían: “En nuestro medio han sido poco los aportes originales para el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad”. Veinte años después podemos afirmar que hemos hecho camino al andar con un equipo de médicos obstetras, perinatólogos y compañeros hemoterapeutas. Sin embargo, **la enfermedad hemolítica perinatal sigue existiendo**. La incidencia de la EHP por anticuerpos anti-D depende de la prevalencia de mujeres Rh (D) negativas.

Los libros anglosajones describen un 15% de mujeres Rh (D) negativas. Este porcentaje fue el que tomó en 1982 el Profesor Dr Caldeyro Barcia al escribir el prólogo de nuestro libro. Sin embargo, recordamos que nos preguntó este será el porcentaje de nuestra población. De esta pregunta sencilla surgió un estudio sobre la incidencia de individuos Rh (D) negativos en algunas poblaciones del Uruguay (22) encontrando que el porcentaje de embarazadas Rh negativas era del 12% en nuestro país. El propio Profesor Dr Caldeyro Barcia presentó estos resultados en la IX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción que se realizó en la ciudad de Campinas, Brasil en noviembre de 1984.

El riesgo de inmunización anti-Rh (D) post parto en una mujer Rh negativo con un feto Rh positivo ABO compatible es del 16%, con feto ABO incompatible 1.5-2%, post aborto provocado 4-5% y post aborto espontáneo 2%. Procedimientos invasivos como la amniocentesis, biopsia de vellosidad coriónica y/o cordocentesis aumentan el riesgo de aloinmunización (23).

Con la administración rutinaria de la inmunoprofilaxis postparto ha descendido notoriamente la incidencia de la aloinmunización anti-D. Incluso, en el momento actual además de la dosis de 250-300 microgramos para la inmunoprofilaxis postparto contamos con dosis de 120 microgramos para los abortos y/o maniobras invasivas del primer trimestre de la gestación. Sin embargo la aloinmunización anti-D y por ende la EHP producida por este anticuerpo sigue ocurriendo en nuestro país por:

- Falla de la inmunoprofilaxis postparto por dosis insuficientes dado que no se cuantifica la hemorragia postparto
- Falta de indicación por errores en la interpretación de resultados
- Abortos clandestinos
- Drogadicción intravenosa
- Transfusiones de sangre Rh (D) positivas a mujeres Rh(D) negativas en edad reproductiva activa
- Inmunización durante la gravidez.

Pero además, ha aumentado en los últimos años la aloinmunización por otros anticuerpos frente a antígenos de glóbulos rojos producidos por gestaciones anteriores, transfusiones de hemocomponentes, trasplantes y/o drogadicción intravenosa para los cuales no existe en el momento actual inmunoprofilaxis como en el anti-D. Muchos de estos anticuerpos producen también EHP y de no ser detectados precozmente durante la gestación pueden generar las consecuencias nefastas para el feto y/o RN.

El objetivo de este libro es mostrar de una manera clara y sencilla para el equipo de salud, los elementos de prevención, diagnóstico y tratamiento de la EHP. Dado que en los últimos años ha variado sustancialmente el encare diagnóstico y de prevención junto con la aparición de nueva tecnología pensamos que al igual que en 1982 lo que aquí se propone debería ser tomado como norma como forma de unificar la prevención de la EHP y los esquemas de seguimiento diagnóstico durante la gestación en todas las embarazadas del país como ha ocurrido recientemente en algunos países del primer mundo.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Diamond LK, Blackfan KD, Baty JM. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J Pediatr* 1932;1:269-309.
- 2- Levine P, Katzin EM, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy: its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis. *JAMA* 1941;116:825-827.
- 3- Bowman JM. RhD Hemolytic Disease of the Newborn. *N Engl J Med* 1998;339:1775-1777.
- 4- Wallerstein H. Treatment of severe erythroblastosis by simultaneous removal and replacement of blood of the newborn. *Science* 1946;103:583-584.
- 5- Liley AW. Intrauterine transfusion of fetus in hemolytic disease. *BMJ* 1963;2:1107-1109.
- 6- Bang J, Bock JE, Trolle D. Ultrasound-guided fetal intravenous transfusion for severe rhesus hemolytic disease. *BMJ* 1982;284:373-374.
- 7- Queenan JT, Tomai TP, Ural SH, King JC. Deviation in amniotic fluid optical density at a wavelength of 450nm in Rh-immunized pregnancies from 14 to 40 weeks gestation: A proposal for clinical management. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1370-6.
- 8- Scasso JC, Decaro J, Cuadro JC, Lieutier G, Alonso J, Varela S. Enfermedad hemolítica perinatal por aloinmunización Rh (D). Premio "El País" 1982 de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed de la Plaza Montevideo-Uruguay, 1983.
- 9- Cuadro JC, Scasso JC, Decaro J, Gutierrez C, Alonso J, Varela S, Miller A. Normas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica por conflicto Rh. Primer premio 1982 otorgado por la Asociación Médica del Uruguay. Ed Delta Montevideo-Uruguay, 1981.
- 10- Alonso J, Decaro J, Marrero A, Lavalle E, Martell M, Cuadro JC. Repeated direct fetal intravascular high-dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh hemolytic disease. *J Perinat Med.* 22 :415-419:1994.
- 11- Ulm B, Kirchner L, Svolba G, Jilma B, Deutinger J, Bernaschek G, Panzer S. Immunoglobulin administration to fetuses with anemia due to alloimmunization to D. *Transfusion* 39;1235-1238:1999.
- 12- Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Gabet S, Deot C. The Gel Test : a new way to delect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 30;109-113:1990.
- 13- Ribera A. The ID-Gel Test in foeto-maternal incompatibility. ISBT meeting. Amsterdam July 6 th, 1994.
- 14- The direct antiglobulin test: Gel test versus Tube test. VII European Congress of The International Society of Blood Transfusion (ISBT). Paris France, July 15-18, 2001.
- 15- Van Dijk BA, Dooren MC, Overbeeke MAM. Red cell antibodies in pregnancy: there is no "critical titre". *Transfusion Medicine* 1995;4:199-202.
- 16- Decaro J. Manual de Medicina Transfusional. Ed. De la Plaza. 1999 Montevideo Uruguay. Premio "El País" otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay.

- 17- Shanwell A, Sallander S, Bremme K, Westgren M. Clinical evaluation of a solid-phase test for red cell antibody screening of pregnant women. *Transfusion* 39;26-31:1999.
- 18- Semmekrot BA, de Man AJ, Boekkooi PF, van Dijk BA. Irregular blood group antibodies during pregnancy: screening is mandatory. *Ned Tijdschr Geneesk* 1999;143:1449-52.
- 19- Judd WJ. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. *Transfusion* 2001;41:1445-1452.
- 20- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734-1738.
- 21- Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med* 2000;342:9-14.
- 22- Decaro J, Caldeyro Barcia R. Incidencia de individuos Rh (D) negativos en algunas poblaciones del Uruguay. Presentado en la IX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana. Campinas-Brasil, noviembre de 1984.
- 23- Bowman JM. Hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 70(suppl3);62-67:1996.

4.2 - FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD HEMOLÍTICA PERINATAL

Cuando una sustancia extraña (antígeno) entra en contacto con el sistema inmunitario de un individuo, generalmente se produce una respuesta inmune, ya sea mediada por células (inmunidad celular) o por anticuerpos (inmunidad humoral). Cuando la respuesta inmune mediada por anticuerpos es producida por antígenos de individuos de la misma especie se denomina aloinmunización. En el hombre, esto ocurre usualmente ante transfusiones de hemocomponentes, drogadicción intravenosa, embarazo y/o trasplante de órganos y tejidos. Cuando la embarazada carece de los antígenos que el feto posee en sus glóbulos rojos y estos penetran en la circulación materna, puede producirse una respuesta inmune. La enfermedad hemolítica perinatal (EHP) es una patología típicamente producida por una reacción de hipersensibilidad tipo II mediada por anticuerpos dirigidos contra antígenos de la superficie celular. Si los anticuerpos maternos corresponden a la clase inmunoglobulina G (IgG) cruzan la placenta hacia el feto, frecuentemente en embarazos subsiguientes y se produce una reacción antígeno-anticuerpo in vivo cuando las células fetales poseen el antígeno correspondiente. Se dice entonces que la madre está **aloimmunizada** a antígenos de glóbulos rojos humanos y que los eritrocitos fetales se encuentran **sensibilizados** pues tienen el anticuerpo unido al antígeno presente en su membrana celular. Estos glóbulos rojos sensibilizados con la IgG son retirados de la circulación fetal por los macrófagos del sistema retículo endotelial, principalmente en el bazo, que tienen receptores para la fracción Fc de la Ig o C3b del complemento produciéndose una **hemólisis extravascular**. Se puede definir entonces a la EHP como una anemia hemolítica de causa extracorpúscular inmune. Este mecanismo fisiopatológico es similar para las citopenias perinatales de origen inmune dado que el macrófago tiene un receptor para la fracción

Fc de la inmunoglobulina y la retira de la circulación unida por su fracción Fab a la célula que contiene el antígeno que le ha dado origen. Esta célula puede ser un glóbulo rojo y se producirá la enfermedad hemolítica perinatal o una plaqueta en el caso de la trombocitopenia neonatal alo o autoinmune.

Resumiendo para que la EHP se produzca es necesario:

- incompatibilidad de grupo sanguíneo materno fetal
- aloinmunización materna específica contra uno o varios antígenos eritrocitarios fetales
- pasaje de anticuerpos maternos hacia el feto
- presencia en los eritrocitos fetales del antígeno correspondiente
- destrucción acelerada de los glóbulos rojos fetales

Los anticuerpos de la clase IgG (monómeros) cuando se unen al antígeno de la membrana de los eritrocitos no producen aglutinación dado que la distancia entre los dos fragmentos Fab (sitios de unión al antígeno) del anticuerpo no alcanzan a cubrir la distancia intercelular (50-100 Å) entre dos glóbulos rojos determinada por el potencial zeta. En el caso de moléculas de IgM (pentámeros) más grandes se produce aglutinación directa. Para detectar la presencia del anticuerpo IgG por la técnica de aglutinación es necesario utilizar el suero de Coombs. En 1945, Coombs, Mourant y Race (1) describieron el procedimiento para detectar los anticuerpos unidos a los eritrocitos y que no provocaban aglutinación. Coombs, que era veterinario, inyectó a un conejo inmunoglobulinas humanas produciendo en el animal una respuesta inmune humoral. Dado que la fracción Fc de la Ig humana es la fracción antigénica de la molécula, los fragmentos Fab del anticuerpo del conejo (anti-globulina humana) se unen a los Fc de la IgG unida a los eritrocitos formando un puente y haciendo visible su presencia mediante la aglutinación de los glóbulos rojos.

La magnitud de la aglutinación suele ser proporcional a la cantidad de IgG fijada.

La **prueba de Coombs directa (PCD)** se usa para demostrar la cobertura “in vivo” de los eritrocitos con inmunoglobulinas en particular IgG o fracciones del complemento como C3d. Por ejemplo, a los glóbulos rojos fetales o del RN que pueden sensibilizarse “in vivo” con las IgG maternas, se les realiza la PCD para diagnosticar EHP. Antes de agregar el suero antiglobulina humana (SAGH) se deben lavar los eritrocitos para eliminar las proteínas libres que pueden neutralizar el SAGH y producir falsos resultados negativos.

La **prueba de Coombs indirecta (PCI)** se utiliza para detectar IgG anti-eritrocitarias libres, circulantes, no unidas a los glóbulos rojos. Es indirecta porque, a diferencia del caso anterior, antes del agregado de SAGH se necesita una fase previa de sensibilización “in vitro”. El suero o plasma de la gestante, en el cual queremos investigar la presencia de IgG anti-eritro-

citarias, se debe incubar “in vitro” con los glóbulos rojos que contengan el antígeno específico. Si existen anticuerpos circulantes estos se van a fijar al antígeno de la membrana del glóbulo rojo y luego con el agregado de SAGH se hará visible su presencia mediante aglutinación. En esta prueba, además del lavado de los eritrocitos como en la PCD, es muy importante que se enfrente el plasma a glóbulos rojos fenotipados que contengan la mayoría de los antígenos clínicamente significativos. De no ser así, se pueden obtener falsos resultados negativos que pueden llevar a catalogar a un embarazo de bajo riesgo cuando en realidad no lo es.

SISTEMAS DE GRUPO SANGUÍNEO

Los grupos sanguíneos son sistemas de antígenos y anticuerpos que tienen implicancias genéticas, bioquímicas, inmunitarias y antropológicas.

En este libro, nos dedicamos exclusivamente al aspecto inmunitario de los grupos sanguíneos y de su significado clínico.

Los antígenos de grupos sanguíneos que se hallan bajo control genético se encuentran en la membrana celular del eritrocito mientras que los anticuerpos existen en la fracción inmunoglobulina del plasma humano.

Los antígenos de grupo sanguíneo pertenecen al mismo **sistema** si se demuestran que son alelomorfos es decir, genes sustitutivos que ocupan el mismo lugar sobre un cromosoma en forma tal que solo uno de dos o más alelomorfos pueden hallarse presente en dicho locus o en cualquier cromosoma. De esta manera una secuencia común en el descubrimiento de los sistemas de grupos sanguíneos lo constituye el hallazgo de un solo anticuerpo que descubre a un antígeno sobre los eritrocitos, seguido por el hallazgo de un segundo anticuerpo, antítesis en su reacción en relación con el primero y que demuestra estar descubriendo el producto de un alelo. Sin embargo, los cuatro primeros sistemas no fueron descubiertos de esta forma.

Los antígenos de grupo sanguíneo que tienen una relación fenotípica, bioquímica o genética pero no son alelomorfos no constituyen un sistema y se denominan “**antigen Collections**”.

En 1901 Landsteiner denominó a los primeros dos antígenos eritrocitarios usando las dos primeras letras del alfabeto en mayúsculas A y B (2). Los glóbulos rojos que no reaccionaban con los sueros con anticuerpos anti-A o anti-B eran denominados C. En 1911, Von Dungern and Hirsfeld (3) fueron los primeros en utilizar la letra O (primera letra del término alemán “ohne” que significa “without” en inglés o “sin” en español) para describir los eritrocitos que no reaccionaban con anti-A y anti-B y con el término AB para describir aquellos que por el contrario reaccionaban con ambos sueros. De esta manera se describe el primer sistema de grupos sanguíneos humanos, el **sistema ABO** con sus cuatro posibilidades A, B, AB y O.

La EHP puede producirse por anticuerpos anti-A o anti-B inmunes del tipo IgG principalmente en madres del grupo O con fetos A o B. A pesar de

que esta incompatibilidad materno-fetal ocurre en el 15% de los embarazos la ocurrencia de EHP es solamente de 1 en 150 nacimientos. Tampoco se producen afectaciones fetales ni muertes intauterinas. La EHP se presenta postnatal y por lo general luego de las 36 horas de vida bajo formas clínicas leves o moderadas. Esta discrepancia entre el grado de inmunización por un lado y la incidencia de EHP así como su severidad por otro se explicaría por dos razones: primero que los antígenos A y B no están completamente desarrollados al nacimiento y segundo que estos antígenos no solo están confinados a los eritrocitos de manera que varios tejidos o fluidos corporales (incluyendo la placenta) tienen un efecto protector pasando hacia el feto una escasa cantidad de anticuerpos. Otra diferencia significativa de esta EHP con la producida por otros anticuerpos es que la PCD que se realiza a los eritrocitos del recién nacido para determinar la presencia de anticuerpos inmunes generalmente es negativa utilizando la técnica de aglutinación en tubo. Esto se explica porque en los glóbulos rojos de recién nacidos con EHP relativamente severa por incompatibilidad ABO existen menos de 220 moléculas de IgG por célula (4). La técnica en tubo necesita más de 150 moléculas por célula para positivizarse por lo cual la mayoría de las EHP por conflicto ABO que son leves o moderadas trabajan seguramente con un número inferior de moléculas. Utilizando métodos más sensibles como la inmunoprecipitación en gel se invierte esta situación y la mayoría de los recién nacidos con conflicto ABO presentan la PCD positiva.

En 1940 se describe otro **sistema de grupo sanguíneo denominado Rh** (5) al tomar las iniciales del mono macacus **Rhesus** que fue la especie con cuyos eritrocitos se realizaron las primeras experiencias de inmunización. Este antígeno fue inicialmente denominado LW en honor a sus descubridores Landsteiner y Wiener pero los mismos investigadores sugieren que no es conveniente esta denominación.

Con la descripción de los cinco antígenos del sistema Rh aparecen los primeros problemas de terminología. Por un lado, Fisher y Race (6) los denominan con las letras mayúsculas y minúsculas CcDEe con amplia difusión en Europa y por otro lado, Wiener (7) utiliza la simbología Rh/Hr asociando números a los antígenos con amplia aceptación en EE.UU.

El antígeno D del sistema Rh ha sido la causa más frecuente de aloinmunización y se ha tomado como ejemplo clásico para determinar la fisiopatología de la EHP. Cuando los individuos tienen el antígeno D en sus eritrocitos se denominan Rh positivos y cuando carecen de él Rh negativos. En los individuos anglosajones predominan los individuos Rh positivos (85%) pero existen diferentes incidencias raciales a nivel mundial (8). En nuestro país, existen aproximadamente un 12% de individuos Rh negativos (9).

Los individuos Rh negativos, que carecen del antígeno D, son los que se pueden inmunizar cuando entran en contacto con él mediante transfusiones de hemocomponentes Rh positivos, drogadicción intravenosa, trasplante de órganos y tejidos y/o embarazos anteriores.

El Dr Bruce Chown en 1953 fue el primero en demostrar que la causa de la inmunización anti-D se debía al pasaje a la circulación materna de eritrocitos fetales Rh positivos (10).

El riesgo de aloinmunización de una embarazada Rh negativa con un feto Rh positivo es del 16% (11) pero cuando existe una incompatibilidad ABO entre la madre y el feto este riesgo es del 1.5 a 2%. Esto se debe a que cuando los eritrocitos fetales entran a la circulación materna los anticuerpos naturales (IgM) anti-A y/o anti-B se unen a los antígenos correspondientes de los glóbulos rojos fetales que son retirados rápidamente de la circulación materna disminuyendo el riesgo de inmunización en el sistema Rh.

Los otros antígenos del sistema Rh (CcEe) pueden también producir aloinmunización por las mismas vías que el D y sus anticuerpos al ser del tipo IgG pueden causar EHP tanto en individuos Rh positivos como Rh negativos.

Hasta nuestros días han aparecido una gran cantidad de **otros sistemas**. En algunos el nombre del sistema deriva del nombre del individuo del cual el anticuerpo fue seleccionado por primera vez. Así, la señorita Kell, las señoras Lutheran y Duffy y la señorita Kidd han prestado sus apellidos a los sistemas conocidos en la actualidad. A veces las primeras letras (por ej. K o Lu) en otras las últimas (por ej. Fy) han sido utilizadas para nombrar los antígenos de cada sistema. Los alelos comunes para cada antígeno son denominados como a y b resultando en Fy^a Fy^b o Lu^a Lu^b, etc.

Todos los sistemas de grupo sanguíneo poseen **variantes** raras y estas a menudo revelan la complejidad del sistema, aun cuando al mismo tiempo contribuyan al entendimiento de su estructura. Por ejemplo, existe un número considerable de alelos raros que aparecen ocasionalmente en el locus Rh. Un sustituto para el antígeno C es el C^W que ocurre en menos del 2% de la población británica (12). En lugar de la combinación habitual de genes CDe un individuo puede ser C^WDe. El antígeno C^W es capaz de estimular la formación de anticuerpos anti-C^W, los cuales en ocasiones aisladas han provocado reacciones hemolíticas durante transfusiones de glóbulos rojos y EHP. El C^x es aun un alelo más raro en el mismo locus, ocurre aproximadamente en 1 de cada 1000 personas pero es también capaz de generar el anticuerpo correspondiente y producir EHP.

El **antígeno D débil (weak) o D^u cuantitativo** significa que existen menos sitios antigénicos D sobre la membrana eritrocitaria pero tanto la madre como el recién nacido D débil deben ser considerados como Rh positivos. Puede existir también, aunque en forma más rara, un **D parcial (D cualitativo)** de manera que personas Rh positivas pueden tener anticuerpos anti-D que no reaccionan con sus propias células dado que el anticuerpo está dirigido hacia una parte (epitopo) faltante del antígeno D. Una de las más importantes variantes del antígeno D es la **variante D^{VI}** que difiere en la parte extracelular de la proteína en tres aminoácidos con la proteína D normal. Las embarazadas o receptores de hemocomponentes que tienen el

fenotipo D^{VI} pueden desarrollar anticuerpos contra los epitopos faltantes de la proteína D por ello deben ser considerados como Rh negativos y en el caso de la gestación deben recibir inmunoprofilaxis anti-D. La mayoría de los sueros monoclonales anti-D que se utilizan para determinar el grupo sanguíneo están dirigidos contra los epitopos 6/7 que son los más inmunogénicos de la proteína D pero son también los que se encuentran ausentes en la variante D^{VI}. Por tanto, estos sueros son ideales para tipificar embarazadas o receptores ya que los fenotipos D^{VI} serán tipificados como Rh negativos y de esta manera recibirán hemocomponentes Rh negativos así como inmunoprofilaxis anti-D. Sin embargo, para la tipificación de donantes de sangre y recién nacidos se recomienda el uso de sueros anti-D que detecten la variante D^{VI} con el fin de que sean tipificados como Rh positivos para que no sean inmunogénicos en receptores o gestantes RhD negativos.

Hasta nuestros días se han descubierto una **gran variedad de antígenos eritrocitarios** que se han agrupado en 30 sistemas.

Esta avalancha de terminología hizo que en 1980 la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (International Society of Blood Transfusion, ISBT) creara un grupo de trabajo con el fin de uniformizar la nomenclatura de los antígenos eritrocitarios (Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens). Así, la ISBT sugiere el uso de letras y números arábigos para denominar los sistemas y código de los antígenos. A cada sistema, antigen collection o series de antígenos se le determina un número por ejemplo el sistema ABO es el 001. A su vez a cada antígeno del sistema se le adjudica un símbolo y un número por ejemplo el A es 001 y el B 002. De manera que en el sistema de computación universal el antígeno A es 001001 y el B 001002 siendo el 001 inicial el que corresponde al sistema ABO y el siguiente 001 el que corresponde al antígeno A.

Si se eliminan los ceros se puede expresar el antígeno A como 1.1 y el B como 1.2. En el sistema Rh (004) el antígeno D es 001, C 002, E 003, etc de manera que en el registro computarizado el D es 004001, el C 004002 y el E 004003 o 4.1, 4.2 y 4.3 respectivamente. De manera similar la combinación expresa la simbología y códigos para cada uno de los otros sistemas de grupo sanguíneo.

Otro grupo de antígenos son los **antigens collections** (serie 200) donde se encuentran por ejemplo los antígenos I i. La gran mayoría de los eritrocitos adultos tienen el antígeno I mientras los glóbulos rojos de cordón umbilical son intensamente positivos al antígeno i. La transición se realizaría 18 meses después del nacimiento. Los anticuerpos anti-I o anti-II son los responsables de la mayor parte de las anemias hemolíticas por anticuerpos fríos.

Los **antígenos de baja incidencia** se agrupan en la serie 700 y los **antígenos de alta incidencia** serie 900. Estos últimos, en su mayoría tienen una incidencia superior al 99% en la población y por ello son denominados

antígenos públicos.

Recientemente diagnosticamos un caso de una embarazada aloinmunizada con un anticuerpo anti-Vel (901001) que presentó reacciones transfusionales severas pero no produjo EHP. Aunque no es lo frecuente, un caso de EHP por anti-Vel fue descrito en el año 1992 (12). Como es un antígeno de altísima incidencia en la población es muy difícil conseguir individuos que carezcan del mismo con fines transfusionales de ahí la importancia de realizar el diagnóstico de aloinmunización e identificar el anticuerpo tempranamente durante la gestación porque aunque la EHP sea la excepción debemos tomar medidas precautorias en caso de anemia materna como técnicas de transfusión autóloga y/o administración de eritropoyetina, hierro y ácido fólico con el fin de evitar seguras reacciones transfusionales al administrar sangre incompatible. En 2008, The international Committee on Terminology of Red Cell Antigens de la Internacional Society of Blood Transfusion (ISBT) reunido en Macao, China realiza algunos cambios en la clasificación establecida. Se creó un nuevo sistema, el RHAG (system 30) y se adicionaron nuevos antígenos a los sistemas Rh (system 4), Kell (system 6) y Dombrock (system 14). En la actualidad se han reconocido un total de 308 antígenos eritrocitarios de los cuales 270 se agrupan en 30 sistemas de grupo sanguíneo (28). La totalidad de la clasificación así como la terminología de cada uno de los antígenos y sistemas se obtiene visitando la página web de el Internacional Blood Group Reference Laboratory en Bristol, UK (www.blood.co.uk/ibgri).

Los médicos clínicos (obstetras y perinatólogos) pueden consolarse con el hecho de que no es necesario el entendimiento detallado de cada uno de los sistemas o antígenos de grupo sanguíneo para la apreciación del papel que juegan los anticuerpos correspondientes en la generación de EHP.

Por un lado, el diagnóstico de aloinmunización es decir, la presencia de anticuerpos antieritrocitarios inmunes en la embarazada es mucho más frecuente que la incidencia de EHP. Esto se debe a que varios de los anticuerpos son del tipo IgM que no atraviesan la placenta como los anti- Lewis, anti-P, anti-M, etc por lo cual si revisamos la tabla 1 sabremos aquellos anticuerpos que pueden producir EHP y/o reacciones transfusionales hemolíticas (RTH). En un estudio que realizamos en los servicios asistenciales del BPS en un período de cinco años estudiamos, mediante la técnica de inmunoprecipitación en gel, a 14860 gestantes de las cuales 153 presentaron aloinmunización. 69(45%) eran Rh negativas y 84(55%) Rh positivas. En las Rh negativas 66 (95,6%) de los aloanticuerpos son capaces de producir EHP mientras que en las Rh positivas 33(42,8%) lo pueden hacer. En las RhD negativas el anticuerpo anti-D se diagnosticó en 55(80%) siendo el mas frecuente. En las Rh positivas el anticuerpo hallado mas frecuente como posible causa de EHP fue el anti-E. En total 104 (0,7%) aloanticuerpos de los 153 hallados eran capaces de producir EHP. De ellos, 98 (94%) pertenecían al sistema Rh y Kell. De los 16 anticuerpos

anti-M hallados ninguno varió a IgG durante la gestación por lo cual fueron considerados como no productores de EHP (25). En un estudio reciente, realizado en Holanda donde tienen un esquema de seguimiento inmunohematológico desde el año 1998, similar al propuesto por nosotros, de investigación de anticuerpos inmunes a todas las gestantes en la primera consulta, se hallaron también resultados similares (26). Dentro de los anticuerpos diferentes al anti-D que podían producir EHP el anti-E fue el más frecuente. Los anticuerpos anti-M hallados se comportaron como IgM no produciendo EHP en ningún caso. La mayoría de los anticuerpos hallados diferentes al anti-D pertenecían al sistema Rh y Kell y por ello proponen que niñas y mujeres en edad reproductiva activa en caso de necesitar transfusiones de eritrocitos estos sean fenotipados para los sistemas RH y Kell. El estudio no discrimina la prevalencia de los aloanticuerpos en gestantes RhD negativas y RhD positivas.

Por otro lado, si el feto no posee el antígeno correspondiente por mas que los anticuerpos IgG pasen la placenta no se producirá hemólisis. Determinamos la PCD de los recién nacidos de 10 madres aloimmunizadas a anticuerpos diferentes al anti-D como forma de determinar cuales fetos tenían el antígeno correspondiente. De ellas 1 era Rh negativa con un anti-E y 9 Rh positivas con 5 anti-E, 2 anti-c, 1 anti-C, 1 anti-K y 1 anti-Jk^a. Una presentó 2 anticuerpos 1 anti-E y un anti-c. De los 10 RN a 9 se le realizó el TCD. Cuatro (44%) tuvieron TCD positivo tres RN de madres Rh positivas (con anticuerpos anti-E, anti-C y anti-c) y 1 de madre Rh negativa (con anticuerpos anti-E). Todos los anticuerpos que dieron el TCD positivo pertenecían al sistema Rh. Una embarazada que tenía un anticuerpo anti-E durante la gestación y que tuvo el parto en el interior del país no se le realizó TCD al RN lo que muestra la importancia de implementar el seguimiento de la EHP en forma universal.

El mismo anticuerpo, en la misma embarazada, puede producir EHP en un embarazo y en el siguiente no o en un embarazo gemelar producir afectación de un solo feto (14).

También una embarazada puede presentar mas de un anticuerpo y uno producir EHP y el otro no. Puede carecer de anticuerpos al inicio de la gestación pero durante la misma aloimmunizarse.

A veces existen en la embarazada anticuerpos del tipo IgG que pasan la placenta y el feto posee el antígeno correspondiente pero no se produce una destrucción acelerada de los eritrocitos fetales y por tanto rara vez producen EHP como ocurre con los sistemas Chido, Rodgers y Knops (15).

Los anticuerpos anti-Cromer son también del tipo IgG pero su concentración disminuye durante la gestación dado que son adsorbidos por los antígenos Cromer presentes en el trofoblasto y que aumentan cuantitativamente con el desarrollo de la placenta. La reaparición del anticuerpo en la sangre materna unas semanas después del parto reafirma esta hipótesis. Porqué no se produce una respuesta anamnésica durante la gestación de

los anticuerpos anti-Cromer no lo sabemos aún. Por esta razón, a pesar de que los antígenos Cromer están bien desarrollados en los eritrocitos fetales y los anticuerpos son del tipo IgG no hay ningún reporte hasta el momento actual de EHP o de recién nacidos con test de Coombs directo positivo (16).

Por todo ello es fundamental para el médico clínico que se realice primero el diagnóstico de aloimmunización, luego el de EHP y por último se establezca un esquema de seguimiento en el tiempo de acuerdo a los resultados paraclínicos y su interpretación. Todo ello lo desarrollamos en los capítulos siguientes.

ETIOPATOGENIA DE LA ALOIMMUNIZACION

La etiopatogenia de esta enfermedad está basada en la incompatibilidad de grupo sanguíneo materno-fetal cuando los eritrocitos fetales poseen antígenos de origen paterno carentes en los glóbulos rojos de la madre.

Esto origina, en la mayoría de las embarazadas una respuesta inmune y la producción de anticuerpos que si son del tipo IgG (principalmente las subclases IgG1 e IgG3) pueden pasar la placenta hacia el feto. Estos aloanticuerpos al unirse a la membrana de los eritrocitos los sensibilizan y son fagocitados principalmente por los macrófagos del bazo que tienen receptores para la fracción Fc de la IgG o la fracción C3b del complemento produciendo el acortamiento de la vida media del glóbulo rojo (hemólisis extravascular).

Dado que los macrófagos de la pulpa roja del bazo no tienen receptores para los antígenos de grupo sanguíneo los eritrocitos alogénicos fetales que ingresan a la circulación materna no son reconocidos y circulan normalmente hasta que se vuelven senescentes o apoptóticos. En el glóbulo rojo senescente se expone la fosfatidilserine (PS) en su membrana la cual es reconocida por el receptor PS del macrófago y los eritrocitos son retirados de la circulación.

La respuesta inmune frente a los antígenos de grupo sanguíneo se produce en la pulpa blanca del bazo que contiene células dendríticas (CD) o presentadoras de antígeno, linfocitos B y células T, mientras que las células plasmáticas productoras de anticuerpos se encuentran en la pulpa roja.

La respuesta inmune frente a antígenos específicos se ha denominado “contacto celular dependiente” pues ella necesita del contacto físico entre las células T y las células presentadoras de antígeno (APC).

La respuesta inmune humoral frente a antígenos proteicos requiere de linfocitos T cooperadores (CD4+) que reconocen al antígeno y desempeñan una función esencial en la activación de los linfocitos B. Los T helper estimulan y ayudan, de ahí su designación de cooperadores, a los linfocitos B a sintetizar anticuerpos.

Los antígenos son captados por células presentadoras de antígenos (APC), macrófagos y células dendríticas. En el endosoma fusionado con un liso-

soma el antígeno es degradado en fragmentos o péptidos los cuales son liberados hacia la superficie celular de la APC donde se unen a las moléculas clase II del complejo de histocompatibilidad (MHC). Aquí recién el antígeno puede ser reconocido por la célula T (CD4+). El receptor TCR del linfocito T se une al péptido que a su vez se encuentra unido a la molécula clase II de la APC formándose un puente entre ambas células. Esta primera señal es potenciada por moléculas de adhesión como CD2, LFA-1 y CD26. Se forma así una verdadera sinapsis entre el linfocito y la APC.

Las células T (CD4+) que se unen al antígeno son estimuladas mediante un complejo sistema de transmisión de señales desde la superficie al interior de la célula y se liberan linfoquinas que estimulan los linfocitos B. Por ello estos linfocitos T se denominan “Helper T cells” (Th) o cooperadores. Los linfocitos B se diferencian y crecen en una clona de células denominadas células plasmáticas o productoras de anticuerpos (inmunidad humoral). Pero, para activar al linfocito T helper no alcanza con la unión del receptor TCR al péptido y la molécula clase II de la APC. Se necesita una segunda señal desde la APC la cual es denominada co-estimulación. Una de las más importantes moléculas co-estimuladoras de las APC es la B7 que se une a la molécula CD28 del linfocito T. La unión de estas dos moléculas provee la segunda señal necesaria para la estimulación de las células T helper.

Estos linfocitos T activados proliferan y migran hasta encontrar las células B que expresan el mismo complejo HLA clase II de las células dendríticas (APC). Los linfocitos B adquieren el antígeno mediante el receptor BCR y por endocitosis. Las células T helper además co-estimulan las células B a través de moléculas como B7-CD28 y CD40 formando una verdadera sinapsis entre ambas células. Los linfocitos T activados secretan linfoquinas o inmunotransmisores como la IL-4 que producen la proliferación, migración y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos de los linfocitos B previamente activados.

1- Aloinmunización por transfusiones de sangre y/o hemocomponentes.

La administración de sangre y/o hemocomponentes Rh (D) positivos a mujeres Rh(D) negativas en edad reproductiva activa fue una causa común de aloinmunización anti-D. Actualmente con las nuevas técnicas quirúrgicas e inmunohematológicas esta es una causa excepcional. Sin embargo, la transfusión de sangre y/o hemocomponentes sigue siendo una de las causas más comunes de aloinmunización por otros antígenos diferentes al A, B y D. Dentro de los anticuerpos generados por transfusión, que pueden producir EHP, los otros antígenos del sistema Rh (C,E,c,e) y el Kell son los más frecuentes.

Por ello, el médico clínico debe establecer siempre un correcto balance riesgo-beneficio antes de realizar la indicación de hemocomponentes sabiendo que desde el punto de vista inmunohematológico toda transfusión de sangre salvo la que se produce entre gemelos idénticos es teóricamente

incompatible dado el gran número de antígenos situados sobre las células sanguíneas. A su vez la indicación no debe basarse exclusivamente en resultados paraclínicos sino en criterios clínicos válidos para cada paciente en particular (17).

Los anticuerpos anti-K (Kell) producidos generalmente por transfusión de hemocomponentes previos a la gestación, producen una hemólisis fetal cuando el feto es K positivo pero además causan una anemia fetal por supresión de la eritropoyesis a nivel de las células progenitoras. Se ha encontrado que los fetos afectados tienen menos reticulocitos y normoblastos con una anemia más severa pero con menos hiperbilirrubinemia que los fetos con anti-D (18).

Tabla 1- Significación clínica de la aloinmunización

Anticuerpo	EHP	RTH
ABO		
Anti - A	*si	si
Anti - B	*si	si
RHESUS		
Anti - D	si	si
Anti - C	si	si
Anti - E	si	si
Anti - c	si	si
Anti - e	si	si
KELL		
Anti - K	si	si
Anti - k	si	si
Anti - Kp ^a	si	si
Anti - Kp ^b	rara	si
Anti - Js ^a	si	si
Anti - js ^b	si	si
KIDD		
Anti - Jk ^a	posible	si
Anti - Jk ^b	rara	si
Anti - Jk ₃	si	posible
DUFFY		
Anti - Fy ^a	si	si
Anti - Fy ^b	posible	si
Anti - Fy ₃	rara	si
MNS		
Anti - S	si	si
Anti - s	si	si
Anti - M	rara	a veces
Anti - N	no	rara
Anti - U	si	si

Anticuerpo	EHP	RTH
LEWIS		
Anti - Le ^a	no	si
Anti - Le ^b	no	rara
Anti - Le ^a _{bH} + Le ^b (Le ^x)	no	si
Anti - Le ^b	no	no
LUTHERAN		
Anti - Lu ^a	posible	posible
Anti - Lu ^b	posible	si
P		
Anti - P1	no	rara
Anti - P	no	si
Anti - Tj ^a (anti-PP1P ^k)**	si	si
DIEGO		
Anti - Di ^a	si	si
Anti - Di ^b	si	si
COLTON		
Anti - Co ^a	si	si
Anti - Co ^b	posible	si
DOMBROCK		
Anti - Do ^a	si	si
Anti - Do ^b	posible	si

* enfermedad hemolítica postnatal

** Los anti-PP1P^k son del tipo IgG y pueden producir abortos espontáneos tempranamente en la gestación (19).

RHT - reacción hemolítica transfusional.

2- Aloinmunización por drogadicción intravenosa.

Esta es una causa de aloinmunización que no planteábamos hace 25 años (20), sin embargo cuando el drogadicto intravenoso comparte agujas y jeringas con otros individuos la infusión de minidosis de glóbulos rojos puede ser causa de aloinmunización. Así, en un estudio realizado en Manitoba-Canadá, en 5 de 27 mujeres Rh negativas aloinmunizadas con anti-D la causa de su inmunización fue la drogadicción intravenosa compartiendo jeringas y agujas (21). Este modus operandi que puede ser causa también de transmisión de enfermedades como el SIDA y hepatitis, hace que las mujeres puedan estar aloinmunizadas desde la primera gestación con fetos severamente afectados (21). Este es un aspecto, la drogadicción intravenosa, que por lo general es ocultado por la paciente pero que se hace evidente en el examen físico cuando quedan al descubierto zonas de punción.

3- Aloinmunización por embarazo.

El embarazo puede producir aloinmunización cuando los eritrocitos fetales, que poseen un antígeno paterno extraño para la madre, ingresan a la circulación materna lo cual se conoce con el nombre de hemorragia feto-materna (HFM). Esta ocurre hasta en el 75% de los embarazos por lo

general en el tercer trimestre y después del parto. Sin embargo, los eritrocitos fetales pueden ingresar también a la circulación materna luego de la amniocentesis, aborto espontáneo o inducido, toma de muestras de la velloidad coriónica, cordocentesis, ruptura de embarazo ectópico así como traumatismo de abdomen.

Chow (10) en 1953 fue el primero en demostrar la presencia de eritrocitos fetales en la circulación materna. En 1957, Keinhauer, Braun y Betke (22) describen la técnica de la elución ácida que es capaz de detectar hasta 0,1 ml de sangre fetal en la volemia materna. Esta técnica se basa en que los eritrocitos fetales tienen hemoglobina F (HbF) y los maternos hemoglobina A. La HbA es eluida de los eritrocitos cuando se sumerge la lámina en un medio ácido a pH 3.3 a 37°C. Los eritrocitos fetales se tiñen con eosina mientras que los eritrocitos adultos cuya hemoglobina ha sido eluida no se tiñen y se ven claros (fantasmas). Esta técnica ha sido usada para detectar HFM de mas de 30 ml de sangre fetal los cuales no estarían cubiertos por la dosis estándar de 300 microgramos de la Inmunoglobulina anti-D. Pero, es una técnica laboriosa, subjetiva y de cierta imprecisión sobre todo cuando se realizan los cálculos cuantitativos (23).

En los últimos años se han desarrollado métodos objetivos para medir la HFM como el que usa anticuerpos monoclonales anti-HbF mediante citometría de flujo (24) o mediante la técnica de inmunoprecipitación en gel (Diamed) (ver capítulo de inmunoprofilaxis anti-D).

Aunque en Uruguay se han hecho las primeras experiencias con estos métodos no se utiliza de rutina ninguna técnica para cuantificar la HFM. Esto hace que hemorragias superiores a los 30 ml sean aun hoy causa de inmunización anti-D post parto dado que la dosis de inmunoglobulina anti-D que se administra es insuficiente para neutralizar esta cantidad de sangre fetal. La formación de las células sanguíneas en el embrión humano comienza en la tercer semana de gestación y el antígeno Rh ha sido demostrado en la membrana eritrocitaria a partir del día 38 . Se han encontrado eritrocitos fetales en la circulación materna en los abortos espontáneos o provocados en el curso del primer trimestre, existiendo por tanto, el riesgo de inmunización . La dosis mínima para producir una inmunización primaria sería de 0,01 a 0,03 ml de glóbulos rojos fetales lo que equivale a 1 eritrocito fetal cada 100.000 maternos . En la práctica el volumen de sangrado de una HFM es variable siendo en el 99,5% de los casos menor a 15 ml.

Sin embargo, un tercio de los individuos de la especie humana no responden a la estimulación antigénica (tolerancia inmunológica) es decir, no forman anticuerpos. Este carácter estaría regulado genéticamente por los genes de respuesta inmune. A su vez, la incompatibilidad en el sistema ABO entre madre y feto disminuye el riesgo de aloinmunización como ya se ha explicado anteriormente y un tercio de las mujeres RhD negativas tendrán fetos también RhD negativos.

FISIOPATOLOGIA DE LA HEMOLISIS PERINATAL

Si la embarazada está aloinmunizada es decir, presenta anticuerpos inmunes contra antígenos de los glóbulos rojos humanos, y si estos anticuerpos son del tipo IgG pueden pasar hacia el feto. Si los eritrocitos fetales poseen en su membrana celular el antígeno correspondiente se producirá una reacción antígeno-anticuerpo in vivo. De esta manera los anticuerpos se unirán por su fracción Fab al antígeno celular y se dice entonces que los glóbulos rojos fetales están sensibilizados. Estos eritrocitos unidos al anticuerpo son captados por los macrófagos del sistema retículo endotelial que tienen un receptor para la fracción Fc de la inmunoglobulina y C3b del complemento. Son retirados de la circulación, principalmente en el bazo, produciéndose una hemólisis extravascular cuyas consecuencias inmediatas son la anemia y la producción de bilirrubina indirecta. Tres receptores Fc para IgG1, IgG3 y C3b han sido identificados FcRI, FcRII (IIa y IIb) y FcRIII (IIIa y IIIb). El "clearance" de los eritrocitos RhD positivos sensibilizados con una IgG1 monoclonal se asocia principalmente con los receptores FcRIIa y FcRIIIa pero no con FcRIIIb. Sujetos homocigotos para ambos alotipos (IIa, IIIa) muestran un clearance más rápido de los glóbulos rojos sensibilizados (27).

La anemia es el principal factor patológico en el feto. La disminución de la hemoglobina estimula la médula ósea fetal produciéndose un aumento de la eritropoyesis con aparición en circulación de elementos jóvenes (reticulocitos y eritroblastos). A su vez, se estimula la eritropoyesis extramedular reactivándose como órganos hematopoyéticos el hígado y el bazo. Anatómicamente esto se traduce por una hepatoesplenomegalia. En casos más severos pueden verse focos de eritropoyesis en riñones, suprarrenales, mucosa intestinal y/o cutáneos.

En las anemias intensas, se produce una hipoxemia que puede llevar a la insuficiencia cardíaca con aumento de la presión venosa central (PVC).

Por otro lado, se produce una hipoproteinemia con la consiguiente hiponcosis y retención hidrosalina. Esto aumenta la volemia y la PVC con lo cual se agrava la insuficiencia cardíaca. La hiponcosis parece ser el factor principal que lleva al edema feto-placentario y en los casos más severos al hidrops fetal. El edema placentario altera el intercambio materno fetal, agrava la hipoxia y las alteraciones metabólicas lo cual lleva a la muerte fetal. El edema placentario parece ser pues la estocada final en un feto severamente anémico e hipóxico. Para el estudio de la anemia fetal, se ha desarrollado recientemente un método no invasivo que es la medición de la velocidad del flujo sanguíneo en la arteria cerebral media mediante ecodoppler y que desarrollaremos en el capítulo de diagnóstico prenatal de la EHP.

La bilirrubina indirecta (BI) formada en los órganos del sistema retículo endotelial fetal como consecuencia de la hemólisis, es transportada en la sangre por la albúmina. Sin embargo, en los primeros meses la alfa feto proteína también transporta BI por su elevada concentración y por su alta

afinidad con el pigmento. Dado el alto gradiente de la concentración de albúmina entre la circulación materna y fetal y dado que la BI es liposoluble, hay un pasaje del pigmento hacia la circulación materna a través de la placenta. De esta manera, la mayor parte de la BI formada por el feto, es conjugada y excretada por la madre. La BI, como ya se ha dicho es liposoluble y difunde a través de los vasos sanguíneos del cordón umbilical hacia el líquido amniótico (LA) tiñiéndolo. La determinación de los incrementos de densidad óptica del LA, es por ello uno de los índices de mayor valor pronóstico y de afectación fetal. Por esta difusión, la coloración amarillenta del cordón umbilical es el único signo de ictericia al nacer.

En suma, las consecuencias de la hemólisis fetal son la anemia y el aumento de bilirrubina no conjugada. En el feto, dado que la mayor parte de la BI es excretada hacia la circulación materna, la anemia adquiere un valor patogénico primordial al desarrollar, como ya vimos, mecanismos en cadena que pueden culminar con la muerte intrauterina. En los casos severos los métodos terapéuticos prenatales, tendrán como objetivo prevenir y/o corregir la anemia. En los recién nacidos (RN) en cambio, la anemia al ser un factor fácilmente corregible, adquiere un papel secundario, mientras que el mayor riesgo lo constituye la hiperbilirrubinemia. La BI libre no conjugada (no unida a la albúmina) en los RN difunde con facilidad las membranas celulares y en la célula desacopla la fosforilación oxidativa, acelera la glicolisis y reduce la síntesis proteica. Su predilección por el sistema nervioso central y sobre todo por los núcleos grises de la base está favorecida por el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el período neonatal. Hay factores asociados que pueden aumentar la bilirrubina libre como la prematurez, la hipoalbuminemia, la acidosis, fármacos, ácidos grasos no esterificados e hipoglicemia o aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica como la hipoxia y/o infección. Una vez fijada la BI al sistema nervioso la encefalopatía es prácticamente irreversible siendo su grado de expresión mayor el cuadro clínico denominado kernicterus.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol* 1945;26:255-266.
- 2- Landsteiner K. Agglutination phenomena in normal human blood. *Wien Klin Wochenschr* 1901;14:1132-34. An English translation by Kappus, appears in *Transfusion* 1961;1:5-8.
- 3- Von Dungern E, Hirszfeld L. Concerning the group-specific structures of the blood. *Z Immunitätsforsch Exp Ther* 1911;8:526-62.
- 4- Romano EL, Hughes-Jones NC, Mollison PL. Direct antiglobulin reaction in ABO haemolytic disease of the newborn. *Brit Med J*. 1973;i:524.
- 5- Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognised by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1940;43:223-4.
- 6- Fisher Ra, Race RR. Rh gene frequencies in Britain. *Nature* 1946;157:48-9.

- 7- Wiener AS, Landsteiner K. History of Rh-Hr blood group system. NY State J Med 1969;69:15-35.
- 8- Dodd BE, Lincoln PJ. Inmunología de los grupos sanguíneos. Cap 6 pag 98. Ed. El Manual Moderno. México, 1976.
- 9- Decaro J, Caldeyro Barcia R. Incidencia de individuos Rh(D) negativos en algunas poblaciones del Uruguay. IX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana. Campinas-Brasil, noviembre de 1984.
- 10- Chown B. Anemia from bleeding of the fetus into the mother circulation. The Lancet 1954;1:1213.
- 11- Bowman JB. Hemolytic disease of the newborn. Vox Sang 1996;70 (suppl3):62-67.
- 12- Dodd BE, Lincoln PJ. Inmunología de los grupos sanguíneos. Cap.6 pag.100. Ed El Manual Moderno. México, 1976.
- 13- Le Masne A, Vachee A, Horbey C, Mannessier L, Gruca L, Rouland V, Lequien P. Severe form of neonatal hemolytic disease by anti-*Vel* allo-immunization. Arch Fr Pediatr 1992;49(10):899-901.
- 14- Scasso JC, Decaro J, Lieutier G, Mautone M. Embarazo gemelar Rh negativo sensibilizado con afectación de un sólo feto. Arch Ginec y Obstet 1981;30:243.
- 15- Judd WJ. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. Transfusion 2001;41:1445-1452.
- 16- Reid ME, Chandrasekaran V, Sausais L, Pierre J, Bullock R. Disappearance of antibodies to Cromer blood group system antigens during mid pregnancy. Vox Sang 1996;71:48-50.
- 17- Decaro J. Manual de Medicina Transfusional. Premio "El País" 1997 de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed de la Plaza. Montevideo-Uruguay, 1999.
- 18- Luban N. Hemolytic disease of the newborn: progenitors cells and late effects. N Engl J Med 1998;338:830-831.
- 19- Cántin G, Lyonais J. Anti-PP1Pk and early abortion. Transfusion 1983;23:350-351.
- 20- Scasso JC, Decaro J, Cuadro JC, Lieutier G, Alonso JG, Varela S. Enfermedad hemolítica perinatal por aloinmunización Rh(D). Premio "El País" 1982 de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed. de la Plaza. Montevideo-Uruguay, 1983.
- 21- Bowman J, Harman C, Manning F, Menticoglou S, Pollock J. Intravenous drug abuse causes Rh immunization. Vox Sang 1991;61:96-98
- 22- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear. Klin Wochenschr 1957;35:637-638.
- 23- Polesky H, Sebring E. Evaluation of methods for detection and quantitation of fetal cells and their effect on RhIgG usage. Am Clin Pathol 1981;76(suppl):525-529.
- 24- Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. Transfusion 1998;38:749-756.
- 25- Pereira A, Silveira S, Hernandez C, Varela A, Gaggero M, Olivera P, Diloreni N, Gularte M, Larrosa V, Miller A y Decaro J. Erythrocyte antibodies in Pregnant Women. XXXI World Congress of de International Society of Hematology (ISH) 20-24 marzo, 2007. Punta del Este-Uruguay.
- 26- Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. Transfusion;2008,48:941- 952.
- 27- Miescher S, Spycher M, Amstutz H, de Haas M, Kleijer M et al. A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcyRIIA and FcyRIIA genes. Blood 2004;103:4028-4035.
- 28- Daniels G, Castilho L, Flegel WA et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. Vox Sanguinis 2009;96:153-156.

4.3 DIAGNÓSTICO PRENATAL

En 1982 se establecieron, en el Uruguay, las primeras normas para el seguimiento de las gestantes Rh (D) negativas (1).

Varios datos científicos se han obtenido durante los 25 años que transcurren desde que estas fueron publicadas y aplicadas.

Primero, con la implementación de las normas y el desarrollo de programas de seguimiento de embarazadas de alto riesgo se ha observado que la EHP por anti-D en las mujeres Rh negativas, si bien ha disminuido por la aplicación de la inmunoprofilaxis, esta sigue existiendo. Segundo, han aparecido una gran variedad de anticuerpos antieritrocitarios diferentes al D que producen EHP, algunos diagnosticados durante la gestación en forma fortuita por pruebas inmunológicas pretransfusionales, otros han pasado inadvertidos hasta que produjeron recién nacidos afectados o muertes intrauterinas tanto en mujeres Rh negativas como Rh positivas. Tercero, se han desarrollado técnicas inmunohematológicas sencillas, de fácil aplicación pero con una alta sensibilidad, especificidad y con monitoreo computarizado. A su vez, se han agregado técnicas no invasivas e invasivas para el diagnóstico y tratamiento prenatal de la EHP.

En base a esta gran cantidad de información científica obtenida en estas dos décadas y media es que se proponen cambios en el **Protocolo de Monitoreo Inmunohematológico de las pacientes obstétricas**. Todas y cada una de las sugerencias vertidas en la presente guía son una base que puede ser excedida en la práctica de acuerdo a las necesidades de cada institución. El espíritu de las mismas es la revisión continua conforme se desarrollen nuevos avances científicos (medicina basada en evidencia). Se recomienda que los servicios de Medicina Transfusional donde se realizan las pruebas inmunohematológicas tengan un estrecho relacionamiento clínico con los médicos obstetras y pediatras con el fin de realizar una correcta interpretación de los resultados y un apropiado seguimiento de la gestación.

Los objetivos de este protocolo de seguimiento que se propone son los siguientes:

- 1- Identificar mujeres aloinmunizadas.
- 2- Identificar embarazadas con riesgo de desarrollar EHP.
- 3- Identificar mujeres Rh negativas que necesiten inmunoprofilaxis anti-D.
- 4- Disponer de hemocomponentes compatibles rápidamente para emergencias obstétricas y/o neonatales.
- 5- Identificar fetos con EHP que puedan necesitar tratamiento prenatal.
- 6- Identificar la aparición de anticuerpos antieritrocitarios adicionales que puedan surgir durante la gestación.
- 7- Predecir si el recién nacido requerirá tratamiento por EHP.

El **protocolo de monitoreo** debe aplicarse a todas las embarazadas desde la primera consulta preferiblemente en el primer trimestre de la gestación. La elaboración de la historia clínica de la embarazada debe ser efectuada en la primera consulta en la cual se ha confirmado el embarazo por la clínica o la paraclínica. Analizar detenidamente los antecedentes obstétricos como embarazos anteriores, abortos provocados o espontáneos, muertes perinatales o neonatos con ictericia, exsanguinotransfusión, fototerapia u otros elementos diagnósticos y/o terapéuticos que orienten a la patología que nos ocupa.

Si conoce el grupo sanguíneo o figura en la historia clínica anterior, en caso de ser Rh negativa, preguntar si recibió inmunoglobulina anti-D.

Se deben obtener datos de la pareja actual confirmando la paternidad del embarazo e interrogando por otra parte si todos los hijos son del mismo matrimonio.

Se debe interrogar también otros **antecedentes inmunohematológicos** como si ha recibido transfusiones de hemocomponentes, trasplante de órganos o tejidos y drogadicción intravenosa.

En la primera consulta, por lo general en el primer trimestre de gestación, se debe solicitar, junto con la paraclínica de rutina, la determinación del **grupo sanguíneo ABO y Rh** junto con la **investigación de anticuerpos inmunes**. Esto es independiente de que la paciente conozca su grupo sanguíneo o figure en la historia clínica anterior. Debe realizarse obligatoriamente en el inicio de cada gestación y de acuerdo a los resultados se repetirá o no posteriormente.

Aquí como veremos más adelante, lo prioritario es determinar si la paciente está o no aloimmunizada e identificar el anticuerpo para saber si puede producir EHP. En caso de serlo el embarazo debe ser catalogado para su seguimiento como de alto riesgo realizando un correcto asesoramiento sobre la patología en cuestión a la pareja.

Nosotros contamos además de la historia clínica con un **sistema de computación específico**, para el seguimiento inmunohematológico de la gestación, donde se archivan los datos patronímicos y los resultados de los estudios realizados así como las maniobras terapéuticas o de prevención realizadas. A su vez nos permite identificar las muestras con una etiqueta de código de barras y almacenar los datos por fecha de consulta y/o realización.

PROTOCOLO DE SEGUIMIENTO INMUNOHEMATOLÓGICO DE LA GESTACIÓN

Una vez obtenido el resultado de la determinación del grupo sanguíneo y la investigación de anticuerpos inmunes hay varias posibilidades.

En primer lugar, la embarazada puede ser Rh positiva con una investigación de anticuerpos inmunes negativo (test de Coombs indirecto negativo) lo que significa que no existen anticuerpos antieritrocitarios circulantes

al ser enfrentado el suero materno a tres paneles de glóbulos rojos con fenotipo conocido donde están representados la mayoría de los sistemas de grupo sanguíneo. La embarazada, en este caso, no debe realizar otro control inmunohematológico durante la gestación.

En segundo lugar puede ser **Rh positiva pero con un test de Coombs indirecto positivo**. Aquí se deberá identificar el anticuerpo antieritrocitario utilizando paneles de glóbulos rojos que combinen la presencia de varios antígenos. En caso de que los anticuerpos encontrados sean del sistema Lewis, anti-I o anti-P1 por ejemplo, no tienen importancia clínica para el feto, pues son del tipo IgM que no pasan la placenta.

La embarazada no necesita nuevos controles inmunohematológicos durante la gestación como en el caso anterior.

Si el anticuerpo hallado, por el contrario, es del tipo IgG (anti-K, anti-C, anti-E, etc) puede producir EHP y su seguimiento será similar al anti-D.

En tercer lugar, la embarazada puede ser **Rh negativa con un test de Coombs indirecto negativo**. La gestante carece de anticuerpos antieritrocitarios circulantes pero debe repetir la investigación de anticuerpos entre las 25 a 28 semanas de gestación. Si la embarazada recibe durante la gestación inmunoglobulina anti-D se deben dejar pasar más de 8 semanas para repetir los estudios inmunohematológicos dado que el test de Coombs indirecto puede resultar positivo por los anticuerpos anti-D administrados a la madre.

Otra posibilidad inmunohematológica es que la embarazada sea **Rh negativa con test de Coombs indirecto positivo** con lo cual se debe identificar el anticuerpo antieritrocitario como en la segunda opción. Lo más frecuente es que sea anti-D pero en un 20% de los casos existe otro anticuerpo diferente al D.

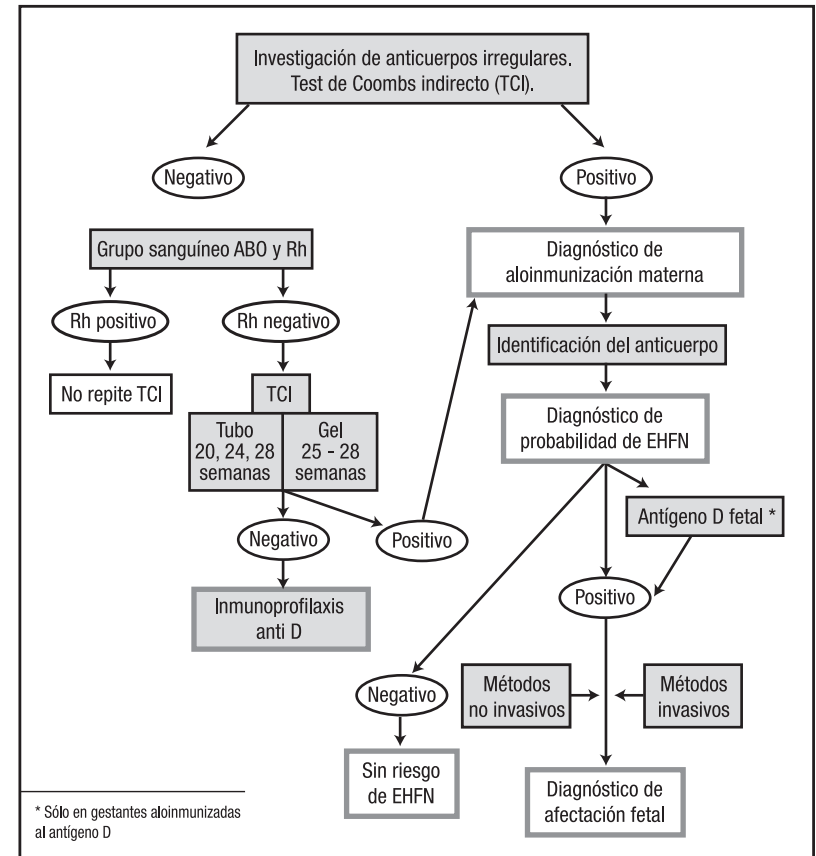
Una vez identificado el anticuerpo, de ser clínicamente significativo, se puede titular. **El título** es una medida indirecta de la concentración del anticuerpo materno. Hemos encontrado títulos altos y/o crecientes de anti-D en embarazadas con fetos Rh negativos dado que el embarazo es un estímulo no específico para el sistema inmunitario (20). A su vez, se han presentado afectaciones fetales severas con títulos bajos y por el contrario, afectaciones leves con títulos altos (40). Por tanto, el valor absoluto del título o su crecimiento durante la gestación NO ES INDICADOR DE AFECTACIÓN FETAL (21). Para que el valor del título sea reproducible se deben tener en cuenta varias condiciones. Existen variaciones en los resultados de los distintos servicios, según el individuo que realice la técnica, del método utilizado (tubo o gel) dado que se obtienen valores más altos por la técnica en gel y del panel de eritrocitos utilizado. A su vez para que un resultado sea comparable con otro obtenido de la misma gestante en el mismo laboratorio se debe realizar el estudio en paralelo con la muestra anterior que ha sido conservada congelada (2)(4). Por tanto, si una paciente tiene un título de un anticuerpo anti-D de 1/1024 realizaremos el TCI a 20

tubos con el consiguiente gasto de reactivos y tiempo. Este material puede ser utilizado para el diagnóstico de aloinmunización de 20 mujeres Rh positivas o 10 Rh negativas de acuerdo al nuevo esquema de seguimiento utilizando la técnica en gel. Más aún, cuando se realizan titulaciones seriadas durante la gestación. Nosotros no realizamos el título desde ya hace 10 años determinando el grado de afectación fetal por otros elementos paraclínicos que desarrollaremos más adelante.

Hace 25 años, proponíamos como esquema de seguimiento en primer lugar la determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh (D). Si la embarazada era Rh positiva no se le realizaba otro control con lo cual la presencia de otro anticuerpo diferente al D era detectado de manera casual o pasaba desapercibido con las inherentes consecuencias fetales. Si la embarazada era Rh negativa se realizaba la búsqueda de aglutininas anti-D. Si las aglutininas eran negativas se repetía el estudio mensualmente durante la gestación y si eran positivas se titulaban repetidamente en el curso del embarazo. Si había otros anticuerpos diferentes al D se descubrían fortuitamente o pasaban desapercibidos como en el caso anterior. Por lo general, se utilizaba un “pool” de glóbulos rojos Rh negativos y positivos pero sin determinar el resto de los antígenos realizándose la prueba de la antiglobulina humana (test de Coombs indirecto) en tubo con lectura macro o microscópica.

Con el esquema actual (ver figura 1), lo prioritario es la investigación de anticuerpos inmunes por la técnica de inmunoprecipitación en gel utilizando tres paneles eritrocitarios que combinan la mayoría de los antígenos. Este estudio debe realizarse en la primera consulta de la gestante y de acuerdo a su resultado se determinará el seguimiento durante el embarazo. Así, lo primero a determinar es si la embarazada tiene o no anticuerpos anti-eritrocitarios independientemente de si es Rh positiva o negativa. Si tiene anticuerpos en un segundo paso se debe identificar la especificidad del mismo para saber si puede producir EHP o no. En caso de ser del tipo IgG que pasa la placenta se debe catalogar el embarazo para su seguimiento como de alto riesgo. En caso de no tener anticuerpos aquí recién importa el resultado del grupo sanguíneo pues si es Rh positiva no realizará más controles inmunohematológicos pero en caso de ser Rh negativa deberá repetir los estudios entre la 25 a 28 semanas de gestación. En 1990, se propone (2) que la determinación del Rh(D) debe ser obtenida en dos resultados concordantes obtenidos en dos ocasiones separadas durante la gestación con el fin de evitar que una embarazada sea falsamente tipificada como Rh positiva siendo realmente Rh negativa. Al utilizar una técnica más sensible que la técnica en tubo, como la inmunoprecipitación en gel, se evitan por un lado las repeticiones mensuales anteriores o los títulos seriados y por otro se aumenta la capacidad diagnóstica con el fin de evitar afectaciones fetales y/o muertes intrauterinas. El diagnóstico precoz de aloinmunización durante la gestación tiene importancia no sólo desde el punto de vista obstétrico neonatal sino también desde el punto de vista transfusional.

FIGURA 1.
Algoritmo diagnóstico de EHFN en el embarazo.



La **técnica de inmunoprecipitación en gel** propuesta en 1990 (3) es una microtécnica con macrolectura que cuando los glóbulos rojos no se aglutinan es decir, no presentan anticuerpos en su membrana celular, descienden libremente a través de las microesferas de dextran (sephadex/sephacryl) del tubo de reacción. Por el contrario, cuando los eritrocitos se aglutinan por la presencia de anticuerpos en su membrana quedan atrapados en las microesferas variando su altura en el tubo de acuerdo a la potencia de la reacción antígeno-anticuerpo. Cada tarjeta contiene 6 tubos y en la que nosotros utilizamos para el diagnóstico prenatal (ver figura 2) en los tres pri-

FIGURA 2.
Inmunoprecipitación en gel.



Con permiso de Saiden S.A., representante exclusivo para Uruguay de Diamed-Suiza.

meros tubos se realiza el diagnóstico del grupo sanguíneo ABO y Rh (D) y en los tres últimos la investigación de anticuerpos antieritrocitarios. **Esta técnica tiene la ventaja que los sueros hemoclasificadores con anticuerpos monoclonales ya están incorporados en las columnas de sephadex por lo cual se disminuye el posible error técnico.** Así, en el tubo 1 se encuentra el suero anti-A que contiene anticuerpos (aglutininas beta) que reaccionan con el antígeno A de la membrana eritrocitaria. En el tubo 2 existe el suero anti-B con aglutininas alfa que aglutina los eritrocitos que poseen el antígeno B. En caso que no se produzca aglutinación en ninguno

de los 2 primeros tubos la paciente es de grupo 0. Si por el contrario, la aglutinación se produce en los dos primeros tubos el grupo es AB.

En el tubo 3 se encuentra el suero anti-D del sistema Rh para determinar si la embarazada es Rh positiva o Rh negativa.

A las embarazadas Rh negativas se les investiga la variante cuantitativa, el D débil (D^u) o D weak, en otra tarjeta adicional mediante la técnica de Liss-Coombs. Si la prueba del D débil es positiva la embarazada se tipifica como Rh positiva. En algunos lugares la prueba del D débil es opcional o no se realiza (4) y la consecuencia sería que se está tipificando a una embarazada como Rh negativa lo cual lleva a mayores controles inmunohematológicos durante la gestación y por otro lado a que reciba inmunoprofilaxis anti-D que no necesita.

Actualmente nosotros estamos utilizando una tarjeta que no detecta la variante DVI (Diaclon Type and Screen A-B-D (VI-)/3 x AHG) dado que las gestantes con esta variante cualitativa pueden desarrollar anticuerpos anti-D contra los epitopes faltantes de la molécula del antígeno D cuando tienen fetos Rh positivos. Por ello deben ser consideradas Rh negativas y recibir inmunoprofilaxis anti-D cuando corresponda.

En suma, en los tres primeros tubos de la tarjeta de inmunoprecipitación en gel se determina el grupo sanguíneo ABO y Rh(D) de la embarazada colocando en cada uno de ellos los glóbulos rojos de la gestante.

La técnica de inmunoprecipitación en gel tiene como ventaja, además de ser una técnica limpia y sencilla, que cada tarjeta tiene un código de barras para su identificación y lectura. El resultado obtenido en un lector automático es validado en la pantalla del computador y este se transcribe por medio de una impresora directamente al papel evitando el error administrativo tan importante de evitar como el error técnico. En el impreso se diagraman los resultados de los 6 tubos de reacción y automáticamente se expresa la interpretación en letras en la parte inferior de la hoja.

En los tres tubos siguientes que contienen como reactivo suero antiglobulina humana AHG (Coombs) se coloca el suero o el plasma de la embarazada junto con glóbulos de los tres paneles de fenotipo conocido para investigar la presencia de anticuerpos antieritrocitarios.

Si el resultado de estos tres tubos donde se realiza el **test de Coombs indirecto (TCI) es negativo y la embarazada es Rh positiva** no debe realizar otro control inmunohematológico durante la gestación.

En un trabajo científico (5) donde se estudiaron 9348 gestantes Rh positivas en el primer y tercer trimestre para investigar la presencia de anticuerpos antieritrocitarios solamente 6 embarazadas (0.06%) desarrollaron nuevos anticuerpos capaces de producir EHP en el control del último trimestre.

En otro estudio (6) se encontraron 58 casos (0.24%) de 17568 embarazadas estudiadas en donde se detectó aloanticuerpos capaces de producir EHP en el momento del parto. Sin embargo, en ambos estudios ninguno de los neo-

atos fue afectado por estos anticuerpos encontrados en el último trimestre de la gestación por lo cual estableciendo un balance costo beneficio no estaría recomendado en las mujeres Rh positivas con TCI negativo realizar otro control inmunohematológico durante la gestación (4). Es de hacer notar que en el esquema de 1982 a las pacientes Rh positivas no se le investigaba la presencia de anticuerpos antieritrocitarios con las consecuencias de RN afectados o muertes intrauterinas y/o reacciones transfusionales.

Si el **TCI es negativo pero la embarazada es Rh negativa** se debe realizar un nuevo control inmunohematológico entre las 25 y 28 semanas para confirmar el Rh y determinar que la paciente carece de anticuerpos previo a la inmunoprofilaxis antenatal que se realiza entre las 28 y 32 semanas de gestación. Si la gestante recibe inmunoprofilaxis durante la gestación se deben dejar pasar por lo menos 8 semanas para repetir los estudios inmunohematológicos por la técnica de inmunoprecipitación en gel. De no ser así puede aparecer un TCI positivo producido por la inmunización pasiva de la inmunoprofilaxis.

Si el TCI es positivo en cualquiera de los controles de la gestación se debe identificar inmediatamente el o los anticuerpos presentes independientemente del grupo sanguíneo de la paciente. No debe asumirse nunca que la embarazada por ser Rh negativa tendrá un anticuerpo anti-D y no realizar el estudio de identificación.

En nuestro país, las muestras de sangre con TCI positivo se envían mayoritariamente al Laboratorio de Referencia en Inmunohematología del Servicio Nacional de Sangre donde por la técnica de inmunoprecipitación en gel se identifica la especificidad del anticuerpo. El resultado es enviado al servicio de Medicina Transfusional solicitante quien lo adjuntará al resultado inicial para ser enviado a la historia clínica de la gestante. El resultado de la identificación del anticuerpos es decir, contra que antígeno de grupo sanguíneo está dirigido, nos puede ayudar a determinar si puede o no producir EHP. Así existen anticuerpos como los anti-Lewis (Lea o Leb) o anti-P1 que son del tipo IgM que no cruzan la placenta hacia el feto. Por otro lado existen anticuerpos del tipo IgG que atraviesan la placenta pero que no producen una destrucción acelerada de los glóbulos rojos como los anticuerpos del sistema Chido, Rodgers y Knops (4). Por el contrario otros anticuerpos IgG como los del sistema Rh (C D E c y e), Kell, Duffy, etc pueden producir EHP. Una excepción para este tipo de anticuerpos son los del sistema Cromer que a pesar de ser del tipo IgG desciende su concentración durante la gestación por la presencia del antígeno correspondiente en el trofoblasto (7).

En el momento actual, más de 50 diferentes antígenos eritrocitarios han sido reportados asociados con EHP (28). Sin embargo, unos pocos parecen producir EHP severa: anti-D, anti-c y anti-Kell. En un estudio realizado en

un centro de referencia en Holanda (29), de 258 gestaciones manejadas con TIU en el 85% de los casos el anticuerpo era un anti-RhD, el 10% anti-Kell y el 3.5 % anti-Rhc. Sólo un caso de anti-RhE, antiRhe y anti-Fya necesitaron TIU. Puede afirmarse entonces que la mayoría de los aloanticuerpos que producen EHP severa corresponden al sistema Rh y Kell. A excepción del anti-D para el cual existe una inmunoprofilaxis los **otros antígenos eritrocitarios siguen siendo una causa de aloinmunización y de morbi-mortalidad por EHP** para lo cual es necesario que sean detectados precozmente durante la gestación.

En los dos tercios de los casos de gestantes aloinmunizadas con anti-Kell existe una historia de transfusión de hemocomponentes previa (30) y con anti-Rhc más del 50% (31). Por ello, algunos países como Holanda y Australia han implementado el uso de sangre fenotipada en el sistema Rh y Kell para las transfusiones que se realizan en niñas o mujeres en edad reproductiva activa. En USA, donde esta práctica transfusional no es aplicada, el anticuerpo anti-Kell ha sobrepasado al anti-RhD en el liderazgo de la asociación con EHP. Inclusive el anticuerpo anti-Kell puede producir una EHP más grave que la generada por el RhD. Esto se debería a que la anemia fetal es más intensa dado que se produciría por un doble mecanismo. Uno periférico por hemólisis extravascular similar al anti-RhD y otro central por disminución de la eritropoyesis. Berkowitz y colaboradores (17) fueron los primeros en encontrar, por esta razón, una discrepancia entre los valores del incremento de densidad óptica y la gravedad de la EHP dado que esta técnica mide exclusivamente el grado de hemólisis fetal pero no la intensidad de la anemia. Actualmente, con la medición por Doppler de la velocidad del flujo sanguíneo en la arteria cerebral media fetal, que mide directamente el grado de anemia se ha encontrado un mejor valor predictivo de la severidad de la EHP por anti-Kell (33).

En un estudio de seguimiento inmunohematológico que realizamos durante cinco años (2001-2005) estudiamos 14860 gestantes aplicando el nuevo protocolo por la técnica de inmunoprecipitación en gel y encontramos que 157(1,05%) tenían anticuerpos antieritrocitarios (25). 153 fueron aloanticuerpos de los cuales 84(55%) se hallaron en mujeres RhD positivas y 69(45%) en RhD negativas. Es decir, aplicando el esquema de seguimiento anterior en donde se investigaba la presencia de anticuerpos inmunes en la gestación de mujeres Rh negativas hubiéramos encontrado el 45% de los anticuerpos con la consiguiente morbi-mortalidad por EHP como publicamos, en una historia de un embarazo gemelar en una gestante Rh positiva donde el anticuerpo anti-Rhc no fue diagnosticado y el resultado fue una muerte neonatal y el otro gemelar severamente afectado (20).

Dentro de las gestantes RhD negativas el 80% (55 casos) tenían un anticuerpo anti-D lo que representa una inmunización residual a pesar de la inmunoprofilaxis del 3%. Si bien la prevalencia exacta de la aloinmunización anti-D es difícil de determinar en el último reporte realizado en USA en el

año 2003 existían 6.8 casos por 1000 nacimientos (0,68%) sensiblemente menor a la encontrada por nosotros lo cual reafirma la necesidad de ajustarse a los protocolos de profilaxis anti-D establecidos (35). Además nunca debemos asumir que por ser Rh negativa una gestante va a tener un anticuerpo anti-D pues como lo demuestra este trabajo (25) en el 20% de los casos se encontrará un anticuerpo diferente al D. De los 153 aloanticuerpos encontrados en 14860 gestantes estudiadas 104(0,7%) podían producir EHP de los cuales los pertenecientes al sistema Rh y Kell fueron 98(94%). En un estudio similar realizado en 1998 sobre un seguimiento durante un año de 22.264 gestantes se encontraron 244 (1%) de anticuerpos antieritrocitarios de los cuales 100 eran anti-D (el anticuerpo más frecuente) y 144 diferentes al anti-D. Dentro de estos los anticuerpos anti-Rhc y Kell fueron los que produjeron EHP más severa seguidos por los anti-RhC, RhE y Fya (36). En un estudio reciente realizado en Holanda, donde aplican la determinación de anticuerpos inmunes a todas las gestantes en la primera consulta desde el año 1998, la prevalencia de aloanticuerpos durante la gestación fue de 1,2% y de 0,4% los que podían producir EHP(37). Dentro de los anticuerpos diferentes al D los más frecuentes fueron anti-RhE seguido de anti-Kell y Rhc. La presencia de múltiples anticuerpos fue encontrada en el 14% de los casos.

El sistema MNS contiene 40 antígenos eritrocitarios. Los anticuerpos anti-M ocurren naturalmente como IgM y típicamente se presentan como aglutininas frías. Sin embargo, raramente existe una conversión hacia IgG y algunos pocos casos se han asociado a EHP. Sin embargo, en el estudio holandés (37), los anticuerpos anti-M o N tuvieron una prevalencia de 0,13% y todos se presentaron como IgM no produciendo EHP. A su vez, en el 7% de los casos un nuevo anticuerpo fue detectado al final de la gestación lo cual confirma que existe un porcentaje de mujeres ya aloinmunizadas que pueden desarrollar otro anticuerpos cuando se exponen al los antígenos fetales por ejemplo por cordocentesis (38) o por transfusiones (39). Esto es importante porque por ejemplo una gestante que está aloinmunizada al antígeno Kell y que se le realiza una TIU cuando el feto es Rh positivo debe recibir inmunoprofilaxis anti-D después de esta u otra maniobra invasiva durante la gestación. De no realizar inmunoprofilaxis probablemente en el próximo embarazo se detecte un anti-Kell y un anti-D. Por último, este trabajo (37) concluye que el protocolo de seguimiento inmunohematológico de la gestación que comienza con la determinación a todas las gestantes de la investigación de anticuerpos inmunes justifica su inserción dentro de los programas rutinarios de cuidado prenatal. Un beneficio adicional de la investigación rutinaria en el primer trimestre es la relevancia que puede tener la identificación precoz del o los anticuerpos con fines transfusionales maternos o feto-neonatal como se muestra en una de las historias clínicas al final de este capítulo.

En aproximadamente el 10% de las gestantes con un TCI positivo se en-

contra la presencia de **anticuerpos múltiples** (23). Lo más frecuente es la asociación de un anti-D con anticuerpos dirigidos a otros antígenos del sistema Rh u otros sistemas (ver historias clínicas del capítulo Tratamiento Prenatal). La presencia de otros anticuerpos con un anti-D parece incrementar la necesidad de transfusiones intrauterinas (24). Sin embargo, en los dos casos clínicos presentados en el capítulo de Tratamiento Prenatal las dos gestantes tiene los mismos anticuerpos (anti-D, anti-C y anti-Fya) pero una de ellas presenta un feto con EHP grave que requiere TIU y EST postnatales mientras que en el otro caso la EHP se presenta como leve realizándose sólo tratamiento postnatal con fototerapia.

A veces, cuando se realiza la investigación de anticuerpos inmunes durante la gestación aparece un TCI positivo que reacciona con los eritrocitos de los tres paneles utilizados. Esto puede ocurrir cuando hay anticuerpos múltiples como en el caso anterior pero por lo general cuando el plasma materno se enfrenta a los 11 eritrocitos del panel de identificación la especificidad de los anticuerpos puede ser realizada. Sin embargo, una reactividad en los tres eritrocitos del panel de investigación, nos obliga a realizar un TCD a la gestante el cual resulta negativo en los casos de aloanticuerpos múltiples.

En otra situación menos frecuente, el TCI positivo de los tres eritrocitos del panel de investigación se acompaña de un TCD positivo o a un autocontrol positivo y cuando se enfrenta el plasma materno a los 11 eritrocitos del panel de identificación nos encontramos también con una panaglutinación que impide por lo general determinar la especificidad del anticuerpo. Aquí, se realiza el diagnóstico de la presencia de un **autoanticuerpo materno**. Fuera de la gestación el primer diagnóstico presuntivo sería el de una anemia hemolítica autoinmune (AHAI). Sin embargo, en la gestante lo primero que debemos pensar es en la presencia de un anticuerpo antifosfolípido (AAF). En el estudio que realizamos de seguimiento durante cinco años en 14860 mujeres embarazadas encontramos 157 que tenían un TCI positivo y de estos 4 presentaban además un TCD positivo. En los cuatro casos se confirmó la presencia de un AAF (25). Sin embargo, la mayoría de los AAF que se presentan durante la gestación no presentan este patrón inmunohematológico. Pero, cuando se presenta en el primer control es fundamental comunicar al médico obstetra dicha posibilidad para que se investigue rápidamente la presencia de AAF dado que este tipo de anticuerpos produce terminaciones precoces de la gestación y un cuadro de trombofilia por lo cual debe iniciarse, luego del diagnóstico, el tratamiento con heparina fraccionada de bajo peso molecular. Otro beneficio adicional de la aplicación del nuevo protocolo de seguimiento inmunohematológico de la gestación. Aún menos frecuente, es cuando la gestante tiene un TCI y TCD positivo pero con anticuerpos AAF negativos (ver historia clínica al final del capítulo). Estos autoanticuerpos generados durante la gestación no producen AHAI clínicamente significativa sin afectar a la gestante ni al recién nacido. Por el contrario cuando estos autoanticuerpos ocurren fuera de la

gestación son clínicamente significativos en un porcentaje mayor (26). Además, las AHAI secundarias a Lupus, artritis, síndromes linfoproliferativos o tumores el cuadro hemolítico se agrava durante la gestación. En los casos asintomáticos que se producen durante la gestación generalmente el TCD es positivo con anti-complemento (C3d) y/o anti-IgG. En algunos casos se puede asociar la presencia del autoanticuerpo a aloanticuerpos gestacionales.

En un estudio de seguimiento realizado durante dos años en Alemania, sobre un total de 22.782 gestantes se encontraron, utilizando la técnica de inmunoprecipitación en gel, 25 (0,11%) autoanticuerpos (23 autoanticuerpos y 2 auto más aloanticuerpos) lo cual muestra una prevalencia aproximadamente nueve veces superior que fuera de la gestación (3 casos-0,02% en 12.903 mujeres estudiadas) (27).

En suma, **no es lo mismo el diagnóstico de aloinmunización que el de EHP.**

Una embarazada puede estar aloinmunizada y el feto no presentar EHP. Para que se produzca EHP es necesario que la embarazada presente un anticuerpo del tipo IgG, que estos anticuerpos pasen hacia el feto, que los glóbulos rojos fetales tengan el antígeno correspondiente y que mediante una reacción antígeno-anticuerpo se produzca una destrucción acelerada de los eritrocitos fetales y/o del RN. La identificación del anticuerpo materno hace el diagnóstico de aloinmunización que es el primer paso para llegar al diagnóstico de EHP. Ni la especificidad del anticuerpo materno ni el nivel del mismo (título o concentración) pueden predecir con certeza el grado de afectación o no del neonato. A continuación estableceremos los métodos para determinar el grupo sanguíneo fetal así como los que determinan el grado de afectación, pasos indispensables para llegar al diagnóstico final de EHP.

Cuando se detecta un anticuerpo materno clínicamente significativo, capaz de producir EHP, es de utilidad determinar el **fenotipo del padre** para predecir la probabilidad del feto de portar el antígeno eritrocitario correspondiente. Pero la determinación serológica es un diagnóstico de probabilidad y siempre deberá tenerse presente la posibilidad de que el sujeto estudiado no sea el padre biológico del feto.

Se ha utilizado como método directo pero invasivo la determinación del genotipo fetal (Rh, K, Fy y Jk) mediante la técnica de polymerase chain reaction (PCR) de material celular obtenido del líquido amniótico o vello-sidad coriónica (4). Recientemente se ha publicado un método no invasivo para determinar la presencia del **fenotipo RhD fetal** mediante amplificación del ADN por PCR a partir del plasma de embarazadas Rh negativas (8). Este método identificó correctamente la presencia del antígeno D en 10 de 12 fetos en el primer trimestre y en todos los 30 fetos del segundo trimestre y en los 15 del tercero. El diagnóstico del fenotipo RhD fetal

tendría dos aplicaciones fundamentales. En primer lugar, en gestantes RhD negativas inmunizadas al antígeno D para determinar la posibilidad o no de afectación fetal y evitar en los fetos RhD negativo la realización de técnicas invasivas de diagnóstico y tratamiento fetal. En segundo lugar, en gestantes RhD negativas no inmunizadas al antígeno D con el fin de evitar, cuando el feto es RhD negativo, el uso de inmunoprofilaxis antenatal.

DIAGNÓSTICO DE AFECTACIÓN FETAL

Técnicas invasivas como **la amniocentesis** (9) y **la Cordocentesis** (10) son usadas para el diagnóstico y tratamiento de fetos con riesgo de desarrollar EHP. Se utiliza la punción de líquido amniótico para determinar el incremento de densidad óptica como método para establecer el grado de hemólisis fetal. El valor absoluto obtenido lo trasladamos al gráfico de Queenan (9) que ha sustituido al anterior gráfico de Liley (11). El gráfico propuesto es aplicable desde las 14 semanas de gestación y se identifican 4 zonas pronósticas. Los valores de la zona inferior corresponden a fetos no afectados que en el caso de una aloinmunización anti-D puede ser un feto Rh negativo. La zona siguiente es indeterminada con fetos no afectados o con afectación leve. Valores de densidad óptica que caen en ambas zonas aún con títulos elevados o crecientes de anticuerpos corresponden por lo general a fetos no afectados.

La tercera zona corresponde a fetos con afectación moderada y los valores más altos caen en la cuarta zona con mayor riesgo de muerte intrauterina. A veces más importante que el valor absoluto es determinar la pendiente entre dos resultados que nos indica la intensidad o no del proceso hemolítico (12) y nos establece un pronóstico anticipado de cuando realizar cordocentesis o parto adelantado.

En fetos con valores absolutos en las dos zonas superiores o con pendientes ascendentes pueden ser estudiados por cordocentesis. El mejoramiento de los equipos de ultrasonido ha permitido dirigir una aguja hacia un vaso sanguíneo umbilical, preferiblemente la vena en su inserción placentaria, para obtener una muestra de sangre fetal. La extracción percutánea de sangre umbilical permite la medición directa de variables hematológicas y bioquímicas y una precisa evaluación de la EHP. Es importante verificar que la muestra haya sido verdaderamente obtenida del feto mediante la evaluación hematológica y serológica de parámetros que pueden diferir entre la madre y el feto (hemoglobina, grupo sanguíneo y TCD). Dado que el grupo sanguíneo, el TCD y el hematocrito pueden ser realizados rápidamente luego de la extracción de la muestra, se puede utilizar la misma punción para fines terapéuticos fetales como exsanguinotransfusión, transfusión intruterina y/o administración intravenosa de gamaglobulina polivalente. El riesgo de complicaciones importantes por la cordocentesis es menor al 1% en la mayoría de los centros (13)

Uno de los **métodos no invasivos** para determinar las repercusiones que

sobre las estructuras ovulares y fetales produce la anemia fetal es la **ecografía** bidimensional. Esta puede detectar un edema vellositario o un engrosamiento del cordón umbilical con dilatación venosa. Un aumento del diámetro abdominal por hepatoesplenomegalia y/o ascitis, un halo pericraneano por edema y en casos más severos un derrame pericárdico con dilatación de la vena cava inferior y del conducto venoso del hígado. Muchas veces el aumento del líquido amniótico (polihidramnios) es el signo más precoz de afectación fetal.

El análisis de **la frecuencia cardíaca fetal** (cardiotocografía externa) es un estudio de utilidad para medir la afectación fetal y como control de los tratamientos intrauterinos. El patrón sinusoidal que se define como una variación rítmica y fija de la línea de base de la frecuencia cardíaca fetal es indicador de anemia fetal severa y mal pronóstico.

A partir del año 2000 se desarrolla una técnica no invasiva para el diagnóstico de la anemia fetal: la medición de **la velocidad del flujo sanguíneo en el pico sistólico de la arteria cerebral media (ACM) fetal** (14). Se estudiaron en este trabajo inicial 111 fetos con riesgo de anemia debido al pasaje transplacentario de anticuerpos maternos en gestantes aloinmunizadas. Los valores de hemoglobina (Hb) fueron comparados con 256 fetos normales. En estos el valor de la Hb aumentó con la edad gestacional. De los 111 fetos con riesgo de desarrollar anemia 41(37%) no tuvieron descenso de la Hb, 35(32%) presentaron anemia leve, 4(4%) moderada, 19(17%) severa sin hidrops y 12(11%) anemia severa con hidrops. El valor predictivo del método no invasivo para determinar la presencia de anemia fetal moderada o severa fue del 100% de sensibilidad y el 12% de falsos positivos (especificidad) debido a que los resultados fueron obtenidos desde varios centros asistenciales con equipos diferentes de ultrasonido y con distintos operadores. Aquí se plantean las dos primeras variables que pueden influir en los resultados del método: el equipo utilizado y el técnico que realiza la medición. La tercera variable es la expresión de los resultados en unidades comparables dado que se necesitan realizar estudios seriados y para lo cual se proponen los valores en cm/seg en un nomograma establecido (14) Cuando el valor se encuentra aumentado 1,5 veces la media indicaría el inicio de medidas diagnósticas y terapéuticas invasivas (cordocentesis). La velocidad del flujo sanguíneo aumenta en los fetos anémicos debido a una disminución de la viscosidad sanguínea y a un aumento del gasto cardíaco. Puede medirse desde la semana 16 a 18 de la gestación y se recomienda un seguimiento semanal (15). Luego de las 35 semanas aumenta la tasa de resultados falsos positivos (16). En este estudio, “of the Diamond Study Group”, se determina que la velocidad de flujo del pico sistólico de la ACM fue superior para diagnosticar anemia fetal severa que la determinación del incremento de la densidad óptica en el líquido amniótico (LA) obtenido por amniocentesis y utilizando los gráficos de Liley y Queenan

(85% Doppler, 76% curva de Liley y 81% curva de Queenan). Sin embargo, el estudio Doppler de la ACM mide el grado de anemia fetal y el incremento de la densidad óptica del LA determina el grado de hemólisis fetal. En este último caso, es recomendable realizar dos punciones espaciadas una o dos semanas para poder determinar la pendiente del incremento de densidad óptica lo cual establece un valor pronóstico evolutivo que nos permite establecer cuando realizar cordocentesis o parto adelantado salvo en los casos donde en la primera amniocentesis el valor absoluto muestra riesgo de muerte intrauterina. La amniocentesis, como técnica invasiva tiene riesgos aunque menos que la cordocentesis.

En períodos de transición, cuando se introduce una nueva técnica como la medición de la velocidad de flujo sanguíneo de la ACM, es recomendable que durante un período de tiempo se realice el seguimiento dual con la amniocentesis con el fin de establecer una correcta correlación entre ambas técnicas (17). Actualmente, la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) en el nuevo Protocolo de Diagnóstico y Prevención de la Enfermedad Hemolítica del Feto y Recién Nacido de marzo de 2008 (www.sets.es) ya no propone la amniocentesis como método de diagnóstico de afectación fetal sustituyéndola por la ecografía y la medición de la velocidad del flujo sanguíneo de la arteria cerebral media.

Una vez que se realiza cordocentesis se invalida el seguimiento evolutivo de la EHP con amniocentesis dado que el LA se contamina con Hb. El Doppler de la ACM tiene una sensibilidad descendida para decidir las subsecuentes cordocentesis para TIU (18) lo cual se incrementa con el número de TIU realizadas.

Es de destacar que la medición de la velocidad del flujo sanguíneo de la ACM sirve para detectar anemia fetal producida por cualquier aloanticuerpo de origen materno. Inclusive en el caso del anti-Kell que produce anemia fetal por un mecanismo dual, supresión de la eritropoyesis (central) y hemólisis (periférica) tendría un mayor valor predictivo que el estudio del LA que mide solamente hemólisis (19).

También puede ser utilizada para detectar otras causas de anemia fetal y que pueden producir hidrops no inmunológicos como la infección por parvovirus B19, hemoglobinopatías, transfusión feto-fetal, etc. (15).

Para la medición del pico sistólico de la velocidad del flujo sanguíneo de la ACM, el feto debe estar en un período de reposo durante al menos 2 minutos. El polígono de Willis debe ponerse de manifiesto con Doppler color. Se debe realizar una ampliación de la imagen de la ACM para que se vea completamente y ocupe el 50% de la pantalla. La ventana Doppler debe tener 1 mm de ancha, debe situarse cerca del origen de la ACM en la carótida interna y de tal manera que el ángulo entre la dirección de la sangre y el haz de ultrasonidos sea lo más cercano a cero. No debe usarse el corrector de ángulo. Se deben observar 15 a 30 ondas con forma similar y debe medirse la onda más alta. El procedimiento debe realizarse por lo menos tres veces.

El valor promedio en cm/seg debe llevarse a una hoja de cálculo (www.fetaltest.com) junto con la edad gestacional. El resultado de la velocidad máxima de la ACM obtenido se expresa en MoM y se estima la concentración de hemoglobina en gr/dl. y a su vez se realiza la representación gráfica del valor de la velocidad máxima de la ACM con respecto a la edad gestacional (14).

Si no se han realizado transfusiones intrauterinas previamente, cuando el valor de la velocidad máxima de la ACM se sitúa por encima de 1,5 MoM es necesario practicar una cordocentesis diagnóstica seguida de transfusión intrauterina para corregir la anemia fetal. Si ya se han practicado transfusiones intrauterinas previas, es necesario repetirlas cuando la velocidad máxima de la ACM se sitúa por encima de 1,68 MoM.

En caso de hidrops fetal es necesario practicar una cordocentesis diagnóstica y en el mismo acto una transfusión fetal con independencia del valor de la velocidad máxima de la ACM.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Cuadro JC, Scasso JC, Decaro J, Gutierrez C, Alonso J, Varela S, Miller A. Normas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica por conflicto Rh. Servicio Nacional de Sangre- MSP, Montevideo-Uruguay, 1982.
- 2- Judd WJ, Luban NLC, Ness PM, Silberstein LE, Stroup M, Widmann FK. Prenatal and perinatal immunohematology :recommendations for serologic management of the fetus, newborn infant and obstetric patient. *Transfusion* 1990;30:175-83.
- 3- Lapiere Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, Drot C. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 1990;30:109-13.
- 4- Judd WJ. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. *Transfusion* 2001;41:1445-1452.
- 5- Rothenberg JM, Weirermiller B, Dirig K. Is a third-trimester antibody screen in Rh+ women necessary? *Am J Manag Care* 1999;5:1145-50.
- 6- Hedle NM, Klama L, Frassetto R. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. *Transfusion* 1993;23:217-20.
- 7- Reid ME, Chandrasekaran V, Sausais L, Pierre J, Bullock R. Disappearance of antibodies to Cromer blood group system antigens during mid pregnancy. *Vox sang* 1996;71:48-50.
- 8- Lo YMD, Hjelm Nm, Fidler C. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734-1738.
- 9- Queenan Jt, Tomai TP, Ural SH, King JC. Deviation in amniotic fluid optical density at a wavelength of 450 nm in Rh-immunized pregnancies from 14 to 40 weeks gestation: a proposal for clinical management. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1370-6.
- 10- Weiner CP, Williamson Ra, Wenstrom KD. Management of fetal hemolytic disease by cordocentesis. I Prediction of fetal anemia. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:546-53.
- 11- Liley AW. Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by Rhesus sensitization. *Am J Obstet Gynecol* 1961;82:1359-70.
- 12- Decaro J. Manual de Medicina Transfusional Premio “El País” 1998 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed de la Plaza, Montevideo-Uruguay.
- 13- Ghidini A, Sepúlveda W, Lockwood Cj, Romero R. Complications of fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1339-1344.
- 14- Mari G, Deter RI, Carpenter RL, RahmanF, Zimmerman R,Moise K, Dorman K, Ludomirsky A, Gonzalez R,Gomez R,Oz U, Detti L, Copel j, Bahadio-Singh R, Berry S, Martinez-Poyer J, Blackwell S. Noninvasive diagnosis by doppler ultrasonography of fetal anemia due

to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med* 2000;342:9-14.

- 15- Moise K. The usefulness of middle cerebral artery Doppler assessment in the treatment of the fetus at risk for anemia. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:161e1-161e4.
- 16- Oepkes D, Seaward G, Vandenbussche F et al. Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. *N Engl J Med* 2006;355:156-164.
- 17- Moise K. Diagnosing Hemolytic Disease of the Fetus-Time to Put The Needles Away?. *N Engl J Med* 2006;355:192-194.
- 18- Detti L, Oz U, Guney I et al. Doppler ultrasound velocimetry for timing the second intrauterine transfusion in fetuses with anemia from red cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:1048-1051.
- 19- Van Dongen H, Klumper FJ, Sikkel E et al. Non invasive test to predict fetal anemia in Kell-alloimmunized pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;25:341-345.
- 20- Decaro J. Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP) Ed. Rimarco. Montevideo-Uruguay. Mayo 2003 pag.123-125.
- 21- Van Dijk BA, Dooren MC, Overbeeke M. Red cell alloantibodies in pregnancy: there is no “critical titre”. *Transfusion Medicine* 1995;4:199-202.
- 22- Weisbach V, Ziener A, Zimmermann R, Glaser A, Zingsem J, Eckstein R. Comparison of the performance of tour microtube column agglutination system in the detection of red cell alloantibodies. *Transfusion* 1999;39:1045-1050.
- 23- Filbey D, Hanson U, Weststrom G. The prevalence of red cell antibodies in pregnancy correlated to the outcome of the newborn: a 12 year study in central Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74:687-692.
- 24- Spong C, Porter A, Queenan J. Management of isoimmunization in the presence of multiple maternal antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:481-484.
- 25- Pereira A, Silveira S, Hernandez C, Varela A, Gaggero M, Olivera P, Dilorenzi N, Gualarte M, Larrosa V, Miller A y Decaro J. Erythrocyte antibodies in Pregnant Women. XXXI World Congress of de International Society of Hematology (ISH) 20-24 marzo, 2007. Punta del Este-Uruguay.
- 26- Releer BS, Smith L, McQuiston D, Pepkowitz SH, Goldfinger D. Red cell autoantibody production in utero: a case report. *Transfusion* 1994;34:72-74.
- 27- Hoppe B, Stibbe W, Bielefeld A, Pruss A, Salama A. Increased RBC autoantibody production in pregnancy. *Transfusion* 2001;41:1559-1561.
- 28- Moise,K. Fetal anemia due to non-Rhesus-D red-cell alloimmunization. *Seminars in Fetal Neonatal Medicine* 2008;13:207-214.
- 29- Van Kamp IL, Klumper FJ, Bakkum RS et al. The severity of immune fetal hidrops is predictive of fetal outcome after intrauterine treatment. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:668-673.
- 30- McKenna Ds, Nagaraja HN, O’Shaughnessy R. Management of pregnancies complicated by anti-Kell isoimmunization. *Obstet Gynecol* 1999;93:667-673.
- 31- Bowell PJ, Brown SE, Dike AE et al. The significance of anti-c alloimmunization in pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1986;93:1044-1048.
- 32- Berkowitz RI, Beyth Y, Sadovsky E. Death in utero due to Kell sensitization without excessive elevation of delta OD450 value in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1982;60:746-749.
- 33- Rimon E, Peltz R, Gamzu R et al. Management of Kell isoimmunization-evaluation of a Doppler-guided approach. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006;28:814-820.
- 34- Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Munson ML. Births: Final data for 2003. *Nat Vital Stat Rep* 2005;54:1-116.
- 35- Recomendación para la Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad hemolítica feto-neonatal en la gestación y para la inmunoprofilaxis anti-D. Consenso 2005. *Arch Gin Obstet* 2005;43:169-176.
- 36-Howard H, Martlew V, McFadyen I, Clarke C, Duguid J, Bromilow I, Eggington J. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell allo-immunisation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 1998;78:F62-F66.
- 37- Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion*;2008,48:941-952.

38- Schonewille H, Klumper FJ, van de Watering LM, Kanhai H, Brand A. High additional maternal red cell alloimmunization after Rhesus and K-matched intrauterine intravascular transfusions for hemolytic disease of the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:143-146.

39- Schonewille H, van de Watering LM, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures?. *Transfusion* 2006;46:630-635.

40- Medicina Transfusional Perinatal en AABB Manual Técnico. American Association of Blood Bank y Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. 15 Ed 2007 en español, Buenos Aires-Argentina. Cap.23 pag 551-552.

HISTORIA CLÍNICA

MERV de 24 años procedente del interior del país cursando su cuarta gesta. Dos partos y una cesárea anterior con tres RN vivos. Primer embarazo a los 19 años. Luego del parto por cesárea recibe transfusión de dos unidades de sangre desplasmatazada.

FUM 6/8/2005 FPP 16/5/2006 .Grupo sanguíneo 0 Rh positivo. Enviada desde el interior a las 28 semanas de gestación por TCI positivo. Se extrae muestra de sangre para realizar estudios inmunohematológicos que muestran un grupo sanguíneo 0 Rh D positivo con TCI positivo frente a los tres paneles de glóbulos de investigación por técnica de inmunoprecipitación en gel. TCD negativo. Se envía al laboratorio de referencia del Servicio Nacional de Sangre para identificar el anticuerpo materno. El suero materno aglutina los 11 eritrocitos de los paneles de identificación y no se encuentra sangre compatible de donantes al azar mediante la realización de pruebas cruzadas en medio gel liss-coombs. Se presume la presencia de un anticuerpo materno originado por un antígeno público de alta frecuencia en la población. Se realiza ecografía que no muestra alteraciones y amniocentesis a las 28 semanas con un resultado de 0,123 que en la gráfica de Queenan corresponde a un feto afectado.

Reingresa a las 34 semanas para una nueva amniocentesis con un resultado de 0,073 que corresponde a la misma zona del gráfico de Queenan (feto afectado). Sin signos ecográficos de afectación. Se decide cesárea con esterilización tubaria a las 38 semanas de gestación. Dado que es imposible conseguir sangre compatible con el suero materno el día anterior al parto se decide realizar una extracción de 450 cc de sangre materna por el procedimiento de hemodilución normovolémica. Procedimiento bien tolerado. Los valores previos a la extracción eran de 11,5g de Hb y 34% de Hto.

El 3/5/2006 se obtiene un RN de sexo femenino de 2770g, apgar 9/9, 0 Rh positivo TCD positivo ++++ por inmunoprecipitación en gel. Los valores de sangre de cordón fueron de BT 7,54 mg%, BI 6,99mg% y 34% Hto. Se coloca en fototerapia. A las cinco horas de vida BT 12,15, BI 11,56 y Hto 30%. Se decide realizar exsanguinotransfusión (EST) con eritrocitos maternos lavados, leucoreducidos, irradiados con radiación gamma y re-

suspendidos en plasma fresco AB.

Luego de la EST tiene valores de BT 7,23 mg%, BI 6,93mg% y Hto de 39%. Se realiza albúmina humana al 20% 10cc e inmunoglobulina polivalente intravenosa 500mg/kg.

A las 24 horas presenta una BT de 18,7mg%, BI 17,85mg% y Hto 35% por lo cual se decide realizar una segunda EST también con sangre materna en iguales condiciones que la anterior. Los valores luego de la segunda EST son BT 9,74 y BI 9,34mg%. Buena evolución posterior.

En suma, se trata de una típica historia de EHP, de gravedad moderada, que evoluciona favorablemente con tratamiento postnatal.

Sin embargo, la historia clínica tiene algunas particularidades. En primer lugar, se diagnostica una aloimmunización en una gestante Rh D positiva lo cual muestra la importancia de la aplicación del nuevo esquema de seguimiento inmunohematológico de la gestación en donde se establece que se debe realizar el estudio de anticuerpos inmunes anti-eritrocitarios en la primera consulta a todas las gestantes con el fin de poder establecer la posibilidad de EHP o evitar reacciones adversas transfusionales.

En el caso clínico presentado, a pesar de que se realiza diagnóstico de aloimmunización se envía a la gestante para identificar el anticuerpo y realizar diagnóstico de afectación fetal recién a las 28 semanas de gestación. La primera amniocentesis hace diagnóstico de afectación fetal por lo cual debió repetirse a la semana o a los 15 días para determinar la pendiente según lo establecido en el consenso 2005 . Sin embargo, se realiza tardíamente a las 34 semanas de gestación.

Al no poder identificar el antígeno eritrocitario al cual está dirigido el anticuerpo materno dado que produce una aglutinación con todos los glóbulos rojos de los paneles de fenotipo conocido y con un TCD negativo, pensamos se trate de un aloanticuerpo generado frente a un antígeno público de alta frecuencia en la población. Dicho anticuerpo fue generado probablemente por las transfusiones de sangre desplasmatazada que recibió la gestante en la cesárea anterior. La única posibilidad de prevenir este tipo de aloimmunización es tratar de evitar las transfusiones de hemocomponentes celulares (principalmente eritrocitos) en mujeres en edad reproductiva activa. Generalmente las transfusiones de sangre desplasmatazada que se realizan en el postparto inmediato se deben a anemias gestacionales no tratadas previamente. Cada vez que se indica una transfusión de eritrocitos se debe establecer un correcto balance riesgo-beneficio. Dentro de los riesgos, existe como en este caso, la aloimmunización que puede tener consecuencias en futuros embarazos o en la necesidad de transfusiones o trasplantes.

Al no poderse identificar el anticuerpo se realizaron pruebas cruzadas in vitro con el suero materno y gran cantidad de unidades de sangre desplasmatazada. Sin embargo, debido probablemente a la alta frecuencia del

antígeno en la población no fue posible encontrar una unidad de sangre compatible. Por tal motivo, se decidió obtener sangre materna el día anterior a la cesárea principalmente para el tratamiento del RN afectado.

A la sangre materna, carente del antígeno al cual estaba dirigido el anticuerpo, se le realizó estudio de enfermedades transmisibles, se irradió con radiación gamma por ser familiar directo, se utilizaron filtros para leuco-reducción y se separó el plasma con los anticuerpos por centrifugación y lavado. Esta unidad se utiliza para la primera EST. Dada la posibilidad de una segunda EST se extrae una segunda unidad de sangre materna la cual es utilizada también para el tratamiento del neonato en iguales condiciones que la anterior. Se realizó un tratamiento similar a cuando ocurre una trombocitopenia aloinmune neonatal por anticuerpos anti-plaquetarios maternos. La diferencia son las células maternas utilizadas eritrocitos o plaquetas.

Pero, como se resolvería este caso si las condiciones maternas por ejemplo infección aguda o anemia no permitieran la obtención de sangre ?.

En primer lugar, que sucedería si la gestante tiene una hemorragia en el parto con descompensación cardiovascular. Aquí debemos realizar una valoración riesgo-beneficio. Si la gestante presenta una anemia aguda con riesgo vital por falta de oxigenación tisular se debe transfundir a la paciente con sangre desplasmatizada isogrupo incompatible (prueba cruzada mayor positiva). En una paciente sangrante se pierden anticuerpos maternos y eritrocitos sensibilizados por lo cual la reacción hemolítica puede ser menor. Además, el anticuerpo materno en este caso es del tipo IgG dado que pasa la placenta hacia el feto produciendo afectación feto-neonatal y un TCD positivo. Por tanto, no se producirá en el receptor una hemólisis intravascular. La hemólisis extravascular produce reacción febril, chicho e ictericia principalmente que son situaciones clínicas benignas que ceden espontáneamente o con tratamiento sintomático. Por tanto, en caso de hemorragia con anemia aguda y riesgo vital se hubiera transfundido a la gestante con sangre con pruebas cruzadas positivas.

Como tratamos al RN afectado de EHP? En el neonato el riesgo mayor es la hiperbilirrubinemia sobretodo indirecta que por su liposolubilidad puede provocar cuadros neurológicos irreversibles cuyo grado mayor desde el punto de vista clínico es el kernicterus. El RN tiene circulando eritrocitos sensibilizados (unidos al anticuerpo materno). En este caso, estaba indicada la EST por lo cual estableciendo un balance riesgo-beneficio se debe realizar este procedimiento terapéutico con sangre aún con pruebas cruzadas positivas con el suero materno (1). Lo que puede suceder en esta situación es que en vez de solucionar la EHP con dos EST como en este caso se necesite un número mayor de procedimientos. Además, los anticuerpos pasivos son temporales por lo cual el RN carece de secuelas inmunológicas.

1 – Medicina Transfusional Perinatal en AABB Manual Técnico 15 Ed en español . American Association of Blood Bank (AABB) y Asociación Ar-

gentina de Hemoterapia e Inmunohematología. Buenos Aires - Argentina 2007. cap.23 pag. 559.

HISTORIA CLÍNICA

Gestante de 20 años, estudiante, casada con un hijo vivo normal, procedente del interior del país. Grupo sanguíneo A RhD negativo. Sin antecedentes personales y familiares a destacar. Menarca a los 14 años, ciclos regulares 4/30, 1 gesta 1 parto vaginal normal, RN vivo 3430 g sano grupo A RhD positivo. Parto en el interior del país. No recibe inmunoprofilaxis anti-D postparto. No cuenta con antecedentes de transfusión de hemocomponentes, transplantes o drogadicción intravenosa. Esposo A RhD positivo.

En el embarazo actual consulta a las 28 semanas de gestación en el interior del país donde se solicitan las primeras rutinas obstétricas. Se determina un grupo sanguíneo A RhD negativo con un test de Coombs indirecto positivo por la presencia de un anticuerpo anti-D título 1/1024. Es enviada a Montevideo para su seguimiento.

El 10/6/2008 ingresa en un centro asistencial de Montevideo. Paciente con buen estado general, bien hidratada, normocoloreada con un examen abdominal y genital normal. Los estudios inmunohematológicos realizados al ingreso confirman los hallazgos realizados en el interior del país. Se hace diagnóstico de gestante aloinmunizada con un anticuerpo anti-D. El resto de las rutinas obstétricas solicitadas muestran resultados normales. La ecografía realizada al ingreso no muestra signos de afectación fetal, con líquido amniótico normal. Placenta anterior con madurez intermedia. Edad gestacional estimada de 30 semanas y un peso fetal estimado de 1437 g.

El ecodoppler de la arteria umbilical es normal y la velocidad del flujo sanguíneo en el pico sistólico de la arteria cerebral media muestra un valor de 57 cm por segundo lo que corresponde en el nomograma del Diamond Study Group para las 30 semanas de edad gestacional al límite superior de la zona de fetos sin anemia o con anemia moderada.

La amniocentesis realizada dos días después el 12/6/2008 se realiza transplacentaria bajo seguimiento ecográfico. El estudio del líquido amniótico muestra un incremento de la densidad óptica de 0,057 lo cual corresponde a la zona indeterminada del gráfico de Queenan.(fetos no afectados o con afectación leve).

Se comienza con inducción de la madurez pulmonar con dexametasona 6 mg intramuscular cada 12 horas por 48 horas. Alta a las 31 semanas.

El 21/7/2008 a las 35 semanas de gestación consulta nuevamente. Se realiza ecografía que muestra signos de hidrops fetal con ausencia de latido umbilical y sin movimientos fetales. Cesárea de urgencia hora 14 y 45. RN de sexo masculino, 2462 g, pálido con bradicardia extrema. Gran distensión abdominal. Apgar 1/5/6. Grupo sanguíneo O RhD positivo Test de Coombs

Directo (TCD) positivo. Se realiza paracentesis extrayéndose 120 cc de líquido citrino. Los estudios de sangre de cordón muestran una BT de 3,82 mg% con una BI de 3,27. En el hemograma tiene una Hb de 4,43 g, Hto de 12,2%, 47.400 glóbulos blancos y 60.000 plaquetas. Se transfunde con 50 cc de sangre RhD negativa desplasmatazada leucoreducida e irradiada. El hemograma postransfusión muestra una Hb de 7,7 g y un Hto de 21,9% con 41.400 leucocitos y 52.000 plaquetas.

Se comienza fototerapia. Los estudios solicitados a la hora 17 del día 21/7/2008 muestran una BT de 5,3 mg% y una BI de 4,4 mg%. Se transfunde nuevamente con 50 cc de sangre desplasmatazada en iguales condiciones que la anterior. En los controles de la hora 22 y 30 tiene una BT de 7,99 y una BI de 6,1 con un hemograma de 10,6 g, un Hto de 29,2 y plaquetas de 30.000.

A la hora 0 y 30 del 22/7/2008 se realiza la primera exsanguinotransfusión (EST) de 280 cc con eritrocitos 0 RhD negativos resuspendidos en plasma AB más un concentrado plaquetario. Los valores post EST muestran una BT de 6,9 y BI de 6,12 con una Hb de 12,9 g, Hto de 36% y 32.000 plaquetas.

A la hora 5 se decide la administración de inmunoglobulina polivalente intravenosa a dosis de 1 g/Kg de peso.

A la hora 8 y 30 la BT es de 9,6, la Hb de 13,6 g, el Hto de 38,9% y las plaquetas de 30.000.

A la hora 16 del día 24/7/2008 la BT alcanza un valor de 21,65 mg% por lo cual se decide realizar la segunda EST en iguales condiciones que la anterior más un concentrado plaquetario. Buena evolución posterior sin secuelas de la EHP al alta.

Esta historia clínica reciente ocurre por no haber realizado la administración de inmunoglobulina anti-D post parto en la primera gestación a pesar de que de que era una indicación clásica: gestante RhD negativa sin aloanticuerpos y RN RhD positivo con un TCD negativo. Tampoco se realizó en esa gestación la inmunoprofilaxis antenatal. Existe evidencia científica por un lado que la administración de inmunoglobulina anti-D postparto y antenatal reduce significativamente la aloinmunización anti-D por gestación. Es claro también, como lo muestra esta historia clínica, que existe un marcado costo beneficio a favor de la prevención de la aloinmunización materna frente al diagnóstico y tratamiento de la EHP ya constituida. No entendemos por qué el personal sanitario actuante no la realiza cuando está indicada (factor personal) y por qué además, no existe un control del centro asistencial (factor institucional) previo al alta, lo cual acarrea un beneficio económico para la propia institución en la atención de las gestaciones siguientes.

Otro elemento importante que se destaca de la historia clínica presentada es que existe una captación tardía de la gestante pues realiza la primer

consulta a las 28 semanas. La consulta óptima debe ser, para un embarazo complicado o normal, en el primer trimestre y más aún para esta patología ya que a las 28 semanas nos podemos encontrar con muertes intrauterinas ya que los anticuerpos maternos comienzan a pasar hacia el feto alrededor de las 18 semanas de gestación. Podemos afirmar aquí que la gestante y el feto tuvieron suerte. Se realizó un correcto diagnóstico de aloinmunización materna por un anticuerpo anti-D en el interior del país. Sin embargo, se demoraron dos semanas más en comenzar los estudios de afectación fetal lo cual en la EHP es un tiempo precioso para hacer diagnóstico y tomar medidas terapéuticas prenatales siempre y cuando no nos encontremos con una muerte intrauterina la cual en esta patología puede ocurrir en horas o días. Segunda vez que la gestante y el feto tuvieron suerte dado que los estudios de afectación fetal que se le realizaron al ingreso del centro asistencial de Montevideo mostraron una afectación leve o moderada a las 30 semanas de gestación.

Sin embargo, cinco semanas después cuando la gestante consulta nuevamente la ecografía hace diagnóstico de afectación fetal grave e hidrops lo que motiva la cesárea de urgencia obteniendo un RN vivo clínicamente grave. Tercer hecho fortuito pues si la gestante hubiera consultado unas horas o días después seguramente estaríamos frente a un caso de muerte intrauterina.

Pero la medicina no se basa en hechos fortuitos a pesar que alguno de ellos han servido para realizar grandes descubrimientos como el de la penicilina. El seguimiento de la gestación en embarazos de alto riesgo se debe realizar mediante hechos pautados que deben ser realizados en tiempo y forma durante el desarrollo de toda la gestación.

Y este es el motivo principal por el cual analizamos esta historia clínica. Si bien el diagnóstico de aloinmunización se realizó correctamente se demoró en comenzar el diagnóstico de afectación fetal pero lo que es más importante es que no se realizó el flujograma de diagnóstico y tratamiento de la EHP pautado en el consenso 2005.

Los estudios de afectación fetal realizados a las 30 semanas de gestación (ecografía, ecodoppler de la arteria cerebral media y amniocentesis) mostraron una afectación fetal leve o moderada pero esos resultados mostraban una instantánea de un proceso patológico que ya se había iniciado y que indefectiblemente progresa hacia el deterioro del feto por la presencia de un anticuerpo anti-D materno que es uno de los que tiene mayor significación clínica sobre el feto.

La amniocentesis como está pautado se debería haber repetido a los 15 días con el fin de establecer la pendiente del incremento de densidad óptica lo cual nos aporta la intensidad del proceso hemolítico y a su vez nos establece un valor pronóstico para tomar medidas terapéuticas prenatales. La medición de la velocidad del flujo sanguíneo en el pico sistólico de la arteria cerebral media, que es un método no invasivo, debe repetirse una vez por

semana y más en esta paciente que tenía un valor en el límite superior de la zona de anemia leve o moderada. Seguramente en los controles siguientes, que en esta gestante no se hicieron, se hubieran encontrado valores correspondientes a la zona del nomograma de anemia severa lo cual indica la realización de una cordocentesis para diagnóstico y tratamiento.

La velocidad del flujo sanguíneo aumenta en la EHP debido a la disminución de la viscosidad sanguínea por la anemia y por el aumento de la frecuencia cardíaca.

Los controles de afectación fetal entonces deben ser seguidos en el tiempo lo cual nos muestra la evolución del proceso patológico por un lado y nos indica los métodos diagnósticos y terapéuticos a seguir. Probablemente en esta gestante se hubiera realizado una cordocentesis con transfusión intrauterina e inmunoglobulina intravenosa o un parto adelantado que hubiera evitado la evolución al cuadro de mayor severidad fetal el hidrops que estaba presente a las 35 semanas de gestación. A su vez, el RN presenta una EHP grave principalmente en su modalidad anémica.

Para finalizar queremos realizar algunas apreciaciones sobre otros hechos, que si bien son secundarios, pueden influir directamente en el diagnóstico y tratamiento de la EHP.

En primer lugar, cuando se realiza el diagnóstico de aloinmunización se realiza la titulación del anticuerpos (1/1024). Sin embargo, este valor único no es tomado en cuenta para el seguimiento de la gestación dado que no es indicador de afectación fetal. El flujograma diagnóstico se cumple independiente del título del anticuerpo. Es lo mismo que la gestante tenga un valor de 1/512, 1/1024 o 1/128. El valor absoluto no nos indica nada ni nos propone nada. Tampoco es necesario realizar títulos seriados pues para que tengan validez técnicamente se deben realizar en la misma institución, por la misma técnica y en paralelo con una muestra anterior que se ha mantenido congelada.

El aumento del título del anticuerpo durante la gestación tampoco es indicador de afectación fetal o para el inicio de medidas terapéuticas prenatales. Gestantes RhD negativas aloinmunizadas con fetos RhD negativos tienen aumento de los títulos del anticuerpo anti-D dado que la gestación produce un estímulo inespecífico del sistema inmune materno. Por otro lado, se han presentado casos de afectación fetal grave con títulos bajos y por el contrario afectaciones leves con títulos altos. Por ello, nosotros desde el año 1995 no realizamos más el título del anticuerpo dado que tiene un costo importante y no tiene como vemos en esta historia ninguna significación clínica ni para la gestante ni para el feto. Para que tengan una idea, para un título de 1/1024 como tenía esta gestante se utilizan por lo menos nueve tubos con el suero de la embarazada y eritrocitos RhD positivos a los cuales se les realiza el TCI en medio Liss-Coombs. Con este consumo podemos realizar el estudio de TCI en nueve gestantes en la primera consulta. Si hubiera que repetir el título durante la gestación se debería hacer

en paralelo con la primera muestra congelada por lo cual de no aumentar el título del anticuerpo por lo menos se gastarían 18 tubos más lo que nos permitiría realizar 27 estudios de embarazadas en la primera consulta con un valor diagnóstico fundamental para considerar un embarazo de bajo o alto riesgo. En varios centros asistenciales por ejemplo se siguen realizando los títulos seriados a las gestantes aloinmunizadas pero no se realiza la investigación de anticuerpos inmunes a las embarazadas RhD positivas como ha sido pautado en el consenso 2005. Recordemos además, que en un estudio de seguimiento de cinco años que realizamos en el BPS encontramos mayor cantidad de anticuerpos inmunes en gestantes RhD positivas que en las RhD negativas.

En los hemogramas que se le realiza al RN aparece un nivel de leucocitos por encima de los 40.000. Este valor que puede ser indicador de una infección congénita debe ser tomado con precaución cuando existe una EHP. Los hemogramas se realizan en contadores hematológicos automáticos que separan las distintas series por tamaño y elementos nucleados. Como todos sabemos ni los eritrocitos ni las plaquetas tienen núcleo por lo cual los contadores agrupan a los elementos nucleados dentro de la serie blanca. Sin embargo, en la EHP existen eritroblastos (células nucleadas de la serie roja) en sangre periférica con el fin de compensar la anemia severa que se produce en el feto. Por ello, esta patología fue denominada inicialmente eritroblastosis fetal aunque después se demostró que la presencia de eritroblastos en sangre periférica no es patognomónico de la EHP ya que se puede ver en anemias fetales por otras causas.

En suma, siempre debemos complementar el hemograma con una lámina de sangre periférica como forma de diferenciar los elementos nucleados de la serie roja y la serie blanca.

En los hemogramas del RN también está presente, de forma constante, una plaquetopenia como se ha descrito asociada a las formas graves (hidrops) producidos por los anticuerpos anti-D o anti-Kell. En nuestro caso se llegó a valores de 30.000 plaquetas sin síndrome hemorrágico. Sin embargo, esta trombocitopenia debe ser seguida clínica y paraclínicamente sobre todo para evitar la muy temida hemorragia intracraneal principalmente en pretérminos. Cuando se realizan procedimientos invasivos es recomendable mantener un recuento por encima de las 50.000 plaquetas y cuando se plantean EST como en este caso se deben realizar concentrados plaquetarios con cada procedimiento terapéutico dado que el recambio sanguíneo produce trombocitopenia.

Por último, a este RN se le realiza inmunoglobulina intravenosa polivalente a altas dosis (1g/kg) recién a las 14 horas de vida y luego de realizada la primera EST. Sin embargo, la inmunoglobulina polivalente (Ig) se debe hacer inmediatamente luego que se realiza el diagnóstico de EHP después del parto y más aún en una forma grave como en este caso dado que el objetivo de la Ig no es terapéutico sino preventivo de la hemólisis. Las altas

dosis de la Ig polivalente intravenosa bloquean los receptores Fc de los macrófagos del RN haciendo que los eritrocitos sensibilizados tengan una vida media mayor disminuyendo el nivel de la hemólisis postnatal lo cual si se administra precozmente puede prolongar o evitar la necesidad de EST o disminuir el número de procedimientos invasivos.

HISTORIA CLÍNICA

Gestante de 22 años, de raza blanca, de profesión labores que cursa su primera gestación sin antecedentes personales ni familiares a destacar. No recibió transfusiones de hemocomponentes ni transplantes de órganos o tejidos. Niega drogadicción intravenosa.

Cursa embarazo de 25 semanas bien tolerado. Buen estado general. El examen clínico no revela anormalidades. Grupo sanguíneo 0 RhD positivo con una prueba de Coombs indirecta positiva que aglutina los tres paneles de eritrocitos para la investigación de anticuerpos inmunes mediante la técnica en gel. Es imposible realizar la identificación del anticuerpo dado que el suero de la gestante presenta una panaglutinación con los 11 eritrocitos del panel. La prueba de Coombs directa se presenta positiva con un anti-IgG positivo (+++) y un anti-C3d (+).

Ante estos resultados inmunohematológicos se hace diagnóstico de la presencia de un autoanticuerpo antieritrocitario que no se puede identificar su especificidad dado que aglutina in vitro a todos los glóbulos rojos estudiados.

Fuera de la gestación el primer diagnóstico presuntivo sería el de una anemia hemolítica autoinmune (AHAI). Sin embargo, en la gestante lo primero que debemos pensar es en la presencia de un anticuerpo antifosfolípido (AAF). En el estudio que realizamos de seguimiento durante cinco años en 14860 mujeres embarazadas encontramos 157 que tenían un TCI positivo y de estos 4 presentaban además un TCD positivo. En los cuatro casos de autoanticuerpos maternos se confirmó la presencia de un AAF (25). Sin embargo, la mayoría de los AAF que se presentan durante la gestación no presentan este patrón inmunohematológico. Pero, cuando se presenta en el primer control es fundamental comunicar al médico obstetra dicha posibilidad para que se investigue rápidamente la presencia de AAF dado que este tipo de anticuerpos produce terminaciones precoces de la gestación y un cuadro de trombofilia por lo cual debe iniciarse, luego del diagnóstico, el tratamiento con heparina fraccionada de bajo peso molecular. Otro beneficio adicional de la aplicación del nuevo protocolo de seguimiento inmunohematológico de la gestación. En esta gestante si se hubiera aplicado el esquema de seguimiento anterior, por ser RhD positiva no se hubiera investigado la presencia de anticuerpos inmunes (prueba de Coombs indirecta)

y como carece de clínica asociada no se hubiera hecho el diagnóstico de la presencia de autoanticuerpos y en caso de ser AAF podría haber tenido una pérdida precoz gestacional.

En este caso los resultados de los anticuerpos anticardiolipinas IgM e IgG fueron negativos así como los antibeta2-glicoproteína. El inhibidor lúpico también fue negativo. El hemograma mostró una Hb de 10 g/dl, leucocitos 9300 por mm³ y 238.000 plaquetas con un funcional hepático normal sin aumento de las enzimas ni de las bilirrubinas.

Con anticuerpos AAF negativos y sin clínica ni paraclínica de hemólisis (anemia más ictericia o aumento de las bilirrubinas) se plantea un segundo diagnóstico que es la presencia de un autoanticuerpo generado por la gestación. Estos autoanticuerpos generados no producen AHAI clínicamente significativa sin afectar a la gestante ni al recién nacido. Por el contrario cuando estos autoanticuerpos ocurren fuera de la gestación son clínicamente significativos en un porcentaje mayor (26). Además, las AHAI secundarias a Lupus, artritis, síndromes linfoproliferativos o tumores el cuadro hemolítico se agrava con el embarazo. En los casos asintomáticos con autoanticuerpos generados por la gestación, generalmente el TCD es positivo con anti-complemento (C3d) y/o anti-IgG como en esta gestante. En algunos casos se puede asociar la presencia del autoanticuerpo con aloanticuerpos gestacionales.

En un estudio de seguimiento realizado durante dos años en Alemania, sobre un total de 22.782 gestantes se encontraron, utilizando la técnica de inmunoprecipitación en gel, 25 (0,11%) autoanticuerpos (23 autoanticuerpos y 2 auto más aloanticuerpos) lo cual muestra una prevalencia aproximadamente nueve veces superior que fuera de la gestación (3 casos-0,02% en 12.903 mujeres estudiadas) (27).

Como el autoanticuerpo diagnosticado no afecta clínicamente a la gestante ni al feto se decide el parto a término.

El parto vaginal ocurre a las 38 semanas de gestación. Se obtiene un recién nacido vivo de sexo masculino de 2962 g con apgar 9/10. Grupo sanguíneo 0 RhD positivo con prueba de Coombs directa negativa por técnica en gel. A las 24 horas de vida comienza con ictericia progresiva. A las 48 horas la cifra de bilirrubina indirecta es de 17,48 mg/dl. Se coloca en fototerapia. Se realiza relevo infeccioso que es normal. Sin anemia clínica ni paraclínica. Continúa en doble luminoterapia con alimentación a pecho directo más complemento. Buena evolución con descenso progresivo de las cifras de bilirrubina.

La ictericia del neonato con una prueba de Coombs directa (PCD) negativa puede interpretarse como una ictericia fisiológica. Sin embargo, existen anemias hemolíticas PCD negativas. Una de ellas es la incompatibilidad por ABO (que no ocurre en este caso pues madre y RN son del grupo 0) aunque más raramente actualmente con la utilización de la técnica en gel. La posibilidad es que se encuentren autoanticuerpos maternos unidos a

los eritrocitos fetales pero con una cantidad inferior a las 200 moléculas por glóbulo rojo que es la cantidad necesaria para positivizar la prueba de Coombs. Sin embargo, el neonato no presentó anemia clínica ni paraclínica asociada a la hiperbilirrubinemia como se observa en la EHP por conflicto ABO.

4.4 - TRATAMIENTO PRENATAL DE LA EHP

Los procedimientos terapéuticos de la EHP pueden iniciarse en fases tempranas de la vida intrauterina. Algunos se realizan en la madre con el fin de disminuir el nivel de los anticuerpos que pueden pasar hacia el feto (tratamiento inmunomodulador) y otros directamente sobre el feto que tienen como objetivo reducir la hemólisis y corregir la anemia fetal.

1 - Terapéuticas maternas

Dos medidas parecen ser eficaces para reducir los niveles de anticuerpos maternos y disminuir la hemólisis fetal, el recambio plasmático y la administración de altas dosis de inmunoglobulina intravenosa.

La primera experiencia nacional sobre **recambio plasmático** fue realizada en el Hospital de Clínicas por nosotros en el año 1982 (1).

Si no se hubiera realizado esta terapéutica a la paciente con la pendiente ascendente que mostraba la espectrofotometría del líquido amniótico (LA) hubiera alcanzado la zona 1B del gráfico de Liley (riesgo de muerte intrauterina) a las 28 semanas de gestación. El recambio plasmático fue efectivo en disminuir el título del anticuerpo anti-D así como la densidad óptica del LA. Sin embargo, después del segundo recambio la paciente realiza una respuesta anamnésica del sistema inmunitario que se refleja en un aumento creciente de la concentración del anticuerpos así como, defasado en el tiempo, del incremento de la hemólisis fetal. A las 32 semanas de gestación se decide interrumpir el embarazo obteniéndose un recién nacido vivo de sexo masculino, que luego del tratamiento neonatal correspondiente presentó buena evolución.

En la década del 90 algunos trabajos muestran que el tratamiento con altas dosis de **inmunoglobulina intravenosa**, 0,4 g/Kg de peso materno durante 4 o 5 días consecutivos repetidos cada 2 semanas, es efectivo para disminuir por feed-back la síntesis del anticuerpos o reducir su pasaje hacia el feto por bloqueo de los receptores Fc placentarios (2).

Dado que en la mayoría de los casos tratados con recambio plasmático se produce un rebote en el título del anticuerpo luego de algunas semanas, algunos autores asocian la administración de inmunoglobulina intravenosa a altas dosis con los recambios plasmáticos como tratamiento inmunomodulador para evitar el aumento de los anticuerpos maternos (3).

Sin embargo, esta terapéutica es tediosa, no muy confortable y sobre todo costosa. En la década del 80 sólo teníamos como opciones terapéuticas prenatales el recambio plasmático sin la administración de inmunoglobulina (Ig) y la transfusión intrauterina (TIU) en la cavidad peritoneal del feto. En el momento actual, nosotros preferimos la realización, como veremos más adelante, de nuevos tratamientos dirigidos al feto que corrigen rápidamente esta patología o la previenen y son menos costosos.

La única indicación del recambio plasmático sería su aplicación en etapas tempranas de la gestación como forma de dilatar el proceso patológico hasta que puedan aplicarse los tratamientos fetales generalmente después de las 20-22 semanas de gestación.

Así por ejemplo, el recambio plasmático asociado a Ig puede ser efectivo en aquellas embarazadas que tienen un anticuerpo anti-P el cual se asocia con abortos precoces o un anti-Kell que produce además de la anemia por hemólisis una anemia por inhibición de las células progenitoras (4) o para tratar casos muy severos de EHP (10).

En una reciente revisión realizada por la American Society for Apheresis (ASFA) el recambio plasmático terapéutico durante la gestación para el tratamiento de la enfermedad hemolítica fetal ha sido incluido en la categoría II lo cual significa que es generalmente aceptado como tratamiento adjunto o de soporte a otras terapéuticas definitivas más que como terapia de primera línea (15). En la revisión del año 2000 figuraba como categoría III. Recientemente también, una **inmunoglobulina anti-D mutante recombinante** no hemolítica ha sido utilizada para bloquear la actividad hemolítica del anticuerpo materno sobre los eritrocitos fetales. Estos anticuerpos mutantes no hemolíticos para ser efectivos terapéuticamente deben ser administrados a la gestante en dosis suficientes, de forma segura, deben pasar la placenta hacia el feto y unirse efectivamente a los eritrocitos fetales Rh D positivos bloqueando el sitio de unión al anticuerpo materno hemolítico. En la EHP producida por anti-D sólo participan las subclases IgG1 e IgG3 que pasan igualmente la placenta hacia el feto, opsonizan los eritrocitos fetales los cuales son retirados de la circulación por los macrófagos principalmente del bazo que contienen receptores para la fracción Fc del anticuerpo (FcyRI, FcyRIIa y FcyRIIIa). El receptor FcyRIIIa de los macrófagos esplénicos parece ser el más activo cuando actúa el anti-D. Está presente en las células a partir de las 18 semanas de gestación (11).

Por el contrario las subclases IgG2 e IgG4 son inefectivas para inducir la destrucción de los eritrocitos fetales. Armour y colaboradores fueron los primeros en investigar la diferencia entre ambas subclases de inmunoglobulinas G con el fin de crear un anticuerpo IgG1 sin que causara hemólisis para lo cual crearon una IgG1 con una porción Fc híbrida inactiva para unirse al receptor FcyRIIIa de los macrófagos y a la fracción C1q del complemento (12). Este anticuerpo anti-D mutante fue testado in vivo en voluntarios Rh positivos cuyos propios eritrocitos fueron sensibilizados con el anticuerpo mutante y comparado con el anti-D policlonal el clearance de los glóbulos rojos fue lento, incompleto y transitorio sin evidencia de hemólisis (12). Sin embargo, la vida media plasmática no fue examinada y experimentos de transferencia placentaria no han sido reportados por lo cual no es todavía posible predecir si este anticuerpo anti-D mutante puede tener un valor clínico en el tratamiento de la EHP (13).

Otro anticuerpo anti-D mutante pero de la subclase IgG3 ha sido desa-

rollado por Nielsen y colaboradores alterando la cadena pesada (hinge region) (14).

Este anticuerpo fue efectivo en bloquear la actividad hemolítica de un anti D monoclonal y policlonal in vitro. La vida media plasmática de este anticuerpo mutante tampoco es conocida pero puede predecirse como corta pues la vida media normal de un IgG3 es menor (7 días) que la vida media de un IgG1 (21 días). Dado que la vida media no se conoce no es posible predecir cuales son los niveles que se necesitan para alcanzar un valor terapéutico in vivo. Para ello, repetidas dosis serán necesarias para alcanzar niveles sanguíneos estables pero existe la posibilidad de inducir una respuesta inmune anti-IgG que pueda interferir con la eficacia (13). Es de esperar que estos tipos de anticuerpos mutantes no produzcan las dificultades halladas en los estudios realizados con la Ig anti-D monoclonal recombinante (ver capítulo nuevas estrategias en la prevención de la inmunización anti-D).

2 - Tratamientos Fetales

En el momento actual, con el advenimiento de la cordocentesis (punción de los vasos sanguíneos umbilicales intraútero) se pueden extraer muestras para diagnóstico (grupo sanguíneo, test de Coombs directo, hemoglobina, hematocrito, bilirrubina, etc) o realizar terapéuticas como la transfusión intrauterina intravascular, exsanguinotransfusión y/o la administración de inmunoglobulina intravenosa.

2.1 Transfusión intrauterina (TIU)

La transfusión intrauterina no carece de riesgos para el feto y se debe indicar sólo después de haber realizado una correcta evaluación clínica y paraclínica. Por lo general este tipo de terapéutica se plantea después de la semana 20 de gestación. La TIU se puede realizar por vía intraperitoneal o por abordaje directo de los vasos umbilicales. Esta última, es el procedimiento de elección pero pueden haber inconvenientes técnicos que lleven a optar por la vía intraperitoneal o a la combinación de ambas.

En la **transfusión intraperitoneal** los eritrocitos se colocan en la cavidad peritoneal fetal a través de una aguja que se pasa con monitoreo ecográfico a través de la pared abdominal materna, pared uterina y pared abdominal fetal. Los glóbulos rojos transfundidos ingresan lentamente a la circulación fetal por absorción de los conductos linfáticos que drenan la cavidad peritoneal. Generalmente el procedimiento se repite cada 2 semanas. En caso de que el feto tenga ascitis puede utilizarse la punción primero para drenar el líquido peritoneal y luego para realizar la transfusión.

El volumen de glóbulos rojos a infundir se calcula por la fórmula $V = (\text{gestación en semanas} - 20) \times 10 \text{ ml}$. Por ejemplo si tenemos una gestación de 24 semanas el volumen a infundir será de 40 ml.

En la **transfusión intravascular** los eritrocitos se infunden directamente

en los vasos umbilicales como una simple transfusión mediante jeringas de plástico o como una **exsanguinotransfusión parcial** (intercambiando extracciones e infusiones isovolumétricas) para aumentar la efectividad al remover glóbulos rojos sensibilizados. La exsanguinotransfusión puede tener particular valor también en los fetos severamente afectados que toleran muy mal la sobrecarga de volumen. En estos casos es preferible trabajar en hipovolemia mediante la extracción de un volumen mayor al infundido siempre bajo control de la frecuencia cardíaca fetal.

Previo a la infusión se debe tomar una muestra de sangre una vez que estamos posesionados en los vasos del cordón para verificar que nos encontramos en el sistema circulatorio fetal, para realizar diagnóstico y para calcular, mediante el microhematocrito que se realiza inmediatamente en la sala de punción, el volumen de glóbulos rojos a infundir. Para ello se utilizan tablas que combinan la edad gestacional o el peso fetal no hidrópico estimado con el incremento del hematocrito que se quiere alcanzar. Por ejemplo si estamos en las 25 semanas de gestación y el feto tiene un hematocrito de 20% y lo queremos llevar a un 35% (15% de incremento) lo debemos transfundir con 24 ml de eritrocitos (ver tabla 1) en alícuotas de 10 ml a intervalos de 1 a 2 minutos. La transfusión se repite cuando el hematocrito desciende por debajo del 30% lo cual corresponde a una hemoglobina de 9-10 g%.

Tabla 1- Cálculo del volumen de eritrocitos para TIU intravascular según la edad gestacional y el incremento del hematocrito fetal deseado.

EG (semanas)	incremento del hematocrito fetal deseado				
	10%	15%	20%	25%	30%
21	13.1	14.2	15.2	16.3	17.3
22	13.7	15.8	17.9	19.9	22.0
23	14.8	17.9	21.1	24.2	27.3
24	16.5	20.6	24.8	30.0	33.1
25	18.7	23.9	29.1	34.3	39.5
26	21.4	27.7	33.9	40.2	46.4
27	24.7	32.0	39.3	46.6	53.9
28	28.6	36.9	45.3	53.6	61.9
29	33.0	42.4	51.7	61.1	70.5
30	37.9	48.4	58.8	69.2	79.6
31	43.4	54.9	66.4	77.8	89.3
32	49.5	62.0	74.5	87.0	99.5
33	56.0	69.6	83.2	96.7	110.3
34	63.2	77.8	92.4	107.0	121.6

Los glóbulos rojos a transfundir deben ser del tipo 0 y negativos para el antígeno correspondiente al anticuerpo materno. Deben ser leucoreduci-

dos para evitar la transmisión de virus como el citomegalo (CMV) o virus linfotrópicos como el HTLV-I/II. El Hto de la sangre a infundir suele ser de 75 a 85% para minimizar la sobrecarga de volumen. La sangre para transfusiones intrauterinas así como los hemocomponentes celulares consecutivamente transfundidos en el período neonatal deben ser irradiados con irradiación gamma para prevenir la enfermedad de injerto versus huésped.

3- Inmunoglobulina intravenosa

A principios de la década del 90 se obtuvieron buenos resultados administrando inmunoglobulina intravenosa a altas dosis 400 mg/kg peso en neonatos con EHP por conflicto Rh con el objetivo de bloquear los receptores Fc de los macrófagos del RN con el fin de que estos no pudieran captar los anticuerpos anti-D unidos a los eritrocitos neonatales circulantes (5). Este procedimiento fue efectivo para disminuir la hemólisis en el RN y por ende los riesgos y necesidades de otros tratamientos neonatales como la EST.

Nuestro equipo de trabajo, apoyado por el consejo invalorable del Prof. Dr. Roberto Caldeyro Barcia, pensó que este tratamiento podía realizarse con el advenimiento de la cordocentesis, en los fetos con EHP dado que el mecanismo fisiopatológico es similar en el feto que en el neonato. Con el acceso vascular por cordocentesis que nos permitía realizar el diagnóstico y el tratamiento inmediato por la misma vía publicamos el primer caso en la literatura mundial de infusión de Ig a altas dosis en un feto con EHP por conflicto Rh (6).

Como se muestra en este caso, la administración de Ig intravenosa al feto por cordocentesis disminuyó la gravedad de la EHP lo cual se reflejó en un marcado descenso de la bilirrubina en el LA y un marcado incremento en el hematocrito fetal. No fueron necesarios otros tratamientos prenatales ni se presentaron complicaciones fetales con las repetidas cordocentesis.

Recientemente, en un trabajo publicado en la revista Transfusión de la American Association of Blood Bank (AABB) se muestran similares resultados obtenidos en 13 fetos con EHP que recibieron inmunoglobulina intravenosa por cordocentesis (7).

El tratamiento con Ig intravenosa puede ser utilizado también para prevenir EHP por otros anticuerpos diferentes al anti-D así como otras citopenias como la trombocitopenia perinatal isoimmune pues el mecanismo de bloqueo de los receptores Fc de los macrófagos fetales es similar para todas ellas (8).

Esta terapéutica como se administra por Kg de peso es muy barata en la etapa perinatal si se lo compara con la administración de Ig a la madre (ver tratamientos maternos) y con una efectividad superior al ser inyectada directamente en la circulación fetal.

Por último, la administración de Ig intravenosa por cordocentesis, puede ser aplicada también para el tratamiento de los hidrops fetales de causa no inmunológica como el que se produce por la infección del parvovirus B19 (9).

Este virus causa la quinta una enfermedad eruptiva que se resuelve espontáneamente con la producción de anticuerpos que neutralizan la infección. En ausencia de una adecuada respuesta inmunológica la infección puede persistir y en individuos inmunocomprometidos se puede producir una crisis aplásica con una anemia intensa a nivel periférico pues el parvovirus B19 parasita los eritroblastos, sobre todo los que presentan el antígeno P en su membrana. La infección fetal puede producir anemia intensa que desencadena la formación del hidrops de manera similar a la EHP con la diferencia que la anemia que se produce aquí no es por hemólisis sino por un descenso en la producción de eritrocitos fetales.

Dado que la mayoría de las personas tienen anticuerpos anti-parvovirus B19, las preparaciones comerciales de Ig tienen concentraciones elevadas de estos anticuerpos que al ser administrados intravenosamente, por ser neutralizantes, eliminan la infección del receptor. En los hidrops fetales por esta causa es necesario, al igual que en la EHP, asociar TIU para corregir la anemia rápidamente. Como vemos, por un mecanismo fisiopatológico diferente al de la EHP, no por bloqueo de los receptores Fc de los macrófagos fetales sino por la administración de anticuerpos neutralizantes, la Ig a altas dosis por cordocentesis, puede ser utilizada también con buen éxito en el tratamiento del hidrops fetal de causa no inmunológica como el producido por la infección del parvovirus B19.

Dado que la transfusión intrauterina y la administración de inmunoglobulina por cordocentesis no son antagonistas proponemos el siguiente esquema de tratamiento prenatal. Cuando el hematocrito fetal se encuentra entre un 30 y 40% administrar sólo inmunoglobulina intravenosa a una dosis de 500 mg/kg de peso fetal estimado para la edad gestacional. Si el hematocrito es inferior al 30% realizar transfusión intrauterina intravascular e inmunoglobulina intravenosa. Si por alguna razón no se pudieran puncionar los vasos umbilicales en estos casos proponemos la transfusión intrauterina en la cavidad peritoneal fetal solamente y en casos severos puede realizarse la TIU intracardíaca.

El objetivo de estas terapéuticas fetales consiste por un lado en mantener los embarazos hasta una mayor edad gestacional y por otro la de obtener neonatos menos agraviados con el fin de mejorar la sobrevivencia neonatal. Los recursos terapéuticos fetales además, deben combinarse con la inducción de la maduración pulmonar mediante la administración de corticoides a la madre.

Antes de la extracción del feto debe realizarse un correcto balance riesgo-beneficio entre los elementos de afectación fetal por un lado y de maduración pulmonar por otro.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Scasso JC, Decaro J, Cuadro JC, Lieutier G, Alonso JG, Varela S. Enfermedad hemolítica perinatal por aloimmunización Rh(D). Premio “El País” 1982 de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed de la Plaza, Montevideo-Uruguay, 1983.
- 2- Margulis M, Voto LS, Mathet E, Margulis M. High-dose intravenous IgG for the treatment of severe Rhesus alloimmunization. *Vox Sang* 1991;61:181-189.
- 3- Berlin G, Selbing A, Gottvall T. Plasma exchange and intravenous immunoglobulin treatment of the mother to diminish fetal Rhesus hemolytic disease. *Transfus Sci* 1990;11:85-90.
- 4- Fernandez-Jimenez MC, JIMENEZ-Marco MT, Hernandez D, Gonzalez A, Omeñaca F, de la Cámara C. Treatment with plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in pregnancies complicated with anti-PP1Pk or anti-K immunization: a report of two patients. *Vox Sang* 2001;80:117-120.
- 5- Rubo J, Albrecht K, Lasch P, Laufkotter E, Leititis J, Marsan D, Niemeyer B, Roesler J, Roll C, Roth B, Burckhard von Stockhausen H, Widemann B, Wahn V. High-dose intravenous immune globulin therapy for hyoerbilirubinemia caused by Rh hemolytic disease. *J Pediatr* 1992;121:93-97.
- 6- Alonso JG, Decaro J, Marrero A, Lavalle E, Martell M, Cuadro JC. Repeated direct fetal intravascular high-dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh hemolytic disease. *J Perinat Med*. 1994;22:415-419.
- 7- Ulm B, Kirchner L, Svolba G, Gilma B, Deutinger J, Bernaschek G, Panzer S. Immunoglobulin administration to fetuses with anemia due to alloimmunization to D. *Transfusion* 1999;39:1235-1238.
- 8- Decaro J. Manual de Medicina Transfusional . Premio “el País” 1997 otorgado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed de la Plaza, Montevideo-Uruguay, 1999.
- 9- Sahakian V, Weiner CP, Naides SJ, Williamson RA, Scharosch LL. Intrauterine transfusion treatment of non immune hydrops fetalis secondary to human parvovirus B19 infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1090-1091.
- 10- Ruma MS, Moise KJ, Kim E, Murtha AP et al. Combined plasmapheresis and intravenous immunoglobulin for the treatment of severe maternal red cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:138e1-138e6.
- 11- Mawas F, Wiener E, Ryan G, Soothill PW, Rodeck CH. Expression of IgG Fc receptors on circulating leukocytes in the fetus and newborn. *Trans Med* 1994;4:25-33.
- 12- Armour K, Parry-Jones D, Beharry N et al. Intravascular survival of red cells coated with a mutated human anti-D antibody engineered to lack destructive activity. *Blood* 2006;107:2619-2626.
- 13- Urbaniak SJ. Noninvasive approaches to the management of RhD hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion* 2008;48:2-5.
- 14- Nielsen LK, Green TH, Sandlie I, Michaelsen TE, Dziegiel MH. In vitro assessment of recombinant, mutant immunoglobulin G anti-D devoid hemolytic activity for treatment of ongoing hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion* 2008;48:12-19.
- 15- Szczepiokowski ZM, Shaz BH, Bandarenko N, Winters JL. The new approach to assignment of ASFA categories-introduction to the fourth special issue: clinical applications of therapeutic apheresis. *Journal of Clinical Apheresis* 2007;22:96-105.

HISTORIA CLÍNICA 1

Se trata de una gestante de raza blanca de 39 años grupo sanguíneo 0 RhD negativo que hace 12 años tuvo un parto vaginal en Venezuela con un recién nacido vivo normal. No recibió inmunoglobulina anti-D postparto. También en Venezuela sufre múltiples quemaduras por la cual recibe transfusiones de hemocomponentes.

El embarazo actual bien tolerado y controlado con FUM 01/08/2007 y FPP 11/05/2008. El 21/01/2008 se le realiza estudio inmunohematológico que muestra un grupo sanguíneo 0 RhD negativo con un TCI positivo. Se identifican tres anticuerpos anti-eritrocitarios: anti-D, anti-C del sistema Rh y un anti-Fy^a del sistema Duffy que pueden producir EHP. El 20/02/2008 se le realiza una ecografía que muestra una placenta anterior y un feto único vivo de 33 semanas de gestación sin elementos patológicos a destacar. El 13/03/2008 se realiza un ecodoppler para determinar la velocidad de flujo en el pico sistólico de la arteria cerebral media. Resultado IP 0,73. El mismo día se hace una amniocentesis que muestra un incremento densidad óptica del LA de 0,059 que corresponde a una afectación leve (zona 2B del gráfico de Liley) con un índice lecitina –esfingomielina de 3,5 y fosfatidil glicerol presente.

El 15/03/2008 se realiza cesárea obteniéndose un RN de sexo masculino con 2102 g Apgar 9/10 grupo sanguíneo 0 RhD positivo con TCD positivo +++ por inmunoprecipitación en gel. Se infunde inmunoglobulina intravenosa 1g/Kg. Hemoglobina de cordón 16,6 Hto 49% y BI 4,72. Se coloca en fototerapia. Buena evolución. Alta el día 22/03/2008.

HISTORIA CLÍNICA 2

Gestante de 35 años, de raza blanca fumadora de 10 cigarrillos/día y sin otros antecedentes a destacar. Grupo sanguíneo O RhD negativo. No recibió transfusiones de hemocomponentes, ni trasplantes ni comparte jeringas. Tuvo cuatro gestaciones anteriores con 3 partos normales y 3 recién nacidos de término vivos. Los dos primeros de otra pareja. No sabemos si recibió inmunoprofilaxis anti-D. La cuarta gestación en el 2006 fue controlada en el HPR donde se hace diagnóstico de aloinmunización. Se identifican tres anticuerpos: anti-D y C del sistema Rh y Fy^a del sistema Duffy que pueden producir EHP. La paciente no concurre regularmente a los controles y no accede a realizar los procedimientos de amniocentesis que se le plantean. Obito a las 40 semanas de gestación.

En el embarazo actual consulta en el primer trimestre donde se confirma la aloinmunización a los tres anticuerpos. FUM 12/08/2007. El 22/01/2008 a las 23 semanas de gestación comienza el seguimiento con ecografías seriadas y velocidad del flujo de la arteria cerebral media. A las 29 semanas de gestación se informa en la ecografía inicio de ascitis con un valor de ACM de 45,8 cm/seg (límite superior). A las 30 semanas importante ascitis sin otros edemas con un valor de ACM de 83,4 (anemia fetal severa). Se decide realizar cordocentesis a las 30 semanas. En el mismo acto se realiza la primera amniocentesis que muestra un incremento de densidad óptica de 0,227 que llevado a la gráfica de Queenan significa riesgo de muerte fetal. No se determinó la madurez pulmonar. Se estimula maduración pul-

monar con dexametasona. Se punciona el cordón umbilical extrayéndose una muestra de sangre fetal con grupo sanguíneo 0 RhD positivo no fenotipándose los otros dos antígenos (C y Fy^a) con un TCD positivo +++ por técnica en gel. Hematocrito inicial de 7,5%. Se extrajeron 55 ml de sangre y se repusieron 65 ml de sangre 0 RhD negativa, C negativa y Fy^a negativa irradiada y leucorreducida compatible con suero materno. Se agregaron 12 ml de inmunoglobulina polivalente (0,6g) peso estimado del feto 1400g. Hto final de 23%.

A la semana (31 de gestación) se realiza segunda TIU con 40 ml de SD intravascular, 20 ml intraperitoneal y 12 ml de inmunoglobulina polivalente intravenosa. Hto inicial 17,3% y final 25%.

El día 27/03/2008 a las 32 semanas de gestación se realiza cesárea.

RN masculino de 1740g Apgar 7 grupo sanguíneo 0 RhD negativo con TCD negativo. Reactivo, estable, edemas generalizados blandos y blancos. Mucosas hipocoloreadas con tinte icterico de cara. Sin adenomegalias. Ritmo regular de 120 cpm. Abdomen discretamente globulosos y distendido, blando, depresible. No se palpa bazo. Hígado a 3 cm del reborde costal con consistencia discretamente aumentada. Muñón umbilical normal. Hemograma de sangre de cordón Hb 6,9 Hto 18,9%. BT 4,40 BI 4,19. En la evolución se le realizan 500mg/Kg de inmunoglobulina intravenosa, dos transfusiones de 30cc cada una de SD y dos EST de 365cc la primera y 265cc la segunda.

En suma, se trata de dos historias de gestantes aloinmunizadas, con una inmunización múltiple a los mismos anticuerpos anti-D, anti-C y anti-Fy^a los cuales pueden producir EHP. Sin embargo, que la gestante tenga tres anticuerpos no significa que tenga EHP más graves que con un sólo anticuerpo y estas historias así lo demuestran aunque no se le realizó a ninguno de los RN la determinación antigénica es sus glóbulos rojos para poder determinar si uno, dos o los tres anticuerpos se podían unir a los eritrocitos fetales. Recuerden que para que se produzca EHP debe darse la tercera condición que es que los eritrocitos fetales tengan el antígeno correspondiente. En el primer caso clínico se debería haber determinado al nacer y en el segundo en la primera muestra de cordocentesis. Lo que sí podemos afirmar es que el antígeno D estaba presente en ambos fetos y que el TCD también era francamente positivo en los dos por lo cual existía por lo menos un anticuerpo materno sensibilizando a los eritrocitos fetales.

En el primer caso la causa de la inmunización materna es por gestación ya que no recibe inmunoglobulina anti-D en la gesta anterior y por las múltiples transfusiones de hemocomponentes. En el segundo caso, la causa es sólo gestacional con distintas parejas y al no recibir inmunoprofilaxis anti-D.

A pesar de tener los mismos tres anticuerpos como causa probable de EHP la evolución de ambos casos es completamente diferente. En el primero no

hay necesidad de realizar tratamientos prenatales y la evolución postnatal es de una EHP leve tratada solamente con fototerapia e inmunoglobulina intravenosa. Coincide la evolución con el diagnóstico prenatal de afectación leve realizada por amniocentesis aunque esta ocurrió un poco tardíamente a las 36 semanas de gestación al igual que el ecodoppler. Esta gestación debió controlarse más precozmente por la posibilidad de desarrollar una EHP severa y poder determinar la realización o no de tratamientos prenatales más precoces. En el segundo, por el contrario, existe una afectación fetal severa que coincide con la evolución postnatal, por la cual recibe dos cordocentesis, dos TIU con administración de inmunoglobulina intravenosa. Aquí también el diagnóstico de afectación fetal es tardío ya que se realiza la primer amniocentesis en el mismo acto que la primer cordocentesis a las 30 semanas de gestación con un resultado de riesgo de muerte fetal. Pensamos que las amniocentesis deben realizarse antes en la gestación pues nos determinan el grado de hemólisis fetal y al poder determinar la pendiente nos da un valor pronóstico y determinar la oportunidad de los tratamientos prenatales con anticipación. Además, debemos tener presente que una vez que se realiza la cordocentesis es imposible hacer un seguimiento correcto por el incremento de densidad óptica ya que el LA se contamina con sangre.

En ambas gestantes se realizó la determinación de la velocidad del flujo sanguíneo en la arteria cerebral media (ACM). En la primera se realiza este estudio también en forma tardía a las 36 semanas de gestación con un resultado que figura como IP 0,73 sin saber a que corresponde este valor y sin referencia al valor normal para esta edad gestacional. En la segunda gestante, se realizan estudios seriados a partir de la semana 23 de gestación y los valores se expresan en cm/seg los cuales deben ser colocados en un nomograma de acuerdo a la edad gestacional (1). Sin embargo, los resultados fueron normales hasta la semana 29 de gestación pero el diagnóstico de afectación fetal se realizó previamente por ecografía (ascitis). Pensamos que estos resultados dilataron la realización de una amniocentesis que nos hubiera proporcionado el grado de hemólisis fetal. Cuando se introduce una técnica nueva, en las primeras etapas se debe realizar un seguimiento en paralelo de la medición de la velocidad de flujo sanguíneo en el pico sistólico de la ACM y los resultados de la amniocentesis hasta que pueda establecerse una buena correlación entre ambas técnicas lo cual es sugerido por el consenso 2005 y otros trabajos recientes (2)(3).

Por último, en la segunda historia se determina el grupo sanguíneo fetal como 0 Rh(D) positivo con TCD positivo de la muestra obtenida por cordocentesis. Sin embargo, al nacer el grupo del RN es 0 Rh(D) negativo TCD negativo. La explicación es que aquí lo que se está determinando es el grupo de los eritrocitos que se administraron en las dos cordocentesis y que no son destruidos por los anticuerpos maternos. Sin embargo, al realizar el estudio probablemente aparezca una doble población de eritrocitos

con el suero anti-D por inmunoprecipitación en gel. Estos RN se seguirán transfundiendo en el período neonatal con eritrocitos 0 Rh(D) negativos leucoreducidos e irradiados.

- 1- Mari G, Deter R, Carpenter R et al. Noninvasive diagnosis by doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. NEJM 2000;342:9-14.
- 2- Recomendación para la Prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica feto-neonatal en la gestación y para la inmunoprofilaxis anti-D. Consenso 2005. Arch Gin Obstet 2005;43:169-176.
- 3- Moise K. The usefulness of middle cerebral artery doppler assessment in the treatment of the fetus at risk for anemia. Am J Obstet Gynecol 2008;198:161.e1-161.e4. www.ajog.org

4.5 - DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO POSTNATAL

El neonatólogo debe formar parte del equipo tratante de una embarazada aloimmunizada para conocer los antecedentes, la historia obstétrica, la evolución clínica, los resultados de la paraclínica y el diagnóstico prenatal de salud o afectación fetal. En el momento del nacimiento, en sala de partos o block quirúrgico, evaluará rápidamente al neonato, determinando su indemnidad o afectación clínica, estableciendo su gravedad, ordenando los estudios paraclínicos para confirmar la EHP y establecer su grado de afectación, realizando su prevención y/o tratamiento.

Existen tres formas clínicas de presentación de la EHP: leve, moderada y grave. Dentro de las **formas leves** hay casos asintomáticos donde la EHP se diagnostica por la paraclínica. Cuando existen signos clínicos estos se reducen por lo general a una ictericia que aparece luego del primer o segundo día de vida, de progresión lenta, sin elementos clínicos de anemia como palidez, taquicardia o taquipnea. Estos casos leves, por lo general, no requieren tratamiento o sólo fototerapia.

En las **formas moderadas** el neonato, en la mayoría de los casos es de término, y presenta un cuadro clínico de anemia e ictericia que se va agravando con las horas de vida y requiere tratamiento con inmunoglobulina intravenosa en altas dosis 0,5 a 1g/Kg peso, fototerapia y/o exsanguinotransfusión (EST). La hepatomegalia es inconstante. El primer signo de ictericia al nacer es la tinción amarillenta del cordón umbilical dado que por allí difunde la bilirrubina indirecta (BI) hacia el líquido amniótico en la vida fetal.

En las **formas graves** la anemia clínica está presente desde el nacimiento caracterizada por palidez cutáneo-mucosa, taquicardia y taquipnea. Es importante valorarla al nacimiento, ya que en las formas graves puede determinar rápidamente la muerte del neonato por hipoxia o favorecer da-

ños cerebrales por lo que debe corregirse con urgencia por transfusión de glóbulos rojos y/o EST. La hepatoesplenomegalia es habitual. Puede ser secundaria a la insuficiencia cardíaca, a la hemólisis extravascular o a la reactivación del hígado como órgano de eritropoyesis extramedular. La fragilidad del bazo obliga a la palpación suave ya que maniobras bruscas pueden provocar su ruptura. A veces se encuentran nódulos cutáneos de eritropoyesis asociados o no a púrpura por alteración de la hemostasis primaria. El RN puede presentar edemas especialmente en cara, genitales externos, sector distal de los miembros y/o derrames serosos (ascitis, pleural y pericárdico) que pueden producir también polipnea. La expresión clínica máxima es el **hidrops fetalis** que le da al RN el aspecto de Buda. Es un cuadro clínico muy grave con anemia, ictericia, edemas y/o derrames serosos e insuficiencia cardíaca. A su vez, en esta presentación clínica, cuando se decide interrumpir el embarazo antes del término, para evitar la agravación por la EHP u otras condicionantes, se suma a los problemas inherentes de esta patología los de la prematuridad. En un estudio reciente se determinó que una trombocitopenia severa se asocia frecuentemente a los neonatos con hidrops producidos por EHP (19). En otro trabajo científico, la trombocitopenia severa (menos de 50.000 plaquetas por mm^3) se presentó en el 23% de los fetos hidrópicos (17), lo cual puede agregar graves consecuencias como la hemorragia intracerebral. Sin embargo, esta presentación clínica, el hidrops, es cada vez menos frecuente dentro de la EHP como consecuencia de la inmunoprofilaxis anti-D, de la disminución de las transfusiones de hemocomponentes en mujeres de edad reproductiva activa, de la identificación de anticuerpos maternos clínicamente significativos en todas las gestantes (Rh negativas y positivas) en la primer consulta, del desarrollo de técnicas de diagnóstico y tratamiento fetales así como de la interrupción más precoz de la gestación de fetos afectados por EHP. Pero, a veces una simple falla en un resultado de una técnica de laboratorio puede determinar un resultado falso negativo catalogando a la gestación de bajo riesgo cuando en realidad el proceso patológico que pasa inadvertido sigue su curso inexorable de deterioro fetal siendo su hallazgo fortuito como se muestra en la historia clínica de este capítulo o anatomo-patológico luego de la muerte intrauterina.

Como diagnóstico diferencial existen hidrops no inmunológicos como los que se presentan secundarios a talasemias, insuficiencia cardíaca por malformación congénita, nefrosis congénita e infecciones intrauterinas como el parvovirus B19 (1) (ver historia cap.).

Más del 10% de los neonatos con EHP por ABO o Rh, que han recibido transfusiones intrauterinas o exanguinotransfusiones, con producción masiva de bilirrubina indirecta desarrollan a veces una **colestasis intrahepática** con incrementos de la bilirrubina directa (síndrome de bilis espesa). Generalmente, la evolución clínica es hacia la resolución espontánea incluso en los casos más severos. Es importante que los estudios de laboratorio

discriminen la bilirrubina conjugada de la no conjugada. Sin embargo, las nuevas guías para el manejo de la hiperbilirrubinemia neonatales establecidas por la Academia Americana de Pediatría (AAP) están basadas en los niveles de bilirrubina total (18).

La paraclínica se utiliza para confirmar o descartar el diagnóstico de EHP así como para establecer el grado de afectación neonatal.

Los primeros estudios se realizan de la sangre del cordón umbilical obtenida por punción y aspiración con jeringa de los vasos umbilicales para evitar los efectos que la gelatina de Wharton puede tener sobre los resultados de laboratorio.

Dentro de los **estudios inmunohematológicos** nosotros proponíamos en 1982 realizar a todos los RN la determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh(D) junto con el test de Coombs directo (TCD) por el método en tubo. Actualmente, estableciendo un estricto balance costo-beneficio proponemos:

1- Si la embarazada presenta durante la gestación anticuerpos del tipo IgG que pueden producir EHP se le debe realizar al RN el grupo sanguíneo ABO y Rh(D) con el TCD. Para ello utilizamos una única tarjeta por la técnica de inmunoprecipitación en gel como se muestra en la figura 1. Hay dos posibilidades, primero que el **TCD sea negativo** lo cual indica que a pesar de estar la madre aloimmunizada el RN carece del antígeno correspondiente por lo cual los anticuerpos pasan la placenta hacia el feto pero no se unen a los eritrocitos quedando libres en el plasma sin producir EHP. Esto se puede confirmar realizando un TCI con el suero del RN y glóbulos que tengan el antígeno correspondiente. Si la embarazada es Rh(D) negativa aloimmunizada con un anticuerpo diferente al anti-D y el RN es Rh(D) positivo debe recibir inmunoprofilaxis postparto.

Nosotros en el momento actual estamos utilizando una tarjeta de inmunoprecipitación en gel (ID-Card ABO/Rh for newborns) que determina el D débil (D^u) y la variante D^{VI} . Esto es importante en RN de madres Rh negativas para que el neonato no sea falsamente tipificado como Rh negativo y se deje sin inmunoprofilaxis a la puerpera .

A veces, la madre está aloimmunizada con anticuerpos del tipo IgG y el RN tiene el antígeno correspondiente pero presenta un TCD negativo. Esto puede deberse a un conflicto ABO o a que los anticuerpos son adsorbidos por el antígeno presente también en el trofoblasto como sucede en el sistema Colton.

La segunda posibilidad es que el RN presente un **TCD positivo** lo cual confirma la presencia del anticuerpo materno sobre los glóbulos rojos del RN, en ausencia de incompatibilidad materno-fetal ABO, y se producirá EHP por acortamiento de la vida media eritrocitaria. Si existe incompatibilidad ABO puede dar el TCD positivo y EHP. Se puede encontrar a veces doble población eritrocitaria debido por ejemplo a tratamientos intrauteri-

nos de fetos afectados como transfusión intrauterina con eritrocitos Rh(D) negativos en fetos Rh(D) positivos o por transfusión materno-fetal en el momento del nacimiento cuando hay incompatibilidad ABO y Rh(D).

En un estudio que realizamos en la maternidad del Banco de Previsión Social (BPS) se determinó el TCD de los RN de 10 embarazadas aloinmunizadas con anticuerpos diferentes al anti-D que se presentaron en el período de un año, con el fin de determinar cuantos RN tenían el antígeno correspondiente al anticuerpo materno. De las 10 embarazadas 1 era Rh negativa con un anti-E y 9 Rh positivas con 5 anti-E, 2 anti-c, 1 anti-C, 1 anti-Kell y un anti Jk^a del sistema Kidd. Una embarazada Rh positiva presentó dos anticuerpos 1 anti-E y un anti-c. De los 10 RN se le determinó el TCD a 9. Una embarazada Rh positiva aloinmunizada con anti-E tuvo el parto en el interior del país y no se le realizó el TCD al RN lo que demuestra la importancia de la difusión de la información de lo que aquí se expresa para un seguimiento universal. Cuatro (44%) RN tuvieron TCD positivo y 5 TCD negativo. Todos los RN que presentaron TCD positivo tenían anticuerpos del sistema Rh diferentes al D sin incompatibilidad ABO materno-fetal.

2- Si la embarazada carece de anticuerpos durante la gestación se le realizará determinación del grupo sanguíneo y TCD a los RN de madres Rh(D) negativas, de madres grupo O y a aquellos RN que presenten ictericia o anemia clínica. Aquí también hay dos posibilidades que el TCD sea positivo o negativo. **Si es positivo**, lo más frecuente es que sea por incompatibilidad ABO materno fetal. Si la embarazada es Rh(D) negativa y el RN Rh(D) positivo se le debe realizar inmunoprofilaxis postparto a pesar del TCD positivo. Si bien la incompatibilidad ABO disminuye el grado de inmunización anti-D en la madre no lo anula por lo cual debe recibir inmunoglobulina anti-D. El TCD positivo puede deberse también a que la embarazada Rh negativa recibió inmunoprofilaxis anti-D durante la gestación cercana a la fecha de parto y los anticuerpos pasivos administrados cruzan la placenta hacia el feto y pueden positivizar el TCD cuando el RN es Rh positivo. La madre debe recibir también inmunoprofilaxis posparto. Como el TCD es positivo, utilizando la técnica en tubo, en un 10-20% de los conflictos ABO, se ha propuesto realizar un TCI con suero del RN y glóbulos rojos adultos A o B. Si bien este TCI es usualmente positivo tiene poco valor predictivo de hemólisis por lo cual nosotros proponemos realizar el TCD por la técnica de inmunoprecipitación en gel que tiene una positividad del 80 al 90%.

Otra posibilidad, aunque mucho menos frecuente, es que aparezca en el RN un TCD positivo a pesar de que la madre carezca de aloanticuerpos (TCI negativo), no exista conflicto ABO ni hubiera recibido inmunoglobulina anti-D durante la gestación. En este caso, reiteramos muy poco frecuente, se le debe realizar un TCD a la madre por la posibilidad de que presente un TCD positivo por la presencia de autoanticuerpos que pueden pasar al feto y expliquen la positividad del TCD del RN.

A veces, recibimos un informe de un TCD del RN con una positividad débil (sólo una cruz) sin que exista conflicto ABO. Repetimos el TCI a la madre por la posibilidad que haya existido una inmunización tardía durante la gestación. El TCI materno sigue siendo negativo y no ha recibido inmunoglobulina anti-D por ser Rh (D) positiva por ejemplo. Se realiza el TCD materno siendo también negativo descartando la presencia de autoanticuerpos. Agotadas las posibilidades diagnósticas teóricas se le debe extraer una nueva muestra la RN para repetir el TCD. En estos casos la repetición del TCD resulta negativo haciendo diagnóstico de un falso resultado positivo de la primera muestra lo más frecuente por una incorrecta relación anticoagulante sangre produciendo la fibrina una pseudoaglutinación o por contaminación con gelatina de Warthon si la muestra es de sangre de cordón.

Si el **TCD es negativo** en un RN Rh (D) positivo de una madre Rh (D) negativa, esta debe recibir inmunoglobulina anti-D postparto.

Los estudios paraclínicos que se solicitan para determinar la afectación neonatal producida por la EHP son:

El hemograma. La hemoglobina (Hb) será menor cuando mayor sea la hemólisis. En las formas graves la Hb de cordón umbilical será menor a 8 g %, en las moderadas estará aproximadamente entre 8 y 13 gramos y en las leves por encima de este valor. En los hemogramas realizados en contadores hematológicos generalmente se informa en las formas moderadas y graves una hiperleucocitosis con cifras de 20 y 30.000 glóbulos blancos lo que hace alarmar al neonatólogo pensando en una infección connatal. Sin embargo, debemos pensar que esta enfermedad se denominó eritroblastosis fetal porque se observaban en la sangre periférica gran cantidad de eritroblastos que son elementos nucleados pero de la serie roja. Por ello, es necesario realizar una lámina periférica con el fin de diferenciar los elementos nucleados de la serie blanca de los de la serie roja. De esta manera existirá un aumento de los eritroblastos con una leucocitosis normal o descendida. Los reticulocitos como ocurre en las anemias hemolíticas están aumentados con cifras de hasta 30 o 40%. Sin embargo, un recuento bajo de reticulocitos puede encontrarse en aquellos RN que recibieron transfusión intrauterina o presentan una sensibilización anti-Kell. Un porcentaje alto de esféricitos se encuentra principalmente en los casos de incompatibilidad ABO.

En las formas graves puede observarse también una trombocitopenia.

Bilirrubinemia. Cuando hay una hemólisis severa la bilirrubina indirecta en sangre de cordón supera los 5 mg% mientras que en las formas moderadas se encuentra entre 3 y 5 mg% y en las leves con valores inferiores. Recientemente, la Academia Americana de Pediatría (AAP) estableció unas guías para el manejo de la hiperbilirrubinemia en recién nacidos con más de 35 semanas de gestación (18), basadas en los niveles de bilirrubina total. Se establece que en todos los RN con ictericia en las primeras 24 horas de vida se debe medir la bilirrubina total en suero o transcutánea. La

repetición de estas determinaciones dependerá de la zona donde se describa el resultado de un nomograma previamente establecido, de la edad y de la evolución de la hiperbilirrubinemia. Para el tratamiento postnatal se recomiendan otros dos nomogramas (uno para fototerapia y otro para EST) basados en los valores absolutos de bilirrubina y los factores de riesgo asociados. Nosotros preferimos basarnos más que en el valor absoluto de la bilirrubina indirecta en el incremento horario determinado por dos determinaciones seriadas por el mismo método. Si el incremento es mayor de 0,5 mg% hora en los RN de término y de 0,3 en los pretérminos indica un importante nivel de hemólisis.

Los resultados de estos dos exámenes junto a la clínica y los estudios inmunohematológicos son suficientes para realizar el diagnóstico de EHP y para determinar el inicio de la prevención y/o tratamientos neonatales.

Se pueden solicitar otros estudios que ayudan a la valoración del estado general del recién nacido como glicemia, albuminemia, gases en sangre, radiografía de tórax, etc.

Recientemente se ha demostrado que los niveles de carboxihemoglobina están aumentados en los neonatos con hemólisis (2).

TRATAMIENTO DEL RN CON EHP

1- Administración de inmunoglobulina intravenosa a altas dosis como inmunomodulador.

Una vez que se produce la reacción antígeno-anticuerpo in vivo, los eritrocitos sensibilizados van a ser retirados de la circulación por los macrófagos del SRE que tienen receptores para la fracción Fc de la inmunoglobulina. Si este mecanismo de destrucción supera la producción celular aparece la citopenia en la sangre periférica. Si administramos altas dosis de inmunoglobulina libre en la circulación del RN teóricamente bloquearemos los receptores Fc del macrófago y los eritrocitos sensibilizados circularán por más tiempo al disminuir la hemólisis.

En la década del 80 aparecen trabajos que muestran resultados beneficiosos en la trombocitopenia neonatal isoimmune tratada con inmunoglobulina intravenosa a altas dosis (3) (4). Dado que el mecanismo fisiopatológico es similar para la EHP se decidió el empleo de esta terapéutica en la EHP por conflicto Rh (5). Así, el empleo de una dosis de 500 a 1000 g por kilo de peso corporal de inmunoglobulina polivalente administrada intravenosa en las primeras horas de vida puede frenar los incrementos de BI y las necesidades de EST en RN con EHP moderada o grave (6). Dicha dosis administrada intravenosa en no menos de 2 horas puede ser repetida a las 12 horas si es necesario (18).

Sin embargo, en una revisión del 2002 de Cochrane (16) se sugiere que estudios futuros bien diagramados son necesarios antes de establecer el uso rutinario de inmunoglobulina intravenosa para el tratamiento de la ictericia hemolítica isoimmune. Recientemente, han comenzado a realizarse estu-

dios prospectivos, randomizados, doble ciego y controlados con placebo para determinar los efectos a corto y largo plazo del uso de inmunoglobulina intravenosa en neonatos con EHP por Rh (D) y cuyos resultados estarán disponibles recién a finales del año 2009 (17). Lo importante es que el tratamiento con inmunoglobulina intravenosa postnatal es aplicable para todas las EHP independientemente del anticuerpo materno que la produzca.

2 - Tratamiento de la anemia

El 25 a 30% de los recién nacidos(RN) con EHP presentan al nacer una anemia moderada y una eritropoyesis insuficiente para mantener el nivel de hemoglobina. Otro 25% de RN tienen una anemia severa que puede producir fallos orgánicos múltiples e inclusive la muerte neonatal.

Por tanto, debe ser rápidamente corregido el nivel de hemoglobina mediante la **transfusión de concentrados de glóbulos rojos** (10-20 cc/Kg) que deben ser leucoreducidos, irradiados y/o calefaccionados. La realización de una **exanguineotransfusión (EST) precoz** además de corregir la anemia, elimina los eritrocitos sensibilizados, los anticuerpos libres, la bilirrubina producida por la hemólisis así como la sobrecarga circulatoria en los casos de hidrops con elevación de la presión venosa central (PVC)(7). En la EST precoz se realiza por lo general el recambio de una volemia pues el objetivo principal es remover los GR sensibilizados, elevar la tasa de hemoglobina y/o corregir la PVC. De esta manera se extrae el 70% de los hematíes afectados que son fuente potencial de BI. Sin embargo, en las guías de la Asociación Americana de Pediatría (AAP) (18) no recomiendan el uso de una EST precoz.

Cuando la **EST es más tardía** se suma como objetivo la remoción de la BI circulante y por lo general se recambian dos volemias que extrae el 90% de los GR sensibilizados y el 25-30% de la bilirrubina corporal total porque esta se encuentra distribuida tanto en el espacio intra como extravascular (8). Los hematíes administrados deben carecer del antígeno problema y si hay además incompatibilidad ABO materno fetal deben ser del grupo 0. Las pruebas de compatibilidad donante-receptor antes de realizar la transfusión o la EST se pueden realizar con el suero materno teniendo en cuenta que este puede tener anticuerpos frente a antígenos presentes en el RN o anticuerpos IgM que no atraviesan la placenta. Es preferible que la sangre a infundir esté leucoreducida, irradiada y/o calefaccionada (7).

La EST es un procedimiento al igual que la transfusión que no está libre de riesgos con una tasa de morbilidad del 5% y de mortalidad del 0,5%. La apnea, bradicardia, cianosis, vasoespasmo, hipotermia, trombosis, enterocolitis necrotizante, alteraciones metabólicas (hipoglicemia, hipocalcemia,etc), paro cardíaco así como la trasmisión de enfermedades infecciosas pueden ocurrir (8) (18).

La EST puede producir una disminución de los niveles de neutrófilos, lo cual es corregido lentamente por el RN pero parece no tener significación clínica. Una trombocitopenia producida o agravada por la o las exanguini-

notransfusiones puede desencadenar hemorragias severas (cerebrales y/o pulmonares) que ocasionan secuelas graves o la muerte neonatal. Para prevenir dicha situación clínica se debe controlar la concentración de las plaquetas mediante un hemograma pero teniendo en cuenta que los RN de mayor riesgo son los que ya se encuentran trombocitopénicos o los pretérminos porque pueden tener además una alteración plaquetaria cualitativa. En estos casos es aconsejable transfundir un concentrado plaquetario a los neonatos con cifras inferiores a las 50.000 plaquetas por mm^3 (9).

3- Tratamiento de la anemia tardía

Lactantes que desarrollaron EHP y que recibieron TIU y/o transfusiones de GR o EST frecuentemente desarrollan una anemia en los primeros meses de vida que requiere tratamiento. La etiología de esta anemia parece ser el feed-back negativo que produce la administración de hemoglobina adulta mediante los procedimientos terapéuticos perinatales lo cual resulta en un descenso en el nivel de eritropoyetina y reticulocitos circulantes.

La administración de eritropoyetina recombinante en estos neonatos sería el tratamiento de elección para evitar la administración de glóbulos rojos los cuales además de los riesgos biológicos corregirían la consecuencia pero agravarían la causa (10) (11). Sin embargo, la suplementación con ácido fólico o hierro no es recomendable su uso rutinario en este tipo de anemia neonatal (17).

4 - Tratamiento de la hiperbilirrubinemia

Los niveles séricos de bilirrubina pueden ser disminuidos mediante **fototerapia**. La luz azul (luz solar o lámpara fluorescente) produce 2 isómeros de BI: la fotobilirrubina soluble en agua, no tóxica que se excreta por la bilis y la lumirrubina que es excretada por orina y bilis. Cuando se aplica la fototerapia el 15% de la bilirrubina circulante consiste en fotoisómeros no tóxicos.

La fototerapia ha reducido apreciablemente la necesidad de EST. Sus indicaciones dependen de la edad, peso, madurez y grado de afectación por la EHP del RN. Siempre debe tenerse presente que el tratamiento con fototerapia puede producir deshidratación por lo cual es fundamental cuidar el estado de hidratación de los RN. La fototerapia no es efectiva cuando la hemólisis es severa y los niveles de BI se incrementan rápidamente. Se determina como fallo de esta terapia la incapacidad de disminuir los niveles de BI en 1-2 $\text{mg}\%$ a las 4-6 horas de iniciado el tratamiento o fallo subsecuente de producir disminución progresiva de la BI a niveles inferiores a los considerados para EST.

Recientemente, nuevas guías para el manejo de neonatos con hiperbilirrubinemia por EHP han sido publicadas por la Academia Americana de Pediatría (AAP) (18).

La administración de **albúmina** (1g/Kg) antes de la EST o la adición de albúmina (4-6 g) a la sangre usada para la EST podría incrementar la cantidad de BI removida por eliminación de la bilirrubina del espacio extra-

vascular. Muchos autores han cuestionado el beneficio de la terapia con albúmina por lo cual no debe establecerse como norma de tratamiento en los RN con anemia pues el incremento de la presión oncótica y de la volemia del RN podría precipitar el fallo cardíaco (11).

5 - EHP por conflicto ABO

Los únicos anticuerpos que pasan de la madre al feto son los de la clase IgG mediante un mecanismo activo unidireccional a través de los receptores de la fracción Fc de la inmunoglobulina presentes en la membrana placentaria. Los anticuerpos IgG más frecuentes en el suero humano son los anti-A y anti-B predominantemente en los individuos del grupo O (12). Los anti-A y anti-B del tipo IgG producirán EHP leve o moderada en aproximadamente 1 de cada 150 nacimientos en madres del grupo O con RN del tipo A o B. Aunque más raramente, también se han descrito casos de EHP en madres del grupo A2 con RN del tipo B (13).

A diferencia de la EHP causada por anti-D puede estar afectado el primer recién nacido. Son excepcionales los casos de EHP prenatales por conflicto ABO así como las presentaciones clínicas severas postnatales por lo cual no existe la necesidad de realizar pruebas de diagnóstico y severidad intrauterinas.

Esta marcada diferencia con la EHP producida por el anticuerpo anti-D del sistema Rh puede deberse a :

- 1- los antígenos A y B no están solo presentes en los eritrocitos sino también en otros tejidos y fluidos lo cual determina que solo una pequeña cantidad de IgG anti-A o anti-B crucen la placenta hacia el feto.
- 2- Los antígenos A y B no estarían completamente desarrollados al nacimiento

Solo el 14% de los RN con EHP por conflicto ABO tienen un test de Coombs directo (TCD) positivo (12). Actualmente con la realización de la técnica de inmunoprecipitación en gel el TCD es positivo en aproximadamente el 80% de los RN con EHP por conflicto ABO (14).

Dado que son raros los casos de EHP postnatal severa la mayoría de los RN se tratan con inmunoglobulina intravenosa y/o fototerapia. Son menos frecuentes los conflictos ABO que deben ser tratados con EST. Se ha demostrado que el uso de inhibidores (Sn-porfirina) de la enzima hem-oxigenasa, que cataliza la síntesis de bilirrubina a partir de la Hb, reduce la producción de BI y la necesidad de fototerapia y/o EST en RN con conflicto ABO (15). Su uso rutinario aun no está recomendado hasta que no se evalúe su seguridad a largo plazo. Tampoco se han reportado su aplicación en EHP por conflicto Rh.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Sahakian V, Weiner CP, Naides SJ, Williamson RA, Scharosch LL. Intrauterine transfusion treatment of nonimmune hydrops fetalis secondary to human parvovirus B19 infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1090-91.
- 2- Stevenson DK, Vreman HJ. Carbon monoxide and bilirubin production in neonates. *Pediatrics* 1997;100:252-254.
- 3- Bussel JB, McFarland JG, Berkowitz R. Antenatal treatment of fetal alloimmune cytopenias. *Blut* 1989;59:136-138.
- 4- Rubo J, Albrecht K, Lasch P, Laufkotter E, Leititis J, Marsan D, Niemeyer B, Roesler J, Roll C, Roth B, Burckhard von Stockhausen H, Widermann B, Wahn W. High-dose intravenous immune globulin therapy for hyperbilirubinemia caused by Rh hemolytic disease. *J Pediatr* 1992;121:93-97.
- 5- Hammerman C, Vreman HJ, Kaplan M, Stevenson DK. Intravenous immune globulin in neonatal immune hemolytic disease: does it reduce hemolysis?. *Acta Pediatr* 1996;11:1351-53.
- 6- Decaro J. Manual de Medicina Transfusional. Premio “El País” 1997 de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed de la Plaza. Montevideo-Uruguay, 1999.
- 7- Scasso JC, Decaro J, Cuadro JC, Lieutier G, Alonso J, Varela S. Enfermedad hemolítica perinatal por aloinmunización Rh (D). Premio “el País” 1982 de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay. Ed de la Plaza. Montevideo-Uruguay, 1983.
- 8- Lopez M, Cortina L. Enfermedad hemolítica perinatal. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2000;16:161-183.
- 9- Strauss RG. Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of neonatal anemia. *Transfusion* 1995;35: 68-73.
- 10- Ovali F, Samanci N, Dagoglu T. Management of late anemia in Rhesus hemolytic disease: use of recombinant human erythropoietin (a pilot study). *Pediatr Res* 1996;39:831-34.
- 11- Peterc SM. Management of neonatal Rh disease. *Clin Perinatol* 1995;22:561-592.
- 12- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine cap.12 pag 545. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford-England. Ninth Edition, 1993.
- 13- Jeon H, Calhoun B, Pothiwala M, Herschel M, Baron BW. Significant ABO hemolytic disease of newborn in a group B infant with a group A2 mother. *Immunology* 2000;16:105-108.
- 14- Chuansumrit A, Siripoonya P, Nathalang O, Sriphaisal T. The benefit of the direct antiglobulin test using the gel technique in ABO hemolytic disease of the newborn. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997;28:428-431.
- 15- Martinez JC, García HD, Oteguay LE, Drummond Gs, Kappas A. Control of severe hyperbilirubinemia in full-term newborns with the inhibitor of bilirubin production Sn-Mesoporphyrin. *Pediatrics* 1999;103:1-5.
- 16- Alcock GS, Liley H. Immunoglobulin infusion for isoimmune haemolytic jaundice in neonates. *Cochrane Database Syst. Rev* ; 2002. CD003313.
- 17- Smits-Wintjens VEJ, Walthier FJ, Lopriore E. Rhesus haemolytic disease of the newborn: Postnatal management, associated morbidity and long term outcome. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2008; 13: 265-271.
- 18- Management of hyperbilirubinemia in the newborn infants 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004;114:297-316.
- 19- Van den Akker ES, De Haan TR, Klumper FJ et al. Severe fetal thrombocytopenia and hydrops RHD alloimmunized pregnancies: independent risk factors. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197: S152.

HISTORIA CLÍNICA

Mujer de 37 años, obesa, sin antecedentes personales ni familiares a destacar que cursa su tercera gestación. Grupo sanguíneo A Rh(D) negativo. Como AGO tiene un hijo vivo sano de la primera gestación y un óbito de

la segunda hace cuatro años. Dos cesáreas. No sabemos si recibió inmunoglobulina anti-D durante las gestaciones y/o luego de los partos. Todas las gestaciones son del mismo padre. No recibió transfusiones de hemocomponentes ni trasplante de órganos o tejidos ni practica drogadicción intravenosa.

El embarazo actual al igual que los anteriores es controlado en un Centro privado del interior del país. FUM 21/04/2007 con FPP 31/01/2008. En junio del 2007 tiene el primer control inmunohematológico que establece grupo sanguíneo A Rh negativo con aglutininas negativas. Un segundo control el día 3/12/2007 a las 32 semanas de gestación determina un resultado similar.

El 12/12/2007, a las 33 semanas se le realiza una ecografía que muestra un polihidramnios con una ascitis fetal y un NST hiporeactivo por lo cual se decide realizar una cesarea de urgencia. Otro control inmunohematológico con fecha 12/12/2007 establece un grupo sanguíneo A Rh negativo con aglutininas positivas título 1/128.

Se obtiene un RN de pretérmino, de sexo femenino, de 2350g con apgar 5-7 con síndrome de dificultad respiratoria precoz (SDR), edema generalizado, importante distensión abdominal e intensa palidez cutáneo mucosa. Ritmo regular de 150 cpm con soplo mesocárdico. Se reanima y se traslada a Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Se realiza intubación vía aérea, cateterismo umbilical y diuréticos (furosemide i/v). Los estudios de sangre de cordón muestran un grupo sanguíneo A Rh positivo con TCD positivo. Una bilirrubinemia total de 7,5 mg/dl con BI de 6 mg/dl y un hematocrito de 14% .

Se realiza transfusión de 30 cc de sangre desplasmatazada (SD) e inmunoglobulina intravenosa 0,5g/Kg. Se coloca en doble luminoterapia intensiva con nutrición parenteral completa. Se drenan aproximadamente 400 cc de líquido de ascitis citrino por síndrome cardiorrespiratorio restrictivo. En su evolución, recibe en los primeros cuatro días de vida tres unidades de sangre desplasmatazada (SD) de 30 cc cada una, dos unidades de plasma fresco (PF) de 30 cc y un concentrado plaquetario (CP) también de 30 cc. No se le realiza ninguna exsanguinotransfusión. A los doce días de vida se encuentra reactiva sin SDR, con subictericia de cara y tronco, deposiciones y diuresis normales. Se prende a pecho directo con complemento de pecho ordeñado. Buena evolución y alta.

DISCUSIÓN

El primer comentario que podemos realizar de esta historia clínica reciente es que el seguimiento inmunohematológico de la gestación no ha estado de acuerdo a las recomendaciones nacionales y/o internacionales (1) (2). El segundo control para la investigación de anticuerpos inmunes se realiza

a las 32 semanas cuando se recomienda que se realice entre las 24 y 28 semanas de gestación pues si el test de Coombs indirecto (TCI) es negativo se aconseja realizar inmunoprofilaxis antenatal, en las mujeres Rh(D) negativas como en este caso, entre las 28 y 32 semanas de gestación.

El resultado de “aglutininas negativas” de fecha 03/12/2007 pensamos sea un resultado falso negativo de la técnica empleada dado que es imposible clínicamente que una gestante que carezca de anticuerpos circulantes desarrolle 10 días después una afectación fetal severa por hemólisis.

Este ha sido el principal objetivo para presentar esta historia clínica a la discusión, mostrar la importancia que tiene la realización de técnicas de laboratorio correctas, de alta sensibilidad para evitar resultados falsos negativos y con controles de calidad internos y/o externos. De no ser así se puede catalogar una gestación de bajo riesgo cuando en realidad no lo es como en este caso. De no haberse realizado la ecografía a las 33 semanas probablemente este feto, al proseguir la gestación, se hubiera convertido en óbito o con una afectación más severa. No sabemos si en el óbito que se presentó en la gestación anterior no ocurrió algo similar.

En este caso para la investigación de anticuerpos inmunes se utilizó la técnica en tubo que tiene muchas variables personales con un “pool” de glóbulos grupo 0. Sin embargo, el consenso nacional (1) establece que “se recomienda utilizar eritrocitos fenotipados que contienen los antígenos más frecuentes de la población. La alternativa de utilizar un pool de eritrocitos del grupo 0 no asegura una completa representatividad de los antígenos eritocitarios pudiendo dar falsos resultados negativos”.

Cuando a las 33 semanas de gestación se informa un resultado de “aglutininas positivas” no sabemos a que anticuerpo inmune se refiere. Se presume que como la gestante es Rh negativa tenga un anticuerpo anti-D. Esto tampoco es correcto porque si bien en el 80% de las mujeres Rh negativas el anticuerpo encontrado es un anti-D hay un 20% donde se detectan otros anticuerpos diferentes al D del sistema Rh (3). Por ello, las pautas nacionales e internacionales recomiendan que “en caso de detectar anticuerpos irregulares positivos, se debe proseguir con la identificación del o los mismos enfrentando el suero materno a un panel celular tipificado que permite definir la especificidad de/los anticuerpos presentes”. Esto es importante por un lado pues pueden existir uno o más anticuerpos inmunes (ver historias de tratamiento prenatal) y por otro lado porque debemos conocer a cual o cuales antígenos eritocitarios están dirigidos con el fin de establecer la posibilidad de que produzca o no EHP. Por ejemplo, tres gestantes Rh (D) negativas tienen un TCI positivo con lo cual se realiza el diagnóstico de aloinmunización. Cuando pasamos a la segunda etapa de identificación encontramos que en la primer gestante un anticuerpo anti-Lewis^a que es del tipo inmunoglobulina M que no pasa la placenta y por tanto no produce EHP. Esta gestante a pesar de tener un diagnóstico de aloinmunizada con un TCI positivo debe ingresar a un protocolo de inmunoprofilaxis anti-D

antenatal y postnatal en caso de que el RN sea Rh positivo y el embarazo se considerará de bajo riesgo. En la segunda gestante se identifica un anticuerpo anti-D que puede producir EHP por lo cual se deberá proseguir con los estudios que determinen la presencia del antígeno D fetal y/o el grado de afectación. Obviamente esta gestante no debe recibir inmunoprofilaxis. La tercera, presenta un anticuerpo anti-Kell que también puede producir EHP por lo cual hay que proseguir con los estudios que evalúen el grado de afectación fetal pero a diferencia del caso anterior a esta gestante se le debe realizar inmunoprofilaxis anti-D antenatal y postnatal si el RN es Rh positivo pues si no lo hacemos probablemente para la próxima gestación además de un anticuerpo anti-Kell tendrá un anti-D.

Creo, que estos ejemplos demuestran claramente la importancia de la identificación del o los anticuerpos inmunes durante la gestación para establecer si el embarazo es de bajo o alto riesgo, de si puede existir o no EHP, si se deben realizar estudios de afectación fetal y si se debe realizar inmunoprofilaxis anti-D. Si no realizamos esta etapa diagnóstica inmunohematológica como en la historia clínica que se presenta los resultados pueden ser impredecibles y caóticos tanto para la gestante como para el feto.

Una vez realizada la identificación del anticuerpo se debe establecer la contraprueba de la especificidad del anticuerpo determinando que los eritrocitos de la gestante carecen del antígeno hacia el cual está dirigido el anticuerpo hallado.

No sólo es importante tener identificado precozmente en la gestación el anticuerpo para determinar si puede producir EHP y poder estudiar el grado de afectación fetal sino también para la embarazada con fines transfusionales.

Pensemos que muchas veces las indicaciones de hemocomponentes son urgentes debido principalmente a síndromes hemorrágicos del último trimestre o del parto. Si el anticuerpo es de alta frecuencia en la población o existen más de un anticuerpo a veces es difícil encontrar eritrocitos compatibles rápidamente (ver historia clínica de diagnóstico prenatal).

Con tiempo, con una identificación precoz, se pueden tener eritrocitos compatibles o planificar terapias de alternativa.

Por último, en el informe de fecha 12/12/2007 se indica “aglutininas positivas título 1/128”. No sabemos como sin identificar previamente al o los anticuerpos se ha podido titular. Se realiza una técnica incorrecta desde el punto de vista inmunohematológico y a su vez las pautas nacionales establecen con “respecto a la utilidad de la titulación de anticuerpos, existe consenso en que no tienen correlación directa con la afectación fetal”.

Esta gestante que carece de antecedentes inmunogénicos presenta un anticuerpo anti-D producido por falla de la inmunoprofilaxis anti-D en las gestaciones anteriores. No sabemos si recibió inmunoglobulina anti-D antenatal y/o postparto. Pero, de haber recibido una dosis única de 300 mcg intramuscular probablemente haya sido insuficiente porque la señora es

una obesa. Es importante tener en cuenta el peso de la paciente cuando se realiza inmunoglobulina anti-D intramuscular dado que se recomienda aumentar la dosis en mujeres obesas (4). La ventaja de administrar inmunoglobulina anti-D intravenosa es que no depende del peso, su acción es más rápida y una dosis de 120 mcg equivale a una de 300 intramuscular con una reducción considerable en el costo.

En suma, creo que la historia comentada nos muestra la importancia de que se cumplan las pautas para el seguimiento inmunohematológico de la gestación utilizando técnicas correctas, de alta sensibilidad y especificidad, con controles de calidad internos y externos para lo cual contamos en el país con un Laboratorio de Referencia en Inmunohematología a nivel nacional en el Servicio Nacional de Sangre cuyo acceso está disponible tanto para servicios de salud públicos como privados. A su vez los servicios de diagnóstico y tratamiento como en este caso, de Medicina Transfusional, no pueden transcribir resultados y realizar técnicas como 30 o 40 años atrás. La Medicina evoluciona permanentemente y los técnicos debemos acompañar los cambios basados en evidencia para el beneficio de los pacientes. Por ello, crece la importancia de la educación médica continua en toda la etapa activa del profesional. El objetivo docente de esta obra es mantener la competencia profesional para mejorar la calidad de asistencia de la medicina transfusional perinatal.

1 – Recomendaciones para la Prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica feto-neonatal en la gestación y para la inmunoprofilaxis anti-D. Consenso 2005. Arch. Gin. Obstet. 2005;43(3):169-176.

2 – Judd WJ. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. Transfusion 2001;41:1445-1452.

3 – Pereira A, Silveira S, Hernández C, Varela A, Gaggero M, Olivera P, Dilorenzi N, Gularte M, Larrosa V, Miller A, Decaro J. Erythrocyte antibodies in pregnant women. XXXI World Congress of the International Society of Hematology (ISH) Marzo 2007 Punta del este – Uruguay. Arch Med Intern 2007; Supl 1: S182.

4 – Woelfer B, Schuchter K, Janisiw M, Hafner E, Philipp K, Panzer S. Postdelivery levels of anti-D IgG prophylaxis in D – mothers depend on maternal body weight. Transfusion 2004;44:512-517.

CAPÍTULO 5 – PREVENCIÓN DE LA INMUNIZACIÓN ANTI-D

5.1 - LO QUE YA FUE

En 1609, en la prensa de París se describe, por primera vez, el nacimiento de dos gemelares de los cuales uno se presenta con un edema generalizado y fallece rápidamente mientras que el segundo, mejor clínicamente, desarrolla a las pocas horas ictericia con síntomas neurológicos falleciendo al tercer día. Ambas condiciones clínicas, el hidrops y el kernicterus, no fueron asociadas hasta que en 1932 Diamond llega a la conclusión de que constituyen diferentes aspectos de una misma patología: una severa hemólisis que desarrolla focos de eritropoyesis extramedular y libera a la sangre células nucleadas inmaduras de la serie roja (Erythroblastosis Fetalis) (1). Pero, hasta ese momento no se tenía idea de la causa de esta hemólisis fetal. En 1938, Ruth Darrow, patóloga de Chicago, quien tuvo un recién nacido que fallece luego por kernicterus, establece la teoría que la causa de la hemólisis fetal se debe a anticuerpos maternos que cruzan la placenta produciendo la destrucción de los eritrocitos fetales (2). Si bien Darrow describe correctamente la fisiopatología de hemólisis fetal piensa erróneamente que el antígeno causante de la respuesta inmune materna es la hemoglobina.

El descubrimiento del sistema Rh en 1940 por Landsteiner y Wiener (3) sirve de base para que en 1941 Levine establezca que el antígeno D es el factor patogénico de la enfermedad hemolítica fetal (4). En 1945, el veterinario Robert Coombs junto con los Dres Arthur Mourant y Rob Race describen el método para la detección de anticuerpos “incompletos” luego denominado test de Coombs (5).

Antes de 1945, el 50% de todos los fetos con enfermedad hemolítica fallecían por hidrops o kernicterus (6). Con la introducción de la exsangüinotransfusión por Wallerstein (7) se erradicó el kernicterus y se redujo la mortalidad perinatal al 25%. Luego, la inducción del parto prematuro, el estudio de la espectrofotometría del líquido amniótico, la transfusión fetal intraperitoneal, la cordocentesis y la transfusión fetal intravascular disminuyeron la mortalidad perinatal al 2.3% en equipos de trabajo expertos en esta patología.

Pero, la única vía por la cual, la hemólisis fetal por anti-D puede disminuir aún más es mediante la prevención de la inmunización materna.

En 1900, el mismo año que Landsteiner describe el sistema ABO, von Dungern determina en experimentos en conejos que la inmunización activa provocada por un antígeno determinado puede ser prevenida por la administración pasiva de anticuerpos específicos contra el antígeno (8). Sin embargo, este descubrimiento no fue aplicado para la prevención de la enfermedad hemolítica fetal hasta después de 25 años del descubrimiento del sistema Rh.

En 1943 Levine observa que los anticuerpos anti-D se desarrollan más frecuentemente en aquellas mujeres que carecen de aglutininas anti-A y anti-B del sistema ABO (9). Sin embargo, recién en 1956 fue claramente demostrado que la incompatibilidad ABO ejercía una protección frente a la inmunización anti-D gracias a los experimentos realizados por Stern y colaboradores (10). En 1957, Kleihauer, Braun y Betke establecen la elución ácida como técnica para distinguir la hemoglobina fetal de la del adulto (11). A partir de 1960 dos grupos de investigadores, uno en Liverpool y otro en New York, comienzan a realizar trabajos experimentales sobre la prevención de la inmunización anti-D. El grupo de Liverpool basa sus trabajos en los hallazgos anteriores de la protección ABO y la técnica de Kleihauer. El grupo de New York en cambio, desarrolla sus trabajos experimentales en el trabajo de Theobald Smith de 1909 en que demuestra que la respuesta inmune frente al toxoide de la difteria podía ser inhibida por un exceso de antitoxina (12). En 1960 el Dr. Finn en un simposio médico en Liverpool sugiere **“It might be possible to destroy any fetal red cell found in their maternal circulation following delivery by means of a suitable antibody. If successful, this would prevent the development of erythroblastosis, so mimicking natural protection afforded by ABO incompatibility”**. El primer trabajo científico fue realizado por Stern y colaboradores en 1961 en el cual a 16 hombres voluntarios 0Rh D negativos se les inyectó repetidamente eritrocitos 0RhD positivos sensibilizados con suero anti-D. Ninguno de los 16 hombres se inmunizó mientras que en subsecuentes inyecciones de eritrocitos no sensibilizados en 10 hombres produjo la inmunización anti-D en 5 después de la segunda inyección (13). También en 1961, Finn y colaboradores determinan la incidencia y cantidad de eritrocitos fetales en la circulación de 256 madres Rh negativas. Los glóbulos rojos fetales fueron encontrados en 30 muestras (11.7%) y en cuatro (1.6%) el volumen de la hemorragia feto-materna fue superior a 5 ml (14). En la misma publicación, Finn y colaboradores inyectan hombres voluntarios Rh negativos con eritrocitos Rh positivos. La subsecuente administración intravenosa de suero anti-D conteniendo inmunoglobulinas M y G, acelera el clearance de los eritrocitos Rh positivos. Concluyen que una manera de prevenir la inmunización anti-D, en madres ABO compatibles, puede ser mediante la rápida destrucción de los glóbulos rojos fetales inyectando suero anti-D lo cual produce un rápido clearance similar a cuando existe incompatibilidad ABO.

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

con 30-50 ml de plasma que contenía anticuerpos anti-D del tipo IgG. En el primer experimento 8 de 13 hombres tratados con anti-D IgM desarrollan inmunización (54%) mientras que sólo 1 de 11 no tratados (9%) se inmuniza. Concluyen que los anticuerpos anti-D completos (IgM) no sólo no previenen la inmunización anti-D sino que parecen estimularla. En el segundo experimento, sólo 3 de 21 hombres tratados con IgG anti-D (14%) y 11 de los 21 no tratados (54%) desarrollan inmunización lo cual, sugiere una protección mediante anticuerpos incompletos (IgG). En el tercer trabajo, se demuestra que los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos IgG desaparecen más rápido de la circulación (15).

También en 1963, Freda, Gorman y Pollack del grupo de New York, introducen una preparación con alto título de anti-D (inmunoglobulina anti-D) en sus programas de investigación. Freda y Gorman que pertenecían a la Universidad de Columbia y Pollack a la Ortho Research Foundation, demuestran que con la administración de 5 ml de esta inmunoglobulina anti-D 24 horas después de la inyección de eritrocitos Rh positivos a 5 hombres voluntarios Rh negativos, mensualmente durante 5 meses, produce una protección total para la inmunización anti-D. Sin embargo, 4 de 5 hombres no protegidos con esta inmunoglobulina anti-D se inmunizan (16). En 1964 el mismo grupo de investigadores, establece que la inmunoglobulina anti-D protege el 100% de los voluntarios cuando es administrada por vía intramuscular hasta 72 horas después de la inyección de eritrocitos Rh positivos (17).

El primer trabajo sobre la prevención de la inmunización anti-D en gestantes fue publicado por Clarke y Sheppard del grupo de Liverpool en 1965 en una carta enviada a la revista The Lancet (18). En ninguna de las 27 madres tratadas en el post-parto con inmunoglobulina anti-D (IgG) se encontró signos de inmunización en un seguimiento realizado a los 3 y 6 meses del parto mientras que 9 de las 29 no protegidas con inmunoglobulina se inmunizaron. También en una carta enviada a la revista The Lancet ese mismo año (19), Freda y colaboradores del grupo de New York reportan sus resultados clínicos preliminares. Ninguna de las 34 madres que recibieron inmunoglobulina anti-D postparto mostró inmunización a los 6 y 18 meses después del parto mientras que 6 de las 56 del grupo control se inmunizaron al antígeno D. En 1967, se publica un trabajo sobre la tasa de inmunización en 329 madres tratadas con inmunoglobulina anti-D y 337 no tratadas recopiladas del grupo inglés, americano y alemán (20). Mientras que ninguna del grupo tratado se inmunizó, 46 (14%) del grupo control si lo hizo.

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

En 1969, se obtiene en Francia la primera preparación de inmunoglobulina anti-D para uso intravenoso (20). La administración de 300 mcg de IgG

anti-D junto con 0,5 ml de eritrocitos Rh pos demostró un clearance de 6 horas para la vía intravenosa y de más de 48 horas para la intramuscular.

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

En 1971 Woodrow y colaboradores establecen que en 1015 mujeres estudiadas el fallo de la inmunoprofilaxis postparto es de 3 en 844 casos (0,36%) después del primer parto y de 3 en 171 (1,8%) luego del segundo (22).

Schneider recoge la información estadística de la inmunoprofilaxis en 10 países encontrando que 93 de 22.239 mujeres (0,42%) tratadas con IgG anti-D desarrollan inmunización después del primer parto y 303 de 5266 (5,75%) de las que no recibieron inmunoglobulina lo cual se corresponde con una tasa de protección del 92,8%. Luego de la segunda gestación la tasa fue de 90,3% (23).

En 1971, Pollack y colaboradores establecen la relación de la cantidad de inmunoglobulina anti-D (IgRhD) necesaria para neuutralizar un volumen determinado de eritrocitos fetales : 20 mcg de Ig RhD por ml de eritrocitos o 10 mcg por ml de sangre fetal (24).

En 1954, el Dr. Bruce Chown trabajando en el Laboratorio Rhesus del Hospital Pediátrico de Winnipeg en Canadá demuestra que la hemorragia feto materna es la responsable de la inmunización materna. Subsecuentemente, Zipursky y colaboradores utilizando la técnica de Kleihauer, fueron los primeros investigadores en reconocer que en un número determinado de gestaciones existía un pasaje transplacentario de eritrocitos fetales antes del parto (25).

La primera profilaxis RhD antenatal, durante la gestación, fue publicada por el Dr. John Bowman en Manitoba-Canadá en 1978. En la fase inicial 300 mcg de IgRhD eran administrados a las 34 semanas de gestación. Luego, se cambia el protocolo y se administra una dosis a las 28 semanas y otra similar a las 34. Por último la profilaxis antenatal se redujo a una sola dosis a las 28 semanas de gestación y una segunda IgRhD era administrada post parto si el recién nacido era Rh positivo (26). John (Jack) Bowman se graduó como pediatra en 1956 y trabajó en el Hospital Pediátrico de Winnipeg en Canadá. En 1946 conoce al Dr. Bruce Chown cuando dona sangre siendo estudiante de medicina. Como su sangre era del grupo RhD negativo el Dr. Chown la utilizaba periódicamente para realizar exsanguinotransfusiones a los recién nacidos con enfermedad hemolítica perinatal. Bowman fue luego uno de los tres pediatras que Bruce Chown entrenó para realizar exsanguinotransfusiones a los recién nacidos por lo cual tuvo una activa participación en el Departamento de Neonatología del Hospital. En 1961 fue denominado director clínico del Laboratorio Rhesus mientras que el Dr. Bruce Chown se dedicaba exclusivamente a la investigación. En 1963 cuando Liley de Nueva Zelanda describe la transfusión intrauterina intraperitoneal Bowman aplica rápidamente esta técnica en una nurse de

Winnipeg que presentaba una gestación con una afectación fetal severa. El 2 de enero de 1964 se reporta la primera transfusión intrauterina en América del Norte. Cuatro meses después nace el niño y la madre en gratitud se convierte en donante regular de plasma para obtener inmunoglobulina anti-D (26). En 1969 se crea por ley en Manitoba-Canadá el Instituto Rh de Winnipeg fundado por Chown, Bowman, Lewis y Bowles siendo denominado director médico John Bowman.

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

Se construye un laboratorio en el Fort Garry Campus de la Universidad de Manitoba cercano al departamento de Química y se comienza a aplicar la técnica de fraccionamiento por columnas de DEAE-Sephadex descrita por Hans Hoppe en Hamburgo. El Plasma era obtenido de mujeres RhD negativas inmunizadas con anticuerpos anti-D que lo donaban voluntariamente mediante plasmáferesis (26).

El laboratorio de fraccionamiento plasmático abrió sus puertas oficialmente en febrero de 1973. La inmunoglobulina anti-D se denominó inicialmente Winnipeg Rho y luego WinRho como se conoce actualmente. El producto era muy puro y podía ser administrado intravenoso mientras que las otras preparaciones de inmunoglobulinas presentes en el mercado de América del Norte como la RhoGam sólo eran de uso intramuscular. Luego de aproximadamente 8 años, y mediante un trabajo clínico realizado por Bowman en 1980 WinRho recibe su aprobación para su uso general (26). En 1984, la dirección del Instituto decide vender el laboratorio de fraccionamiento plasmático a Apotex una compañía farmacéutica canadiense. El Instituto Rh pasa a denominarse a partir de ese momento RhInstitute Cangene Corporation. Cangene es actualmente una compañía productora de vacunas e inmunoglobulinas que funciona en el Campus de la Universidad de Manitoba en Canadá. El laboratorio Rh original forma parte actualmente de la Facultad de Música.

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

En 1979, publicamos en Uruguay el primer trabajo sobre la transfusión feto materna y la profilaxis por inmunoglobulina anti-D (32).

En 1982, un grupo de médicos del Hospital de Clínicas y del Centro Latinoamericano de Perinatología (CLAP) escribía un libro donde se describían la inmunoprofilaxis anti-D y todos los métodos de diagnóstico así como los tratamientos pre y postnatales utilizados en la Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP) por aloinmunización anti RhD. Dicho esfuerzo comunitario fue premiado por la Academia Nacional de Medicina del Uruguay con el premio “El País” con lo cual se logró la publicación del

libro y su distribución gratuita (27). El mismo grupo de médicos pensó que además de lograr la difusión de los conocimientos debía pautar el seguimiento de esta patología tanto en el período prenatal como postnatal para lo cual se propusieron las “Normas de prevención, diagnóstico y tratamiento de la EHP por conflicto Rh(D)” a las cuales se les otorgó el primer premio de la Asociación Médica del Uruguay (28) y luego fueron adoptadas como normas nacionales por el Ministerio de Salud Pública (MSP).

En el año 2001 entra en vigencia el Reglamento Técnico del Mercosur Decreto PE 385/00 que en el capítulo L dedica cinco incisos a la profilaxis con inmunoglobulina anti-D en las gestantes Rh negativas (29).

El desarrollo de técnicas como la cordocentesis, la transfusión intrauterina intravascular, la gráfica de Queenan para los valores de densidad óptica del líquido amniótico, la técnica de inmunoprecipitación en gel para el diagnóstico inmunohematológico, la medición del flujo sanguíneo en la arteria cerebral media para el diagnóstico de anemia fetal, el diagnóstico del fenotipo fetal, la aparición de una inmunoglobulina anti-D de uso intramuscular o intravenoso con presentación de 120 mcg, nos ha motivado para realizar una revisión bibliográfica y comentar nuestra experiencia personal no sólo de la EHP por Rh(D) sino la producida por otros anticuerpos clínicamente significativos (30).

El objetivo de esta publicación fue mostrar de manera clara y sencilla, inclusive a través de la revisión de 11 historias clínicas, los elementos de prevención, diagnóstico y tratamiento de la EHP. Dado que en los últimos años ha variado sustancialmente el encare diagnóstico y de prevención junto con la aparición de nueva tecnología, pensamos que al igual que en 1982 este libro podía servir de base para realizar nuevas pautas de seguimiento de esta patología. En el año 2005 luego del trabajo en talleres de equipos multidisciplinarios se logró un consenso sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la EHP que ha sido publicado (31) y presentado al programa prioritario de Salud y Género del MSP par su revisión y adopción como nuevas pautas nacionales.

Luego de cuatro décadas de la aparición de la IgRhD comercial (RhoGam) se ha disminuido notablemente el número de casos de EHP por anti-D. Sin embargo, existe un número de casos residuales por falla de la inmunoprofilaxis pero también han aumentado los casos de EHP por otros anticuerpos diferentes al D para los cuales no existe todavía inmunoprofilaxis. La única prevención en el momento actual sería la disminución de las transfusiones, sobre todo de glóbulos rojos, en la población de mujeres en edad reproductiva activa y en caso de realizarlas utilizar sangre fenotipada en el sistema Rh y Kell dado que producen más del 90% de los casos de EHP por anticuerpos diferentes al D.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Diamond LK, Blackfan KD, Baty JM. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus. *J Pediatr* 1932; 1: 269-309.
- 2- Darrow RR. Icterus gravis (erythroblastosis neonatorum, examination of etiologic considerations). *Arch Pathol* 1938;25:378-417.
- 3- Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1940;43:223.
- 4- Levine P, Katzin EM, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy: its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis. *JAMA* 1941; 116: 825-827.
- 5- Coombs RRA, Mourant AE, Race RR Detection of weak and “incomplete” Rh agglutinins: a new test. *Lancet* 1945;246:15-16.
- 6- Bowman J. Rh-immunoglobulin : Rh prophylaxis. *Best Practice and Clinical Haematology* 2006; 19: 27-34.
- 7- Wallerstein H. Treatment of severe erythroblastosis by simultaneous removal and replacement of blood of the newborn infant. *Science* 1946 ;103: 583-584.
- 8- Von Dungern F. Beitrage zur Immunitatslehr. *Munch Med Wochenschr* 1900; 47: 677.
- 9- Levine P. Seological factors as possible causes in spontaneous abortions. *J Hered* 1943;34: 71-80.
- 10- Stern K, Davidson I, Masaitis L. Experimental studies on Rh immunization. *Am J Clin Pathol* 1956; 26: 833-843.
- 11- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hamoglobin in den Erythrocyten eines. *Blutausstrichs Klin Wochenschr* 1957;35:637-638.
- 12- Smith T. Active immunity produced by so called balanced or neutral mixtures of diphteria toxin and antitoxin. *J Exp Med* 1909;11:241-256.
- 13- Stern K, Goodman H, Berger M. Experimental immunization to hemoantigens in man. *J Immunol* 1961;87: 189-198.
- 14- Finn R, Clarke CA, Donohoe WTA y col. Experimental studies on the prevention of Rh Haemolytic disease. *BMJ* 1961; II : 1486-1490.
- 15- Clarke CA, Donohoe WTA, Mc Connell RB y col. Further experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease. *BMJ* 1963 ; II: 979-984.
- 16- Freda J, Gorman JG, Pollack W. Succesful prevention of sensitizacion to Rh with experimental anti-Rh gammaglobulin antibody preparation. *Fed Proc* 1963;22:374.
- 17- Gorman JG, Freda J, Pollack W. Prevention of sensitization of Rh with anti-Rh gamma globulin. *Fed Proc* 1964; 23: 238.
- 18- Clarke CA, Sheppard PM. Prevention of rhesus haemolytic disease. *Lancet* 1965;II:526.
- 19- Freda J, Gorman JG, Pollack W. Prevention of rhesus haemolytic disease. *Lancet* 1965; II: 690.
- 20- Freda VJ, Gorman JG, Pollack W y col. Prevention of Rh isoimmunization. *JAMA* 1967; 199: 390-394.
- 21- Jouvenceaux A, Adenot N, Berthoux F y col. Lyophilised anti D gamma globulin given intravenously for the prevention of anti-Rh immunization. *Rev Fr Transfus* 1969; 12 (suppl): 341-347.
- 22- Woodrow JC, Clarke CA, McConnell RB y col. Prevention of Rh haemolytic disease: results of the Liverpool “low risk” clinical trial. *BMJ* 1971; II: 610-612.
- 23- Schneider J. Tagungsberichte. IV. Arbeitstagung zur Prophylaxe der Rhesus-Sensibilisierung mit Immunoglobulin-anti-D. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1971; 31: 493-522.
- 24- Pollack W, Ascari WQ, Crispin JF y col. Studies on Rh Prophylaxis. II Rh prophylaxis after transfusion with Rh-positive blood. *Transfusion* 1971;11:340-344.
- 25- Zipursky A, Pollock J, Neelands P y col. The transplacental passage of foetal red blood-cells and the pathogenesis of Rh immunization during pregnancy. *Lancet* 1963;II : 489-493.
- 26- Warren P, Jamieson JC. Jack Bowman : Winnipeg’s contributions to the treatment and prevention of Rhesus Hemolytic Disease of the Newborn. *Transfusion Medicine Review* 2010;24:68-76.
- 27- Scasso JC, Decaro J, Lieutier G y col. Enfermedad Hemolítica Perinatal por aloinmuniza-

- ción Rh (D). Ed. De la Plaza, Montevideo-Uruguay, 1983.
- 28- Cuadro JC, Scasso JC, Decaro J y col. Normas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica por conflicto Rh(D) Ed. Delta, Montevideo-Uruguay, 1981.
- 29- Reglamento Técnico del Mercosur –Decreto PE 385/00
- 30- Decaro J. Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP). Ed. Rimarco. Montevideo-Uruguay, 2003.
- 31- Recomendaciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica feto-neonatal y para la inmunoprofilaxis anti-D. Archivos de Ginecología y Obstetricia 2005;43: 169-176.
- 32- Rodríguez A, Decaro J, Borelli C. La transfusión feto materna y la profilaxis por inmunoglobulina anti-Rh(D). An Fac Med 1979;2:123-127.

5.2 INMUNOPROFILAXIS

La inmunoglobulina Rh (IGRh) es un hemoderivado producido a partir del fraccionamiento industrial de plasmas de individuos aloinmunizados en el que predomina la IgG anti-D. Una dosis de 300 microgramos de anti-D es suficiente para contrarrestar los efectos inmunizantes de 15 ml de eritrocitos Rh D positivos o aproximadamente 30 ml de sangre total (efecto dosis dependiente).

Este efecto protector de la IgG anti-D sobre los individuos D negativos expuestos a células D positivas probablemente resulta de la interferencia con el reconocimiento antigénico en la fase de inducción de la inmunización (1). La IgG anti-D en la circulación materna se une a los glóbulos rojos fetales (GRF) Rh D positivos y estos son secuestrados en el bazo. Básicamente, las funciones de este órgano del sistema inmune son 1- retirar células sanguíneas senescentes y microorganismos extraños por filtración y 2- desarrollar la respuesta inmune frente a antígenos foráneos. Estas actividades están anatómicamente separadas una se cumple en la pulpa roja y otra en la pulpa blanca. La rápida desaparición de los GRF pasivamente sensibilizados en la pulpa roja evitaría el contacto del antígeno D con las células inmunocompetentes de la pulpa blanca donde se produce la respuesta inmune (14). La profilaxis con IgG anti-D no es efectiva una vez que se ha iniciado la respuesta inmune. A los 13 días de la administración de 1 ml de eritrocitos RhD positivos la infusión de 100 microgramos de IgG anti-D neutraliza la inmunización en el 50% de los casos (7).

Como el mecanismo de profilaxis es mediante la administración pasiva de anticuerpos tiene un efecto temporal por lo cual debe repetirse la dosis en cada acto inmunizante.

La IGRh adecuadamente preparada mediante doble inactivación viral (solvente detergente - nanofiltración) como otras preparaciones de inmunoglobulinas, tiene un riesgo escaso o nulo de trasmisión viral (2). Cada microgramo (mcg) equivale a 5 unidades internacionales (UI) por lo cual la presentación de 120 mcg representan 600UI y la de 300 mcg 1500UI.

En dos recientes revisiones (Cochrane Review) se demostró que la administración de IgG anti-D tanto después del parto como durante la gestación previenen la inmunización anti-D (16) (17).

1) PREVENCIÓN DE LA ALOINMUNIZACION ANTI-D EN EL EMBARAZO

Administración antes del parto

La IGRh debe administrarse a una mujer Rh D negativa con pruebas para anticuerpos anti-D negativas, luego de cualquier acontecimiento obstétrico capaz de permitir el ingreso de células fetales a la circulación materna: el aborto espontáneo o terapéutico, el embarazo ectópico, la amniocentesis, la extracción de muestras de vellosidades coriónicas, la cordocentesis, la hemorragia anteparto o la muerte fetal.

Si cualquiera de estas posibilidades ocurre **antes de las 13 semanas** de gestación, una dosis de 50-100 microgramos de IGRh es adecuada para proteger contra el pequeño volumen fetal durante el primer trimestre (3).

Desde las 13 semanas en adelante hasta el término se debe dar una dosis de IGRh de 250-300 microgramos intramuscular o 120 mcg intravenosa.

El amplio uso de la inmunoprofilaxis posparto ha disminuído la inmunización contra el antígeno D asociada con el embarazo desde aproximadamente 13% hasta 1-2%. El riesgo disminuye hasta 0,1% si se da también IGRh antes del parto **entre las 28 y 32 semanas** de gestación (4) dado que las mujeres que desarrollan anticuerpos anti-D durante el embarazo, el 92 % lo hacen a esta edad gestacional. La sangre obtenida antes de la inyección de IGRh debe ser sometida a pruebas para grupo sanguíneo ABO, Rh D, variantes del antígeno D (D débil o Du y D^{VI}) y para anticuerpos anti-eritrocitarios utilizando paneles eritrocitarios de fenotipo conocido. Nosotros estamos utilizando en el momento actual la **técnica de precipitación en gel** que es una microtécnica que permite macrolectura, con reactivos incorporados y asociado a un sistema computarizado que evita el error humano. Es además un método más sensible que la tradicional técnica en tubo por eso actualmente recomendamos que los controles inmunohematológicos durante el embarazo se realicen uno en el primer trimestre y otro a las 25-27 semanas. Inclusive, cuando administramos IGRh entre las 28 y 32 semanas si repetimos los estudios de anticuerpos anti-D antes de las 8 semanas siguientes probablemente sean positivos por los anticuerpos anti-D administrados pasivamente por la IGRh. Por la misma razón, los anticuerpos anti-D administrados son principalmente IgG por lo cual pasan la placenta y el recién nacido en caso de ser Rh D positivo puede nacer con un Test de Coombs directo (TCD) positivo pero sin evidencia de hemólisis (5). Por ello, debe haber una buena comunicación entre el médico tratante y el médico hemoterapeuta para asegurar que exista una correcta interpretación de las pruebas de laboratorio realizadas durante la gestación y en el momento del parto.

En 1982, con la técnica en tubo, proponíamos controles inmunohematológicos seriados cada 4 semanas durante la gestación (6).

El servicio de Medicina Transfusional debe llevar un correcto seguimiento inmunohematológico del embarazo realizando la historia clínica así como un registro de los resultados de laboratorio pre y posparto y de la administración de la IGRh.

El médico hemoterapeuta supervisará la administración de la IGRh, en que dosis y en que edad gestacional, en base a resultados de laboratorio recientes.

De acuerdo al esquema 1 no se debe administrar IGRh a las mujeres embarazadas Rh D positivas o D débil (Du). En estos casos los glóbulos rojos tienen el antígeno D en su membrana en mayor o menor grado por lo cual la embarazada no produce anticuerpos anti-D. Tampoco se debe dar IGRh a las Rh D negativas pero que ya presentan anticuerpos anti-D (aloinmunizadas) salvo en los casos que el resultado de laboratorio es debido a la presencia de anticuerpos pasivos por la administración previa de IGRh. Es deseable obtener confirmación de los registros médicos y de laboratorio en el servicio de Medicina Transfusional pero la IGRh debe darse siempre y cuando no se pueda resolver la duda con facilidad. Las mujeres Rh D negativas aloinmunizadas pero con anticuerpos diferentes al D (por ejemplo anti-c, anti-e, anti-C, anti-E, anti-Kell, etc) son candidatas a la administración de IGRh para evitar que se agregue un anticuerpo anti-D.

Administración posparto

La sangre de cordón de lactantes nacidos de madres D negativas se debe someter a pruebas para grupo sanguíneo ABO, Rh D y test de Coombs directo (TCD). Una mujer Rh D negativa cuyo recién nacido (RN) es Rh D negativo no debe recibir IGRh. En caso que el RN sea Rh D positivo o Du con TCD negativo la madre debe recibir una dosis de 300 microgramos de IGRh intramuscular o 120 mcg intravenosa lo antes posible dentro de las **72 horas posteriores al parto**. Si pasan más horas es mejor hacer la inmunoprofilaxis que no hacerla. En algunos casos ha sido efectiva aun administrada hasta 13 días después del parto (7). Cuando la embarazada ha recibido inmunoprofilaxis en la semana 28 de gestación debe recibir también inmunoprofilaxis posparto ha pesar que el RN Rh positivo pueda mostrar un TCD positivo por los anticuerpos pasivos administrados durante el embarazo. La presencia de IgG anti-D residual de la administración preparto no indica una protección vigente en el momento del parto. Una embarazada Rh negativa con TCI negativo puede tener también un RN con TCD positivo debido a un conflicto ABO por lo cual debe recibir inmunoglobulina anti-D postparto. Una embarazada Rh negativa con TCI positivo por un anticuerpo diferente al D (anti-C, anti-e, anti-Kell, etc) puede tener un RN con TCD positivo o negativo. En ambos casos debe recibir inmunoprofilaxis anti-D postparto (ver esquema 2). Más raramente, un RN Rh D positivo puede tener un TCD positivo porque la madre Rh D negativa tam-

bién presenta un TCD positivo por autoanticuerpos que pasan la placenta. En estos casos también debe realizarse inmunoprofilaxis cuando el RN es Rh D positivo. Durante la gestación, los autoanticuerpos más frecuentes son los antifosfolípidos dando un patrón de aglutinación característico con un test de Coombs indirecto positivo que aglutina los eritrocitos de los tres paneles de investigación e inclusive los once de los paneles de identificación sin poder interpretar los resultados de esta panaglutinación. Sin embargo, no existen inconvenientes para realizar el grupo sanguíneo ABO y Rh. En un estudio de seguimiento que realizamos durante cinco años en 14860 gestantes encontramos que 157 (1.05%) tenían anticuerpos anti-eritrocitarios de los cuales 153 eran aloanticuerpos y 4 autoanticuerpos con este patrón de aglutinación (21). En los cuatros casos de autoanticuerpos se demostró la presencia de anticuerpos antifosfolípidos. Este diagnóstico precoz es muy importante para la gestación si se realiza en la primera consulta.

Pensamos que cuando la gestante presenta un test de Coombs indirecto

Tabla 1 - ESQUEMA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE IGRhD PREPARTO

	Rh D	TCI	diagnóstico	seguimiento	IGRhD
1	pos	neg	sin anticuerpos	ninguno	no administrar
2	pos	pos	anticuerpos distintos al anti-D	identificación del anticuerpo	no administrar
3	pos D débil (Du)	neg	antígeno D presente	ninguno	no administrar
4	neg	neg	sin anticuerpos	primer trimestre 26 semanas	administrar
5	neg	pos	con anticuerpos	identificación del anticuerpo	
				5.1 anti-D inmune	no administrar
				5.2 anti-D pasivo	administrar
				5.3 anticuerpo distinto al anti-D	administrar

TCI = Test de Coombs Indirecto con panel de glóbulos rojos de fenotipo conocido.

Tabla 2 - ESQUEMA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE IGRh ANTI-D POSTPARTO

MADRE	DIAGNÓSTICO	RN	IGRhD
Rh neg TCI neg		Rh neg TCD neg	no
Rh neg TCI neg		Rh pos TCD neg	si
Rh neg TCI neg	conflicto ABO	Rh pos TCD pos	si
Rh neg TCI pos	anti-D	Rh pos TCD pos	no
Rh neg TCI pos	diferente al D	Rh pos TCD pos	si
Rh neg TCI pos	diferente al D	Rh pos TCD neg	si
Rh neg TCI pos	diferente al D	Rh neg TCD pos	no

TCD: Test de Coombs Directo

y directo positivo se debe informar al obstetra para que investigue anticuerpos antifosfolípidos y comience la terapéutica anticoagulante lo antes posible. Sin embargo, la mayoría de los anticuerpos antifosfolípidos no producen TCD y TCI positivos por técnica en gel durante la gestación. Más raramente, la gestante puede presentar una anemia hemolítica autoinmune (AHAI). Hasta el momento actual, nosotros no hemos visto ningún caso clínico ni paraclínico pero se han reportado algunos casos a nivel mundial (22) (23). Inclusive este mecanismo autoinmune puede estar generado por medicamentos como la alfametildopa que se puede utilizar para el tratamiento de la hipertensión durante la gestación y generar un TCD positivo.

En cuanto a la inmunoprofilaxis para las variantes del antígeno D ya dijimos que la variante cuantitativa (D débil o D^u) debe ser considerada como Rh positiva y por tanto no recibir IgG anti-D. En cambio, la variante cualitativa D^{VI} debe ser considerada como Rh negativa por lo cual debe recibir inmunoprofilaxis antenatal y en caso de tener un RN Rh positivo una nueva dosis postparto (24). La pregunta es si la dosis administrada de IgG anti D se une a los epitopes presentes en los eritrocitos maternos y por tanto no es suficiente para prevenir la inmunización. En un trabajo publicado se muestra que una importante proporción de la IgG -anti-D no se une a los eritrocitos con variante D^{VI} (25). Es importante diagnosticar esta variante como Rh negativa ya que si bien es rara puede producir anticuerpos anti-D los cuales pueden ser causa de hidrops (26).

La administración postparto de la IGRh puede no impedir la inmunización si la cantidad de eritrocitos fetales D positivos que ingresan a la circulación materna exceden la capacidad supresora de la IGRh. Se estima que sólo

el 0,3% de los embarazos tienen una **hemorragia fetomaterna (HFM)** mayor de 30 ml de sangre. Las HFM mayores son una causa importante y prevenible de inmunoprofilaxis fallida.

Históricamente, la cuantificación de la HFM se ha logrado por la **prueba de elución ácida de Kleihauer-Betke**, que se basa en las diferencias entre la hemoglobina fetal y la adulta en la resistencia a la elución ácida.

Los resultados se informan como porcentajes de células fetales pero la precisión y exactitud del procedimiento pueden no ser buenas.

La citometría de flujo tiene una sensibilidad similar a la técnica de Kleihauer-Betke pero suministra un resultado más objetivo y reproducible desde el punto de vista cuantitativo (8).

Recientemente, se ha utilizado la técnica de **inmunoprecipitación en gel** (9) para la detección de glóbulos rojos Rh(D) positivos en la sangre materna.

En la primera fase de esta técnica se incubaba la muestra de sangre materna postparto con un suero anti-D optimizado para que los eritrocitos fetales Rh(D) positivos en la sangre materna captan el anti-D. Luego se centrifuga para separar el sobrenadante con el anti-D residual. En la segunda fase el sobrenadante con el anti-D residual es testeado mediante Test de Coombs Indirecto (TCI) con glóbulos rojos Rh(D) positivos. La cantidad de anti-D consumido en la primera fase (por unión a los eritrocitos fetales Rh(D) positivos), es luego semicuantificado a través del grado de positividad de la segunda fase. El procedimiento se basa en que si hay eritrocitos fetales Rh(D) positivos en la muestra materna se consume el anticuerpos anti-D. Cuando mayor es el consumo en la primera fase menor es la positividad de la segunda fase del test. Por el contrario, si no existen glóbulos rojos fetales mayor es la positividad en la segunda fase (TCI). La cantidad de eritrocitos fetales en circulación materna puede estimarse comparando los resultados de la prueba con el patrón de reacción obtenido frente a glóbulos rojos estandarizados (ver cuadro 3). Las ventajas y desventajas de las tres técnicas mencionadas se presentan en el cuadro 4 resultando que la técnica de inmunoprecipitación en gel es la de mejor estandarización para los servicios de Medicina Transfusional estableciendo un correcto costo-beneficio. Cualquiera sea la técnica que se emplee para la determinación de la HFM esta debe realizarse antes de las 12 horas posteriores al parto ya que luego los hematíes fetales hacen clearance fisiológico y no se detectan.

En las grandes HFM como las que ocurren en las placentas previas o en el desprendimiento de placenta normoincerta (DPNI) al realizar la determinación del grupo sanguíneo Rh (D) puede aparecer campo mixto o doble población (hematíes aglutinados y sin aglutinar) inclusive puede llevar a error y clasificar a una puerpera Rh negativa como positiva siendo por el contrario la puerpera que más dosis de inmunoglobulina requiere. Si la HFM excede los 30 ml de sangre fetal se deben hacer dosis propor-

cionales de IGRh. No se deben administrar en forma intramuscular más de cinco dosis de IGRh en una vez. Para cantidades mayores las dosis se pueden espaciar por períodos de 72 horas rotando los sitios de punción o realizarla intravenosa en forma lenta.

Algunos trabajos muestran que los embarazos múltiples tienen un riesgo mayor de HFM (57)(58) lo cual es importante en el momento actual dado el incremento que este tipo de gestaciones ha tenido debido a la aplicación de técnicas de reproducción asistida. Lo correcto sería administrar las dosis recomendadas para las gestaciones con un único feto midiendo el volumen de la HFM con el fin de ajustar o no la dosis de IGRhD suministrada. Como en nuestro país la medición de la HFM no se realiza de manera rutinaria durante la gestación y el postparto, sugerimos en los casos de gestaciones múltiples administrar una dosis postparto de 300 mcg (1500UI) intravenosa. De esta manera aumentamos la dosis, cubrimos una HFM de 37,5 ml de GRF pero sin incrementar el número de inyecciones.

Tabla 3 - SUSPENSIONES ESTANDARIZADAS DE GLÓBULOS ROJOS (GR) CONTROL

GR estandar	% de Gr control		Volumen (ml) fetal de	
	Rh +	Rh -	GR	sangre
Control HFM 0%	0%	100%	0	0
Control HFM 0,1%	0,1%	99,9%	1,8	3,6
Control HFM 0,2%	0,2%	99,8%	3,6	7,2
Control HFM 0,4%	0,4%	99,6%	7,2	14,4

Tabla 4 - CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LAS TÉCNICAS DE SCREENING DE LA HFM

	Gel	Kleihauer	Citometría
Especificidad (detectar GR Rh+)	si	no	si
Facilidad de estandarización	si	no	si
Interpretación objetiva	si	no	si
Costo efectivo como screening	si	si	no
Aplicable en servicios de Medicina Transfusional	si	no	no
Provisión de entrenamiento y soporte	si	no	no

En nuestro país estamos utilizando una **preparación intravenosa** de anti-D para su uso en la supresión de la inmunización anti-D. Una dosis de

120 microgramos (600 UI) de IGRh intravenosa es recomendada dentro de las 72 posteriores al parto dado que con la administración intravenosa se alcanza una concentración plasmática de IGRh 2.5 veces superior y más precozmente que la intramuscular (18). El máximo de concentración con la IGRh por vía intramuscular se logra recién a las 48 horas por lo cual el clearance de los glóbulos rojos D positivos fetales se realiza más rápidamente con la infusión intravenosa. La vida media de los anticuerpos anti-D son de aproximadamente 24 días cuando se administran por vía intravenosa y de aproximadamente 30 días después de la administración intramuscular. La administración intravenosa tiene como ventajas que se necesita menos dosis, es de acción más rápida, no depende de la superficie corporal y es menos costosa.

Administrar una dosis de 120 mcg I/V antenatal y otra igual post parto, tiene un costo promedio similar a la realización de una sola dosis I/M de 300 mcg.

La dosis intramuscular depende del peso corporal por lo cual en las mujeres obesas se recomienda administrar una dosis adicional (19).

La presentación **WinRho SDF** es para uso intramuscular e intravenoso indistintamente. Es preparada a partir de plasma humano por un proceso de cromatografía por lo cual se obtiene un producto de alta pureza comparado con los que utilizan el método de Cohn con etanol. Se agregan dos procesos de inactivación viral, el solvente-detergente (SD) para remover los virus con cubierta lipídica y la nanofiltración (F) para remover otros virus de cubierta no lipídica. Se obtiene de plasma humano proveniente exclusivamente de América del Norte con el fin de evitar la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD). No contiene preservativos y niveles mínimos de IgA. Puede ser usada también para el tratamiento del púrpura trombocitopénico autoinmune (PTA) en pacientes Rh (D) positivos y no esplenectomizados o para inmunoprofilaxis en receptores Rh (D) negativos que reciben glóbulos Rh (D) positivos. Tiene tres presentaciones 600, 1500 o 5000 UI o 120, 300 o 1000 microgramos respectivamente. Debemos tener cuidado cuando preparamos el producto liofilizado con el diluyente previamente a la infusión. El frasco diluyente trae un volumen de 8,5 ml que es para la presentación de 1000 mcg (5000UI) pero cuando se usa una dosis de 120 mcg o 300 mcg intravenosa se debe diluir con sólo 2,5 ml mientras que por vía intramuscular con la mitad del volumen (1,25 ml).

No existe **criterio universal para la inmunoprofilaxis anti-D.**

La dosis de inmunoglobulina anti-D a administrar así como los tests para determinar el volumen de la HFM varían de un país a otro. Por ejemplo, la dosis standard de inmunoglobulina anti-D (IgD) **postparto** es de 300 microgramos en Estados Unidos de Norteamérica, 120 microgramos en Canadá y de 200 a 300 microgramos en la mayoría de los países europeos a excepción de Inglaterra, Francia e Irlanda donde la dosis es de 100 mi-

crogramos (500 UI).

Algunos estudios muestran que el 99% de las mujeres tienen HFM menores a 4 ml durante el parto (10)(11) y que 100 microgramos son capaces de prevenir una inmunización de 5 ml de glóbulos Rh (D) positivos. En esto se basa Inglaterra para administrar 100 microgramos postparto pero, se debe realizar rutinariamente un test, con una muestra de sangre materna obtenida dentro de las dos horas postparto, para determinar la HFM mayores de 5 ml que requieren una dosis adicional de IgD. Por el contrario, la mayoría de los países europeos utilizan una dosis postparto de 200 a 300 microgramos (1000 a 1500 UI) sin utilizar un test para medir la HFM (12). Pero, con este protocolo no se cubriría el 0,3% de las mujeres que tienen HFM superiores a los 15 ml de glóbulos Rh (D) positivos.

La **profilaxis antenatal** con una dosis de IgD entre las 28 y 32 semanas de gestación de 300 microgramos se utiliza rutinariamente en Estados Unidos y Canadá desde hace ya varios años con buenos resultados. The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (13) recomienda una dosis de por lo menos 500 UI (100 microgramos) a las 28 semanas de gestación y otra similar a las 34 semanas. Recientemente, en un trabajo científico realizado en Holanda, donde se realiza un protocolo de seguimiento inmunohematológico similar al de nuestro país desde 1998, se determinó que una sola dosis de 200 mcg intramuscular de IGRh a las 30 semanas de gestación previene la inmunización anti-D (36). Es de destacar, que en este país europeo, la inmunoprofilaxis antenatal se realiza solamente en aquellas gestantes que no han tenido hijos debido a la escasez del hemoderivado. En nuestro país, según el consenso 2005 se recomienda una dosis de 300 mcg intramuscular o 120 mcg intravenosa postparto y antenatal entre la semana 28 y 32 de la gestación (20).

Tabla 5 - ESQUEMA DE INMUNOPROFILAXIS ANTI-D

Indicación	Dosis y vía de administración
Terminación de la gestación antes de las 12 semanas, aborto, embarazo ectópico u otras complicaciones obstétricas.	120 mcg por vía IM
Después de las 12 semanas, amniocentesis, muestra de vello-sidad coriónica, complicaciones obstétricas (placenta previa o desprendimiento placentario, etc)	120 mcg por vía IV o 300 mcg por vía IM
Profilaxis antenatal entre las 28 y 32 semanas de gestación	
Postparto	

Para establecer un correcto **programa de inmunoprofilaxis** debemos conocer, en primer lugar, cual es la prevalencia de gestantes Rh D negativas. En un estudio que realizamos en Uruguay encontramos una prevalencia del 12% (27). Pero, esto varía de un país a otro y de una región a otra del mundo. Por ejemplo el antígeno D del sistema Rh tiene una prevalencia muy baja entre los indios americanos (1%), Asia (1%) y Africa (4%). Así, en países de Asia como China (0,25%), Corea del Sur (0,35%) y Hong Kong-China (1,2%) la inmunoprofilaxis anti-D no constituye un verdadero problema de salud pública.

Sin embargo, la mayoría de los países europeos tienen una prevalencia de individuos Rh D negativos mayor del 15% (Austria 19%, Inglaterra 17%, España 17%, Irlanda 16%, Dinamarca 16%, Holanda 16,3%, Suecia 18%) (28).

En segundo lugar, se deben establecer pautas o guías nacionales para el seguimiento inmunohematológico de la gestación y la inmunoprofilaxis anti-D. En un relevamiento que se realizó en 10 países desarrollados sólo el 50% tenían normas o guías nacionales (Inglaterra, Polonia, Holanda, Finlandia y USA), tres de 10 realizaban profilaxis antenatal, cuatro de 10 cuantificaban la HFM de rutina, 9 de 10 estudiaban la variante D^U y tan sólo 2 la variante D^{VI} (29).

En otro reciente estudio en 8 países de la comunidad europea (CE) cuatro presentaban guías, cuatro no realizaban profilaxis antenatal, en cinco no hay datos de la prevalencia de la inmunización anti-D y la dosis de inmunoprofilaxis varía de 100 a 300 mcg (30).

En España, país que no fue incluido en el estudio anterior, el 92% de los hospitales realiza el grupo sanguíneo y la búsqueda de anticuerpos inmunes entre la semana 10 y 16 de la gestación. El estudio de anticuerpos se repite entre la semana 28 y 36 en el 86% de los hospitales de los cuales 16 de 57 (86%) realizan sólo la determinación en mujeres Rh negativas. La profilaxis antenatal se realiza en forma sistemática entre las 28 y 32 semanas de gestación (300 mcg i/m) en el 76% de los hospitales. Para la profilaxis postparto utilizan la misma dosis (30). Carecen de la presentación de 120 mcg de uso intravenoso o intramuscular.

Un **consenso internacional** debería ser alcanzado para establecer un correcto programa de prevención de la aloinmunización materna al antígeno D del sistema Rh.

En nuestro país carecemos de datos sobre la incidencia de la EHP por anti-D dentro de las patologías perinatales y cual es la tasa de mortalidad. Menos aun es posible establecer las causas de falla de la inmunoprofilaxis.

Existe, a pesar de la administración de la IgG anti-D una **“aloinmunización residual”** al antígeno D en embarazadas. En un estudio que realizamos el 80% de los anticuerpos encontrados en las gestantes Rh negativas era un anti-D lo cual corresponde a una prevalencia del 3% (55 casos en 1783 gestantes Rh negativas) (31). Esta inmunización residual se debería

a que no se administra la IgG anti-D porque no se indica, porque no se administra a pesar de estar indicada, se administra tardíamente o con dosis insuficientes y no se realiza antenatal.

Es posible disminuir la tasa de inmunización residual mediante una estricta adherencia a las recomendaciones o guías nacionales, en cada acto inmunizante y entre las 28 y 32 semanas de gestación para prevenir la **“inmunización silenciosa”** no ligada a ningún acto inmunizante que ocurre más frecuentemente en el tercer trimestre de la gestación (32).

En una revisión reciente, la mayoría de los **estudios costo-eficacia** realizados concluyen que un programa de prevención sistemática de la aloinmunización anti-D es muy rentable (33).

En dos estudios que analizan los costos brutos, los ligados al tratamiento de la aloinmunización anti-D, los costos por patologías evitables y los costos años de vida ajustados por calidad de vida se concluye que la prevención antenatal es sumamente benéfica en términos de costo-beneficio (34) (35).

Actualmente, en Gran Bretaña se realiza la prevención sistemática a todas las gestantes Rh negativas independientemente de los costos (33).

La determinación del fenotipo fetal RhD desde muestras de líquido amniótico, vellosidad coriónica y recientemente de plasma materno, es utilizada para establecer, en gestantes inmunizadas al antígeno D, la posibilidad o no de afectación fetal con el fin de evitar técnicas invasivas de diagnóstico y tratamiento (37). Pero, también puede utilizarse en gestantes Rh negativas no inmunizadas al antígeno D para evitar la inmunoprofilaxis antenatal cuando existen fetos Rh D negativos. En un trabajo reciente (38), se determinó el valor predictivo de la determinación del fenotipo RhD desde el ADN fetal obtenido del plasma materno validado con los resultados del fenotipo serológico obtenido al nacer.

Con muestras obtenidas en promedio a las 28 semanas de gestación y utilizando una PCR en tiempo real se encontró que 1118 (59,8%) eran RhD positivas, 670 (35,9%) RhD negativas, 14 (0,8%) falsos positivos, 3 (0,16%) falsos negativos e inconclusos 56(3%) de los cuales 31 eran RhD positivos y 25 RhD negativos. Es decir, en aproximadamente un tercio de las gestantes RhD negativas no inmunizadas no necesitarían inmunoprofilaxis antenatal. Sin embargo, en los casos de falsos resultados positivos recibirán inmunoglobulina anti-D innecesariamente y en los resultados falsos negativos existiría la posibilidad de inmunización y morbimortalidad por EHP en gestaciones subsiguientes.

Los casos con resultados inconclusos probablemente se deban a la existencia de variantes del antígeno D. Estudios futuros deben realizarse para establecer el verdadero costo beneficio entre la realización del fenotipo RhD fetal y la realización de inmunoprofilaxis antenatal. Además, sería importante realizar la determinación del fenotipo fetal del plasma materno, como método no invasivo, en etapas más precoces de la gestación con el fin de evitar dosis antenatales de inmunoglobulina anti-D anteriores a la semana 28 de gestación.

2) PREVENCIÓN DE LA INMUNIZACIÓN ANTI-D POR TRANSFUSIÓN DE ERITROCITOS RHD POSITIVOS

La prevalencia del anticuerpo anti-D producido por transfusión de eritrocitos RhD positivos a individuos RhD negativos, es desconocida (39). La mayoría de los casos ocurren en hombres o mujeres de edad avanzada en los cuales los riesgos de la aloinmunización anti-D son menores. Sin embargo, la mayoría de los casos bien documentados de la efectividad de la IgG anti-D en prevenir la aloinmunización por transfusión ocurre en mujeres jóvenes con necesidad urgente de transfusión y falta de disponibilidad de eritrocitos RhD negativos.

En un estudio retrospectivo sobre 78 pacientes que recibieron transfusiones incompatibles RhD a los cuales no se les administró inmunoprofilaxis, se reporta un 30% de aloinmunización anti-D (40). En otro estudio, también retrospectivo pero más reciente, de los 98 pacientes no oncológicos, el anticuerpo anti-D se desarrolló en el 22% y de manera interesante los que recibieron eritrocitos leucoreducidos desarrollaron menos anticuerpos anti-D (13%) (41).

Algunos grupos de pacientes con disminución de la función inmune tienen un riesgo menor de inmunizarse. Por ejemplo, aquellos pacientes que reciben drogas inmunosupresoras para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, hematológicas, oncológicas o trasplante de hígado o corazón (42). También aquellos que tienen una inmunodeficiencia como por ejemplo los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH (43).

En la mayoría de los países, como en USA por ejemplo, no hay guías de cómo realizar la inmunoprofilaxis con IgRhD para evitar la aloinmunización anti-D por la administración de hemocomponentes RhD positivos (39). Varios factores importantes asociados a la administración de IgRhD como la dosis, la vía intramuscular o intravenosa, el tiempo óptimo de la infusión así como las reacciones adversas que pueden ocurrir, faltan aún por ser estandarizados.

En 1971, Pollack y colaboradores (44) sugieren que una relación mínima de 10 mcg de IgGRhD por cada ml de eritrocitos RhD positivos (10/1) es suficiente para prevenir la inmunización anti-D. Sin embargo, estudios clínicos posteriores han utilizado relaciones mayores 12, 18 y 24 mcg/ml por vía intramuscular para prevenir la aloinmunización anti-D por transfusión en pacientes mujeres jóvenes (45)(46)(47).

La dosis recomendada para la administración intramuscular sería de 20mcg por cada ml de eritrocitos RhD positivos según las guías establecidas por el British Committee for Standards in Haematology del 2006 (48). Hasta 1500 mcg pueden administrarse en cada sitio de inyección. Dos sitios de inyección glútea pueden ser administrados simultáneamente.

Últimamente se utiliza la IgGRhD por vía intravenosa para prevenir la aloinmunización anti-D por transfusión. Los productos de uso intravenoso

tienen ciertas ventajas frente a los de uso intramuscular como ser mayor pureza, dos métodos de inactivación viral, mejor confort para el paciente, menor dosis y clearance más rápido de los eritrocitos sensibilizados.

La dosis recomendada por vía intravenosa sería de 12 mcg/ml de eritrocitos (48). Se sugiere no administrar más de 2500 mcg por vez. Se puede dividir la dosis a la mitad y pasarla diluida en una hora y si no hay reacciones adversas administrar la segunda parte de la dosis (39). Una paciente de 26 años que recibió IgGRhD intravenosa para prevenir la inmunización anti-D por la administración de cuatro unidades de eritrocitos RhD positivos desarrolló fiebre y taquicardia lo cual fue resuelto con la administración de 200 mg de hidrocortisona (49). En subsecuentes administraciones de IgGRhD se realizó una premedicación con 100 mg de hidrocortisona y los síntomas no aparecieron.

En este estudio, a las 36 horas de la administración de IgGRhD intravenosa no había células RhD positivas detectables en la sangre de la paciente (TCD negativo). Luego de cinco meses se detectaban anticuerpos anti-D (TCI positivo) pero con una concentración baja de 0,16 UI por ml. A los 11 meses no había anticuerpos anti-D detectables en la sangre de la paciente. Seguramente, los anticuerpos anti-D detectados a los cinco meses después de la infusión de IgGRhD eran anticuerpos pasivos por la dosis de inmunoglobulina recibida. En otro estudio, el TCD fue negativo después de cuatro a seis días de la infusión de IgGRhD y el TCI se negativizó recién después de los seis meses (50). Si bien la vida media de las Ig tipo G es de 21 días su desaparición en sangre es mucho más tardía no sólo para la IgGRhD sino también para otros anticuerpos como los anti-core y anti-s de la hepatitis B como se demuestra en la historia clínica del capítulo de seguridad sanguínea de las transfusiones neonatales.

Tomando como referencia el púrpura trombocitopénico autoinmune (PTA) donde también se utiliza la IgGRhD a dosis masivas (50 a 75 mcg/Kg peso) si se realiza premedicación no se presentan reacciones adversas severas (51). Sin embargo, en trabajos recientes se ha reportado casos de hemólisis intravascular, CID e insuficiencia renal en pacientes con PTA que recibieron IgGRhD (52) (53). La IgGRhD se utiliza sólo en los pacientes con PTA que son RhD positivos y no esplenetomizados para que los anticuerpos anti-D de la IgG se unan a los antígenos D de los eritrocitos del paciente. De esta manera, los glóbulos rojos sensibilizados son captados por los macrófagos del SER principalmente del bazo que carecen de receptores para los antígenos de grupos sanguíneos de la membrana del eritrocitos pero si para la fracción Fc de la Ig o para la fracción C3d del complemento. De esta manera se satura el mecanismo macrófagico permitiendo que las plaquetas del paciente que tienen el autoanticuerpo unido a su membrana tengan una sobrevivencia mayor.

Aquí la pregunta que surge inmediatamente porqué los macrófagos del bazo tienen mayor afinidad por los eritrocitos sensibilizados que a las pla-

quetas sensibilizadas. Será porque uno es un aloanticuerpo y el otro un auto. Sin embargo, la fracción Fc de ambos es similar.

Será porque le macrófago es un buen gourmet y prefiere la carne roja (eritrocitos) frente a la blanca (plaquetas). Pensamos, aunque no está descrito en la bibliografía, que es un problema de cantidad de la oferta ya que existen 10 a 20 veces más eritrocitos circulando que plaquetas por lo cual el macrófago, como buen glotón, se engulle con lo que hay más.

Por tanto, la rara complicación de hemólisis intravascular, CID e insuficiencia renal en los pacientes con PTA no se puede explicar por el mecanismo de acción de la IgG dado que producen, como ya vimos, una hemólisis extravascular. Los anticuerpos que producen hemólisis intravascular son los de la clase IgM por tanto, debe existir en las preparaciones de IgGRhD otros anticuerpos anticuerpos antieritrocitarios contaminantes capaces de producir esta rara pero grave reacción cuando se administra IgRhD a altas dosis (39). Recientemente, en el XVII Congreso Regional de la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT) realizado en Madrid en junio del 2007 se presentó un trabajo de dos años de seguimiento en pacientes en el Hospital de Ottawa, Canadá. Trece casos de reacción hemolítica por la administración de IgG intravenosa fueron reportados con una prevalencia de 1,6% (13 sobre 800) (54). La mayoría de los pacientes fueron mujeres (10) que no pertenecían al grupo 0. En la mayoría se detectó anticuerpos anti-A o anti-B en plasma o el eluido de los eritrocitos. En suma, se llega a la conclusión que que la hemólisis intravascular en estos pacientes se produce por la transferencia pasiva de aglutininas ABO del tipo IgM presentes en las preparaciones de inmunoglobulinas de uso intravenosos como contaminantes y sobre todo en mujeres que no son del grupo 0 re reciben dosis altas.

Con el fin de disminuir la dosis de IgGRhD a administrar a aquellas mujeres RhD negativas en edad reproductiva activa que recibieron eritrocitos RhD positivos, se sugiere asociar la realización de una eritraféresis con glóbulos rojos RhD para disminuir la cantidad de eritrocitos RhD y luego realizar IgGRhD intravenosa para cubrir la probable inmunización de los eritrocitos remanentes. Nester y colaboradores (15), reportan el éxito de dos casos de sexo femenino de 10 y 16 años, tratadas en primer lugar con eritraféresis de dos volemias eritrocitarias, a través de un separador Cobe-Spectra como los que existen en nuestro país y luego con IgGRhD intravenosa a una dosis total de 2700 mcg dividida en tres dosis de 600 mcg cada 8 horas en el primer caso y de 900 mcg en el segundo caso (600 mcg iniciales y 300 mcg a las 8 horas). Posteriormente, Laspina y colaboradores (49), reportan un caso de una mujer de 26 años, RhD negativa que recibió cuatro unidades de eritrocitos RhD positivos por falta de disponibilidad de sangre RhD negativa. Aquí, una eritraféresis de una volemia eritrocitaria fue realizada e inmediatamente después se infundieron por vía intravenosa un total de 24.000 UI de IgGRhD repartida en dosis de 600 mcg (3000 UI) cada 5 horas.

Si bien las plaquetas no contiene en su membrana los antígenos del sistema Rh la aloinmunización anti-D puede ocurrir en aquellos pacientes, principalmente no inmunosuprimidos, que reciben concentrados plaquetarios pero que contienen eritrocitos RhD positivos como contaminantes (55) Los concentrados plaquetarios (CP) derivados por centrifugación de la sangre total suelen tener de promedio entre 0,3 a 0,5 ml de eritrocitos mientras que en los obtenidos por aféresis (CPA) sólo trazas (39).

Recientemente, Hasped y colaboradores (56) documentan un caso de un niño RhD negativo de 17 semanas de vida que se aloinmunizó desarrollando un anticuerpo anti-D después de la infusión de dos CP con menos de 0,6 ml de eritrocitos RhD positivos contaminantes. Es ampliamente aceptado que la inmadurez del sistema inmune en neotatos raramente produce aloanticuerpos sin embargo este caso sugiere que la formación de anti-D debe ser tenida en cuenta.

Una dosis de 20 mcg de IgGRhD intravenosa por cada ml de eritrocitos es recomendada para prevenir la aloinmunización anti-D de los CP. En los pacientes trombocitopénicos está contraindicada la vía intramuscular. En los pacientes jóvenes trombocitopénicos no inmunosuprimidos o inmunodeficientes RhD negativos que requieran reposición de plaquetas es recomendable el uso de concentrados obtenidos por aféresis (CPA).

En suma, la inmunoprofilaxis con IgGRhD para prevenir la aloinmunización anti-D por transfusión de hemocomponentes RhD positivos, también es altamente efectiva.

3) MECANISMO DE ACCIÓN DE LA IgGRhD

La IgGRhD polivalente unida a GR RhD positivos (GR opsonizados) e inyectados a individuos RhD negativos, inhibe la respuesta inmune que se produce con GR RhD positivos no opsonizados. Este efecto ha sido observado en una variedad de modelos animales inmunizados con una cantidad de diferentes antígenos y se ha denominado supresión de la respuesta inmune mediada por anticuerpos (Antibody Mediated Immune Supresión, AMIS) (59) (60).

Las células T son activadas por las células presentadoras de antígeno (APC) que incluyen macrófagos, células dendríticas y células B. A pesar de que las células dendríticas maduras parecen ser el mayor mecanismo de activación de las células T la presentación del antígeno por células B parece ser suficiente para activar las células T (61). Pero, el rol de estas células B en la respuesta específica de las células T frente al antígeno D no es conocido aún.

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar el mecanismo de AMIS (59)(60)(62):

- 1- la rápida desaparición (clearance) de los GR opsonizados
- 2- la inhibición de células T y B
- 3- el bloqueo de determinados epitopes del antígeno D.

La primera teoría asume que la rápida remoción de los GRRhD positivos con IgGRhD, mediante los receptores Fc de los macrófagos, es suficiente para prevenir la respuesta inmune como ya vimos anteriormente (14). Sin embargo, algunos anticuerpos anti-D monoclonales o recombinantes, en un efecto no esperado, aumentan la respuesta inmune anti-D en lugar de suprimirla (63).

La segunda hipótesis establece que el complejo GR-IgG puede producir una señal negativa a través del receptor Fc-gamaRIIB sobre las células B. Sin embargo, utilizando ratas deficientes genéticamente de este receptor se demostró que no es necesario para producir el efecto AMIS (64).

La tercera hipótesis sugiere que la IgG reconoce determinados epitopes del antígeno D de los GR. Se ha observado que no es necesario bloquear todos los epitopes del antígeno para prevenir la respuesta inmune (65).

En las dos primeras teorías el efecto AMIS dependería de la fracción Fc de la IgG mientras que en la tercera sólo se requiere la fracción Fab. Sin embargo, se ha descrito un efecto AMIS Fc dependiente como independiente por lo cual, este aspecto aún no ha sido resuelto (60) (66).

Recientemente, se han utilizado modelos animales para testear la interacción entre las células B y los GR opsonizados con IgGRhD (67). El grupo canadiense liderado por los Dres Davor Bric y Alan Lazarus, del Canadian Blood Service y del Transfusión Medicine Research del St Michel Hospital de Toronto, han publicado tres sucesivos trabajos para establecer los posibles mecanismos de la inhibición de la respuesta inmune por los GR opsonizados con IgG. En el primero de ellos, publicado en el año 2007, demuestran que la inmunosupresión mediada por IgG no depende del clearance de los eritrocitos opsonizados o de la evasión inmunológica (68). Utilizando un modelo animal de AMIS, en una primera instancia, exponen células fagocíticas con GR de oveja in vitro y luego transfieren estas células (macrófagos) a la rata receptora. Los GR de oveja opsonizados con IgG inyectados al modelo animal inesperadamente aumentan, en lugar de disminuir, la respuesta inmune.

Este hallazgo estaría demostrando que la remoción de los GR opsonizados por los macrófagos no previene el reconocimiento del sistema inmunológico y sugiere que el clearance del antígeno puede no ser el principal mecanismo de la inhibición de la respuesta inmune.

En el segundo trabajo (69), utilizando también un modelo murino, demuestran que la atenuación de la respuesta inmune mediante la infusión de GR opsonizados con IgG no está asociada con una inmunosupresión activa o una depleción clonal tanto de células T como B.

En una tercera publicación del año 2008 (70), establecen que la transfusión de GR foráneos opsonizados con IgG producen una reducción en la habilidad de las células B en presentar el antígeno a las células T. Normalmente la activación de las células B ocurre directamente por el contacto con el antígeno que es internalizado y procesado. Estas células B activadas con el

antígeno procesado se relocalizan, actúan como células APC y estimulan las células T. La interacción entre las células B y T activadas dan lugar a la posterior expansión clonal y diferenciación de las células B en células productoras de anticuerpos y células memoria.

Por último, según estos autores (67), parecería ser que la IgG administrada pasivamente inhibe un estadio tardío de la activación de las células B. Surge la hipótesis que cuando la célula B internaliza la IgG junto con el antígeno se produciría una inhibición de la respuesta inmune si se compara con la internalización y procesamiento del antígeno solo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine, 9th Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993.
- 2- van Aken WG. Preparation of plasma derivatives. En Rossi EC, Simon TL, Moss GS, Gould SA, eds. Principles of transfusion medicine, 2nd Ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1995:403-13.
- 3- Manual Técnico. American Association of Blood Banks (AABB), 12 edition. Bethesda, Maryland 1996.
- 4- Bowman JM. The prevention of Rh immunization. Transfus. Med. Rev. 1988;2:129.
- 5- Heddle NM, Klama L, Frassetto R. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. Transfusion 1993;33:17-20.
- 6- Cuadro JC, Scasso JC, Decaro J, Gutierrez C, Alonso JG, Varela S, Miller A. Normas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica perinatal por conflicto Rh D. Servicio Nacional de Sangre-MSP, 1982.
- 7- Samson D, Mollison PL. Effect on primary Rh immunization of delayed administration of anti-Rh. Immunology 1975;28:349.
- 8- Lloyd-Evans P, Kumpel BM, Bromelow Y, Austin E and Taylor E. Use of a directly conjugated monoclonal anti-D (BRAD-3) for quantification of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. Transfusion 1996 ;36:432-437.
- 9- Salama A, David M, Wittmann G, Stelzer A, Dudenhausen JW. Use the gel agglutination technique for the determination of fetomaternal hemorrhage. Transfusion 1998;38:177-1880.
- 10- Woodrow JC, Donohue WTA. Rh-immunisation by pregnancy: results of a survey and their relevance to prophylactic therapy. BMJ 1968;IV:139.
- 11- Poulain M, Huchet J. Appreciation de l'hemorragie foeta-maternelle apres l'accouchement en vue de la prevention of isoimmunization anti-D. Revue Francaise de Transfusion 1971;14:219-224.
- 12- Committee for Proprietary Medical Products, Commission of European Communities. Note for Guidance: core summary of product characteristics for human anti-D immunoglobulin in. Brussels;CEC,1994(III/3446392EN).
- 13- Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Clinical Green Top Guidelines. Use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis (22) 06/08/2002.
- 14- Kumpel BM. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. Transfusion 2006;46:1652-1656.
- 15- Nester TA, Rumsey DM, Howell DM et al. Prevention of immunization to D positive red blood cells with red blood cell exchange and intravenous Rh immunoglobulin. Transfusion 2004;44:1720-1723.
- 16- Crowther C, Middleton P. Anti-D administration after childbirth for preventing Rhesus alloimmunisation. The Cochrane Library Issue 3,2003 www.thecochranelibrary.com
- 17- Crowther C. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. The Cochrane Library Issue 3,2003 www.thecochranelibrary.com
- 18- Bichler J, Schondorfer G, Pabst G, Andresen I. Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant

- Rh-negative women. *BJOG* 2003;110:39-45.
- 19- Woelfer B, Schuchte K, Janisiw M et al. Postdelivery levels of anti-D IgG prophylaxis in D-mothers depend on maternal body weight. *Transfusion* 2004;44:512-517.
- 20- Recomendaciones para la Prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica feto neonatal en la gestación y para la inmunoprofilaxis anti-D. *Archivos de Ginecología y Obstetricia* 2005;43:169-176.
- 21- Pereira A, Silveira S, Hernandez C, Varela A, Gaggero M, Olivera P, Dilorenzi N, Gualarte M, Larrosa V, Miller A y Decaro J. Erythrocyte antibodies in Pregnant Women. XXXI World Congress of de International Society of Hematology (ISH) 20-24 marzo,2007. Punta del Este-Uruguay.
- 22- Erler BS, Smith L, McQuiston D, Pepkowitz SH, Goldfinger D. Red cell autoantibody production in utero: a case report. *Transfusion* 1994;34:72-74.
- 23- Williamson TD, Liles LH, Blackall DP. A maternal warm-reactive autoantibody presenting as a positive direct antiglobulin test in a neonate. *Immunohematology* 1997;13:68.
- 24- Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA. Frecuencias of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinical relevant high-frecuency antigens in south-western Germany. *Infusionsther Transfusionsmed* 1995;22:285-290.
- 25- Lubenko A, Contreras M, Habash J. Should anti-Rh immunoglobulin be given to D variant women?. *BJH* 1989;22:285-290.
- 26- Cannon M, Pierce R, Taber EB, Schucker J. Fatal hidrops fetalis caused by anti-D in a mother with parcial D. *Obstet Gynecol* 2003;102:1143-1145.
- 27-Decaro J, Caldeyro Barcia R. Incidencia de individuos Rh(D) negativos en algunas poblaciones del Uruguay. Presentado en la IX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana. Campinas-Brasil, noviembre de 1984.
- 28- Blood Types. www.wikipedia.org/wiki/bloodtype
- 29- Internacional Forum. *Vox Sanguinis* 2003;85:328-337.
- 30- Rodríguez-Villanueva J. Prevención de la aloimmunización materna con gammaglobulina anti-D. *Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS)* 2007;19(2):4-9.
- 31- Pereira A, Silveira S, Hernandez C, Varela A, Gaggero M, Olivera P, Dilorenzi N, Gualarte M, Larrosa V, Miller A y Decaro J. Erythrocyte antibodies in Pregnant Women. XXXI World Congress of de International Society of Hematology (ISH) 20-24 marzo,2007. Punta del Este-Uruguay.
- 32- Executive summary: Routine antenatal anti-D prophylaxis. *Health Technology Assessment* 2003;7: (Executive summary).
- 33- Ravinet J, Carbone B. Analyse économique de la prévention de la immunisation anti-D. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006 ;35 (suppl 1) :1S104-1S111.
- 34- TorranceGW, Zipursky A. Cost-effectiveness of antepartum prevention of Rh immunization. *Clin Perinatol* 1984;11:267-281.
- 35- Chilcott J, Tappenden P, Lloyd Jones M et al. The economics of routine antenatal anti-D prophylaxis for pregnant women who are Rhesus negative. *BJOG* 2004;111:903-907.
- 36- Koelewijn J, Haas M, Vrijkotte T, Bonsel G, van der Schoot C. One single dose of 200mcg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. *Transfusion* 2008;48:1721-1729.
- 37- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma:introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079-1085.
- 38- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;336:816-818.
- 39- Ayache S, Herman JH. Prevention of D sensitization alter mismatched transfusión of blood components: toward optimal use of RhIG. *Transfusion* 2008;48:1990-1999.
- 40- Frohn C, Dumbgen I, Brand JM, Gorg S, Luhm J, Kichner H. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion* 2003;43:893-898.
- 41- Yazer MH, Triulzi DJ. Detection of anti-D in D-recipients transfused with D+ red blood cells. *Transfusion* 2007;47:2197-2201.
- 42- Ramsey G,Hahn LF, Cornell FW, Boczkowski DJ, Staschak S, Clark R, Hardesty RL, Griffith BP, Starzl TE. Low rate of Rhesus immunization from Rh-incompatible blood transfusions during liver and heart transplant surgery. *Transplantation* 1989;47:993-995.
- 43- Boctor FN, Ali NM, Mohandas K, Uehlinger J. Absence of D-alloimmunization in AIDS patients receiving D-mismatched RBCs. *Transfusion* 2003;43:173-176.
- 44- Pollack W, Ascari WQ, Kochesky RJ, O'CONNOR RR, Ho TY, Tripodi D. Studies on Rh prophylaxis. Relationship between doses of anti-Rh and size of antigenic stimulus. *Transfusion* 1971;11:333-339.
- 45- Keith L. Anti-Rh therapy after transfusion. *J Reprod Med* 1972;8:293-298.
- 46- Keith L, Hauser GH. Anti-Rh immune globulin after a massive transfusion accident. *Transfusion* 1971;11:176.
- 47- McElrath TG, Ascari WQ. Prevention of Rh immunization after transfusion with Rh positive blood. *Am J Obstet Gynecol* 1971;110:309-311.
- 48- Parker J, Wray J, Gooch A, Robson S, Qureshi H for the British Committee for Standars in Haematology. Guidelines for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis 2006, London . www.bcsghguidelines.org
- 49- Laspina S, O' Riordan JM, Lawlor E, Murphy WG. Prevention of post-transfusion RhD immunization using red cell Exchange and intravenous anti-D immunoglobulin. *Vox Sanguinis* 2005;89:49-51.
- 50- Wegmann A, Hubner H, Erb H. Intravenous administration of anti-D hyperimmunoglobulin after mismatched transfusion . *Dtsch Med Wochenschr* 1976;101:1354-1356.
- 51- Newman GC, Novoa MV, Fodero EM, Lesser ML, Woloski BM, Bussel JB. A dose of 75 mcg/Kg/d of IV anti-D increases the platelet count more rapidly and for a longer period of time than 50 mcg/Kg/d in adults with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001;112:1076-1078.
- 52- Gaines AR. Disseminated intravascular coagulation associated with acutebhemoglobinemia or hemoglobinuria following RhD immune globulin intravenous administration for immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2005;106:1532-1537.
- 53- Gaines AR. Acute onset hemoglobinemia and/or hemoglobinuria and sequelae following administration in immune thrombocytopenic purpura patients. *Blood* 2005;95:2523-2529.
- 54- Daw Z, Padmore R, Tokessy M, Cober N, Neurath D, Desjardins D, Olberg B, Timmouth A, Giulivi A. Hemolytic transfusion reactions following administration of intravenous gammaglobulin. Abstract 4C-S19-3 XVII Regional Congress of the ISBT, June 23-27,2007. Madrid, Spain.
- 55- Atoyebi W, Mundy N, Croxton T, Littlewood TJ, Murphy MF. Is it necessary to administer anti-D to prevent RhD immunization after the transfusion of RhD-positive-platelets concentrates?. *Br J Haematol* 2000;111:980-983.
- 56- Haspel RL, Walsh L, Sloan SR. Platelet transfusion in an infant leading to formation of anti-D: implications for immunoprohylaxis. *Transfusion* 2004;44:747-749.
- 57- David M, Smidt J, Chen FCK, Stein U, Dudenhausen JW. Risks factors for fetal-to-maternal transfusion in Rh D-negative women-results of a prospective study on 942 pregnant women. *J Perinat Med* 2004;32:254-257
- 58 - Adeniji AO, Mabayoje VO, Raji AA et al. Feto-maternal haemorrhage in parturients: Incidence and its determinants. *J Obstet Gynecol* 2008;28:60-63.
- 59- Uhr JW, Moller G. Regulatory effect of antibody on the immune response. *Adv Immunol* 1968;8:81-127.
- 60- Heyman B. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:709-737.
- 61- Rodriguez-Pinto D, Moreno J. B cells can prime naive CD4+ T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. *Eur J Immunol* 2005;35:1097-1105.
- 62- Kumpel BM, Elson CJ. Mechanism of anti-D mediated immune suppression-a paradox

awaiting resolution?. *Trends Immunol* 2001;22:26-31.

63- Kumpel BM. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sang* 2007;93:99-111.

64- Karlsson MC, Wernersson S, Diaz de Stahl T et al. Efficient IgG-mediated suppression of primary antibody responses in Fcγ receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2244-2249.

65- Houghton G, Nash Dr. Specific immunosuppression by minute doses of passive antibody. *Transplant Proc* 1969;1:616-618.

66- Sinclair NR. Fc-signaling in the modulation of immune responses by passive antibody. *Scand J Immunol* 2001;53:322-330.

67- Brinc D, Lazarus AH. Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Hematology* 2009. www.asheductionbook.hematologylibrary.com. Consulta 14/12/2009.

68- Brinc D, Le-Tien H, Crow AR, Freedman J, Lazarus AH. IgG-mediated immunosuppression is not dependent on erythrocyte clearance or immunological evasion: implications for the mechanism of action of anti-D in the prevention of haemolytic disease of the newborn?. *BJH* 2007;139:275-279.

69- Brinc D, Le-tien H, Crow AR, Siragam V, Freedman J, Lazarus AH. Transfusion of IgG-opsonized red blood cells mediates reduction of antigen-specific B cell priming in a murine model. *The Journal of Immunology* 2008;181:948-953.

70- Brinc D, Le-Tien H, Crow AR, Siragam V, Freedman J, Lazarus AH. Immunoglobulin G-mediated regulation of the murine immune response to transfused red blood cells occurs in the absence of active immune suppression: implications for the mechanism of action of anti-D in the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn?. *Immunology* 2008;124:141-146.

HISTORIA CLÍNICA

Recién nacido de sexo femenino, de término con 3200 g y Apgar 9-10. Grupo sanguíneo 0 Rh D positivo con TCD positivo (+) por técnica en gel de sangre de cordón umbilical.

Madre que cursó su primera gestación con un parto vaginal normal el día 27/03/2008. Grupo sanguíneo 0 Rh D negativo con TCI negativo por técnica en gel con tres paneles de investigación en el primer trimestre y repetido a las 26 semanas de gestación. Embarazo bien tolerado y controlado sin antecedentes personales ni familiares a destacar.

Se consulta a Medicina Transfusional para saber si se realiza o no la inmunoglobulina anti-D postnatal.

DISCUSIÓN

Se trata de un RN normal producto de la primera gestación que presenta un TCD positivo con intensidad de una cruz. En primer lugar debemos evaluar clínicamente al RN. No presenta signos de anemia, ictericia, visceromegalias y el cordón no está amarillento. Luego investigamos clínicamente a la madre quien no presenta ningún síndrome clínico, no ha ingerido medi-

camentos y no recibió inmunoglobulina anti-D antenatal. Extraemos una muestra de sangre materna para repetir los estudios inmunohematológicos. Grupo sanguíneo 0 Rh D negativa con TCI y TCD negativos por técnica en gel.

Cuales son las probables causas de un TCD positivo en el RN?

En primer lugar la presencia de aloanticuerpos maternos que aquí se descartan porque no hay incompatibilidad ABO y el TCI es negativo durante la gestación y aún después del parto para descartar una inmunización tardía después de las 26 semanas de gestación.

En segundo lugar por inmunización pasiva al recibir inmunoprofilaxis antenatal aunque generalmente esto puede ocurrir cuando la gestante recibe IgG anti-D entre las 28 y 32 semanas y luego se adelanta la fecha de parto por ejemplo a las 34 o 35 semanas. En este caso se descarta pues la embarazada no recibió IgG anti-D antenatal a pesar de que estaba indicada de acuerdo al consenso nacional 2005.

En tercer lugar, un TCD positivo en el RN puede deberse a autoanticuerpos generados por medicamentos o por patologías autoinmunes. En este caso también se descarta pues la madre no tiene ningún cuadro clínico de enfermedad autoinmune, no ha recibido medicación y el TCD materno es negativo.

Luego de agotar todas las posibilidades diagnósticas pensamos se deba a un resultado falso positivo del TCD. Para ello, extraemos una muestra de sangre venosa al RN y repetimos el estudio por la misma técnica y el resultado es un TCD negativo.

La respuesta de Medicina Transfusional es que la puerpera debe recibir inmunoglobulina anti-D postnatal.

Creo que la enseñanza que deja este caso es que cuando hay un resultado de un TCD positivo con una reactividad muy débil (+) antes de adjuntarlo a la historia clínica se debe validar por el médico hemoterapeuta según la clínica y paraclínica del RN. Si no hay ningún signo ni resultado que explique esta positividad es mejor extraer una nueva muestra al RN y repetir el estudio antes de validarlo. De esta manera, se evita realizar nuevos estudios a la madre y dilatar la administración de IgG anti-D. La mayoría de las veces la reactividad (+) se debe a problemas preanalíticos sobre todo en la muestra de sangre como relación anticoagulante-sangre (restos de fibrina) o contaminación con gelatina de Wharton (seudoaglutinación) pues recordemos que la muestra analizada en primera instancia fue tomada del cordón umbilical.

5.3 - LO QUE VENDRÁ: NUEVAS ESTRATEGIAS EN LA PREVENCIÓN DE LA INMUNIZACIÓN ANTI-D.

1- ANTICUERPOS MONOCLONALES

Hasta el momento actual no hay una opción alternativa, aprobada para su uso clínico, tan segura y eficaz como el uso de la inmunoglobulina anti-D policlonal (IgG anti-D) para la prevención de la aloinmunización y por ende la EHP producida por este anticuerpo del sistema Rh.

Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias como la inmunoglobulina anti-D monoclonal y la estimulación de la tolerancia inmunológica.

La IgG anti-D policlonal es preparada a partir del plasma de individuos inmunizados al antígeno D al cual se le realiza un proceso industrial de fraccionamiento e inactivación viral. Esta preparación acarrea dos problemas principales: uno, el problema de abastecimiento de la materia prima, el plasma hiperinmune sobretodo en la Comunidad Europea (CE) donde desde hace años se ha prohibido los protocolos de inmunización de sujetos sanos “voluntarios” Rh negativos para la obtención de plasma con fines de fraccionamiento. Las industrias importan plasma de América del Norte (USA y Canadá).

El segundo problema son los aspectos éticos ligados a la inmunización de sujetos sanos, teóricamente voluntarios.

Los anticuerpos monoclonales, desde su descubrimiento en 1975 por Kohler y Milstein (1), tienen como ventaja que no necesitan como fuente plasma humano, reducen los costos de manufactura, son productos de alta pureza y no tienen riesgo de transmitir enfermedades por lo cual no necesitan procedimientos de inactivación de patógenos. El objetivo de la primera etapa es seleccionar linfocitos B productores de anticuerpos humanos y la segunda etapa es obtener la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes anti-D. Actualmente, por lo que nosotros conocemos, existen cuatro anticuerpos monoclonales anti-D recombinantes que se están utilizando en ensayos clínicos.

Un anticuerpo anti-D de estas características se ha desarrollado en Rusia (Rhesoclone) pero hasta el momento actual se desconocen los resultados sobre su efecto terapéutico y farmacocinética.

El Instituto de Inmunobiología de Berna-Suiza ha desarrollado un anticuerpo monoclonal anti-D (MonoRho). Los estudios clínicos en fase I mostraron que una dosis única de esta inmunoglobulina anti-D recombinante previene la inmunización primaria de glóbulos rojos Rh positivos (2). Comparada con la IgG anti-D policlonal, la recombinante tiene un “clearance” menor de los eritrocitos Rh positivos. No se encontraron evidencias del desarrollo de anticuerpos anti-D hasta seis meses después de la

administración de la IgG recombinante para neutralizar los efectos de 15 mililitros de glóbulos Rh positivos.

Es de uso intramuscular e intravenoso. Al igual que en la policlonal la vía intramuscular es más lenta que la intravenosa en alcanzar el pico máximo de concentración en sangre (2-4 días) (3). En ninguno de los 31 individuos RhD negativos a los cuales se les inyectó MonoRho desarrollaron anticuerpos contra la IgG recombinante inyectada (2). Sin embargo, la demora en el clearance de los eritrocitos RhD positivos puede constituirse en una limitante para su uso a gran escala.

En el Reino Unido el Laboratorio de Referencia Internacional sobre Grupos Sanguíneos (IBGRL) de Bristol ha desarrollado dos anticuerpos anti-D monoclonales uno IgG1 y otro IgG3 (Bioproducts Laboratories). El clearance de los eritrocitos RhD positivos fue más rápido con estos anticuerpos monoclonales que con la IgG policlonal pero con hemólisis y acumulación de los eritrocitos en el hígado(4). Los dos anticuerpos monoclonales previenen la inmunización anti-D pero paradójicamente estimulan la respuesta inmune anti-D a los dos o tres meses de los estudios de clearance pues la IgG obtenida de roedores puede presentar estructuras no humanas como oligosacáridos que interaccionan con otros receptores (manosa y asialoglicoproteína) que están presentes en macrófagos, células dendríticas o células retículo endoteliales. Estas moléculas participan de la captura y remoción de organismos foráneos, activan el complemento, estimulan la fagocitosis, liberan citoquinas pro-inflamatorias y aumentan la presentación antigénica por parte de las células dendríticas. Estos eventos favorecen la iniciación de la respuesta inmune y la formación de anticuerpos contra antígenos foráneos. Las glicofomas de los anticuerpos monoclonales anti-D pueden ser reconocidas por estas moléculas lo cual explicaría la estimulación de la respuesta inmune anti-D (5).

Por último, el Laboratorio Francés de Fraccionamiento y Biotecnología (LFB) ha desarrollado un anticuerpo monoclonal recombinante. En un estudio primario en voluntarios RhD negativos mostró que el anti-D LFB es al menos que el clearance de los eritrocitos RhD positivos es tan rápido y completo como el que se produce con la IgG anti-D policlonal (6). La preparación de un estudio clínico sobre sujetos Rh negativos está en curso con el fin de demostrar la capacidad de clearance y de inmunosupresión de estos anticuerpos monoclonales anti-D

Esta nueva generación de inmunoglobulinas anti-D monoclonales recombinantes quizá, en un futuro cercano, puedan sustituir a la inmunoglobulina policlonal en uso clínico desde el año 1968 para la inmunoprofilaxis de las gestantes Rh negativas. Sin embargo, en el momento actual existen más preguntas que respuestas.

2 – INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

El sistema inmune responde frente a los estímulos antigénicos pero posee mecanismos que regulan la forma, extensión y duración de la respuesta inmune. La exploración de estos mecanismos reguladores ha sido el inicio para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades autoinmunes, alérgicas o trasplantes. Un método que ha renovado el interés del mundo científico en los últimos años es la regulación de los linfocitos T inducida por antígenos específicos. Los linfocitos T reguladores (supresores) fueron descritos por primera vez en 1971 por Gershon y Kondo (7) quienes demostraron la habilidad de estas células para transferir una tolerancia antígeno específica en animales.

En 1995, se describe el fenotipo de estos linfocitos T que expresan los antígenos CD4 y CD25 (8) y que se encuentran naturalmente presentes en la sangre periférica.

Se define como “tolerancia inmune” a la falta de respuesta inmune frente a un antígeno. Esta puede ser natural cuando el sistema inmune no responde frente a antígenos propios. Una falla de esta tolerancia inmunológica se traduce en una enfermedad autoinmune.

La tolerancia inducida es la que se crea por antígenos externos que han sido creados para deliberadamente manipular el sistema inmune y serviría por ejemplo para evitar el rechazo del órgano trasplantado. Tanto los linfocitos B como los T pueden ser tolerantes pero es más importante actuar sobre las células T porque las B no pueden producir anticuerpos sin la ayuda de los linfocitos T. Las células T se originan en el timo y cuando maduran expresan el receptor (TCR) lo que les permite responder frente a una variedad de antígenos.

La respuesta inmune frente a antígenos específicos se ha denominado “contacto celular dependiente” pues ella necesita del contacto físico entre las células T y las células presentadoras de antígeno (APC).

La respuesta inmune inicial requiere si o si que el antígeno sea reconocido por el linfocito T la prueba de ello es el SIDA en donde se produce un gran descenso de estas células T CD4+ lo cual genera una inmunodeficiencia frente a virus, bacterias o parásitos.

Los antígenos exógenos (inhalados, ingeridos o inyectados) son captados por células presentadoras de antígenos (APC) macrófagos y células dendríticas. En el endosoma fusionado con un lisosoma el antígeno es degradado en fragmentos o péptidos los cuales son liberados hacia la superficie celular donde se unen a las moléculas clase II del complejo de histocompatibilidad (MHC). Aquí recién el antígeno puede ser reconocido por la célula T (CD4+). El receptor TCR del linfocito T se une al péptido que a su vez se encuentra unido a la molécula clase II de la APC formándose un puente entre ambas células. Esta primera señal es potenciada por moléculas de

adhesión como CD2, LFA-1 y CD26. Se forma así una verdadera sinapsis entre el linfocito y la APC.

Las células T (CD4+) que se unen al antígeno son estimuladas mediante un complejo sistema de transmisión de señales desde la superficie al interior de la célula y se liberan linfoquinas que estimulan los linfocitos B. Por ello estos linfocitos T se denominan “Helper T cells” (Th) o cooperadores. Los linfocitos B se diferencian y crecen en una clona de células denominadas células plasmáticas o productoras de anticuerpos (inmunidad humoral). Pero, para activar al linfocito T helper no alcanza con la unión del receptor TCR al péptido y la molécula clase II de la APC. Se necesita una segunda señal desde la APC la cual es denominada coestimulación. Una de las más importantes moléculas coestimuladoras de las APC es la B7 que se une a la molécula CD28 del linfocito T. La unión de estas dos moléculas provee la segunda señal necesaria para la estimulación de las células T helper.

En la tolerancia inmune las células que presentan el antígeno propio no expresan la segunda señal o transmiten otra segunda señal que transforma las células T en células T regulatorias (Treg) que expresan el antígeno CD25+ y se vuelven tolerantes o suprimen la respuesta inmune. La destrucción de esta población celular en animales hace que rápidamente se desarrolle un espectro de enfermedades autoinmunes. Las Treg son abundantes en el intestino y serían las responsables de la tolerancia inmunológica frente a antígenos de los alimentos.

La administración vía oral de antígeno induce la formación de células T supresoras (Treg) (9) e inclusive abolir la respuesta inmune a la subsecuente infusión del antígeno por vía parenteral (10). Sin embargo, la administración del antígeno D vía oral diariamente durante dos semanas no tuvo efecto en prevenir la respuesta inmune en voluntarios Rh negativos no inmunizados (11).

Por el contrario, los antígenos endógenos es decir los que se generan por una célula del organismo por ejemplo proteínas virales de una célula infectada son liberadas a la superficie de las células donde se unen a moléculas del complejo de histocompatibilidad clase I y de esta manera son reconocidos por las células T (CD8+) o citotóxicas responsables de la inmunidad celular.

3- TOLERANCIA INMUNOLÓGICA AL ANTÍGENO D DEL SISTEMA Rh.

Dos genes compuestos por 10 exones cada uno, el RHD y el RHCE, dan origen a dos proteínas la RhD que contiene el antígeno D (Rh1) y la RhCE que contiene los antígenos C, c, E, e (Rh2 a Rh5). Ambas proteínas están compuestas por 417 aminoácidos con un modelo estructural de 6 ondas extracelulares, 12 transmembrana y 7 segmentos intracelulares (12). Las proteínas RhD y RhCE difieren entre si por 34 a 37 aminoácidos.

Pero, las proteínas que contienen los antígenos Rh se expresan en la superficie del eritrocito solamente si existe una glicoproteína asociada (RhAG) que es producida por el gen RHAG.

La asociación entre las proteínas Rh y la glicoproteína asociada es denominada “complejo Rh” (13). En el feto, los antígenos Rh están presentes en la membrana del glóbulo rojo a partir de las seis semanas desde la concepción (14). El antígeno RhD es altamente inmunogénico. Epitopes (fragmentos) de la proteína RhD inducen la proliferación in vitro de células T Helper (Th) obtenidas de donantes aloinmunizados (15), en particular los péptidos Rh 52-66, RhD 97-111, RhD 117-131 y RhD 177-191.

La pregunta es si estos péptidos administrados por una vía que induzca tolerancia inmunológica pueden prevenir la respuesta inmune in vivo frente a la proteína RhD completa. Para responder a ella, el Dr. Stanislaw Urbaniak de la Universidad de Aberdeen en Escocia ha desarrollado un “modelo animal humanizado”. La expresión del alelo HLA-DRB1-1501 está muy aumentada en los individuos Rh negativos que responden al antígeno D. Un modelo animal con un ratón transgénico HLA-DR15 fue seleccionado para este estudio previendo que la proteína RhD humana puede generar una respuesta inmune en este modelo (16). Luego cada uno de los péptidos dominantes fueron testeados para determinar si producían inmunotolerancia cuando se administraban por la mucosa nasal.

En primer lugar, 100 microlitos de una solución de 2mcg/ml de proteína RhD fueron inyectados subcutáneos y dos semanas después intraperitoneal en ratones transgénicos HLA-DR15 y en ratones no transgénicos para ver si desarrollaban anticuerpos anti-D, los cuales, fueron medidos por un método enzimático y por inmunoprecipitación en gel (Diamed) que es la técnica que nosotros utilizamos para detectar anticuerpos durante la gestación. La estimulación de las células Th se demostró por la habilidad de los esplenocitos de los ratones inmunizados para proliferar in vitro en respuesta a la administración de la proteína RhD purificada. Los anticuerpos anti-D que se unen a glóbulos rojos humanos RhD positivos fueron detectados sólo en ratones transgénicos al igual que la proliferación de los esplenocitos (16).

En segundo lugar, una vez demostrada la respuesta inmune frente a la proteína RhD del modelo animal humanizado, se administró una dosis única de 50 microlitros de una solución de 2 mcg/ml de cada péptido dominante por vía nasal 15 días antes de la administración de la proteína RhD. La respuesta inmune (producción de anticuerpos anti-D y proliferación de esplenocitos) fue abolida en los ratones transgénicos HLA-DR15.

Dos péptidos el RhD52-66 y el RhD 117-131 fueron los más efectivos en producir tolerancia inmunológica frente a la proteína RhD. La administración de péptidos no dominantes (RhD 302-316) no produjo supresión de la respuesta inmune por lo cual la tolerancia es específica para péptidos dominantes de la proteína RhD (13).

El mecanismo de la supresión activa de la inmunización anti-D difiere al de la administración pasiva de inmunoglobulina anti-D.

La IgG anti-D es un hemoderivado que depende para su producción de donantes humanos RhD negativos inmunizados, tiene un costo de manufactura con procedimientos de inactivación de patógenos, es necesario mantener un stock y produce inmunidad pasiva que tiene un efecto temporal por lo cual debe administrarse en cada acto inmunizante y no suprime la respuesta inmune una vez que se ha producido.

Por el contrario, la tolerancia inducida por péptidos no es un producto humano, produce tolerancia inmunológica de forma activa, revierte la respuesta inmune en individuos inmunizados y puede realizarse antes o después de la respuesta inmune por transfusión o embarazo. Es crucial para inducir tolerancia la oportunidad y la ruta de administración de los péptidos dominantes.

Los mecanismos propuestos para la inducción de la tolerancia serían : 1- los péptidos dominantes producirían una falla en la expresión de las moléculas co-estimuladoras (señal 2) B7-CD28, 2- las células T reconocen antígenos específicos que llevan a la apoptosis y no a la estimulación de las células inmunocompetentes, 3- se liberarían citoquinas inhibitorias IL-10 y TGF-Beta (Transforming Growth Factor Beta) y por último 4 – se produciría la generación de células Treg CD4+/CD25+.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Kolher G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)* 1975;256:495-497.
- 2- Mieschner S, Spycher M, Amstutz H et al. A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate polymorphisms in the FcyRIIA and FcyRIIA genes. *Blood* 2004;103:4028-4035.
- 3- Bichler J, Spycher M, Amstutz H et al. Pharmacokinetics and safety of recombinant anti-RhD in healthy RhD-negative male volunteers. *Transfusion Medicine* 2004;14:165-171.
- 4- Kumpel BM. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sanguinis* 2007;93:99-111.
- 5- Kumpel BM. New developments in the biological activity of anti-D monoclonal antibodies. *Vox Sanguinis* 2007;2:75-77.
- 6- Cortey A, Brossard Y, Beliard R, Bourel D. Prévention de la allo-immunisation Rhésus-D foeto-maternelle. Perspectives. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006;35(suppl 1):1S119-1S122.
- 7- Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971;21:903-914.
- 8- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
- 9- Mattingly JA, Waksman B. Immunologic suppression after oral administration of antigen I. Specific suppressor cells formed in rats peyers patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. *J Immunol* 1978;121:1878.
- 10- Hanson Dg, Vaz NM, Mais LCS et al. Inhibition of specific response by feeding protein antigens III evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies. *J Immunol* 1979;123:2337-2343.
- 11- Barnes R, Duguid J, Toberts F et al. Oral administration of erythrocyte membrane antigen does not suppress anti-Rh(D) antibody response in humans. *Clin Exp Immunol* 1987;67:220-226.
- 12- Wagner E, Flegel W. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 2004;20:23-32.
- 13- Avent N, Reid M. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-387.
- 14- Chown B. On a search for Rhesus antibodies in very young fetuses. *Arch Dis Child* 1955;30:232-233.
- 15- Stott L, Barker RN, Urbaniak SJ. Identification of alloreactive epitopes on the Rhesus D protein. *Blood* 2000;96:4011-4019.
- 16- Hall A, Cairns L, Almann D, Barker R, Urbaniak S. Immune responses and tolerance to the RhD blood group protein in HLA-transgenic mice. *Blood* 2005;105:2175-2179.

CAPÍTULO 6 - TROMBOCITOPENIAS INMUNES NEONATALES

“Más allá de un valor”

Si bien la trombocitopenia es un trastorno cuantitativo de la serie plaquetaria, el recuento de plaquetas es un elemento de valor para el diagnóstico y tratamiento pero no el único. Debe ser necesariamente enmarcado dentro de un conjunto primero clínico y luego paraclínico. Se describen a continuación dos trombocitopenias de igual mecanismo patogénico, el inmune, pero que van a diferir en su presentación clínica, diagnóstico y tratamiento. A su vez, no todas las trombocitopenias requieren de la transfusión de plaquetas para su corrección. Es más, en algunas esta modalidad terapéutica está contraindicada por lo cual no se pueden realizar pautas de diagnóstico y tratamiento basadas principalmente en un valor paraclínico o peor simplificar la terapéutica al valor hallado. Además, existen patologías que son propias del binomio materno-fetal como la trombocitopenia neonatal aloinmune y otras, como la trombocitopenia neonatal autoinmune, que también se presentan en el adulto pero que mientras en el neonato es un mecanismo transitorio y autolimitado en individuos mayores de edad es un proceso inmunitario activo que generalmente se produce por una falla de la tolerancia inmunológica.

La trombocitopenia, menos de 150.000 plaquetas por mm^3 , ocurre en el 22% de los neonatos de pretérmino (1) mientras que es documentada en menos del 1% de los de término (2). Las trombocitopenias de causa periférica pueden ser debidas a un mecanismo inmune o no inmune. Las de origen no inmune generalmente son secundarias a hemorragias, coagulación intravascular diseminada (CID), infecciones o sepsis, hemangioma, hiperesplenismo, asfixia perinatal, enteritis necrotizante, trombosis o por la realización de exsanguinotransfusiones. Así, el 25% de los neonatos que se admiten en las unidades de cuidados intensivos presentan trombocitopenia (3). Las de causa inmune se pueden producir por alo o autoanticuerpos de origen materno o por medicamentos.

La Trombocitopenia Neonatal Aloinmune (TNAI) se considera en la actualidad la causa más común de trombocitopenia grave del recién nacido. Se define como trombocitopenia grave o severa cuando existen menos de 50.000 plaquetas por mm^3 .

La disminución en el número de plaquetas se produce como consecuencia de la destrucción de las plaquetas fetales y/o neonatales inducidas por un aloanticuerpo plaquetario tipo inmunoglobulina G (IgG) procedente de la circulación materna y dirigido contra un antígeno plaquetario específico heredado del padre. Las plaquetas unidas al anticuerpo pueden tener una destrucción intravascular por un mecanismo de citólisis mediado por complemento o extravascular por los macrófagos del sistema retículo en-

dotelial, que a través de los receptores Fc, retiran de la circulación las inmunoglobulinas unidas a las plaquetas disminuyendo su vida media. El mecanismo fisiopatológico es similar al que se produce en la Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP) pero aquí en lugar de anemia se produce trombocitopenia. La diferencia es que los anticuerpos antiplaquetarios están presentes en la primera gestación en aproximadamente el 30% de los casos (4). Si bien el mecanismo exacto de la inmunización materna no se conoce, los anticuerpos son detectados a las 16 semanas de gestación en primíparas primigrávidas (5). Estos anticuerpos maternos cruzan la placenta desde la semana 14 y los aloantígenos fetales se expresan totalmente en la membrana plaquetaria a partir de la semana 18 (6).

En la mayoría de los **casos clínicos** se trata de un recién nacido de una madre sana no trombocitopénica en la cual la gestación y el parto han transcurrido sin complicaciones y que al nacer o pocas horas después aparece en el neonato un púrpura con petequias y/o equimosis. Suele tratarse de un recién nacido sano que no presenta otras alteraciones detectables al examen físico. En otros casos, puede tratarse de un recién nacido asintomático en el cual se detecta la trombocitopenia en forma casual por la realización de un hemograma solicitado por otras causas. El diagnóstico clínico de púrpura debe acompañarse de la paraclínica que certifique la trombocitopenia. Se sugiere realizar también un hemograma materno. Si la madre no presenta trombocitopenia pensamos en un mecanismo aloinmune y si encontramos una trombocitopenia materna en un mecanismo autoinmune. El diagnóstico serológico incluye la detección e identificación en el suero materno del anticuerpo antiplaquetario específico. Hasta el momento se han definido cinco sistemas de grupo sanguíneo plaquetarios (Human Platelet Antigens HPA) todos ellos bialélicos y constituídos por un alelo de alta frecuencia (a) y otro de baja (b). La sustitución de un sólo aminoácido, leucina por prolina en la posición 33 del complejo GPIIb/IIIa distingue a los fenotipos HPA-1^a y HPA-1^b. Los anticuerpos de especificidad anti-HPA 1^a son responsables de entre el 75 y 85% de los casos diagnosticados clínicamente seguidos por el HPA 5b en el 10% (6).

Generalmente una gestante homocigoto HPA-1b se inmuniza cuando tiene un feto HPA-1^a o recibe transfusiones de plaquetas HPA-1^a positivas.

La mayoría de los anticuerpos que producen TNAI están dirigidos contra la glicoproteína de membrana GP IIIa alterando la unión al fibrinógeno y por ende la agregación plaquetaria. Esto explicaría porqué la TNAI es un cuadro potencialmente muy grave dado que entre el 10 y 30% de los recién nacidos pueden desarrollar una hemorragia cerebral con muerte en el 10% y secuelas neurológicas irreversibles en el 20%. De esta manera una trombocitopenia neonatal severa en las primeras 48 horas de vida es una situación clínica de urgencia donde se debe realizar rápidamente **diagnóstico y tratamiento** sin esperar el resultado de los estudios serológicos.

Ante el diagnóstico clínico de trombocitopenia neonatal aloinmune debe

comenzarse el tratamiento sin dilación en aquellos neonatos que presentan menos de 30.000 plaquetas y/o síndrome hemorrágico. El tratamiento de elección es transfundir plaquetas de donantes con fenotipo HPA compatible (HPA-1^a o 5b negativos), ABO y Rh compatibles y leucoreducidas (7). Sólo el 2,5 % de los donantes de raza blanca serán HPA-1^a negativos y el 1% HPA-5b negativos (8). En nuestro país no es posible, hasta el momento actual, obtener plaquetas fenotipadas pues en los servicios de hemoterapia o el Servicio Nacional de Sangre no se realizan estudios serológicos para antígenos plaquetarios específicos y aunque se realizaran no estarían disponibles rápidamente. La transfusión de plaquetas maternas representa una segunda opción pero en la práctica esto depende de si la madre se encuentra con el neonato, si es apta como donante debido a los problemas físicos del parto junto con el impacto emocional de la complicación detectada en el recién nacido. En caso de obtenerse un concentrado plaquetario materno por aferesis se debe realizar el estudio serológico de las enfermedades transmisibles por la sangre. Se deben lavar para extraer el plasma con los anticuerpos antiplaquetarios y resuspenderlas en salino o soluciones aditivas para plaquetas. También deben ser irradiadas (irradiación gamma) para evitar la reacción de injerto vs huésped al provenir de un familiar directo. Si se realizan todos estos procedimientos las plaquetas estarían disponibles para transfusión en aproximadamente 12 horas. La tercera opción terapéutica sería la administración de inmunoglobulina polivalente a altas dosis (1g/kg/día durante 2 días) para bloquear los receptores Fc de los macrófagos neonatales. Sin embargo, este mecanismo tarda por lo menos 24 horas en comenzar a elevar los recuentos plaquetarios para alcanzar niveles de seguridad (mayor de 50.000 plaquetas).

Se utiliza como tratamiento de elección para aquellos neonatos sin síndrome hemorrágico o con recuentos plaquetarios superiores a 30.000.

La última opción terapéutica pero la más rápida es la transfusión de plaquetas no compatibles de donantes al azar a razón de 10-20 ml /Kg peso. En un trabajo reciente (9) se demuestra su efectividad elevando en más de 20.000 el recuento plaquetario postransfusional en 24 de 27 casos. Deben ser ABO y Rh compatibles y administrarse leucoreducidas para prevenir la infección por citomegalovirus pero todo esto ocurre en minutos. El porqué son efectivas las plaquetas randomizadas no compatibles se explicaría porque los anticuerpos presentes en el neonato fueron adquiridos pasivamente por lo cual una parte de la dosis de plaquetas suministradas saturarían los anticuerpos y el resto serían efectivas clínicamente. Esto no ocurre cuando el mecanismo de producción de anticuerpos antiplaquetarios es activo como el púrpura trombocitopénico autoinmune (PTA) del adulto y por ello las plaquetas randomizadas están contraindicadas salvo en situaciones especiales.

Cuando se transfunden plaquetas no compatibles puede asociarse el tratamiento con inmunoglobulina polivalente intravenosa dado que actúan por

mecanismos y latencia diferentes.

Los antígenos del sistema ABO se expresan débilmente en la superficie plaquetaria. Sin embargo, en el 1% de los sujetos normales se expresan totalmente (Type II high expressers). Pueden ser causa de TNAI cuando la madre posee un alto título de anti-A y/o anti-B y el feto y/o recién nacido es un Type II high expressers (10). De esta manera se presentará un neonato con un conflicto ABO, icterico y trombocitopénico lo cual es muy importante a tener en cuenta porque las exsanguinotransfusiones que pueda recibir como tratamiento del conflicto ABO disminuyen el número de plaquetas circulantes.

Es de destacar que la TNAI es un proceso autolimitado y transitorio pues los anticuerpos pasivos, de origen materno, tienden a desaparecer espontáneamente con el transcurso de los días. Es un cuadro clínico de buen pronóstico siempre y cuando no se desarrolle una hemorragia cerebral por ello, debemos actuar rápidamente para prevenirla.

La probabilidad de recurrencia de la TNAI en siguientes gestaciones es muy elevada, hasta del 100% si en la gestación anterior se produjo hemorragia intracerebral. Durante la etapa intrauterina existen dos modalidades de diagnóstico, tratamiento y prevención de la hemorragia cerebral. Uno, menos invasivo, consiste en el diagnóstico serológico de la presencia de aloanticuerpos plaquetarios y la administración a la madre de inmunoglobulina intravenosa (2g/Kg por semana o 1g/kg por semana asociado a 0,5 mg/kg/día de prednisona) (11). Este esquema se aplica principalmente en los centros hospitalarios de Estados Unidos de Norteamérica pero si bien la inmunoglobulina polivalente a dosis altas representa un método no invasivo es muy caro y no totalmente exento de riesgos. Además, la falta de un grupo control en las series más optimistas no permite asegurar que la eficacia del tratamiento sea indefectiblemente debida a su acción terapéutica (4). La otra opción aplicada en la mayoría de los centros hospitalarios europeos consiste en la realización de cordocentesis primero, para realizar diagnóstico de trombocitopenia fetal y de su intensidad y luego, para administrar plaquetas compatibles maternas leucoreducidas e irradiadas (12) y/o inmunoglobulina intravenosa por los vasos umbilicales. Es de hacer notar que esta técnica la administración de inmunoglobulina polivalente a altas dosis por cordocentesis fue descrita inicialmente por nosotros en 1994 (13) para el tratamiento intrauterino de la EHP. Pero, como ya dijimos el mecanismo fisiopatológico de la TNAI y la EHP es similar, la inmunoglobulina administrada bloquea los receptores de los macrófagos al segmento Fc de los aloanticuerpos maternos evitando la hemólisis por un lado o la trombocitopenia por otro.

La cordocentesis si bien es una técnica invasiva que en manos expertas tiene un riesgo de interrupción de la gestación del 1-3%, es la única estrategia que permite una valoración objetiva e inmediata del la trombocitopenia fetal y de su gravedad así como del tratamiento realizado. En nuestro país

dado que no se realiza hasta el momento actual, un diagnóstico serológico de la presencia de aloanticuerpos plaquetarios en la gestante proponemos realizar el esquema europeo dado que ya existe por un lado experiencia en los tratamientos fetales, menos costoso que los maternos, como la cordocentesis y por otro que se pueden obtener plaquetas maternas por hemaféresis. Además, si bien la cordocentesis es un procedimiento invasivo, recordemos que la TNAI que se presenta en embarazos siguientes tiene casi un 100% de incidencia de hemorragia cerebral por lo cual esta técnica se convierte en la única que puede salvar la vida del feto in útero.

Otra trombocitopenia de causa inmune es el púrpura autoinmune neonatal. Aquí, a diferencia de la TNAI, la madre presenta un cuadro clínico de púrpura trombocitopénico autoinmune (PTA) o lupus eritematoso sistémico (LES) y/o un recuento plaquetario descendido. Los autoanticuerpos maternos son también del tipo IgG que cruzan la placenta hacia el feto. Sin embargo, por lo general, los neonatos presentan recuentos plaquetarios más elevados que en la TNAI y el riesgo de desarrollar hemorragia cerebral es muy bajo (1%). Dado que no existe un riesgo inminente de hemorragia cerebral el tratamiento de elección es la gammaglobulina polivalente intravenosa (1g/Kg/día durante dos días). El púrpura autoinmune es al igual que la TNAI un proceso patológico autolimitado dado que los anticuerpos son adquiridos pasivamente por el neonato (14).

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Castle V, Andrew M, Kelton J y col. Frequency and mechanism of neonatal thrombocytopenia. *J. Pediatr.* 1986;108:749-755.
- 2- Castro V, Kroll H, Origa AF y col. A prospective study on the prevalence and risk factors for neonatal thrombocytopenia and platelet alloimmunization among 9332 unselected Brazilian newborns. *Transfusion* 2007;47:59-66.
- 3- Wong W, Glader B. Approach to the newborn who was thrombocytopenia. *NeoReviews* 2004;5:444-450.
- 4- Muñiz-Diaz E, Ginovart G. Trombocitopenia Aloinmune en el feto y recién nacido. *Anales de Pediatría* 2003;58:562-567.
- 5- Durand-Zaleski I, Schleger N, Blum-Boisgard C y col. Screening primiparous women and newborns for fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia: a prospective comparison of effectiveness and costs. *Am. J. Perinatol.* 1996;13:423-431.
- 6- Mueller-Eckhardt C, Grubert A, Weisheit M y col. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989;333:363-366.
- 7- Bassler D, Greinacher A, Okascharoen C y col. A systematic review and survey of the management of unexpected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2008;48:92-98.
- 8- Rayment R, Birchall J, Yarranton H y col. Neonatal alloimmune thrombocytopenia. *BMJ* 2003;327:331-332.
- 9- Kiefel V, Bassler D, Kroll H y col. Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood* 2006;107:3761-3763.
- 10- Curtis BR, Fick AF, Lochowicz AJ y col. Neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with maternal-fetal incompatibility for blood group B. *Transfusion* 2008;48:358-364.
- 11- Berkowitz RL, Lesser ML, Mc Farland TG, Wissert M, Primiani A, Hung C, Bussel JB.

Antepartum treatment without early cordocentesis for standard-risk alloimmune thrombocytopenia. A randomized Controlled Trial. *Obstetrics and Gynecology* 2007;110:249-255.

12- Ringwald J, Schroth M, Faschingbauer F y col. Intrauterine use of hyperconcentrated platelet concentrates collected with Trima Accel in a case of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2007;47:488-493.

13- Alonso J, Decaro J, Marrero A, Lavalle E, Martell M, Cuadro JC. Repeated direct fetal intravascular high-dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh hemolytic disease. *J Perinat Med* 1994; 22: 415-419.

14- Roberts, I. Murray NA. Neonatal Thrombocytopenia. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2008; 13: 256-264.

CAPÍTULO 7 - SÍNDROMES HEMORRAGÍPAROS NEONATALES

Los problemas hemorrágicos están presentes frecuentemente durante el período neonatal pero particularmente en aquellos RN que se encuentran en las unidades de cuidados intensivos. La trombocitopenia es quizá la causa más frecuente pero las alteraciones de la hemostasis secundaria también pueden observarse e inclusive en muchos casos coexisten con las alteraciones plaquetarias. Dentro de los síndromes hemorrágíparos neonatales los más frecuentes son los defectos adquiridos pero, aunque en un número menor, también las condiciones congénitas pueden estar presente en este período de vida extrauterina.

Los desórdenes adquiridos frecuentemente se presentan en neonatos enfermos o de pretérmino mientras que las situaciones congénitas ocurren más en recién nacidos aparentemente sanos.

Un apropiado diagnóstico y manejo de estas condiciones clínicas depende principalmente de un rápido reconocimiento clínico de las características del síndrome hemorrágíparo así como del inicio de una rápida investigación paraclínica.

Sistema hemostático neonatal

La hemostasis neonatal, al igual que la del adulto, es un proceso fisiológico complejo que depende de un serie de interacciones entre células del continente (endoteliales), de la sangre (glóbulos blancos, rojos y plaquetas) y de proteínas hemostáticas (factores de la coagulación). Los conocimientos sobre el desarrollo de este proceso biológico han aumentado considerablemente en los últimos años. Actualmente se acepta que el modelo tradicional “en cascada” no refleja adecuadamente los eventos que se desarrollan “in vivo”. Por ello, se ha propuesto un nuevo modelo celular de la hemostasis. Ante una lesión de la pared vascular en la microcirculación se dispara el sistema hemostático para reparar la herida y evitar el sangrado. En vasos sanguíneos de mayor tamaño, flujo y presión la única medida efectiva para detener la hemorragia es la hemostasis quirúrgica y farmacológica.

Ante un lesión vascular lo primero que ocurre es una rápida vasoconstricción refleja (axo-axónica) para disminuir el volumen del sangrado. Luego, la vasoconstricción es humoral, mantenida en el tiempo, por factores solubles liberados de las plaquetas activadas como el tromboxano A2 y serotonina. El segundo mecanismo que se dispara rápidamente es que la molécula adhesiva más potente del organismo, el factor Von Willebrand (FvW), se adhiere por un lado al subendotelio expuesto por la lesión y por otro lado al receptor plaquetario, una glicoproteína de membrana (GP-Ib) iniciando la formación del “tapón” plaquetario sobre la zona injuriada. Cuando falta este receptor plaquetario ocurre el síndrome de Bernard-

Soulier que produce una alteración de la adhesión que se define como la unión de la membrana plaquetaria a una superficie no plaquetaria. El tercer mecanismo que activa velozmente la lesión vascular es la hemostasis secundaria (coagulación). En esta fase de “iniciación” el factor tisular (FT) es considerado hoy en día el principal disparador de la coagulación in vivo. Este FT es una glicoproteína que normalmente no circula en la sangre y se encuentra encriptado en el subendotelio y en células endoteliales sanas o no activadas.

Cuando queda expuesto rápidamente activa al factor VII de la coagulación formando un complejo FT-FVIIa. Este complejo activa principalmente los factores V y X de la coagulación formando en segundos pequeñas cantidades de trombina (el 5% de toda la trombina que se produce por el sistema de coagulación se forma en esta etapa inicial).

Esta trombina formada en pequeñas cantidades es la llave para desencadenar mecanismos hemostáticos subsecuentes. Por un lado, activa otros factores de la coagulación, como el factor XI, que intervendrá en la segunda fase de “amplificación” de la coagulación. También rompe la unión del factor VIII-Factor vW activando de esta manera la FVIII que va a intervenir también como cofactor en la etapa de amplificación. El factor VIII circula normalmente inactivo unido al FvW que lo protege de su degradación por un inhibidor fisiológico de la coagulación, la proteína C que también inhibe al otro cofactor el FV.

Esta trombina formada en la etapa de iniciación de la coagulación tiene como función primordial, además de las descritas, de activar las plaquetas (PAR-1). Las plaquetas activadas cambian de forma emitiendo pseudopodios que facilitan la agregación es decir la unión de la membrana plaquetaria a una superficie plaquetaria. La activación de las plaquetas produce la secreción del contenido de los gránulos densos que contienen calcio, ADP, ATP, GTP, tromboxano y serotonina así como de los gránulos alfa que contiene moléculas adhesivas como FvW, trombospondina y fibrinonectina además de fibrinógeno. Algunas de estas moléculas secretadas como ya vimos actúan reforzando la vasoconstricción (TXA2 y serotonina), otras favoreciendo la adhesividad ya iniciada y otras como el ADP y el TXA2 estimulando la agregación plaquetaria aumentando de esta manera el “tapón” plaquetario ya formado. La formación de este acúmulo plaquetario es el resultado de la unión del fibrinógeno a otro receptor de la membrana plaquetaria la glicoproteína GP IIb-IIIa y esta unión es calcio dependiente. La ausencia de la GP IIb-IIIa constituye la trombostenia de Glanzmann que se transmite autosómica y recesiva y que consiste en una alteración de la agregación plaquetaria.

La segunda fase del sistema de la coagulación es la de “amplificación” que tiene como objetivo formar grandes cantidades de trombina para convertir el fibrinógeno en fibrina y lograr la estabilidad del coágulo. Esta fase ocurre en la superficie plaquetaria activada que aporta fosfolípidos de

membrana necesarios para la formación de complejos activados. El complejo FT-FVIIa activa directamente al factor IX cuyo déficit produce la hemofilia B. Este en presencia de calcio y del cofactor FVIII (activado por la trombina) cuyo déficit produce hemofilia A activan al factor X. El factor Xa a su vez en presencia de calcio y del otro cofactor el FV generan grandes cantidades de trombina (95%). En esta reacción inclusive participa el factor XI activado por las pequeñas cantidades de trombina de la fase de iniciación. Los cofactores (FV y FVIII) aceleran la velocidad de reacción y además constituyen los dos factores lábiles de la coagulación. Las grandes cantidades de trombina formadas intervienen en el desarrollo de las etapas siguientes de “formación” y de “consolidación y disolución”. La trombina actúa sobre el fibrinógeno convirtiéndolo en monómeros de fibrina cuya red atrapa los elementos formes de la sangre como eritrocitos, glóbulos blancos y plaquetas cerrando la etapa de formación del coágulo. La consolidación de este coágulo se realiza por la activación por parte de la trombina del inhibidor de la fibrinólisis (TAFI) que protege al coágulo de la proteólisis y del factor XIII que produce polímeros de fibrina estables. La rara deficiencia congénita del FXIII que se manifiesta clínicamente sólo en las formas homocigotas puede producir sangrado del cordón umbilical, hemorragia intracraneal o falla de suturas. Básicamente se forma el coágulo pero al no tener la consistencia adecuada se disuelve. Por otro lado, la trombina estimula nuevamente las plaquetas (PAR-4) y se produce la retracción del coágulo. Pero para que el sistema de coagulación no se propague indefinidamente estimula la activación de un inhibidor fisiológico la proteína C (vitamina K dependiente) que inactiva los cofactores (FV y FVIII). Esta activación se realiza a través de un cofactor presente en la célula endotelial la trombosmodulina. Cuando se produce una mutación en la molécula del FV (factor Leiden) existe una resistencia a la acción de la proteína C con un consiguiente riesgo aumentado de trombosis.

Otro inhibidor que se produce en la célula endotelial es el TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) que constituye el principal inhibidor del FT in vivo.

La antitrombina III (AT-III) que se sintetiza en el hígado pero no es vitamina K dependiente neutraliza los factores XII, XI, IX, X y trombina. In vivo los glicosaminoglicanos y heparan sulfato de la superficie de la célula endotelial aumentan la acción de la AT-III mediante cambios de conformación de la molécula. La heparina acelera la velocidad de reacción de la acción de la AT-III siendo el verdadero cofactor prueba de ello es que la heparina no tiene acción anticoagulante cuando se produce un déficit congénito de AT-III siendo este uno de los cuadros más dramáticos de trombosis. La heparina acelera también la acción del HC-II (Heparin Cofactor-II) pero a diferencia de la AT-III, el HC-II sólo inhibe trombina pero no el resto de los factores de la coagulación.

El sistema hemostático descrito está profundamente influenciado por la edad gestacional y postnatal del recién nacido. Los factores de la coagulación maternos no pasan la placenta hacia el feto. La sangre del feto comienza a coagular alrededor de las 11 semanas de la gestación. Al nacimiento, la concentración de los factores vitamina K dependientes (FII, FVII, FIX y FX) así como los factores XII y XI están reducidos al 50% de su concentración en el adulto y esto es aún mayor en prematuros. Sin embargo, los cofactores FV y FVIII se encuentran dentro de un rango similar al adulto. El factor von Willebrand (FvW) circula como grandes multímeros por lo cual la actividad del FvW se encuentra incrementada tanto en neonatos de término como prematuros. Las concentraciones de los anticoagulantes fisiológicos como la AT-III, proteína C y S, y TFPI están disminuidas también al nacimiento. La macroglobulina alfa-2 (alfa-2M) es un inhibidor del FXa y la trombina cuyo rol biológico en el adulto no es claro. En los neonatos y niños mayores se encuentra elevada y jugaría un papel preponderante en la inhibición de la trombita dado los bajos valores de ATIII. Como consecuencia tanto los mecanismos que generan trombina como aquellos que la inhiben están reducidos en el período neonatal.

A su vez el plasminógeno que es la proteína más importante del sistema fibrinolítico también tiene una menor concentración lo que se traduce en un estado de hipofibrinólisis (1). La mayoría de los factores de la coagulación alcanzan valores similares a los del adulto a los seis meses de vida. Las plaquetas también están influenciadas por la edad pero más desde el punto de vista cualitativo que cuantitativo. Generalmente el recuento plaquetario al nacer es similar al del adulto tanto en niños de término como de pretérmino pero los estudios de la función plaquetaria in vitro demuestran que son hiporeactivas. Sin embargo, el tiempo de sangría que evalúa in vivo la interacción entre las plaquetas y la pared vascular está acortado en RN sanos (2). Esto probablemente refleja la influencia de múltiples factores como el aumento de la concentración del FvW, la presencia de grandes multímeros de FvW, y el aumento del volumen de las plaquetas (3).

Comparado con los adultos los neonatos se caracterizan por una disminución de la síntesis de varios factores de la coagulación lo cual es responsable del alargamiento del tiempo de protrombina (TP) o del tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT). Sin embargo, los neonatos presentan una hemostasis clínica excelente aún luego de cirugía o trauma. La razón de esta discrepancia clínica-paraclínica sería que los niveles bajos de factores pro-coagulantes son compensados por niveles también bajos de anticoagulantes restaurándose el equilibrio hemostático (25). No existe evidencia que la corrección de estos índices (TP y APTT) reduzca los episodios hemorrágicos o mejore la sobrevida. Nos debemos guiar por la condición clínica del neonato y no simplemente “tratar los números” (26). A su vez, la generación de trombina en los capilares es más rápida y fuerte que en el adulto lo cual se demuestra in vitro pues se necesitan menores

cantidades de FT para la activación de la coagulación (27). Por ello, para obtener mejor información de la generación de trombina in vivo en neonatos se han desarrollado pruebas de generación de trombina in vitro. La medición de los fragmentos de protrombina 1+2 (F1+2) nos está indicando cuanta protrombina se convierte en trombina. Cada molécula de F1+2 se genera por cada molécula de trombina formada. Por otro lado, los complejos trombina-antitrombina (TAT) reflejan los mecanismos inhibitorios. Así, los F1+2 se encuentran con valores superiores a los del adulto en los recién nacidos lo cual significa una adecuada respuesta frente a la injuria por el sistema de coagulación neonatal. Por el contrario, los TAT tienen un valor inferior que en el adulto lo cual muestra una menor capacidad inhibitoria antitrombina del recién nacido (28).

Hasta hace algunos años se defendía el concepto de que la respuesta del organismo para mantener la hemostasis se debía principalmente a procesos que ocurrían en los sistemas biológicos del contenido (sangre) mientras que el continente se presentaba como una selectiva pero estática barrera fisiológica. Actualmente, se sostiene que son las células las que regulan los procesos fisiopatológicos a través de interacciones o mediante la liberación de factores solubles. Uno de ellos, el óxido nítrico (NO) como veremos enseguida revolucionó el concepto de molécula mensajera. El NO es un gas de producción endógena, de vida media muy corta, que actúa como una molécula mensajera. La transmisión de señales por un gas producido por una célula que penetra en la membrana y regula la función de otras células es un nuevo mecanismo en el organismo humano dado que hasta el momento todas las moléculas mensajeras descritas eran sustancias químicas. El NO fue descubierto en 1772 por Joseph Priestley pero por más de dos siglos fue considerado un gas tóxico componente del aire, del humo del cigarro y producto de degradación del metabolismo bacteriano. En 1980, Furchgott describe por primera vez el Factor Relajante Derivado del Endotelio (EDRF) producido por la célula endotelial frente a determinados estímulos como el ATP o la acetilcolina y que actuando sobre las células del músculo liso producía vasodilatación (29). En 1987, Palmer, Ferrige y Moncada sugieren que el EDRF es el NO el cual es producido mediante la oxidación de L-arginina (30).

En 1992, Malinsky definitivamente demuestra esta sugerencia mediante la medición directa in situ del NO en una célula endotelial (31). Finalmente, en 1998, Ferid Murad describe el mecanismo bioquímico por el cual el NO liberado por la célula endotelial produce relajación del músculo liso (32). Ese mismo año, Furchgott, Ignarro y Murad reciben el premio Nobel de Medicina por sus trabajos en la fisiología del NO. Luego, numerosos trabajos han demostrado que el NO tiene una vida media muy corta de 3 a 6 segundos en los tejidos y de 1 a 2 segundos en sangre, que es un neurotransmisor, un agente citostático que inhibe la proliferación de células cancerígenas y ciertos patógenos, que se libera frente a la acción de agentes

químicos (ATP, acetilcolina, bradiquinina, histamina) y físicos (fuerzas de flujo, luz ultravioleta, fuerzas electromagnéticas) y finalmente, lo que más nos interesa para este tema es que produce vasodilatación y es un potente antiagregante plaquetario (33).

El principal productor de NO del organismo es la célula endotelial que mediante una enzima, la NO sintetasa calcio dependiente transforma la L-arginina en L-citrulina y NO.

Sin embargo, el principal reservorio del NO en el organismo es el eritrocito. El NO penetra en el glóbulo rojo a través de un transportador de membrana (banda 3) para luego unirse a la hemoglobina y por ello es denominado el tercer gas (34). Pavlowski y Stamler demostraron que la hemoglobina se une al NO de manera similar al oxígeno tomándolo en los tejidos oxigenados y liberándolo en los tejidos hipóxicos actuando como vasodilatador y antiagregante asegurando el correcto flujo sanguíneo (35). La hemoglobina ejerce un efecto protector dado que el NO libre en la sangre rápidamente es oxidado a nitrato que es un metabolito inactivo. Esto es lo que se produce en caso de hemólisis intravascular. A su vez, el eritrocito hemolizado libera una arginasa intracelular que convierte la L-arginina en ornitina disminuyendo aún más la concentración de NO en los tejidos produciendo vasoconstricción y agregación plaquetaria (microtrombos) lo cual en algunos tejidos como el riñón puede provocar necrosis tubular aguda. Similarmente, se producen microtrombos en las crisis hemolíticas de la anemia falciforme.

Como ya vimos, las plaquetas neonatales y más frecuentemente las de los pretérmino muestran una hipofunción in vitro que es contrarrestada por una adecuada adhesión in vivo producida por la presencia de multímeros de FvW (36). Por el contrario, las plaquetas neonatales, tienen una reacción normal in vitro frente a inhibidores como el NO (37). Dado que en las unidades de cuidados intensivos neonatales se utiliza el NO inhalado, dado su efecto vasodilatador, para el tratamiento del síndrome de distress respiratorio o la hipertensión pulmonar persistente esto puede constituir un riesgo adicional para la presencia de síndromes hemorrágicos en los neonatos críticos.

Investigación de un neonato con síndrome hemorrágico

Comienza con una correcta anamnesis a la madre del RN para hallar antecedentes familiares o personales que puedan sugerirnos la causa del sangrado. Una historia familiar o sangrados en RN anteriores pueden sugerirnos alteraciones hemostáticas hereditarias. Complicaciones obstétricas o problemas durante el parto pueden también activar el sistema hemostático. Por último tanto drogas de uso materno o neonatal pueden alterar este mecanismo prestando particular atención a las que alteran el metabolismo de la vitamina K. Si el síndrome hemorrágico ocurre en RN sanos puede su-

gerirnos alteraciones congénitas o trombocitopenias inmunes (ver capítulo 6). Mientras que si el sangrado ocurre en neonatos enfermos nos orienta hacia alteraciones adquiridas del sistema hemostático.

Un estudio básico de la hemostasis que conste de cuatro pruebas, tiempo de trombina (TP) tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT), fibrinógeno y recuento de plaquetas debe ser ordenado inmediatamente en un RN con sangrado teniendo siempre en cuenta evitar errores preanalíticos como contaminación o activación de la muestra por una extracción dificultosa o un enrase incorrecto del tubo que lleva a una reacción anticoagulante sangre que no es correcta. De acuerdo a los resultados de estas cuatro pruebas se solicitarán ensayos para dosificar factores específicos y sólo en un número pequeño de otras circunstancias son necesarias pruebas más complejas para llegar al diagnóstico. Si obtenemos un APTT prolongado con las otras tres pruebas normales puede ser sugestivo de alteraciones como **hemofilia y enfermedad de von Willebrand** por lo cual en una segunda instancia investigaremos la concentraciones de los factores VIII y IX y ensayos para la detección de von Willebrand sin embargo el tipo I que es el más frecuente de esta enfermedad no se manifiesta clínicamente en el período neonatal dado que existe un aumento fisiológico del FvW al nacer como ya vimos. Algunos subtipos del tipo II que se manifiestan con trombocitopenia pueden ser causa de sangrados en el período neonatal.

El tipo III es una rara condición autosómica recesiva el cual es más común en poblaciones cosanguíneas. Típicamente ambos padres pueden ser asintomáticos. En esta situación el FvW puede estar totalmente ausente y una tendencia al sangrado puede manifestarse en el período neonatal y aquí los síndromes hemorrágicos cutáneo-mucosos son mucho más frecuentes que en las hemofilias. Para contrarrestar este cuadro hemorrágico se sugiere la infusión de factores comerciales de FVIII con pureza intermedia que tienen altas concentraciones de multímeros de FvW (4).

Las hemofilias son las alteraciones congénitas más frecuentes que se pueden manifestar en el período neonatal. La hemofilia A (déficit de FVIII) y la hemofilia B (déficit de FIX) son clínicamente indistinguibles y se heredan ligadas al sexo en especial al cromosoma X por lo cual es una enfermedad que la sufren los hombres y la transmiten las mujeres. Salvo en un caso, cuando el padre es enfermo y la madre portadora el 50% de la descendencia femenina puede sufrir la enfermedad. Por ello, es que se aconseja que no existan lazos de consanguinidad. La frecuencia es 10 veces superior para la hemofilia A. El factor VIII es un cofactor (al igual que el FV) que actúa sobre el FIX formando un complejo en la superficie plaquetaria para activar el FX en la fase de propagación del sistema celular de la hemostasis. El FVIII circula inactivo unido al FvW que lo protege de la acción inhibitoria de la proteína C. Las pequeñas cantidades de trombina que se forman en la etapa de inicio del proceso hemostático a través del

complejo FT-FVIIa rompe la unión FVIII-FvW activando los factores. El FVIII es una glicoproteína de PM 330.000 y el gen que lo origina se encuentra en el brazo largo del cromosoma X posición Xq28.

El tipo de sangrado difiere el que se observa en el período neonatal al de niños mayores. Generalmente el RN puede presentar hemorragias o hematomas luego de una punción venosa o por la administración profiláctica de vitamina K intramuscular, hemorragias del cordón umbilical, cefalohematomas y circuncisión. Sangrados mayores intra o extracraneales pueden ser reconocidos en esta etapa y en una revisión reciente el 41% de todos los casos reportados de sangrados durante el primer mes de vida se refieren a sangrados craneales (5). Estas hemorragias generalmente son el resultado de traumatismos durante el nacimiento y son de un pronóstico pobre (6). El 40 a 60% de los RN con hemofilia A severa presentan algún síntoma al nacimiento, el 40% dentro del primer año de vida y el 50% dentro del año y medio.

Como el FVIII no atraviesa la placenta y su concentración es normal o está moderadamente aumentada al nacimiento es casi siempre posible confirmar el diagnóstico de hemofilia A al nacimiento.

Por el contrario, el FIX se encuentra reducido significativamente al nacimiento (recordemos que es uno de los factores vitamina K dependientes) por lo cual para realizar el diagnóstico de los casos leves se debe esperar hasta la edad de los seis meses y a veces mujeres portadoras con niveles bajos de FIX pueden requerir reposición del factor para cubrir el parto sobre todo cuando se realiza cesárea. El factor IX es una glicoproteína de PM 56.000 y el gen que lo produce se encuentra en el brazo largo del cromosoma X en la posición Xq27. La desmopresina no tiene ningún efecto en portadoras de hemofilia B. Sin embargo, una prolongación fisiológica del APTT debe ser interpretada con cuidado y por otro lado una hemofilia A leve puede acompañarse de un APTT normal. Una dosificación de los factores VIII y IX en estos casos debe ser realizada cuando el sangrado clínico aparece como excesivo. Una vez que el diagnóstico se ha realizado una adecuada terapia de reemplazo del factor en déficit debe iniciarse con factores específicos de uso comercial doblemente inactivados. El riesgo de hemorragia intracraneana (HIC) es aproximadamente del 10% en neonatos hemofílicos de término (5) pero del 30% en prematuros no hemofílicos de menos de 1500g. Por tanto, la profilaxis y tratamiento de la HIC en prematuros hemofílicos es uno de los objetivos primordiales que se debe plantear en el cuidado neonatal. Existen pocos trabajos disponibles que nos brinden información acerca de la vida media del factor y porcentaje de recuperación en pretérminos siendo el caso publicado por Gale y colaboradores uno de los pocos que explicita el manejo de un pretérmino con hemofilia moderada (7). La Federación Mundial de Hemofilia (WFH) recomienda pautas para el manejo perinatal de posibles RN hemofílicos (8): realizar una ecografía prenatal para la determinación del sexo, es posible

el parto vaginal, la cesárea no estaría indicada solamente por la posibilidad de un RN con hemofilia, rápida determinación postnatal del nivel del factor de la coagulación de muestra obtenida del cordón umbilical para evitar subsecuentes punciones, la profilaxis con vitamina K debe realizarse vía oral y tampoco administrar otros medicamentos intramusculares, estudio ecográfico cerebral para HIC y realización de terapia de sustitución con factor comercial sólo por sangrado.

En el caso de la enfermedad de Von Willebrand (EVW) que se hereda bajo forma autosómica dominante el diagnóstico antenatal del feto no es necesario pues la tendencia al sangrado es relativamente baja. En la gestante, el nivel de FvW se incrementa durante la gestación y en particular en el último trimestre por lo cual el soporte hemostático por lo general no es necesario. Pero, los niveles de FvW pueden no aumentar significativamente durante el primer y segundo trimestre y una terminación precoz de la gestación se puede acompañar de una importante hemorragia. Aproximadamente el 80% de los casos son EVW tipo 1 que se caracteriza por niveles bajos de FvW pero con multímeros normales.

Si bien la enfermedad de von Willebrand es la coagulopatía congénita más frecuente en niños mayores rara vez se presenta clínicamente en los RN dado que las concentraciones de FvW aumentan al nacimiento con la presencia de grandes multímeros que producen mayor adhesividad plaquetaria. Los tipos 2 y 3, menos frecuentes, pueden estar presentes clínicamente al nacer y serán tratados con concentrados comerciales de FvW a una dosis de 5-40 UI/ml cada 12 o 24 horas inicialmente.

El FvW es una glicoproteína multimérica de PM 390.000 producida por un gen que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12 (herencia autosómica) en la posición 12 pter-p12. Transporta como ya vimos el FVIII evitando la degradación por la proteína C y es la molécula adhesiva más potente del organismo uniéndose al receptor GPIb de las plaquetas y al subendotelio.

En nuestro país contamos actualmente con un concentrado de FvW de origen plasmático, de alta pureza, doblemente inactivado (Wilate) con 400 UI de FvW y 450 UI de FVIII. El crioprecipitado contiene FvW pero no es un producto inactivado, no sabemos exactamente las unidades que contiene de FvW cada lote y produce más reacciones adversas por su componente plasmático sobrenadante. En estos casos, otra opción terapéutica es la desmopresina (DDAVP) dado que eleva los niveles de FvW y FVIII en sangre en los casos de hemofilia moderada o EVW tipo 1 que es el más frecuente (9). Los fabricantes anuncian que la DDAVP (Octastim) debe ser utilizada con cuidado en la gestación pues puede producir parto prematuro e hiponatremia principalmente cuando se realiza por vía intravenosa. Sin embargo, estos efectos adversos son raros y la DDAVP no tendría una contraindicación absoluta durante la gestación (8) pero esta droga no tiene acción demostrada en los otros subtipos de EVW (2A, 2B, y 3).

En el tipo 3 el FvW no aumenta significativamente en todas las gestaciones por lo cual una terapia sustitutiva con factor comercial puede estar requerida en algunos casos.

Generalmente las mujeres con EVW tienen un parto vaginal normal pero algunos estudios muestran un aumento significativo del riesgo de sangrado tanto de hemorragias primarias o secundarias en el postparto (10) (11). La DDAVP puede estar indicada en el postparto de EVW tipo 1 sabiendo que no existen en cantidades significativas en la leche materna.

En los RN la EVW tipo 3 puede ser diagnosticada rápidamente por una muestra de sangre de cordón pero es difícil diagnosticar las formas más leves o moderadas más frecuentes.

El tipo 2B se asocia con trombocitopenia la cual puede presentarse en el período neonatal y ser causa de sangrado.

Existen otras **coagulopatías congénitas denominadas “raras”** que comprende un grupo de deficiencias heredadas en forma autosómica recesiva pero que su tendencia hemorrágica puede manifestarse en los primeros días de vida (12) siendo las más comunes las alteraciones de los factores I, VII, X y XIII. En la deficiencia de factor XIII se manifiesta por un sangrado de tejidos blandos, de cordón umbilical o por dehiscencia de heridas dado que se forma un coágulo pero inestable. Aún en los casos más severos las pruebas del estudio básico de hemostasis son normales debiéndose hacer el diagnóstico utilizando un test específico para FXIII. Dado el alto riesgo de HIC tanto en las deficiencias severas de FXIII como de FVII se aconseja comenzar una profilaxis con factor una vez establecido el diagnóstico. En el caso del FXIII carecemos de un concentrado comercial por lo cual se utiliza el crioprecipitado o el plasma fresco. Se necesitan concentraciones bajas en sangre (2 a 5%) del factor para realizar una hemostasis y su vida media es prolongada (11 a 14 días) por lo cual el intervalo entre las dosis es largo. Por el contrario, el FVII tiene una vida media intravascular muy corta (2 a 3 horas) por lo cual no puede utilizarse plasma fresco sin causar una sobrecarga de volumen y el crioprecipitado carece de FVII. En nuestro país existe un concentrado comercial de FVII recombinante y activado que no tiene riesgos de transmitir patógenos (rFVIIa NovoSeven). La dosis recomendada es de 15-30 mcg/Kg de acuerdo a la situación clínica para mantener un nivel hemostático de 15 al 20%. Sin embargo, hasta el momento actual, nosotros conocemos dos pacientes con alteraciones congénitas de FVII que fueron diagnosticados en la edad adulta. Incluso uno de ellos recientemente fue sometido a una intervención quirúrgica en el Hospital de Clínicas previa infusión de FVII no produciéndose hemorragias (13).

Los síndromes hemorrágicos producidos por **coagulopatías adquiridas**, más frecuentes que las congénitas, son una de las mayores causas de morbi-mortalidad en los pretérminos pero más raras en los RN de término (14). La hemorragia que se presenta en los pretérminos patológicos es generalmente una HIC con una mayor frecuencia en las primeras 72 horas de vida.

Como estos RN presentaban una hipocoagulabilidad generalmente por el consumo de factores producidos por la patología de base se sugirió realizar infusiones de plasma fresco (PF) preventivas de HIC. Sin embargo, en una revisión de Cochrane muestra que la infusión rutinaria de PF no produce beneficio en disminuir la mortalidad y la HIC (15). En otra revisión, tampoco el clampeo tardío del cordón (30 a 120 segundos) parece estar asociado con una menor necesidad de transfusión de eritrocitos y a una menor incidencia de HIC (16). Sin embargo, el factor VII activado recombinante ha sido utilizado con éxito para el tratamiento de la HIC en pretérminos (17). El concentrado de factor VII ha sido autorizado su uso para pacientes hemofílicos con inhibidor, deficiencia congénita de FVII y para la trombostenia de Glanzmann. Pero, como el FVII activado es un rápido generador de trombina la enzima que convierte el fibrinógeno en fibrina, se está utilizando clínicamente para otros síndromes hemorrágicos (18). El Factor VII según el nuevo modelo celular de la hemostasis tiene dos mecanismos de acción. Uno dependiente del FT que inicia la coagulación formando pequeñas cantidades de fibrina en el sitio de la injuria vascular que aporta firmeza al tapón plaquetario pero también activa factores y células como las plaquetas que van a intervenir en la etapas siguientes de amplificación y propagación. Otro, independiente del FT por el cual el FVII activado actúa rápidamente sobre la superficie plaquetaria activando al factor X generando grandes cantidades de trombina produciendo un salto sobre los mecanismos iniciales de la hemostasis primaria y secundaria. De esta manera produce hemostasis rápidamente en trombocitopenias, trombocitopatías como la trombostenia de Glanzman, alteraciones hepáticas, hemorragias masivas, cirugías cardíacas, etc. Ya se ha demostrado su eficacia y seguridad para el tratamiento de la hemorragia en el pretérmino luego que un agresivo tratamiento transfusional no había sido efectivo (19). Dos dosis de 40 mcg/Kg separadas seis horas fueron suficientes para detener la hemorragia en un pretérmino de 1120g.

La enfermedad hemorrágica del RN ahora denominada **hemorragia por deficiencia de vitamina K** (Vitamin K Deficiency Bleeding-VKDB) ha disminuido su incidencia mediante la administración profiláctica de vitamina K al nacer. Las concentraciones de los factores vitamina K dependientes (II, VII, IX y X) están descendidas en los RN y en ausencia de vitamina K estos son inactivos. El RN puede presentar una deficiencia de vitamina K en el período neonatal porque hay un pasaje transplacentario de sólo el 10% de la vitamina K materna, porque el RN tiene una insuficiente colonización bacteriana intestinal al nacer, porque la leche materna tienen muy poca cantidad de vitamina K comparada con la leche de vaca y por último por el consumo de drogas maternas que actúan como antivitaminas K. La VKDB ha sido tradicionalmente clasificada en precoz, clásica y tardía dependiendo del tiempo de presentación y de los factores de riesgo asociados. La precoz se presenta en las primeras 24 horas y típicamente se asocia a

la ingestión antenatal de medicamentos que interfieren con el metabolismo de la vitamina K como los anticonvulsivantes (fenobarbital, difenilhidantoína) y antituberculosos (rifampicina). Puede presentarse con sangrados severos inclusive con hemorragia intracraneal. La clásica ocurre en la primer semana de vida por no administrar vitamina K al nacer en RN alimentados a pecho. Pueden ocurrir sangrados gastrointestinales, equimosis en los sitios de punción y a veces hemorragia intracraneana. La tardía desde la segunda semana hasta los seis meses de edad se asocia a la lactancia o a síndromes malabsortivos como diarrea, enfermedad celíaca, hepatitis, etc. Las manifestaciones hemorrágicas son variables (epistaxis, equimosis, gastrointestinales, de cordón, cefalohematoma, etc) pero sobretodo las formas tardías se asocian con HIC (20)

El diagnóstico se sospecha cuando existe inicialmente un tiempo de protrombina prolongado seguido por un APTT alterado pero con un fibrinógeno y un recuento plaquetario normales. La confirmación del diagnóstico requiere la dosificación de los factores vitamina K dependientes cuyos valores son corregidos con la administración de vitamina K. La deficiencia de vitamina K produce los FII, FVII, FIX y FX decarboxilados por lo cual son inactivos (protein induced by vitamin K absence, PIVKA).

En casos de hemorragia se puede administrar vitamina K intravenosa (1mg) en forma lenta pues puede producir arritmia o anafilaxia. La vía de elección es la subcutánea pero a pesar de ser de más rápida acción que la vía oral tiene una latencia de horas por lo cual es necesario asociarle plasma fresco (10-15ml/kg) o concentrados de complejo protrombínico (CCP). Estos tienen como ventaja frente al plasma que tienen menor volumen, se adquiere una concentración sanguínea más rápida de los factores vitamina K dependientes, se conoce exactamente la cantidad suministrada de cada uno de ellos y es un producto biológico doblemente inactivado. A pesar de que se recomienda su uso en dosis de 20 a 50 UI/kg no existen trabajos disponibles sobre su uso en neonatos. Con respecto al riesgo trombotico los CCP, como el que tenemos en nuestro país, de segunda generación, contienen inhibidores fisiológicos de la coagulación (proteínas C, S y Z) así como heparina para evitar este tipo de complicaciones.

Se han descrito varios casos de sangrado por administración de rifampicina durante la gestación. Para reducir el riesgo de sangrado algunos proponen administrar vitamina K a la embarazada en las últimas 4 semanas de la gestación. Sin embargo, el paso transplacentario es muy escaso por lo cual es dudosa su eficacia (21). En estos casos se recomienda una evaluación precoz del estado de la hemostasis al nacer y la rápida detección de signos de hemorragia. De ser así, se debe administrar vitamina K no intramuscular y terapia de reposición de los factores vitamina K dependientes.

La coagulación intravascular diseminada (CID) es un síndrome hemorrágico común en neonatos enfermos, secundario a numerosas patologías y clínicamente caracterizado por elementos de microtrombosis con falla

multiorgánica así como por hemorragias producidas por consumo de los factores de la coagulación. En los pretérminos se puede presentar asociada a síndrome de distress respiratorio, infecciones virales congénitas, infecciones bacterianas, hipotermia, aspiración de meconio o líquido amniótico. En los RN de término por asfixia, shock o liberación de FT durante el nacimiento. La paraclínica muestra una alteración de todas las pruebas básicas de la hemostasis (prolongación del PT y APTT, fibrinógeno y recuento de plaquetas descendidos) con aumento de D-dímeros y factores de degradación del fibrinógeno o la fibrina. Una trombocitopenia puede ser el primer signo de una CID en curso pero esta es la complicación hematológica más frecuente durante el período neonatal sobretodo en las unidades de cuidados intensivos. Una trombocitopenia severa y persistente puede ser indicador de una CID subyacente. Se produce por una activación endógena del sistema hemostático principalmente por citoquinas que activan el FT de los monocitos circulantes o la célula endotelial produciendo depósitos de fibrina intravascular, con disminución de la fibrinólisis y producción de microtrombosis que puede llevar a la falla multiorgánica. El consumo de los factores de la coagulación y de las plaquetas puede producir hemorragias. El tratamiento prioritario es el de la causa patológica que origina la CID. En los casos de hemorragia se administran concentrados plaquetarios, plasma fresco y/o crioprecipitados para mantener un recuento de plaquetas por encima de 50.000, un fibrinógeno de 100 mg% y un APTT y TP con valores cercanos a los normales. No se aconseja el uso de heparina en las formas hemorrágicas pero estaría indicada en las formas tromboticas. La CID se observa frecuentemente en neonatos con **sepsis** o enterocolitis necrotizante (NEC). El síndrome hemorrágico es una frecuente complicación de la sepsis sobretodo en pretérminos. En la sepsis el modelo celular de la hemostasis es iniciado, al igual que cuando se produce una injuria vascular, por el factor tisular (FT). En la infección la estimulación es endógena, los lipopolisacáridos de los gérmenes estimulan a los monocitos circulantes que liberan FT y citoquinas pro-inflamatorias que producen una disfunción endotelial por la cual las células endoteliales exponen el FT normalmente encriptado evitando el contacto con el FVII circulante. Aquí, al igual que cuando se produce una lesión vascular, son las células que regulan la respuesta hemostática. El FT liberado de los monocitos circulantes y de las células endoteliales se une rápidamente al FVII circulante formando un complejo que activa el resto de las fases del sistema de coagulación. La consecuencia de la formación de fibrina intravascular es por un lado la microtrombosis que puede producir fallas multiorgánicas y por otro el consumo de factores de la coagulación y células como las plaquetas que producen hemorragias. En la trombocitopenia severa de la CID puede actuar además un mecanismo central la hemofagocitosis. Este proceso patológico es producido por la fagocitosis de megacariocitos y otras células hematopoyéticas por los monocitos y macrófagos hipotética-

mente en respuesta a los niveles altos de factor estimulante de colonias de macrófagos que se observa en la sepsis (22).

La disfunción endotelial produce también una disminución de los inhibidores fisiológicos de la coagulación y una hipofibrinólisis mecanismos que tienden a agravar y perpetuar el cuadro clínico. El tratamiento principal es el de la causa que produce la CID. En el caso de la sepsis la antibioticoterapia con buena hidratación y oxigenación. La hemorragia puede ser tratada con PF (10-15 ml/Kg) para reponer los factores en déficit, crioprecipitado (5-10 ml/Kg) para aumentar los niveles de fibrinógeno y concentrados plaquetarios (10-15 ml/Kg) para mantener un recuento por encima de las 50.000 por mm^3 . No existe evidencia que el tratamiento de la coagulopatía no sintomática sea efectivo (23). Tampoco el recambio plasmático ha mostrado ventajas en el tratamiento de niños con meningococemia (24). No existe evidencia científica clara para que el tratamiento con concentrados comerciales de AT-III o proteína C recombinante activada (Xigris-Roche), sea una indicación rutinaria en los neonatos con sepsis y CID al mismo tiempo (23).

La NEC es un cuadro clínico severo que se presenta más frecuentemente en pretérminos de menos de 1500 g y generalmente se asocia a RN con sepsis o infección gastrointestinal.

Las complicaciones hematológicas asociadas a NEC fueron descritas hace más de 30 años e incluyen trombocitopenia, CID, neutrofilia o neutropenia y anemia hemolítica (38). No todas las muertes que se producen por NEC corresponden a complicaciones hematológicas pero estas pueden contribuir significativamente a la mortalidad por NEC. La administración masiva de hemocomponentes sigue siendo necesaria para tratar efectivamente las alteraciones hematológicas severas.

La trombocitopenia se encuentra presente en el 65 a 90% de los neonatos con NEC y los recuentos inferiores se han asociado con la severidad de la enfermedad (39). En la NEC el recuento plaquetario cae rápidamente, en horas, lo cual sugiere un mecanismo periférico de consumo más que un déficit de la producción lo cual fue demostrado dado que los estudios de médula ósea mostraron un número y maduración normal de megacariocitos (38)(39).

Las transfusiones de plaquetas logran aumentar el recuento sólo por un breve período de tiempo (24 a 48 horas) (40).

El factor activador de plaquetas (PAF) es uno de los implicados en el mecanismo patológico de la NEC. Es una citoquina inflamatoria que contribuye a la necrosis del intestino (41). La leche materna contiene una enzima, la acetilhidrolasa, que metaboliza el PAF. En los pretérminos alimentados con leche materna se previene la NEC (42).

Las alteraciones de la coagulación se observan frecuentemente asociadas a NEC presentado CID en los cuadros más severos. El tratamiento continúa siendo de reposición con factores de la coagulación. Contrariamente mi-

crotrombosis pueden ocurrir lo cual contribuye a la falla orgánica. La anemia se asocia frecuentemente a la NEC y tiene características de anemia hemolítica asociada a la microangiopatía trombótica dado que en la lámina periférica se presentan esquistocitos, esferocitos y acantocitos. Entre el 25 a 40% de los neonatos con NEC presentan evidencias de fragmentación eritrocitaria en la periferia (38).

Por otro lado, más del 34% presentan activación del antígeno T el cual normalmente se encuentra encriptado en la membrana del eritrocito (43). El antígeno T queda expuesto en la membrana del eritrocito mediante la acción de ciertas enzimas bacterianas o virales. Además, algunas bacterias o vacunas contienen sustancias idénticas al antígeno T lo cual explica la presencia de anticuerpos anti-T en la mayoría de los plasmas adultos. Cuando la sangre transfundida tiene anticuerpos anti-T puede agravarse el cuadro clínico por lo cual se recomienda el uso de hemocomponentes lavados para el tratamiento de estos neonatos (44). La activación del antígeno T en los neonatos con NEC se asocia con un aumento de la incidencia de hemólisis, hiperbilirrubinemia, hiperkalemia, insuficiencia renal, cirugía y muerte (45).

La causa de la anemia en la NEC también puede deberse a hemorragias generalmente asociada a trombocitopenia, por reiteradas extracciones de sangre para estudios de laboratorio o a la prematuridad. La producción de eritropoyetina (EPO) está disminuida en los procesos inflamatorios por acción de las citoquinas. Los receptores celulares de EPO están presentes en las células del intestino los cuales tendrían un rol fisiológico en el desarrollo postnatal de este órgano pero, además de ser una hormona trófica evitaría la apoptosis celular. En estudio realizado, se demostró que los neonatos tratados con EPO para la prevención y tratamiento de la anemia de la prematuridad tenían una menor incidencia de NEC comparados con los tratados con placebo (46).

La EPO también está presente en la leche materna y es posible que juegue un rol directo en la prevención de la NEC de manera similar a lo que ocurre en el adulto en la prevención de la necrosis tubular aguda luego de una hemólisis intravascular (47).

Estudios recientes muestran que el NO está implicado en el mecanismo patogénico de la NEC (48) (49) (50). En los neonatos con NEC se asocia una disminución de la concentración en plasma de arginina lo cual se traduce en una menor disponibilidad de NO, jugando este descenso un rol importante en la fisiopatología de la NEC al producir vasoconstricción y agregación plaquetaria inductores de la microtrombosis, también de forma similar a lo que ocurre en la necrosis tubular aguda renal. Por tal razón, se propone un estudio multicéntrico donde se utilice la suplementación con arginina en prematuros con NEC (51).

La trombocitopenia, menos de 100.000 plaquetas por mm^3 , está presente

en la mayoría de los pretérminos de bajo peso y en los neonatos enfermos (52). Estos pacientes reciben repetidas transfusiones de plaquetas. El número de transfusiones de plaquetas administradas en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCI) se ha hallado como predictor de la tasa de mortalidad. Los neonatos con trombocitopenia tuvieron una tasa de mortalidad 5% mayor que los que tenían un recuento normal (53). La mayoría de las transfusiones de plaquetas que se administran en las UCI no son para tratar sangrados clínicos (terapéuticas) sino para prevenir los sangrados (profilácticas) basadas generalmente en un nivel arbitrario del recuento plaquetario (54). Un 20% de los neonatos que ingresan a UCI presentan trombocitopenia. Las causas de las trombocitopenias neonatales pueden ser asfixia, CID, infección viral o bacteriana, NEC, EHP severa (anti-D, anti-Kell), fototerapia, síndrome de distress respiratorio, ventilación asistida, pequeño para la edad gestacional, aspiración de meconio, hipertensión pulmonar, circulación extracorpórea, policitemia y trombosis. En los neonatos normales la trombocitopenia es mucho menos frecuente (4,1%) y las principales causas son las inmunes (auto o alo) o el uso de drogas maternas que causan trombocitopenia (sulfas, diuréticos, AINE, heparina, anticonvulsivantes, etc), hipertensión, toxemia, infección durante la gestación, anomalías placentarias o congénitas. En las infecciones congénitas como el CMV, toxoplasmosis y sífilis puede asociarse una anemia hemolítica a valores variables de trombocitopenia. Inclusive estas infecciones pueden causar hidrops no inmunológicos. El parvovirus B19 puede también producir hidrops no inmune, no hemolítico por anemia hiporegenerativa y se asocia también frecuentemente a trombocitopenia (ver historia clínica del capítulo seguridad sanguínea).

Similarmente, los cuadros de hidrops inmunológicos (anti-RhD, anti-Kell) presentan cuadros de trombocitopenias asociados.

Más del 50% de los neonatos de bajo peso (menos de 1000 g) y alrededor del 4% de todos los neonatos de las UCI reciben múltiples transfusiones de plaquetas profilácticas (52). Sin embargo, no se ha demostrado el beneficio de esta práctica transfusional para prevenir la hemorragia intraventricular en neonatos de menos de 1500 g con recuentos entre 50.000 y 150.000 plaquetas (55). La mayoría de los pacientes de UCI que reciben múltiples transfusiones de plaquetas tienen una trombocitopenia por consumo (NEC, sepsis, CID) y menos frecuentemente un defecto en la producción. Sin embargo, en algunos casos como en la sepsis o NEC, puede existir un mecanismo mixto por hemofagocitosis medular (56).

El recuento plaquetario no debe ser tomado como único indicador de sangrado dado que influyen otros elementos como el mecanismo patológico que produce la trombocitopenia (en algunos está contraindicada la transfusión de plaquetas), la funcionalidad plaquetaria, la masa de las plaquetas circulantes, otras alteraciones de la hemostasis asociadas y la presencia o no de inflamación (57). Ya vimos que las plaquetas del neonato tienen una

correcta funcionalidad in vivo y además son de mayor tamaño que las del adulto. Ante un mismo valor de recuento plaquetario un neonato puede desarrollar sangrado sólo cuando se asocia un proceso inflamatorio.

Siempre antes de indicar una transfusión de plaquetas se deben valorar los riesgos y beneficios de esta terapéutica biológica. Dentro de los riesgos la transmisión de infecciones o el agravamiento de situaciones como NEC, hipertensión pulmonar, edemas o de la función respiratorio por un TRALI (insuficiencia respiratoria aguda asociada a transfusión) no reconocido clínicamente (58).

En un estudio prospectivo reciente (59), sobre 3498 neonatos que fueron admitidos en UCI desarrollaron una trombocitopenia severa (menor de 60.000 plaquetas) 194 (5,5%) de los cuales 169 fueron seguidos clínicamente, con recuentos plaquetarios y si recibían transfusiones de plaquetas. En este estudio se determinó que dentro del grupo de neonatos con trombocitopenia las que eran secundarias a retardos de crecimiento intrauterino o a hipertensión materna eran los que tenían menor riesgo de sangrados mayores. Por contrario, el grupo de trombocitopenias secundarias a sepsis, NEC o CID eran los de mayor riesgo de desarrollar hemorragias. En estos cuadros influye no sólo el número de plaquetas, sino la alteración de la función y la inflamación. El primer período de trombocitopenia ocurre en la primera semana de vida (media de 4 días). El riesgo de sangrados mayores (intracraneales y pulmonares, gastrointestinales) es menor luego de la primera semana.

La mejor terapia es tratar la causa de la trombocitopenia. Neonatos con sangrados clínicos debido a trombocitopenias secundarias requieren transfusiones de plaquetas terapéuticas hasta que la causa sea resuelta manteniendo un nivel de plaquetas por encima de 50.000. Una dosis de 1 por 10^{10} plaquetas por Kg de peso es recomendada. Un concentrado de plaquetas de donante al azar contiene 5,0 por 10^{10} plaquetas en 40 a 70 ml de plasma y uno de aféresis un mínimo de 3 por 10^{11} en un volumen de 200 a 280 ml por lo cual deben ser alicuotados mediante conector estéril. Se calcula una dosis de 15 ml/Kg. No existe en cambio guías establecidas para las transfusiones profilácticas. La mayoría de los centros transfunden a los neonatos cuando los recuentos plaquetarios se encuentran entre 20.000 y 50.000. Pensamos que una guía de seguridad sería transfundir neonatos enfermos y/o pretérminos con recuentos inferiores a 30.000 esperando que en un futuro estudios prospectivos puedan establecer el mejor criterio clínico y paraclínico para indicar una transfusión de plaquetas.

Cuando se presenta una trombocitopenia aislada en un RN sano, por lo general, son de causa inmune las cuales son tratadas en un capítulo aparte de este libro.

Si bien un 20% aproximadamente de los neonatos en las unidades de cuidados intensivos (UCI) reciben una o más transfusiones de plaquetas, una pequeña porción de estos son transfundidos con grandes cantidades de pla-

quetas (mayor de 20 unidades).

En un estudio realizado entre 2002 y 2007 sobre un total de 12329 pacientes en UCI sólo 45 de ellos recibieron más de 20 unidades de plaquetas con una media de 29 (rango 20-79). Cuarenta y tres de los 45 pacientes presentaban una trombocitopenia por consumo. La gran mayoría de las transfusiones fueron administradas profilácticamente y la mayoría de los pacientes fallecieron a pesar de que la causa de muerte no estuvo relacionada con sangrado. Si las transfusiones de plaquetas se hubieran administrado sólo para tratar síndromes hemorrágicos se hubiera reducido su número en un 80% (60).

En 1954, se demuestra que los antígenos A y B están presentes en la membrana de las plaquetas (61). En 1965, Aster establece que cuando se transfunden plaquetas incompatibles en el sistema ABO estas producen un menor recuento en el receptor comparadas con las ABO compatibles (62) y principalmente cuando hay una incompatibilidad mayor (plaquetas grupo A y receptor 0). Los antígenos del sistema ABO se expresan en la membrana plaquetaria sobre la glicoproteína GPIIb/IIIa. Los individuos A1 expresan completamente el antígeno A en la membrana plaquetaria sin embargo los A2 no por lo cual las plaquetas de estos últimos son compatibles con los receptores del grupo 0. En un estudio realizado en 1978, se demostró que la incompatibilidad ABO no influenciaba el recuento postransfusional en pacientes pediátricos (63) lo cual se debe probablemente a que los niveles de los anticuerpos anti-A y/o anti-B alcanzan los niveles del adulto entre los 5 a 10 años de edad. En un trabajo reciente, se evaluó la incompatibilidad ABO en la transfusión de plaquetas a 50 pacientes pediátricos con una edad media de 6,7 años (64). Se encontró que los incrementos postransfusionales fueron un 34% menor cuando hubo una incompatibilidad ABO mayor que en los pacientes que recibieron plaquetas ABO idénticas. Por el contrario, cuando existía incompatibilidad mayor A2 o incompatibilidad ABO menor (plaquetas de grupo 0 y receptor A o B) el incremento postransfusional fue similar a las ABO idénticas. Sin embargo, en la incompatibilidad menor las aglutininas anti-A y/o anti-B administradas pasivamente pueden producir una hemólisis intravascular aguda en el receptor particularmente en receptores pediátricos de menor volemia. Dado que las plaquetas de aferesis derivan de un sólo donante tienen mayor riesgo de producir hemólisis que cuando se realiza un pool con plaquetas de donante múltiples. Una forma de prevenir la hemólisis es determinar el título de aglutininas a todos los donantes del grupo 0. Una alternativa es reducir el volumen plasmático cuando se transfunden plaquetas con incompatibilidad ABO menor o eliminar totalmente el plasma restituyéndolo con soluciones aditivas como se realiza en Europa (65).

Dado que la mayoría de las transfusiones de plaquetas en los pacientes trombocitopénicos se realizan de manera profiláctica y que el estudio PLADO (66) demuestra que el riesgo de sangrado no cambia cuando se realizan

dosis bajas de plaquetas comparado con dosis estándar o inclusive haría suponer que la incompatibilidad ABO no alteraría el riesgo de sangrado en aquellos pacientes que no presentan síndrome hemorrágico cuando se utilizan dosis estándar. Contrariamente si las dosis bajas de plaquetas se establecen como norma para la indicación profiláctica la incompatibilidad ABO puede tener significación clínica. En los pacientes con sangrados activos es casi imposible demostrar que la incompatibilidad ABO afecta directamente el incremento postransfusional pero parece apropiado que en estos casos las plaquetas transfundidas sean las que tengan una mejor sobrevivencia (65).

Al contrario de lo que sucede con el sistema ABO, los antígenos del sistema Rh no se expresan en la superficie plaquetaria por lo cual la incompatibilidad en este sistema no afecta los incrementos o la sobrevivencia de las plaquetas transfundidas. Sin embargo, la presencia de eritrocitos contaminantes de los concentrados plaquetarios pueden inmunizar al receptor RhD negativo cuando recibe plaquetas de donantes RhD positivos.

Algunos centros asistenciales cuando existen neonatos Rh D negativos trombocitopénicos que necesitan transfusión de plaquetas, los transfunden con alícuotas de plaquetas RhD negativas obtenidas por aferesis de un único donante. Pero, si no hay plaquetas RhD negativas disponibles ¿existen algunas medidas terapéuticas alternativas?. ¿Se pueden transfundir, por ejemplo, plaquetas RhD positivas y luego administrar inmunoglobulina anti-D al neonato para evitar la aloinmunización?. En un estudio realizado por Molnar y colaboradores se realizaron 2300 transfusiones de plaquetas RhD incompatibles a pacientes pediátricos hematóncológicos durante un período de 3,5 años. A ningún paciente se le administró inmunoglobulina anti-D en forma profiláctica. Todos los pacientes recibieron plaquetas obtenidas por aferesis y ninguno desarrolló anticuerpos anti-D (67). La condición clínica de estos pacientes, al ser inmunodeprimidos, disminuye la probabilidad de la respuesta inmunitaria. La mayoría está de acuerdo que los neonatos tienen una respuesta inmune disminuida en particular en respuesta a la carga antigénica de las transfusiones por lo cual son considerados como equivalentes a los pacientes hematóncológicos pediátricos. Basados en estos trabajos se podría transfundir plaquetas RhD positivas a neonatos RhD negativos sin la administración de inmunoglobulina anti-D preventiva. Sin embargo, un caso publicado por Haspel y colaboradores en 2004 ha llamado la atención dado que un niño de 17 semanas de edad, RhD negativo, que recibió dos concentrados de plaquetas RhD positivas obtenidas de sangre total, en una cirugía por una cardiopatía congénita, desarrolló anticuerpos anti-D (68). Basados en esta apreciación los autores recomiendan que a todos los pacientes pediátricos RhD negativos que reciben plaquetas de donantes RhD positivos se les debe administrar inmunoglobulina anti-D preventiva. Es de hacer notar que en los pacientes trombocitopénicos se debe infundir inmunoglobulina anti-D intravenosa

para evitar la formación de hematoma en el sitio de punción intramuscular. Sin embargo, la mayoría de los médicos clínicos establecen, según su experiencia, que los niños menores de 3 o 4 meses no desarrollan anticuerpos contra antígenos eritrocitarios por lo cual el caso descrito en el trabajo anterior sería una rara excepción. Por tanto, no administran inmunoglobulina anti-D en niños menores de 3 o 4 meses que reciben plaquetas incompatibles en el sistema Rh, sobretodo si son de sexo masculino. Sólo administran inmunoglobulina cuando son de sexo femenino.

Dos factores influyen directamente la posibilidad de desarrollar anticuerpos anti-D. Uno el nivel de inmunosupresión del receptor y dos la cantidad de eritrocitos presentes en el hemocomponente transfundido. Las plaquetas obtenidas de sangre total de donantes múltiples tienen más eritrocitos que las obtenidas por aferesis. Así, los receptores inmunosuprimidos que reciben plaquetas de aferesis RhD incompatibles tiene baja probabilidad de desarrollar anticuerpos anti-D. Por el contrario, receptores inmunocompetentes que reciben plaquetas RhD incompatibles obtenidas de sangre total de donantes múltiples tienen alta probabilidad de desarrollar anti-D.

Cuando una unidad de plaquetas contiene 2 ml de eritrocitos el nivel de contaminación se hace visible. Por lo general, la mayoría de los servicios no utilizan estos concentrados para la transfusión de receptores RhD negativos. Por tanto, con la infusión de una minidosis de 50 mcg de inmunoglobulina anti-D por cada transfusión de plaquetas RhD positivas a neonatos de sexo femenino estaríamos realizando un correcto bloqueo del sistema inmunitario.

Sin embargo, en el caso específico de los neonatos no se ha podido establecer aún, de forma definitiva, la capacidad que tienen para desarrollar anticuerpos anti-D y tampoco se ha logrado establecer la eficacia de la inmunoprofilaxis bajo esta condición. Solamente trabajos randomizados, bien definidos y bien conducidos, podrán dilucidar en un futuro estos aspectos aún no resueltos en la transfusión de plaquetas.

En un trabajo reciente se ha demostrado que el riesgo de hemorragia intracraneana (HIC) en los neonatos nacidos de madres drogadictas es seis veces mayor que en los del grupo control (69). En un análisis prospectivo se demostró un aumento de la HIC en niños de término solamente en el grupo de gestantes que consumían altas dosis de cocaína (70).

Un trabajo retrospectivo siguiente halló similares resultados en pretérminos (71).

Cuando se analizaron recién nacidos con bajo peso para la edad gestacional de madres adictas a la cocaína, un estudio mostró una alta incidencia de hemorragia intraventricular grado I y II (72) mientras otro trabajo no encontró un riesgo elevado de hemorragia intraventricular grados III y IV (73). El mecanismo fisiopatológico de la hemorragia asociada al consumo de

cocaína no ha sido todavía bien determinado. Influyen factores producidos por la droga como vasoconstricción, hipoxia e hipertensión (74).

Recientemente se ha publicado un caso clínico de un pretérmino de 29 semanas, nacido de madre adicta a la cocaína por vía intravenosa, que desarrolla isquemia e infartos multiorgánicos. A las 36 horas de vida agrega una hemorragia intraventricular bilateral.

Los autores proponen estudios de hemostasis y ecografías craneales precoces en recién nacidos de madres adictas a la cocaína por vía intravenosa (75).

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the haemostatic system in the neonate and young infant. *J Pediatr Hematol Oncol* 1990;12:95-104.
- 2- Andrew M, Paes B, Bowker J et al. Evaluation of an automated bleeding time device in the newborn. *Am J Hematol* 1990;35:275-277.
- 3- Michelson AD. Platelet function in the newborn. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:507-512.
- 4- Guidelines for the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary bleeding disorders. *Haemophilia* 2003;9:1-23.
- 5- Kulkarni R, Lusher J. Perinatal management of neonates with haemophilia. *Br J Haematol* 2001;112:264-274.
- 6- Ljung R, Lindgren AC, Patrini P et al. Normal vaginal delivery is recommended for hemophilia carrier gravidae. *Acta Paediatrica* 1994;83:609-611.
- 7- Gale RE et al. Management of a premature infant with moderate haemophilia A using recombinant factor VIII. *Haemophilia* 1998;4:850-853.
- 8- Giangrande PLE. Pregnancy in women with inherited bleeding disorders in: Treatment of Hemophilia nro 29 Feb 2003 (WFH).
- 9- Mannucci PM. Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years. *Blood* 1997;90:2515-2521.
- 10- Greer IA, Lowe GDO, Walker JJ, Forbes CD. Haemorrhagic problems in obstetrics and gynaecology in patients with congenital coagulopathies. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1991;98:909-918.
- 11- Kadir RA, Lee CA, Sabin CA, Pollard D, Economides DL. Pregnancy in women with von Willebrand disease or factor XI deficiency. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1998;105:314-321.
- 12- Mannucci PM, Duga S, Peyvandi F. Recessively inherited coagulation disorders. *Blood* 2004;104:1243-1252.
- 13- Insagaray J, Lemos F, Rodríguez I, Rivas G, Decaro J. Tratamiento con factor VII recombinante activado en el déficit congénito de FVII de la coagulación. XXVIII Congreso Mundial de la Federación Mundial de Hemofilia (WFH) en Estambul- Turquía. Junio de 2008.
- 14- McDonald MM, Koops BI, Jonson ML, Guggenheim MA, Rumack CM, Mitchell SA, Hathaway WE. Timing and antecedents of intracranial hemorrhage in the newborn. *Pediatrics* 1984;74:32-36.
- 15- Osborn DA, Evans N. Early volume expansion for prevention of morbidity and mortality in very preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;2:CD002055.
- 16- Rabe H, Reynolds G, Diaz-Rossello J. Clampeo precoz versus clampeo tardío del cordón umbilical en prematuros. *La Biblioteca Cochrane Plus* 2006 Número 2. www.thecochranelibrary.com.
- 17- Mathew P. The use of rFVIIa in non-hemophilia bleeding conditions in pediatrics. A systematic review. *Thromb Haemost* 2004;92:738-746.
- 18- Hedner U. NovoSeven as a universal agent. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11(suppl1):S107-S111.

- 19- Chuansumrit A, Nuntnarumit P, Okascharoen C, Teeraratkul S, Suwansingh S, Supapanachart S. The use of recombinant activated factor VII to control bleeding in a preterm infant undergoing exploratory laparotomy. *Pediatrics* 2002;107:169-171.
- 20- Chalmers EA. Neonatal Coagulation Problems. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2004; 89:F475-F478.
- 21- Ribes C, Rossich R, Aramburo A, Danés I, Bernat M, Castillo F. Sangrado de riesgo vital en un recién nacido hijo de madre tratada con rifampicina. *An Pediatr (Barc)* 2006;65:629-630.
- 22- Levi M, Opal S. Coagulation abnormalities in critically ill patients. *Critical Care* 2006;10:1-9.
- 23- Manco-Johnson MJ, Goldenberg N. Use of fresh frozen plasma and plasma proteins in newborn infants. *Haematologica reports* 2006;2:71-74.
- 24- Churchwell KB, Mcmanus ML, Kent P et al. Intensive blood and plasma exchange for the treatment of coagulopathy in meningococemia. *J Clin Apheresis* 1995;10:171-174.
- 25- Tripodi A, Ramenghi LA, Chantarangkul V, de Carli A, Clerici M, Groppo M, Mannucci PM. Normal thrombin generation in neonates in spite of prolonged conventional coagulation test. *Haematologica* 2008;93:1256-1259.
- 26- Murray NA, Roberts IA. Neonatal transfusion practices. *Arch Dis Child Fetal Neonatol* 2004;89:F101-F107.
- 27- Cvrin G, Gallistl S, Leschnik B, Muntean W. Low tissue factor pathway inhibitor (TFPI) together with low antithrombin allows sufficient thrombin generation in neonates. *J Thromb Haemost* 2003;1:263-268.
- 28- Muntean W, Leschnik B, Baier K, Cvrin G, Gallistl S. In vivo thrombin generation in neonates. *J Thromb Haemost* 2004;2:2071-2072.
- 29- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
- 30- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
- 31- Malinsky T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992;358:676-678.
- 32- Murad F. Nitric oxide signaling : would you believe that a simple free radical could be a second messenger, antacid, paracrine substance, neurotransmitter and hormone?. *Recent Prog Horm Res* 1998;53:43-59.
- 33- Schechter AN, Gladwin MT. Hemoglobin and paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med* 2003;348:1483-1485.
- 34- Dzik S. Nitric oxide: nature third respiratory gas. *Transfusion* 2002;42:1532-1533.
- 35- Pawloski JR, Stamler JS. Nitric oxide in RBCs. *Transfusion* 2002;42:1603-1609.
- 36- Israels SJ, Rand ML, Michelson AD. Neonatal platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:363-372.
- 37- Keh D, Gerlach M, Dudenhausen W, Woltmann W, Falke K, Gerlach H. Effects of nitric oxide (NO) on platelets in neonates. *Critical Care* 1998; 2(suppl 1):P028.
- 38- Hutter JJ, Hathaway WE, Wayne ER. Hematologic abnormalities in severe neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1976;88:1026-1031.
- 39- Patel C. Hematologic abnormalities in acute necrotizing enterocolitis. *Pediatr Clin N Am* 1977;24:579-584.
- 40- Sola M, Vecchio A, Rimsza L. Evaluation and treatment of thrombocytopenia in the neonatal intensive care unit. *Neonatal Hematol* 2000;27:655-679.
- 41- Caplan M, Sun X, Hsueh W. Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rats: the role of platelet-activating factor (PAF-Acether). *Gastroenterology* 1990;99:979-986.
- 42- Furukawa M, Narahara H, Yasuda K, Johnston J. Presence of platelet-activating factor-acetylhydrolase in milk. *J Lipid Res* 1993;34:1603-1609.
- 43- Hall N, Ong EGP, Ade-Ajayi N et al. T cryptantigen activation is associated with advanced necrotizing enterocolitis. *J pediatr Surg* 2002;37:791-793.
- 44- Kling PJ, Hutter JJ. Hematologic abnormalities in severe neonatal necrotizing enterocolitis : 25 years later. *Journal of Perinatology* 2003;23:523-530.
- 45- Osborn DA, Lui K, Pussell P, Jana AK, Desai AS, Cole M. T an Tk antigen acyivation in

- necrotizing enterocolitis: manifestations, severity of illness, and effectiveness of testing. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 1999;80:F192-F197.
- 46- Ledbetter Dj, Juul SE. Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *J Pediatr Surg* 2000;35:178-182.
- 47- Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Jonson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:348_355.
- 48- Caplan MS, Jilling T. New concepts in necrotizing enterocolitis. *Current Opinion in Pediatrics* 2001;13:11-115.
- 49- MacKendrich W, Caplan M, Hsueh W. Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced bowel injury in the rat. *Pediatr Res* 1993;34:222- 228
- 50- Nadler EP, Dickinson E, Knisely A et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis. *J Surg Res* 2000;92:71-77.
- 51- Neu J. Arginine supplementation for neonatal necrotizing enterocolitis: are we ready? *British Journal of Nutrition* 2007;97:814-815. 5
- 52- Christensen RD, Henry E, Wiedmeier SE, Stoddard RA, Sola-Visner MC, Lamberts DK, Kiehn TI, Ainsworth S. Thrombocytopenia among extremely low birth weight neonates: data from multihospital healthcare system. *J Perinatol* 2006;26:348-353.
- 53- De Alarcón P. Newborn platelet disorders, *En Neonatal Hematology. De Alarcón P y Werner E, Ed. Cambridge University Press, New York, USA, 2005. Cap.10 pag187.*
- 54- Calhoun DA, Christensen RD, Edstrom CS, Kuul SE, Ohis RK, Schibler KR, Sola MC, Sullivan SE. Consistent approaches to procedures and practices in neonatal hematology. *Clin Perinatol* 2000;27:733-753.
- 55- Andrew M, Vegh P, Caco C, Kirpalani H, Jefferies A, Ohlson A, Watts J, Saigal S, Milner R, Wang E. A randomized, controlled trial of platelet transfusions in thrombocytopenic premature infants. *J Pediatr* 1993;123:285-291.
- 56- Brown RE, Rimsza LM, Pastos K, Young I, Saxonhouse MA, Bailey M, Lawrence RM, Sola-Visner MC. Effects of sepsis on neonatal thrombocytopenia. *Pediatr Res* 2008; jun 11 (Epub ahead to print).
- 57- Christensen RD, Paul DA, Sola-Visner MC, Baer VL. Improving platelet transfusion practices in the neonatal intensive care unit. *Transfusion* 2008;48:2281-2284.
- 58- Goldman M, Webwert KE, Arnold DM, Freedman J, Hannon J. TRALI consensus P. Proceedings of a consensus conference towards an understanding of TRALI. *Transfus Med Rev* 2005;19:2-31.
- 59- Roberts I, Murray NA. Neonatal thrombocytopenia, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2008;13:256-264.
- 60- Dohner ML, Wiemeier SE, Stoddard RA et al. Very high users of platelet transfusions in the neonatal intensive care unit. *Transfusion* 2009, Early View.
- 61- Gurevitch J, Nelken D. ABO groups in blood platelets. *J Lab Clin Med* 1954;44:562-570.
- 62- Aster RH. Effect of anticoagulant and ABO incompatibility on recovery of transfused human platelets. *Blood* 1965;26:732-743.
- 63- van Eys J, Thomas D, Olivos B. Platelet use in pediatric oncology: a review of 393 transfusions. *Transfusion* 1978;18:169-173.
- 64- Julmy F, Amman RA, Taleghani BM et al. Transfusion efficacy of ABO mismatched platelets (PLTs) in children is inferior to that of ABO-identical PLTs. *Transfusion* 2009;49:21-33.
- 65- Kaufman RM. Platelet ABO matters. *Transfusion* 2009;49:5-7.
- 66- Blood. *ASH Annual Meeting Abstracts, december 2008, San Francisco-USA.* www.bloodjournal.hematologylibrary.org
- 67- Monlar R, Johnson R, Sweat LT, Geiger TI. Absence of D alloimmunization in pediatric oncology patients receiving incompatible single-donor platelets. *Transfusion* 2002;42:177-182.
- 68- Haspel RL, Walsh L, Sloan SR. Platelet transfusion in an infant leading to formation of anti-D: implications for immuno prophylaxis. *Transfusion* 2004;44:747-749.
- 69- Vucinovic M, Roje D, Vucinovic Z et al. Maternal and neonatal effects of substance abuse during pregnancy: our ten-year experience. *Yonsei Med J* 2008;49:705-713.
- 70- Franck DA, McCarten KM, Robson CD et al. Level in utero cocaine exposure and neonatal ultrasound findings. *Pediatrics* 1999;104:1101-1105.

- 71- Smith Lm, Qureshi N, Renslo R, Sinow RM. Prenatal cocaine exposure and cranial sonographic findings in preterm infants. *J Clin Ultrasound* 2001;29:72-77.
- 72- Singer LT, Yamashita TS, Hawkins S et al. Increased incidence of intraventricular haemorrhage and developmental delay cocaine-exposed, very low birth weight infants. *J Pediatr* 1994;124:1765-1771.
- 73- Dusik AM, Tebbett IR. Risk of intracranial haemorrhage and other adverse outcomes after cocaine exposure in a cohort of 323 very low birth weight infants. *J Pediatr* 1993;122:438-445.
- 74- Nolte KB, Brass LM, Fletterick CF. Intracranial hemorrhage associated with cocaine abuse: a prospective autopsy study. *Neurology* 1996;46:1291-1296.
- 75- Reynolds BC, Penman DKM, Howatson AG et al. Multifocal multi-organ ischaemia and infarction in a preterm baby due to maternal intravenous cocaine use: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2009;3:9259. (www.jmedicalcasereports.com/article/view/9259).

CAPÍTULO 8 - TRANSFUSIÓN DE GRANULOCITOS

La hematopoyesis en el feto comienza en el saco de yolk con la formación de islotes de sangre a partir de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) alrededor de las 16 semanas de gestación. Existen tres fases en el desarrollo de la hematopoyesis fetal: la mesodérmica, la hepática y la mieloide. Al segundo mes de la gestación, el hígado fetal se constituye en el principal sitio productor de las células sanguíneas lo cual se extiende también al bazo a los cinco meses de gestación. Al mismo tiempo los precursores en la médula ósea comienzan progresivamente a aumentar su producción de células sanguíneas hasta el nacimiento y la hematopoyesis hepato-esplénica comienza a disminuir. Aparecen en sangre las primeras CPH circulantes probablemente por la migración desde los focos de hematopoyesis en el hígado y en el bazo hacia la médula ósea. El potencial regenerativo de estas CPH al nacimiento es mayor que al de las células adultas de la médula ósea por ello se están utilizando las células progenitoras de cordón umbilical para el trasplante y regeneración de la médula ósea en numerosas patologías y utilizando su plasticidad (capacidad de regenerar tejidos no hematopoyéticos) para la terapia celular y medicina regenerativa (ver capítulo trasplante de células de cordón).

Al nacimiento y durante el período neonatal, la producción de células mieloides y la cinética celular difiere de la que ocurre en niños mayores y el adulto. La mayor diferencia consiste en el tamaño menor y menor grado de movilización hacia la sangre periférica del pool de polimorfo nucleares (PMN) de la médula ósea. En el neonato el tamaño de este pool celular de depósito o reserva es de aproximadamente el doble de los PMN circulantes mientras que en niños mayores y en el adulto es 10 veces superior.

Se ha sugerido que esta reducción en el tamaño del pool de PMN medular se debería a un descenso de los factores estimulantes de la hematopoyesis durante la vida intrauterina.

Sin embargo, las mediciones del factor estimulante formador de colonia de granulocitos (G-CSF) y del factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en el cordón umbilical muestran niveles altos por lo cual se crea la hipótesis de que al término la mielopoyesis neonatal se encuentra cerca del máximo de la producción celular. Por tal razón la capacidad neonatal para aumentar la producción de PMN ante determinadas situaciones clínicas se encuentra limitada. Eso hace que el pool de depósito quede exhausto rápidamente ante determinadas situaciones patológicas como las infecciones.

Morfológicamente los PMN neonatales no tienen diferencias groseras con los de los niños mayores o el adulto.

Luego de la producción de los PMN en la médula ósea, los PMN maduros pasan a la sangre integrándose al pool circulante y al pool marginal. Nor-

malmente, estos pool celulares tienen aproximadamente el mismo número de células y se mantiene un intercambio fluido entre ellos para mantener el equilibrio. Los PMN tienen una vida media del orden de seis a siete horas bajo condiciones normales. El pool marginal contiene células que ruedan (rolling) sobre la superficie de las células endoteliales. Este contacto es mediado por la interacción de la L-selectina de los PMN y una variedad de receptores (carbohidratos) presentes en la célula endotelial lo cual ocurre por el estímulo de una variedad de citoquinas inflamatorias. A su vez la célula endotelial secreta E-selectina y P-selectina de los gránulos de Wiedel-Palade que se unen a los receptores de los PMN (glicoproteínas) estableciendo un sistema de contacto bidireccional.

Desde los gránulos secundarios de los PMN se secretan L-integrina (CD11b/CD18) cuyos receptores incluyen las moléculas de adhesión intercelular (Intercellular Adhesión Molecules, ICAM-1 e ICAM-2) presentes en otros PMN (ICAM-1) o en las células endoteliales (ICAM-1-ICAM-2). En suma, los PMN se adhieren a las células endoteliales (adhesión propiamente dicha) por un mecanismo similar al de las plaquetas al subendotelio mediante la acción del factor von Willebrand (FvW) pero lo que cambian son los actores.

A su vez, los PMN adhieren entre sí, lo cual se denomina agregación, también al igual que las plaquetas.

Cuando el rolling sobre la célula endotelial cesa, comienza la exudación es decir el pasaje de los PMN a través de la barrera endotelial al espacio extravascular (diapedesis) mediante la emisión de pseudopodios. Las células se deforman morfológicamente para pasar entre los poros del endotelio que miden 3 micras o menos de diámetro. También, en el pasaje de la circulación al medio extravascular, los PMN además de los cambios morfológicos sufren cambios fisiológicos, lo cual refleja su activación. Luego mediante quimiotaxis migran al sitio de injuria donde identifican el blanco mediante opsonización. Una vez identificado el blanco se unen a él y lo fagocitan. Los pequeños mediante la formación de fagosomas y los más grandes por fusión y acción de los lisosomas produciéndose luego la apoptosis celular. La gran diferencia entre los PMN y los monocitos es el estado de diferenciación celular en que entran a la circulación desde la médula ósea. El monocito es considerada una célula precursora con un potencial de diferenciación en otro tipo celular como son las células dendríticas o células presentadoras de antígenos mientras que el PMN es una célula madura terminal que migra hacia los tejidos y muere luego de cumplir su función. Al nacer, a pesar de que los PMN son morfológicamente normales, existe una disminución del tamaño del pool de depósito medular y una gran cantidad de anomalías funcionales pueden ocurrir. Existe una disminución de la L-selectina que puede afectar el rolling sobre la célula endotelial y de la L-integrina que puede disminuir la adhesión y agregación. En los PMN la expresión del receptor Fc (FcRIII) está también descendida lo cual

puede alterar la fagocitosis. Se ha observado una disminución de la quimiotaxis por defecto en la secreción de los gránulos secundarios que puede durar hasta los seis meses de vida. Por último. Puede existir una alteración funcional de la acción microbircidal y de opsonización por alteración de los gránulos primarios de los PMN. Generalmente, la fagocitosis y la acción microbircidal son normales en los neonatos sanos pero en los enfermos pueden estar comprometidas por alteraciones en la opsonización. Se ha utilizado la pentoxifilina (PTXF) para mejorar las alteraciones funcionales de los PMN. In vitro la infusión de 40 a 100 mcg mejora la funcionalidad como la quimiotaxis y estudios clínicos en sepsis neonatales muestran una mejora de los parámetros funcionales de los PMN y de la supervivencia.

Similarmente a los PMN neonatales, los monocitos, en la fase de infección aguda, muestran una expresión descendida de L-selectina y de la quimiotaxis. La acción microbircidal y la fagocitosis varían de acuerdo al germen actuante.

El número de PMN normalmente en la circulación varía según el peso y la edad postparto.

Al nacimiento, el número absoluto de PMN se encuentra entre 1800 y 5500 por mm^3 pero este número puede incrementarse de tres a cinco veces en las próximas 12 a 18 horas de vida. En RN de bajo peso, el rango normal de leucocitos desde el nacimiento hasta las 18-20 horas de vida es de 500 a 2200 pero a las 60 horas de vida disminuye a 1100. Hasta los 28 días de vida el rango se mantiene entre 1100 y 6000. Los valores por debajo de estos rangos normales según el peso y la edad se considera neutropenia.

Las causas de neutropenia neonatales pueden ser de origen materno como en el caso de las neutropenias inmunes por pasaje transplacentario de alo o autoanticuerpos. Estos anticuerpos destruyen los PMN feto-neonatales por un mecanismo similar al que ocurre en la EHP o en las trombocitopenias de causa inmune. Las neutropenias inmunes neonatales ocurren aproximadamente en 3 de cada 1000 nacimientos y generalmente responden al tratamiento con inmunoglobulina intravenosa o G-CSF.

Una segunda causa materna de neutropenia neonatal puede ser la hipertensión.

Además de las causas maternas puede haber condiciones congénitas que causan neutropenia como por ejemplo la trisomía del 21 lo cual hace que estos neonatos tengan un mayor riesgo de infección que los neonatos normales.

Las causas adquiridas de neutropenia neonatal más frecuente son las infecciones, la asfixia, hemorragia periventricular y sensibilidad a drogas.

La neutropenia neonatal puede predisponer a la infección y a su vez las infecciones son causa frecuente de neutropenia neonatal y depleción del pool de depósito de PMN medular.

La neutrofilia neonatal por el contrario se produce como una respuesta inespecífica en respuesta a distintas situaciones de stress como infección, enfermedad hemolítica y al uso de ciertas drogas maternas. Los neonatos que nacen de madres que han recibido betametasona 36 horas antes del parto muestran una neutrofilia. Algo similar ocurre con la dexametasona. Si la madre recibe G-CSF después de las 30 semanas de gestación pueden producirse una neutrofilia en el RN.

En el mecanismo fisiopatológico de la sepsis deben considerarse varios aspectos. ¿Es el tipo de defensa del organismo más importante que la naturaleza del germen actuante como factor determinante en la sobrevida del paciente?. ¿La sepsis invariablemente activa los mecanismos de coagulación e inflamación? ¿El monocito es el conductor de la respuesta frente a la infección?. ¿La célula endotelial actúa como un observador inocente o es una activa participante que sirve para amplificar la respuesta del organismo frente a la infección?.

Las toxinas bacterianas o lipopolisacáridos que penetran en la sangre estimulan los monocitos circulantes mediante receptores específicos en su membrana celular. Los monocitos activados estimulan simultáneamente dos sistemas el de coagulación e inflamación. Estimulan las células endoteliales que a su vez amplifican la respuesta de estos dos sistemas y a los PMN circulantes que se convierten en los soldados de a pie (infantería) en respuesta a la infección y que van a morir en el campo de batalla.

El sistema de coagulación se puede activar por dos vías : una, cuando se produce una lesión vascular, el organismo reacciona produciendo una vasoconstricción rápida refleja axoaxónica que tiene como finalidad disminuir el flujo sanguíneo del vaso lesionado para reducir la hemorragia y para acercar los elementos celulares a la herida para que se activen.

Las plaquetas se adhieren al subendotelio mediante su receptor de membrana GPIIb/IIIa y el factor von Willebrand circulante. Cambian de forma, se activan, secretan sustancias de sus gránulos densos y alfa como el ADP y el tromboxano A2 que son potentes agregantes. Las plaquetas se agregan entre sí mediante el receptor GPIb y el fibrinógeno formando un tapón hemostático en el sitio lesión (hemostasis primaria), pero también participan activamente de la segunda fase la hemostasis secundaria o coagulación. El sistema de coagulación, cuando hay una lesión, se activa por exposición en el subendotelio o en la célula endotelial del factor tisular (FT) que rápidamente forma un complejo con el factor VII circulante activándolo. Normalmente esto no ocurre pues el FT se encuentra encriptado en la célula endotelial y no hay lesión vascular. El complejo FT-FVIIa forma pequeñas cantidades de trombina en el sitio de lesión que refuerza el tapón hemostático del sitio lesional pero a su vez inicia una serie de activaciones en cadena para las fases siguientes de aplicación y propagación del nuevo modelo celular de la hemostasis (ver capítulo síndromes hemorrágicos neonatales).

En la infección o en la sepsis en cambio el sistema de coagulación se dispara por vía endógena. Los monocitos activados exponen el FT en su membrana y mediante las citoquinas que liberan exponen también el FT de la célula endotelial formando rápidamente un complejo FT-FVIIa que dispara la fase de iniciación, amplificación y propagación de la coagulación de forma similar a lo que ocurre cuando hay una lesión vascular. Lo que varía es el mecanismo que dispara el sistema pero siempre son las células las que regulan el proceso así como la activación e inhibición de los factores plasmáticos. Las consecuencias de la activación del sistema de la coagulación en la sepsis pueden ser una trombocitopenia no inmune por consumo y una coagulopatía (CID) que pueden producir hemorragias por descenso de los factores de la coagulación o microtrombosis que pueden llevar a la falla multiorgánica.

En suma, la respuesta del organismo frente a la sepsis es un proceso bien orquestado que envuelve una plétora de mecanismos que involucran numerosas interacciones celulares y factores solubles.

Dado que los neonatos pueden presentar neutropenia y alteraciones funcionales de los PMN tienen un riesgo mayor de infecciones que niños mayores. Como los PMN juegan un rol primordial en la defensa del organismo y en la inflamación, los cambios cuantitativos y cualitativos de los PMN en el período neonatal pueden resultar en una disminución de las defensas principalmente ante infecciones bacterianas con una respuesta inflamatorio deprimida. En neonatos con sepsis y neutropénicos las tasas de mortalidad varían entre el 60 y 90%. Como tratamiento tanto del número como de la función se han ensayado diversas medidas como la exsanguinotransfusión, la transfusión de granulocitos, la inmunoglobulina intravenosa o el G-CSF. En la década del 80 junto con el Prof. José Luis Peña realizamos las primeras transfusiones de granulocitos en neonatos con sepsis bacteriana(1). Utilizamos la técnica de obtención de granulocitos a partir del buffy coat mediante la sedimentación de los glóbulos rojos con hidroxethylstarch (HES) a partir de una bolsa de sangre total con menos de 24 horas de extraída (2). Esta técnica se utiliza en el momento actual para concentrar las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) CD34+ mediante la sedimentación de los eritrocitos con HES en una relación de 4 a 1 con el volumen del producto obtenido por punción de médula ósea o de sangre periférica por aféresis.

La efectividad clínica de estos granulocitos fue evaluada después de la infusión a tres neonatos sépticos y neutropénicos mostrando incrementos post-transfusionales razonables. La funcionalidad celular estuvo conservada cuando se utilizó sangre entre 5 y 24 horas de extraída.

Paralelamente, obteníamos granulocitos para transfundir a pacientes adultos neutropénicos e inmunodeprimidos mediante circulación extracorpórea utilizando filtración (Leucopack) o centrifugación de flujo continuo en un separador celular (Aminco) en la Cátedra de Hemoterapia del Hospital de

Clínicas donde a partir de 1981 comenzamos a realizar los primeros procedimientos en el país sobre hemaferesis en donantes o terapéutica en pacientes. En un estudio realizado (3), comparamos los granulocitos obtenidos en 58 leucaferesis por filtración (LF) y 108 por centrifugación de flujo continuo (CFC). Los leucocitos obtenidos por LF tenían una concentración de $2,16 \times 10^{10}$ granulocitos mientras que en CFC la concentración de granulocitos fue de $1,08 \times 10^{10}$. Sin embargo, la funcionalidad y morfología determinada por microscopia electrónica realizada en el Instituto Clemente Estable fue superior en los granulocitos obtenidos por CFC.

Pero, dos diferencias fundamentales entre el adulto y el neonato llevaron a que se comenzaran a realizar transfusión de granulocitos en estos últimos. Primero, un adulto que requiere una transfusión de granulocitos por lo general presenta una deficiencia en el mecanismo de producción de neutrófilos maduros desde la médula ósea como ocurre en las enfermedades hematológicas malignas tratadas con quimioterapia. Los neonatos con sepsis en cambio producen neutrófilos maduros pero agotan rápidamente el pool de depósito pues la tasa de utilización en la periferia supera a la producción medular. Segundo, la obtención de una cantidad suficiente de leucocitos es dificultosa cuando el donante tiene aproximadamente la misma superficie corporal que el receptor lo cual no ocurre cuando el receptor es un neonato (4).

Sin embargo, entre 1985 y 1995 la terapia con transfusión de granulocitos fue discontinuada debido a varias razones. En primer lugar, una nueva generación de antibióticos comenzó a usarse clínicamente con un mejor soporte general en las unidades de cuidados intensivos. En segundo lugar las transfusiones de granulocitos producían reacciones adversas en el receptor como las reacciones pulmonares con riesgo vital.

Por último, y probablemente la más importante fue que no se obtenía una concentración adecuada para transfundir a pacientes adultos con células que además tenían una muy corta supervivencia intravascular con una rápida apoptosis (5).

Con la utilización clínica del factor recombinante estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF) se abrió una nueva era en la transfusión de granulocitos dado que la administración de este factor solo o asociado a dexametasona a sujetos normales 12 horas antes de la colecta incrementaba sensiblemente la concentración de granulocitos obtenidos por aféresis (6). Los granulocitos obtenidos por esta técnica han mostrado tener una función normal tanto in vitro como in vivo (5).

Las causas más comunes de leucopenia en las unidades de cuidados intensivos neonatales son la sepsis, la hipertensión materna y la endotoxemia (7). La neutropenia aloinmune por anticuerpos maternos es una causa muy rara y puede ser tratada con G-CSF o inmunoglobulina intravenosa (7). La neutropenia asociada a hipertensión materna se resuelve espontáneamente en horas o días y no necesita tratamiento. En cambio, la sepsis neonatal con granulocitopenia tiene una alta tasa de mortalidad (8). La transfusión

de granulocitos no es beneficiosa para prevenir infecciones (profiláctica) pero puede utilizarse para eliminar la infección en combinación con el uso de antibióticos.

Sin embargo, la transfusión de granulocitos ha sido usada infrecuentemente en la sepsis neonatal y no hay hasta el momento actual estudios basados en evidencia sobre el uso de granulocitos en recién nacidos. Una dosis de 1 a 2×10^{10} granulocitos por Kg de peso es sugerida como efectiva y debe ser repetida diariamente o en días alternos durante una o dos semanas (9). Cuando los granulocitos se obtienen por leucaferesis en un separador celular el donante además de recibir la estimulación previa con G-CSF debe ser ABO compatible, no es necesario que se seleccione por compatibilidad leucocitaria, será citomegalovirus negativo dado que por razones obvias estos productos no se pueden leucoreducir y cumplirán las pautas generales existentes para el resto de los donantes de sangre. Una vez seleccionado el donante adecuado puede utilizarse varias veces para un mismo neonato. El producto debe ser irradiado por radiación gamma para evitar la reacción de injerto versus huésped dado que por esta técnica, la hemaferesis, existe una cantidad de linfocitos (CD3+) contaminantes. El concentrado debe transfundirse, en lo posible, antes de las seis horas de obtenido lo cual no es un inconveniente pues los estudios serológicos de los donantes de aféresis se realizan días antes del procedimiento de colecta.

Los granulocitos pueden ser obtenidos a partir del buffy coat de donantes normales pero se obtiene una concentración menor que la de los concentrados obtenidos por aféresis mediante la movilización previa con G-CSF (10). Es posible que los leucocitos obtenidos de buffy coat tengan más reacciones adversas que los obtenidos por aféresis además de ser obtenidos de donantes múltiples lo cual dificulta su preparación a partir de individuos CMV negativos. A su vez, los neonatos Rh D negativos deben recibir productos Rh D negativos para evitar la inmunización anti-D lo cual puede acarrear consecuencias getacionales o transfusionales en la edad adulta.

Se propuso que la estimulación con corticoides (dexametasona) en donantes de granulocitos podía producir catarata subcapsular posterior (CSP). Sin embargo, en un estudio de seguimiento realizado en donantes de granulocitos no se encontró una asociación lesional ni riesgo aumentado de desarrollar CSP (11). Otros aspectos relacionados con la transfusión de granulocitos quedan aún por establecer como la seguridad de la administración del G-CSF a largo plazo, los efectos adversos en pacientes como el desarrollo de aloinmunización así como el efecto de la transfusión en el clearance de la infección y la mortalidad a tres meses.

En una reciente revisión Cochrane (12) el objetivo primario fue determinar la eficacia de la transfusión de granulocitos en neonatos con sospecha o confirmación de sepsis y neutropenia como método adjunto a la antibioterapia y comparado con placebo.

El segundo objetivo fue determinar los efectos adversos de la transfusión

de granulocitos como sobrecarga de volumen, trasmisión de infecciones, complicaciones pulmonares y aloinmunización en un año o más.

La revisión se realizó sobre neonatos con sospecha o diagnóstico de sepsis pero con neutropenia que recibieron además de antibióticos, transfusión de granulocitos obtenidos de buffy coat o por leucaferesis comparados con placebo o que no recibieron transfusión de granulocitos. Se comparó además la transfusión de granulocitos con otras medidas adjuntas a la antibioticoterapia como el uso de inmunoglobulina intravenosa a altas dosis. De esta revisión, los autores concluyen que no existe una evidencia concluyente para afirmar o descartar el uso rutinario de la transfusión de granulocitos en neonatos con sepsis y neutropenia con el fin de reducir la morbimortalidad. Futuros trabajos multicéntricos deben ser realizados para definir esta indicación. En la misma revisión, cuando se comparó el uso de la transfusión de granulocitos con la infusión de inmunoglobulina polivalente intravenosa existió una reducción de la mortalidad en el borde de la diferencia estadísticamente significativa a favor de la transfusión de granulocitos en los 35 neonatos estudiados.

Sin embargo, las guías británicas sobre la transfusión de hemocomponentes en neonatos y niños mayores (13), recomiendan el uso de la transfusión de granulocitos en neonatos con sepsis cuando existe un deterioro del estado general aun luego de la terapia con antibióticos y con una neutropenia severa por más de 24 horas. Estos pacientes pueden también responder a la administración de G-CSF y actualmente no está claro cual de estas dos opciones es más efectiva.

Otros trabajos recientes, muestran la eficacia de la transfusión de granulocitos en niños con infecciones a hongos (aspergilosis) y en pacientes con neutropenia y fiebre que recibieron un trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (14) (15).

En nuestro país, no se ha retomado aún la obtención de granulocitos por aferesis a pesar de que contamos con separadores celulares de última generación y factor recombinante de colonia de granulocitos (G-CSF).

El uso de **G-CSF en neonatos** no se ha asociado con ningún efecto desfavorable en los estudios que administraron 5 a 10 mcg/kg (16). Sin embargo, a pesar de que el G-CSF aumenta el número de neutrófilos y mejora la función celular en los neonatos neutropénicos su utilidad como terapia adjunta en el tratamiento o prevención de la sepsis es todavía cuestionable. En una reciente revisión (17) se concluye que un limitado número de resultados sugieren que el tratamiento con G-CSF puede reducir la mortalidad cuando la infección sistémica se acompaña de neutropenia severa pero esto debe ser investigado en trabajos futuros que recojan un número suficiente de neonatos infectados con organismos asociados con un significativo riesgo de mortalidad. Es necesario realizar un seguimiento a largo plazo de los neonatos que reciben G-CSF para establecer que no se asocian efectos adversos sobre todo en tejidos no hematopoyéticos.

El aumento del factor de necrosis tumoral (TNF) en sangre se correlaciona con un aumento de la mortalidad en sepsis. **La pentoxifilina (PTXF)** que inhibe la producción de TNF se ha usado en neonatos con sepsis mejorando la supervivencia y atenuando los síntomas clínicos (18) (19). La PTXF administrada por vía intravenosa 5mg/Kg/hora durante seis horas y en tres días sucesivos inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias en neonatos con sepsis por lo cual previene la disfunción endotelial (20). Preserva el sistema trombomodulina – proteína C y S, estimula la fibrinólisis aumentando el activador tisular del plasminógeno, disminuye la liberación del tromboxano A2 potente vasoconstrictor y agregante plaquetario. No actúa sobre la adhesión plaquetaria. Mejora el flujo sanguíneo a nivel de la microcirculación por lo cual disminuye la incidencia de la enteritis necrotizante (21). Mejora el flujo renal durante la bacteriemia (22) y la deformabilidad de los eritrocitos a nivel de la microcirculación por lo cual puede utilizarse como tratamiento de las crisis de anemia falciforme (23).

Una revisión Cochrane (24) establece que la PTXF asociada al tratamiento con antibióticos puede disminuir la mortalidad por sepsis en neonatos sin causar efectos adversos. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para recomendar el uso rutinario de la PTXF en la sepsis neonatal. Las investigaciones futuras deberán además, comparar la PTXF con otras terapias adjuntas a los antibióticos como las que modulan la respuesta inflamatoria (inmunoglobulina intravenosa y G-CSF) y determinar su eficacia para reducir la morbimortalidad por sepsis neonatal.

En suma, cuando los granulocitos obtenidos por aferesis mediante estimulación previa del donante con G-CSF y dexametasona son infundidos a pacientes neutropénicos se alcanzan valores normales o cercanos al normal del recuento de neutrófilos en sangre lo cual puede mantenerse por más de 24 horas. Estos granulocitos tienen una funcionalidad normal tanto in vitro como in vivo. Se utilizan para tratar pacientes neutropénicos con infecciones bacterianas o micóticas (cándida o aspergillus). Recientemente se ha desarrollado un trabajo randomizado en fase III para establecer si la terapia con altas dosis de granulocitos puede resolver la infección en pacientes con neutropenia (RING study, Resolving Infection in People with Neutropenia) pero los resultados de este estudio multicéntrico tardarán tres o cuatro años (25).

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Peña JL, Burghi M, Cancela MJ, Decaro J, Fleitas T. Tratamiento de la sepsis bacteriana del recién nacido. *Clínicas de Ginecología, Obstetricia y Perinatología* 1985;2:511-537.
- 2- Rock G, Zurakowski S, Britten A. A simple and rapid preparation of granulocytes for the treatment of neonatal septicemia. *Transfusion* 1984; 24:510.
- 3- Decaro J, Silva H, Alallon W. Leucaferesis por centrifugación de flujo continuo y filtración en donantes normales. Presentado en el Segundo Congreso Latinoamericano de Hemoterapia e Inmunohematología. Buenos Aires-Argentina, noviembre de 1982.
- 4- Christensen RD, Rothstein G, Anstall HB et al. Granulocyte transfusions in neonates with bacterial infections, neutropenia and depletion of mature bone marrow neutrophils. *Pediatrics* 1982;70:1-6.
- 5- Price T. Granulocyte transfusion therapy: it is time for an answer. *Transfusion* 2006;46:1-5.
- 6- Liles WC, Huang JE, Llewellyn C et al. A comparative trial of granulocyte-colony stimulating factor and dexametasona separately and in combination for the mobilization of neutrophils in the peripheral blood of normal volunteers. *Transfusion* 1997;37:182-187.
- 7- Christensen RD, Calhoun DA, Rimsza LM. A practical approach to evaluating and treating neutropenia in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol* 2000;27:577-601.
- 8- Rodwell RI, Taylor KM, Tudehope DI, Gray PH. Hematologic scoring system in early diagnosis in sepsis in neutropenic newborns. *Pediatr Infect Dis* 1993;12:373-376.
- 9- Engelfriet CP, Reesink HW, Klein HG et al. International forum: granulocyte transfusion. *Vox Sang* 2000;79:59-66.
- 10- Von Lindern JS, Brand A. The use of blood products in perinatal medicine. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2008;13:272-281.
- 11- Burch JW, Mair DC, Meny GM et al. The risk of posterior subcapsular cataracts in granulocyte donors. *Transfusion* 2005;45:1701-1708.
- 12- Mohan P, Brocklehurst P. Granulocyte transfusions for neonates with confirmed or suspected sepsis and neutropenia. *The Cochrane Database of Systematic Review* 2003; issue 4: Art No CD003956.
- 13- British Committee for Standards in Haematology Transfusion Task Force. *Transfusion Guidelines for neonates and older children.* *BJH* 2004;124:433-453.
- 14- Ikinciogullari A, Dogu F, Solaz N et al. Granulocyte transfusion in children with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 2005;9:137-141.
- 15- Oza A, Hallemeier C, Goodnough L et al. Granulocyte-colony stimulating factor mobilized prophylactic granulocyte transfusions given after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation result in a modest reduction of febrile days and intravenous antibiotic usage. *Transfusion* 2006;46:14-23.
- 16- Gathwala G, Bala H. Colony stimulating factors as adjunctive therapy in neonatal sepsis. *Indian Journal of Pediatrics* 2006;73:393-394.
- 17- Carr R, Modi N, Doré C. G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections. *The Cochrane Database of Systematic Review* 2003, issue 3 Art No CD003066.
- 18- Lauterbach R, Pawlik D. Pentoxifylline treatment of sepsis of the premature infants. Preliminary clinical observations. *Eur J Pediatr* 1994;153:672-674.
- 19- Ali W, Ahmed P, Bhat M, Mushtaq S. Pentoxifylline in the treatment of sepsis of premature infants. *JK-Practitioner* 2006;13:204-207.
- 20- Wang P, Wood TJ, Baz F. Pentoxifylline maintains vascular endothelial cell function during hyper dynamic sepsis. *Surgery* 1996;130:367-373.
- 21- Steeb GB, Wilson MA, Garrison RN. Pentoxifylline preserves small intestinal microvascular blood flow during bacteremia. *Surgery* 1992;112:756-763.
- 22- Krysztovich RJ, Bentley FR, Wilson MA. Free radical scavenging by lazaroids improves renal blood flow during sepsis. *Surgery* 1996;20:657-662.
- 23- Betticher C, Keller H. Effect of endotoxin and TNF on erythrocyte and leucocyte deformability. *Br J Haematol* 1993;83:130-137.
- 24- Haque K, Mohan P. Pentoxifylline for neonatal sepsis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 4 Art No CD004205.
- 25- Peters C. Granulocyte transfusions in neutropenic patients: beneficial effects proven?. *Vox Sanguinis Early View* 2009.

CAPÍTULO 9 - RIESGO DE TRASMISIÓN DE AGENTES INFECCIOSOS POR LA TRANSFUSIÓN DE HEMOCOMPONENTES:

¿SON SEGURAS LAS TRANSFUSIONES PERINATALES?

La sangre es un vehículo natural de agentes infecciosos que tienen una diferente distribución mundial. Hay algunos de estos agentes patógenos que se presentan en unos países como endémicos pero, por el contrario, no se manifiestan en otros. Si bien el movimiento de hemocomponentes de un país a otro no es lo habitual, la migración de personas o animales así como el aumento de frecuencia de los viajes hacen que los agentes infecciosos traspasen fronteras. En nuestro país no existe el reservorio para que se transmita la malaria pero personas que viajan a zonas endémicas tienen riesgo de infectarse y si lo hacen, cuando regresan pueden transmitirla al donar sangre. Este es un ejemplo típico de una infección importada cuyo vehículo para traspasar fronteras es el hombre. Por el contrario, en países de América Central y Sudamérica la enfermedad de Chagas tiene una alta prevalencia y la migración de personas hacia países del primer mundo donde carecen de esta patología y por ende, no se realiza su investigación en la sangre donada, hace que el *Tripanosoma Cruzi* pueda transmitirse de un individuo a otro. Para nosotros, este es un ejemplo de una infección exportada cuyo vehículo también es el ser humano.

El virus del Nilo occidental (NO) que fue descubierto en una mujer de Uganda en 1937 produjo en las Américas la primera epidemia registrada de encefalitis vírica en el área metropolitana de New York al final del verano de 1999. Si bien no se ha determinado como el virus del NO se introdujo en el continente americano se sospecha que las aves migratorias fueron los principales huéspedes introductorios de la infección viral. Los primeros casos de transmisión de este virus por transfusión de hemocomponentes en Estados Unidos de Norteamérica (USA) se publicaron en el año 2003 (1) (2).

A su vez, un mismo agente infeccioso, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede presentar variantes genéticas que pueden afectar la seguridad de la sangre donada ya que algunos test diagnósticos pueden detectar una variante pero no la otra. La variante 0 del VIH es común en países del centro y oeste de África pero raro en USA donde predomina la variante M.

Como expresamos anteriormente, **el movimiento internacional de agentes infecciosos y sus variantes** puede afectar la seguridad sanguínea a nivel mundial. Esta es una de las razones por la cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece un programa global de seguridad sanguínea con el fin de uniformizar las políticas sanitarias en los distintos países para evitar la transmisión de agentes infecciosos por la sangre donada.

Estrictamente hablando la **seguridad sanguínea** (blood security) debe diferenciarse de la seguridad transfusional (transfusion security). La seguridad sanguínea se refiere a la seguridad del producto (hemocomponente o hemoderivado). La **seguridad transfusional** incluye todo el proceso donante-producto-receptor. En este proceso transfusional, es fundamental establecer un balance riesgo-beneficio de la terapéutica biológica basados en un correcto diagnóstico, el planteo de terapéuticas alternativas, la realización de un consentimiento informado, la evaluación clínica y paraclínica del tratamiento realizado, la trazabilidad del proceso descendente (donante-producto-receptor) o ascendente, así como el registro de la morbimortalidad de los incidentes que puedan ocurrir en el tiempo (hemovigilancia). A partir de este momento, me referiré exclusivamente a la seguridad sanguínea (del producto) y dentro de ella al riesgo que se produce por la transmisión de agentes infecciosos.

La transmisión de infecciones por la transfusión de hemocomponentes tiene ciertas particularidades. En primer lugar la infectividad depende del agente patógeno pero además del hemocomponente utilizado. Por ejemplo el plasma tiene un riesgo mínimo de transmisión de virus intracelulares, en los leucocitos, como el linfotrópico humano (HTLV) o el citomegalo (CMV) comparado con los hemocomponentes celulares (3).

En segundo lugar, depende del período de conservación del producto biológico. Así, los concentrados plaquetarios que se almacenan a una temperatura ambiente entre 18 a 22° centígrados tienen un riesgo mayor de transmisión de agentes bacterianos que el resto de los hemocomponentes que se mantienen a temperatura de heladera o congelados.

El *treponema pallidum*, agente transmisor de la sífilis, no sobrevive más de 72 horas en la sangre donada conservada en ácido cítrico dextrosa (ACD) o fosfato dextrosa (CPD) a 4° centígrados (3).

En tercer lugar, una sola unidad de sangre infectada puede transmitir la infección a varios receptores. Este mecanismo amplificador puede ser mayor cuando se realiza pool de hemocomponentes como en el caso del plasma utilizado para el fraccionamiento industrial.

Ustedes recordarán las devastadoras consecuencias a nivel mundial que tuvo la utilización de plasma infectado con VIH para la fabricación de concentrados de factores de la coagulación que luego fueron transfundidos principalmente en pacientes hemofílicos.

El **riesgo probable** de transmisión de un agente infeccioso por la sangre depende de la incidencia de ese agente en la población, de la sensibilidad y especificidad de los test de diagnóstico, de los errores técnicos y/o administrativos que se puedan producir y por último del número de transfusiones que se realicen.

Actualmente, **los agentes infecciosos** que se pueden transmitir por la transfusión de hemocomponentes los podemos dividir para su estudio en tres

categorías. En la **primera** se agrupan aquellos agentes a los que se les realiza, de forma obligatoria, un diagnóstico serológico en la sangre donada. Esto puede variar de un país a otro así como también los test utilizados para tal fin. En nuestro país, se realiza el diagnóstico serológico para sífilis, chagas, VIH 1-2, HTLV I-II, hepatitis B (antígeno Australia y anticuerpos anti-core) y hepatitis C (4). La **segunda categoría** agrupa a patógenos conocidos a los cuales no se le realiza el diagnóstico serológico de rutina pero se puede realizar en situaciones especiales como el CMV para pacientes inmunodeprimidos o el parvovirus B19 para receptores con aplasia medular o neonatos. También en esta categoría estarían las especies de *Plasmodium* que transmiten la malaria en los seres humanos. En la **tercera categoría** se agrupan los patógenos denominados emergentes como el virus NO, el coronavirus que produce un síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y la variante (prion) de la Creutzfeldt-Jacob disease (vCJD) que puede producir en el hombre una enfermedad neurológica fatal (5).

Sin embargo, debemos distinguir entre agentes emergentes de problemas emergentes.

La enfermedad de chagas transmitida por un conocido y antiguo agente patógeno causa un **problema emergente** en USA por el aumento de los inmigrantes de países con alta prevalencia del mismo. Por el contrario, el virus del nilo occidental, también conocido desde hace años, representaba un distante y mínimo riesgo transfusional hasta que el cambio de ciertas condiciones ambientales hacen que se produzca la infección de una vasta población como ocurrió en la ciudad de New York en 1999. Este es el caso de un virus ya detectado que **re-emerge** en la población humana. El coronavirus que produce el SARS es un caso típico de un **virus emergente**, es decir que es detectado por primera vez cuando produce la enfermedad en los seres humanos. Los virus de la familia flavivirus (GBV-C/HGV) y circovirus (TTV) recientemente descubiertos, posibles agentes de transmisión de la hepatitis G, son considerados **sub-emergentes** desde el punto de vista del riesgo transfusional dado que no existen aún trabajos científicos que puedan probarlo (6).

Para la detección de estas nuevas infecciones deben existir mecanismos epidemiológicos y técnicos para evitar su rápida propagación a los seres humanos. Mientras que en la década del 80 se tardó años en identificar el VIH en la reciente epidemia del SARS se demoró aproximadamente 1 mes en detectar el agente viral que la producía.

Cuando un nuevo agente infeccioso es detectado epidemiológicamente debe plantearse la posibilidad de su transmisión sanguínea lo cual hace necesario tomar **medidas preventivas de emergencia** en las zonas epidémicas mientras se investiga el agente patógeno y se puedan desarrollar test de diagnóstico. Así, durante la epidemia del SARS, en China se establecieron nuevas preguntas en el cuestionario de los donantes de sangre referidas al síndrome respiratorio, se controló la temperatura corporal en el examen

físico y todos los donantes debían notificar al Banco de Sangre la aparición posibles de síntomas relacionados al SARS en las dos semanas siguientes de efectuada la donación. Hasta el momento actual, no se ha confirmado ningún caso de SARS transmitido por transfusión de sangre (7). Recientemente han aparecido casos en Europa en países como Francia y España de la fiebre de Chikungunya que es una enfermedad transmitida a humanos por la picadura de un mosquito infectado del género *Aedes*. El nombre significa en suajili “enfermedad del hombre encorvado” ya que provoca además de fiebre fuertes dolores articulares que lleva a adoptar esa postura. El arbovirus causante fue aislado por primera vez en Tanzania en 1953. Desde entonces aparece en países del oeste y centro de África y en varias zonas de Asia. En el año 2005, se extendió a las islas del océano Índico (Comores, Mauricio, Mayotte, Reunión, Seychelles y Madagascar) por ello se han descrito los primeros casos en Europa debido a la alta frecuencia de viajes hacia estas zonas endémicas.

Teóricamente, el virus puede ser transmitido por transfusión de hemocomponentes y trasplante de órganos y tejidos. Si bien hasta hoy no se ha documentado ningún caso secundario a transfusión si se ha referido infección por exposición a sangre. Por tal motivo, las personas provenientes de las zonas donde existe el virus principalmente de las islas del océano Índico, pues el resto es excluido por malaria, deben ser rechazadas como donantes por un mes desde su regreso y si han presentado un cuadro viral durante el viaje deben ser excluidos durante seis meses. En las islas Reunión ya se han diagnosticado los primeros casos de transmisión vertical materno-fetal del virus Chikungunya con una morbilidad alta (50).

En el Uruguay no existe hasta el momento actual ningún caso clínico confirmado de Dengue. Sin embargo existen casos diagnosticados en países cercanos como Argentina, Brasil y Paraguay. En Singapur país en zona endémica de Dengue se ha publicado un caso de fiebre hemorrágica transmitido por transfusión (51) y otro en Hong Kong país no endémico (52).

¿Cuáles son las **medidas preventivas** que podemos aplicar para disminuir el riesgo de transmisión de estos agentes patógenos por la transfusión de hemocomponentes?

Una gran variedad de medidas, más o menos sofisticadas pueden ser aplicadas para disminuir la transmisión sanguínea de infecciones teniendo en cuenta que el descenso del riesgo se acompaña casi siempre con un aumento de los costos operativos (8) (9).

En primer lugar se ha demostrado que los **donantes voluntarios y de repetición** tienen una menor incidencia que los donantes por primera vez, pagos o familiares del paciente.

En el **cuestionario** que se utiliza para los donantes de sangre se incluyen preguntas para proteger la seguridad del donante y del receptor. Este debe

ser un proceso dinámico que permita agregar o quitar preguntas de acuerdo a nuevas conclusiones epidemiológicas y de investigación científica. Con la aparición de la vCJD se agregó, por ejemplo, la pregunta si ha recibido hormona de crecimiento o trasplante de duramadre. Con el SARS una persona asintomática que viajó a zonas epidémicas se lo posterga como donante de sangre por un mes en cambio, para personas también asintomáticas que han viajado a otras zonas, pero endémicas de malaria, se lo posterga 6 meses. En el **examen físico** del donante como ya vimos se determina la temperatura corporal en zonas epidémicas del SARS. También, la aparición de un aumento del número de leucocitos en el hemograma del donante puede estar indicándonos la presencia de una infección subclínica. Se le debe dar al donante la **posibilidad de autoexcluirse** luego de que ha sido informado de los riesgos y que esa sangre donada puede ser recibida por un familiar o un amigo. También debe ser informado de que en caso de sufrir algún síntoma en los días siguientes a la donación es importante por su seguridad y la del posible receptor que lo comunique al Banco de Sangre.

La **aplicación de pruebas de tamizaje serológico** para la determinación de los agentes infecciosos transmitidos por la sangre donada ha sido una de las medidas preventivas que ha provocado una dramática reducción de los riesgos transfusionales en las últimas dos décadas. Se han aplicado métodos indirectos que determinan la presencia de anticuerpos frente a un agente infeccioso o métodos directos que analizan la presencia de antígenos o ácidos nucleicos de los mismos. Los agentes patógenos que se investigan en la sangre donada varían de un país a otro así como los tipos de análisis que se realizan. La aplicación de estas pruebas si bien disminuyen el riesgo de transmisión de infecciones por la transfusión de hemocomponentes, no lo anula pues se realiza para algunos agentes patógenos y no para otros, se utilizan test de diferente sensibilidad y especificidad, la posibilidad de análisis en el período de ventana inmunológica y el siempre posible error humano.(10).

La extracción de los leucocitos por filtración (**leucoreducción**) de los hemocomponentes celulares (concentrados de glóbulos rojos y plaquetas) disminuye el riesgo de transmisión de virus como el HTLV I-II o el CMV y de bacterias como la *Yersinia enterocolitica*.

La aplicación de la **autotransfusión** en sus tres modalidades, donación de pre-depósito, la hemodilución normovolémica y la recuperación de sangre autóloga del campo quirúrgico (11) así como el uso de **vacunas** recombinantes (hepatitis A y B) evitan la infección de estos agentes patógenos en el receptor.

Durante la gestación, se pueden extraer unidades de sangre autóloga en el último trimestre por una posible hemorragia materna (placenta previa), para transfusiones intrauterinas al feto, por presentar anticuerpos contra grupos sanguíneos raros o de alta frecuencia en la población. Las mujeres

testigos de Jehová no aceptan esta modalidad de donación previa. Existe poca experiencia sobre la hemodilución normovolémica en obstetricia y esta modalidad de transfusión autóloga debe reservarse para las testigos de Jehová en las que se espera una importante pérdida sanguínea. Con respecto a la recuperación de sangre autóloga en el momento de la hemorragia del parto su uso está contraindicado cuando hay una enfermedad maligna, infección o se ha usado material hemostático. Esta técnica se reserva también para las testigos de Jehová teniendo en cuenta que se debe hacer un correcto lavado y filtrado del aspirado para quitar líquido amniótico, factor tisular, restos celulares entre otros que pueden producir reacciones adversas como el síndrome de anafilaxis de la gestación. Para mayor seguridad se recomienda utilizar un filtro de leucoreducción luego del lavado y previo a la infusión.

Estas tres modalidades de transfusión autóloga obviamente no son aplicables al recién nacido (RN). Sin embargo, algunos plantean que el clampeo tardío del cordón umbilical (30 a 120 segundos) parece estar asociado con una menor necesidad de transfusión y una menor incidencia de hemorragias intraventriculares en prematuros (45). En un trabajo reciente, si bien el clampeo tardío produce un aumento del hematocrito en pretérminos entre 30 y 36 semanas con una disminución de la necesidad de resucitación inmediata esto no se traduce en una disminución del número de transfusiones ni de la hemorragia intracraneal (46).

Las **transfusiones directas o dirigidas** son planteadas por los padres del RN o el médico tratante como forma de aumentar la seguridad sanguínea. Sin embargo, no existe evidencia científica que este tipo de transfusión sea más segura que cuando se emplean donantes voluntarios anónimos al azar. En algunos casos, la transfusión dirigida es menos segura pues al ser familiares no revelan una historia personal de riesgo y asumen que las pruebas de laboratorio todo lo detectan. La transfusión de sangre que proviene de familiares directos tiene mayor riesgo de producir una reacción grave, muchas veces fatal, la enfermedad de injerto versus huésped. Para evitarla hay que irradiar con irradiación gamma todos los hemocomponentes celulares que provienen de familiares directos. A su vez, una transfusión realizada entre familiares puede entorpecer futuros trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas. A todos los donantes dirigidos se le debe realizar los grupos sanguíneos, las pruebas de compatibilidad y los estudios de enfermedades transmisibles de forma similar a los donantes voluntarios anónimos. Por ello, las transfusiones dirigidas no pueden utilizarse en la urgencia.

La utilización de técnicas de **hemaféresis** que permiten obtener concentrados de plaquetas leucoreducidos desde un donante único, que se puede repetir en el tiempo para un mismo paciente, o más recientemente la obtención por aféresis de multicomponentes de un mismo donante, hace que se disminuya el riesgo de transmisión de infecciones comparado con el uso de

hemocomponentes obtenidos de múltiples donantes seleccionados al azar. El uso de **sustitutos de la sangre** como los expansores plasmáticos o más recientemente el desarrollo de una solución de hemoglobina (MP4) carente de un efecto vasopresor parece ser más efectiva que los numerosos intentos anteriores de crear una sangre artificial que no tenga riesgos de transmisión de infecciones, que pueda ser utilizada inmediatamente en emergencias, situaciones de desastre, guerras o en áreas remotas sin realizar los controles previos inmunohematológicos del grupo sanguíneo y las pruebas de compatibilidad donante-receptor (12). También en los últimos años se han desarrollado, aunque todavía en fase experimental, sustitutos plaquetarios como alternativa de menor riesgo que la transfusión de concentrados plaquetarios alogénicos (13).

Cada vez más y más productos biotecnológicos se están investigando y utilizando como alternativas a la transfusión de hemocomponentes. En la actualidad existen **factores recombinantes** para la estimulación de la hematopoyesis como la eritro y trombopoyetina, para la hemostasis (concentrados de factor VIII, IX y VII activado), para la anticoagulación (concentrados de antirombina III y proteína C activada) (8), para el tratamiento del púrpura trombocitopénico autoinmune (PTA) o la prevención de la inmunización anti-D la inmunoglobulina anti-Rh D recombinante (14), careciendo todos ellos de riesgo para transmisión de agentes infecciosos.

Dado que el FVIII recombinante de primera generación contenía albúmina humana existía la posibilidad de transmisión de virus como el parvovirus B19 o el TT (Transfusión Transmitted Virus). Por ello, los productos de segunda generación utilizan sucrosa en lugar de albúmina y tienen un proceso de inactivación viral con solvente-detergente y ultrafiltración como el Kogenate-FS (FVIII recombinante) disponible en nuestro país. Los de tercera generación están libres de proteínas humanas y animales. Estos productos recombinantes han demostrado no ser más inmunogénicos que los plasmáticos en el desarrollo de inhibidores.

El factor IX recombinante utilizado para el tratamiento de pacientes con hemofilia B es único pues no contiene proteínas animales o humanas, su alta pureza evita los riesgos trombóticos y no existe evidencia que se desarrollen inhibidores con una frecuencia alta en los pacientes tratados. Sin embargo, a pesar de que este parece ser el siglo de la biotecnología donde se obtienen productos cada vez más seguros, en el tratamiento de la hemofilia existe la paradoja de que a nivel mundial el 70% de los pacientes no están diagnosticados y a su vez el 75% no está tratado según la Federación Mundial de Hemofilia (WFH) www.wfh.org.

Las ventajas de estas medidas preventivas se han materializado en una disminución del riesgo de transmisión de patógenos infecciosos. No obstante, estas medidas no están exentas de limitaciones. Por ejemplo, si bien la aplicación de test diagnósticos de estos agentes en la sangre donada ha disminuido sensiblemente la transmisión de los agentes analizados siempre

queda un riesgo residual atribuible a las donaciones efectuadas en el **período de ventana inmunológica**.

Cuando se utilizan tests de tercera generación para detectar anticuerpos anti-**VIH** en la sangre donada el período ventana es de 22 días. Con test de cuarta generación (combos) que determinan anticuerpos y el antígeno p24 del virus en forma simultánea, para las variantes 0 y M, el período ventana es de 16 días. Algunos Bancos de sangre de nuestro país utilizan estos test combos como diagnóstico del VIH. Con la aplicación de los test de ácidos nucleicos el período ventana se reduciría a 11 días (15). Si bien con la aplicación de los test de ácidos nucleicos (NAT) al tamizaje de la sangre donada se ha disminuido a niveles casi excepcionales la transmisión del VIH por transfusión de hemocomponentes, esta todavía existe. Recientemente se han publicado trabajos precisamente de transmisión del VIH por transfusión de sangre con estudios previos NAT no reactivos (16) (17).

En el caso del **virus de la hepatitis C (HCV)** utilizando test de detección de anticuerpos de tercera generación el período ventana es bastante prolongado, de 70 días (15). Con la realización de los NAT se disminuiría a 12 días (15). Al igual que en el HIV, se están utilizando reactivos combos (detección de antígeno y anticuerpo) para HCV por enzoinmuno análisis (ELISA) que reduciría el período ventana a niveles casi similares (26 días) a los NAT. Tienen como ventaja que es una técnica menos costosa, más fácil de realizar y en menos tiempo que los ensayos para HCV RNA. Es una buena opción para identificar precozmente una infección activa por HCV en aquellos lugares donde la tecnología de los NAT no se encuentra disponible como método de tamizaje para la sangre donada (18) (19) y a menor costo (47).

En tres años (marzo de 1999 a abril del 2002) un total de entre 37 a 40 millones de unidades de sangre fueron analizadas con NAT en minipools de 16 a 24 muestras de donantes de sangre en USA y se encontraron 12 NAT positivas para HIV que eran no reactivas para el estudio de anticuerpos y 139 NAT positivas para HCV también negativas en el estudio de anticuerpos de tercera generación. Este trabajo, publicado el 19 de agosto del 2004 en el New England Journal of Medicine (20), muestra que 1 de 3,1 millones de donaciones estudiadas fue confirmada como positiva para HIV por NAT y negativas con el estudio de anticuerpos y 1 de 230.000 para HCV. No hubo diferencias significativas en la reactividad de las dos marcas de NAT utilizadas. A su vez de las 12 muestras HIV positivas por NAT dos fueron reactivas con la determinación del antígeno p24, Cuarenta y cinco muestras HCV NAT positivas tenían la enzima alaninoaminotransferasa (ALT) elevada, El estudio no compara las muestras HCV NAT positivas con la reactividad al antígeno core del HCV.

Por último, 6 millones de unidades de sangre fueron analizadas por NAT para el virus NO desde junio a diciembre del 2003 en USA, encontrándose 818 reactivas las cuales fueron separadas del stock. Sin embargo, seis casos

de transmisión del virus NO asociada a transfusión no fueron detectados por NAT en minipool de 6 a 16 muestras (21).

A pesar de que las técnicas de tamizaje de la sangre donada cada vez son más automatizadas, computarizadas y con protocolos estrictos, el hombre participa desde la identificación de la muestra hasta la exclusión del hemocomponente del stock. Por ello, el error humano, técnico y/o administrativo, puede estar presente e influir en la transmisión de agentes infecciosos. Para reducirlo hemos implementado un **algoritmo diagnóstico**.

Cuando una muestra es reactiva para cualquier agente infeccioso estudiado se repite en paralelo con una muestra extraída directamente de la tubuladura de la bolsa con la sangre donada. Cuando en el segundo estudio se confirma la reactividad de la bolsa y el tubo se descarta la unidad, se habilita el resto del stock con resultado negativo y se envía la muestra al Laboratorio de Referencia con el fin de realizar un test confirmatorio más específico y de acuerdo al resultado se citará al donante para su notificación. Cuando en el segundo estudio se confirma la reactividad de la sangre del tubo pero no de la bolsa correspondiente, se desacarta la bolsa del stock, se repite el estudio del stock de día (tres donaciones anteriores y tres posteriores correlativas) para evitar error de identificación y se envía la muestra reactiva para test confirmatorio. Cuando la repetición del estudio muestra un tubo no reactivo con una bolsa reactiva se elimina la bolsa del stock al igual que cuando la repetición muestra un tubo no reactivo con una bolsa no reactiva por el resultado reactivo del primer estudio y no se realiza la notificación al donante.

En los casos que el estudio confirmatorio sea positivo, se citará al donante a quien previamente se le extraerá una segunda muestra, con la que se repetirá el test de tamizaje que fue inicialmente reactivo. Una vez confirmada la reactividad de ese donante por la segunda muestra se notificará de la infección y se realizará consejería sobre la misma.

Con este algoritmo diagnóstico se establecen dos medidas de seguridad fundamentales por un lado, se asegura que la sangre analizada pertenezca a la bolsa correspondiente, imaginen ustedes las consecuencias si por error se retirara del stock una bolsa no reactiva y se habilitara una infectada y por otro lado, se asegura que la sangre estudiada como reactiva pertenezca al donante correspondiente. Imaginen ustedes también las consecuencias catastróficas si se informara a un donante que está infectado cuando en realidad no lo está.

A su vez, se establece un **control de calidad interno** de los reactivos utilizados mediante el agregado en la corrida de muestras de la seroteca con diferentes niveles de reactividad.

Por otro lado, se reciben periódicamente del Servicio Nacional de Sangre (SNS) muestras con resultados desconocidos que deben ser incluidas en el protocolo de tamizaje diario con el fin de realizar un **control de calidad**

externo.

En nuestro país, según datos aportados por el SNS, entre los años 1988 y 2002, se infectaron con VIH por transfusión de hemocomponentes 6 pacientes (1 cada 30 meses) de los cuales, 2 fueron por el período ventana y los restantes 4 pacientes por tres errores humanos. Se identifica un caso como probable cuando se produce una seroconversión en el receptor relacionada con una transfusión. Se confirma la transmisión sanguínea por transfusión cuando se identifica la o las unidades de hemocomponentes o la muestra de seroteca del donante correspondiente como infectada y existe una correspondencia en el genotipo del germen entre el donante y receptor. Para que este proceso de confirmación se cumpla adecuadamente deben existir, como ya se mencionó anteriormente, un sistema de trazabilidad y de hemovigilancia. Se entiende por trazabilidad un sistema de registro de información que permita asegurar poder identificar cada componente en todo el proceso desde el donante al receptor (descendente) y viceversa, desde el receptor al donante (ascendente). La hemovigilancia es un sistema de búsqueda activa y prospectiva de las complicaciones de la transfusión de hemocomponentes (morbimortalidad). Para ello, es necesario que los incidentes transfusionales sean identificados, investigados, diagnosticados, notificados y analizados de manera sistemática. El análisis de los datos aportados por la hemovigilancia permite tomar medidas preventivas, limitar el daño y responder rápidamente ante riesgos emergentes (22).

Nuestro país no tiene implementado un sistema de hemovigilancia por lo cual la incidencia de la transmisión transfusional de las enfermedades infecciosas es prácticamente anecdótica.

Los primeros países en establecer un sistema de hemovigilancia fueron Francia (23) y el Reino Unido (24). El término hemovigilante fue creado en Francia cuando a partir del año 1994 el reporte de todas las reacciones transfusionales fue obligatorio. En 1996 se implementó en el Reino Unido el System for serious hazards of transfusion (SHOT).

Un dato interesante que muestran los sistemas de hemovigilancia es que la sepsis bacteriana es considerada una de las principales causas de muerte asociada a transfusión de hemocomponentes. La transmisión de agentes bacterianos por los hemocomponentes es mucho más frecuente que los virales principalmente, en los concentrados plaquetarios que son mantenidos a temperatura ambiente (18-22° centígrados) hasta 5 días (25).

La severidad del cuadro clínico va a depender primero del tipo de bacteria. Las bacterias gram negativas por lo general producen reacciones más severas debido a la presencia de endotoxinas. Segundo, del número total de bacterias infundidas o presentes en el hemocomponente transfundido lo cual depende del período de conservación del producto.

Tercero, de la velocidad de reproducción de la bacteria presente y por último de las características del receptor (inmunodeprimido o si está recibiendo antibioticoterapia concomitante) (26).

Las causas de la infección bacteriana de los hemocomponentes pueden ser: la bacteriemia del donante, la contaminación por la flora cutánea del donante en el proceso de extracción o la contaminación en el proceso de producción y/o almacenamiento.

Las medidas preventivas en el caso de una bacteriemia del donante es diferir como donantes a aquellos individuos que han presentado cuadros abdominales de dolor, diarrea y/o fiebre en los últimos 15 días. En estos casos las bacterias más frecuentes son las gram negativas como la yersinia enterocolítica. También los personas que se han realizado una extracción dentaria reciente deben ser diferidos como donante dado que se puede producir una bacteriemia principalmente con Staphylococcus Aureus. En el examen físico el aumento de la temperatura corporal o el aumento de los leucocitos en el hemograma del donante son causa de rechazo como medida preventiva de la transmisión bacteriana.

Una correcta desinfección de la piel en el sitio de punción así como la derivación de los primeros 10 a 20 ml de la sangre extraída para los análisis de laboratorio son medidas que disminuyen el riesgo de contaminación del producto por la flora cutánea del donante (Clostridium Perfringens, Staphylococcus epidermidis).

En nuestro país, hemos implementado, en algún servicio de Medicina Transfusional, el uso de bolsas de extracción con derivación en Y para poder obtener los primeros mililitros de la sangre donada en los tubos para análisis de laboratorio dado que se ha demostrado que este sistema además de incrementar la bioseguridad del operador disminuye la posibilidad de contaminación de la sangre donada por la flora cutánea del donante lo cual ocurriría en la venopunción. Esta técnica es obligatoria en Francia desde el año 2000 (27) y luego se ha extendido su uso a otros países europeos (28) y más recientemente a Canadá. Otra medida que disminuye el riesgo de transmisión de agentes bacterianos en el receptor de hemocomponentes principalmente celulares es la leucoreducción por filtración. Ya existen bolsas de extracción con filtros leucoreductores en línea con el fin de obtener todos los hemocomponentes leucoreducidos desde su producción en un sistema cerrado al igual que las plaquetas de donante único obtenidas por aféresis.

Según la OMS, a nivel mundial, 75 millones de unidades de sangre son donadas anualmente. El 40% (30 millones) es donada en países en vías de desarrollo de las cuales, sólo el 57% son analizadas para enfermedades transmisibles por la sangre (29). Como la mayoría de la población mundial vive en países con índice de desarrollo humano (IDH) medio o bajo esto determina que el 80% de la población mundial tenga acceso a sólo el 20% de la reserva mundial de sangre segura y tamizada. Esta es otra de las razones, quizá la más importante, por la cual la OMS estableció un programa global de seguridad sanguínea. En un relevamiento realizado también por la OMS en 178 países se encontró que 20 de ellos no realizaban en el 100%

el screening para HIV, 24 no realizaban regularmente test para hepatitis B, 37 ignoraban el diagnóstico serológico de la hepatitis C y 34 no realizaban el estudio para la sífilis (30).

En Uruguay, según datos aportados por el SNS (31), se realiza el tamizaje serológico del 100 % de la sangre donada para VIH 1-2, HTLV I-II, hepatitis B y C, Sífilis y Chagas de acuerdo a las pruebas de tamizaje obligatorias establecidas por el Reglamento Técnico de Medicina Transfusional del MERCOSUR (4). El promedio de las donaciones de sangre es de aproximadamente 100.000 por año en todo el país. La prevalencia de las enfermedades infecciosas analizadas de rutina en forma obligatoria fue del 1% para la sífilis, del 0,46% para el antígeno Australia (HBsAg), del 1,90 % para los anticuerpos anti-core de la hepatitis B, del 0,46% para los anticuerpos anti-VHC, del 0,67% para el Chagas y de 0,06% para el VIH. En el caso del VIH corresponde a resultados luego de realizado el o los tests confirmatorios mientras que el resto son resultados primarios de pruebas de tamizaje. Por lo tanto, aproximadamente 5871 unidades de sangre son descartadas anualmente por ser reactivas frente a alguna de las pruebas de tamizaje realizadas teniendo en cuenta que una unidad puede tener más de un resultado reactivo.

Hasta aquí hemos hecho una revisión acerca del empleo de técnicas modernas de selección de donantes, del tamizaje serológico, de la biotecnología así como de alternativas a la transfusión de hemocomponentes, las cuales han disminuido sensiblemente el riesgo de adquirir enfermedades infecciosas transmisibles por la sangre. Sin embargo, la probabilidad de que esto ocurra es real y significativa y varía sensiblemente, como hemos visto, de un país a otro. Dado que hasta el momento la transfusión más segura es la que no se hace, los médicos estamos obligados a disminuir al mínimo la transfusión de hemocomponentes realizando previamente una evaluación clínica y paraclínica para establecer un correcto diagnóstico y tratamiento (32).

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

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

Las técnicas de inactivación o eliminación de agentes infecciosos más

reportadas hasta el momento utilizan un tratamiento térmico (calor seco, vapor caliente, pasteurización), por irradiación (ultravioleta, gamma), por remoción (ultrafiltración, nanofiltración) o químico (solvente-detergente, azul de metileno, psoralen, riboflavina).

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

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

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

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

La mayoría de estos métodos utilizan compuestos, como el psoralen, azul de metileno o riboflavina, que tienen gran afinidad con los ácidos nucleicos provocando un daño permanente e irreversible en las bacterias, virus y parásitos mediante el agregado, por lo general, de irradiación ultravioleta (33). Las células que carecen de núcleo como las plaquetas y los glóbulos rojos y por supuesto el plasma no son afectados por este sistema. Sin embargo esta tecnología no puede aplicarse para las infusiones de células progenitoras hematopoyéticas (stem cells) o de linfocitos y/o granulocitos por ser células nucleadas. Pero, esta técnica de inactivación haría innecesaria la irradiación gamma de los hemocomponentes celulares con el fin de evitar la reacción de injerto versus huésped como se realiza hasta el momento actual (34).

Por lo menos cuatro firmas comerciales, han desarrollado hasta el momento actual procedimientos para inactivar patógenos en los hemocomponentes. Baxter Healthcare Corporation (Chicago, Illinois) y Cerus Corporation (Concord, California) han ideado un sistema de inactivación de patógenos denominado Intercept Blood System que consiste en el agregado de psoralen sintético S59 para los concentrados de plaquetas y plasma mientras

que utiliza el psoralen S303 para los concentrados de glóbulos rojos con una irradiación de luz ultravioleta durante no más de 10 minutos. Esta tecnología fue primeramente desarrollada en concentrados plaquetarios a los que se les agregó altos niveles de patógenos previamente a la inactivación fotoquímica y el comportamiento in vivo de los concentrados inactivados fue evaluado en un modelo animal (35). Un reciente estudio toxicológico fue desarrollado para determinar la seguridad de esta nueva tecnología que usa psoralen y luz ultravioleta (36). El 15 de marzo del 2003 la revista Blood de la American Society of Hematology publica los resultados del trabajo denominado euroSPRITE, un trabajo europeo multicéntrico, clínico fase III, realizado para confirmar la eficacia terapéutica y seguridad del sistema Intercept en los concentrados plaquetarios obtenidos de buffy coat y transfundidos en pool (37). Concentrados de plaquetas convencionales y tratados con el sistema Intercept fueron suministrados a 103 pacientes con trombocitopenia por cancer o trasplante de células madres hematopoyéticas pertenecientes a centros asistenciales del Reino Unido, Francia, Holanda y Suecia. Los resultados de este estudio mostraron que los concentrados plaquetarios a los que se les realizó esta tecnología de inactivación de patógenos establecida para aumentar la seguridad sanguínea no sufrieron alteraciones de la performance y de la función in vivo, sin producir además aumento de reacciones adversas en el receptor. Esto fue el factor determinante para que el sistema Intercept fuera aprobado para su uso clínico en Europa a partir del año 2003. Tuvimos oportunidad de observar esta nueva tecnología precisamente en el servicio de Donación de Sangre de la Cruz Roja de Madrid en el año 2007. Se ha demostrado, que esta tecnología inactiva patógenos que contengan ARN o ADN (inhibe la replicación) como por ejemplo virus con cubierta lipídica (el HIV 1-2, HBV, HCV, CMV y HTLV) o sin ella (parvovirus B19), bacterias gram negativas (yersinia enterocolítica, E. Coli) o gram positivas (Staphylococcus epidemidis, aureus o el Bacillus cereus), protozoarios (tripanosoma Cruzi), Treponema Pallidum y patógenos emergentes como el virus del NO y el coronavirus del SARS. La mayoría de estos trabajos fueron presentados en el congreso de la American Association of Blood Bank (AABB) en noviembre del 2003 y en el de la American Association of Hematology (ASH) en diciembre del 2003, ambos realizados en San Diego-California.

En un trabajo reciente se evaluó también esta tecnología en las plaquetas obtenidas por aféresis no mostrando el procedimiento de inactivación la alteración de la función plaquetaria in vitro (38). El sistema Intercept ha demostrado también ser efectivo para inactivar los leucocitos contaminantes de los concentrados plaquetarios (inhibición de la replicación y de la síntesis de citoquinas) lo cual puede utilizarse para prevenir la reacción de injerto versus huésped que hasta ahora era suprimida por la irradiación gamma (39). Antes de aplicar esta tecnología a la inactivación de patógenos se usó el 8-methoxypsoralen con luz ultravioleta (PUVA) en el tratamiento

de la psoriasis y como terapia ex vivo del linfoma cutáneo a células T o síndrome de Sézary. El psoralen puede provocar reacciones alérgicas en algunas personas y eritema en los neonatos que están bajo tratamiento de fototerapia. En un trabajo multicéntrico europeo reciente se evaluó la seguridad de 5106 transfusiones de plaquetas inactivadas por Intercept Blood System demostrándose que en el 99.2 % de las transfusiones se presentaron sin reacciones adversas atribuibles a esta tecnología (48).

Otra empresa Gambro BCT (actualmente Caridien) conjuntamente con Navigant Biotechnologies han desarrollado también una tecnología de reducción de patógenos (PRT) de los hemocomponentes basados en el mismo principio pero utilizando riboflavina (vitamina B2) y luz ultravioleta en lugar de psoralen, para el tratamiento de los concentrados plaquetarios (40). Este sistema puede aplicarse para la inactivación de patógenos en plasma, concentrados de plaquetas y glóbulos rojos (41).

Se utiliza también el azul de metileno junto a la luz ultravioleta (MacoPharma Maco-Tronic System) para la inactivación de patógenos en el plasma humano (42). Si bien con esta técnica no se alteraría la función de los factores de la coagulación existiría un pequeño descenso en la concentración de los mismos (43). En un trabajo reciente (44), el plasma tratado con azul de metileno fue menos efectivo que el plasma fresco (FFP) en el tratamiento de pacientes con púrpura trombocitopénico trombótico (PTT) mediante recambio plasmático.

En marzo del 2007 se realiza, en Ontario-Canadá una conferencia de consenso sobre todos los procedimientos de inactivación de patógenos y cuyas conclusiones y revisiones han sido publicadas en enero de 2008 (49).

Por último, dos trabajos para evaluar el costo beneficio de la técnica de inactivación de patógenos fueron realizados: uno en España (45) y otro en USA (46). En ambos se llega a la conclusión que costo-efectividad del sistema Intercept es similar al generado por otras intervenciones en seguridad transfusional como los test de ácidos nucleicos (NAT).

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

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

BIBLIOGRAFIA

- 1- Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med* 2003;349:12361245.
- 2- Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H et al. West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion* 2003;43:1018.
- 3- Smith Dm and Dodd RY. *Transfusion Transmitted Infectios*. Ed. American Society of Clinical Pathologists. Chicago-USA, 1991.
- 4- Reglamento Técnico de Medicina Transfusional del Mercosur. Servicio Nacional de Sangre-MSP-ASSE. Montevideo-Uruguay, enero 2001. Decreto PE 285/00.
- 5- Knight R. Prion Disease. *Vox Sang* 2004;87 (suppl 1):S104-S106.
- 6- Alter HJ. Emerging, re-emerging and submerging infections threats to blood supply. *Vox Sang* 2004;87:56-61.
- 7- Shan H, Zhang P. Viral attacks on the blood supply: the impact of severe acute respiratory syndrome in Beijing. *Transfusion* 2004;44:467-469.
- 8- Goodnough LT, Shander A, Brecher ME. *Transfusion Medicine: looking to the future*. *Lancet* 2003;361:161-169.
- 9- Barbara J. Viruses. *Vox Sang* 2004;87 (suppl 1):S595-S597.
- 10- Shander A. Emerging risks and outcomes of blood transfusion in surgery. *Seminars in Hematology* 2004;1 (suppl 1):117-124.
- 11- Decaro J. *Manual de Medicina Transfusional*. Preño El País 1998. Academia Nacional de Medicina del Uruguay-Ministerio de Educación y Cultura. Ed de la Plaza. Montevideo-Uruguay, 1999.
- 12- Vandergriff KD, Malavalli A, Wooldrige J et al. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-516.
- 13- Blajchman MA. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in Thrombocytopenic patients. *J Thromb Haemost* 2003;1(7):1637-1641.
- 14- Bichler J, Spycher MO, Amstutz HP et al. Pharmacokinetics and safety of recombinant anti-Rh D immunoglobulin in healthy Rh negative male volunteers. *Transfusion Medicine* 2004;14:165-171.
- 15- Committee Report. Nucleid acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infections diseases. *Transfusion* 2000;40(2):143-159.
- 16- Delwart E, Kalmin N, Jones S et al. First case of HIV transmission by RNA-screened blood donation. 768W session 101 poster session, Retrovirus Conference. February 24-28, 2002 Seattle-USA.
- 17- Phelps R, Robbins K, Liberti T et al. Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. *Transfusion* 2004;44:929-933.
- 18- Raker C, Tabor E, Okayama A. Hcv core antigen as an alternative to NAT to detect HCV viremia. *Transfusion* 2004;44:307-308.
- 19- Laperche S, Le Marrec N, Simon N et al. A new core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. *Transfusion* 2003;43:958-962.
- 20- Stramer S, Glynn S, Kleiman S et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleid acid-amplification testing. *N Engl J Med* 2004;351:760-768.
- 21- Update: West Nile virus screening of blood donations and transfusion-associated transmission-United States, 2003. *MMWR* 2004;53(13):281-284.
- 22- *Manual Técnico de Hemovigilancia*. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria - Ministerio da Saude. Segunda Versao. Brasilia 2002, Brasil.
- 23- Debeir J, Noel L, Aullen JP. The French Haemovigilance System. *Vox Sang* 1999;77:77-81.
- 24- Williamson LN, Heptonstall J, Soldan K. A SHOT in the arm for safer blood transfusion. *BMJ* 1996;313(7067):1221-1222.
- 25- Goldman M. Bacterial contamination of platelet concentrates: where are we today? *Vox Sang* 2004;87(suppl 2):S90-S92.
- 26- Blajchman MA. Bacterial contamination of cellular blood components: risks, sources and control. *Vox Sang* 2004;87 (suppl 1): S98-S103.

- 27- Bruneau C, Perez P, Chassaigne M et al. Efficacy of a new collection procedure for preventing bacterial contamination of whole-blood donations. *Transfusion* 2001;41:74-81
- 28- de Corte D, Marcellis JH, Verhoeven AJ, Soeterboek AM. Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole blood collections. *Vox Sang* 2002;83:13-16.
- 29- *Blood Safety and Clinical Technology. 2000-2003 Strategy*. WHO Geneva.
- 30- Zarocostas J. Blood donations must be safer in poor nations, says WHO. *Lancet* 2004;363:2060.
- 31- La transfusión de sangre en el Uruguay. Servicio Nacional de Sangre. Ministerio de Salud Pública-ASSE. Informe 2001-2003, Montevideo-Uruguay.
- 32- AuBuchon JP. Pathogen reduction technologies: what are the concerns?. *Vox Sang* 2004;87 (suppl 2): S84-S89.
- 33- Regan F, Taylor C. *Blood transfusion Medicine*. *BMJ* 2002;325:143-147.
- 34- Lin L, Cook DN, Wiesehahn GP et al. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psolaren and long-wave length ultraviolet light. *Transfusion* 1997;37(4): 423-435.
- 35- Ciaravino V, Mc Cullough T, Cimino G. The role of toxicology assessment in transfusion medicine. *Transfusion* 2003;43:1481-1492.
- 36- Van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP et al. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. The euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101(6):2426-2433.
- 37- Janetzko K, Lin L, Eichler H et al. Implementation of the Intercept Blood System for platelets into routine blood bank manufacturing procedures: evaluation of apheresis platelet. *Vox Sang* 2004;86(4):239-245.
- 38- Luban NL. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by inactivation of T cells in platelet components. *Semin Hematol* 2001;38 (suppl 11):34-45.
- 39- Ruane PH, Edrich R, Gampp D et al. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using Riboflavin and light. *Transfusion* 2004;44(6):877-885.
- 40- Corbin F 3rd. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using Riboflavin as a photosensitizer. *Int J Hematol* 2002;76(suppl 2):253-257.
- 41- Williamson L, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: What is the contribution to blood safety? *Transfusion* 2003;43:1322-1329.
- 42- Hornsey VS, Drummond O, Young D et al. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco-Pharma Maco-Tronic System. *Transf Med* 2001;11(1):31-36.
- 43- Alvarez-Larran A, Del Rio J, Ramirez C et al. Coste efectividad de las transfusiones de componentes plaquetarios preparados con tratamiento de inactivación de patógenos en España. *Rev Esp Econ Salud* 2003;2(3):166-175.
- 44- Bell Ce, Botteman MF, Gao X et al. Cost-effectiveness of transfusion of platelet components prepared with pathogen inactivation treatment in the United States. *Clin Ther* 2003;25(9):2464-2486.
- 45- Rabe H, Reynolds G, Diaz-Rossello J. Clampeo precoz versus clampeo tardío del cordón umbilical en prematuros. *Biblioteca Cochrane Plus* 2006, Número 2. www.thecochranelibrary.com
- 46- Strauss RG, Mock DM, Johnson KJ et al. A randomized clinical trial comparing immediate versus delayed clamping of the umbilical cord in preterm infants: short-term clinical and laboratory endpoints. *Transfusion* 2008;48:658-665.
- 47- Laperche S. Antigen-antibody combination assays for blood donor screening: weighing the advantages and costs. *Transfusion* 2008;48:576-579.
- 48- Osselaer JC, Messe N, Herving T, et al. A prospective observational cohort safety study of 5106 platelet transfusions with components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2008;48:1061-1071.
- 49- Weibert K, Cserti C, Hannon J et al. *Proceedings of a Consensus Conference: Pathogen Inactivation Making Decisions About New Technologies*. *Transfusion Medicine Reviews* 2008;22:1-34.
- 50- Ramful D, Carbone M, Pasquet M et al. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:811-815.

51- Tambyah PA, Koay E, Poon M, Lin R, Ong B. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med* 2008;359:1526-1527.

52- Chuang VW, Wong TY, Leung YH et al. Review of the dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med J*. 2008;14:170-177.

HISTORIA CLÍNICA

Pretérmino, nacido por cesárea a las 33 semanas de gestación. Madre A Rh D negativa aloimmunizada al antígeno D. Se decide cesárea por polihidramnios, ascitis e hiporeactividad fetal. RN de sexo femenino con 2350g y apgar 5-7. Síndrome de dificultad respiratoria (SDR) precoz. Palidez cutáneo-mucosa, importante distensión abdominal, ritmo regular de 150 cpm con soplo mesocárdico. Pequeña mueca de llanto y apertura ocular.

Es reanimado y trasladado a unidad de cuidados intensivos. Grupo A Rh D positivo con test de Coombs directo (TCD) positivo. Se drenan 400 cc de líquido de ascitis citrino. Anemia severa, con 18% de hematocrito. Bilirrubina total (BT) de 7,5 mg% con predominio de bilirrubina indirecta (BI) de 6mg%. Se coloca en doble luminoterapia intensiva y se le administra 500 mg/Kg peso de inmunoglobulina polivalente intravenosa.

En la evolución se trata con seis transfusiones de hemocomponentes : tres sangres desplasmatizadas de 30cc, un concentrado plaquetario y tres plasmas frescos de 30cc.

No se le realiza exsanguinotransfusión. A los doce días está reactiva sin SDR, subictericia de cara y tronco, deposiciones y diuresis normales, se prende a pecho directo.

Al mes, consulta por intolerancia digestiva por lo cual se le realiza un funcional hepático que muestra alteraciones enzimáticas con una BT 4,13 mg% con predominio de BD 3,28mg% y proteínas totales de 7,80g/l. Se solicitan marcadores para hepatitis B y C que muestran HCV negativo, con un antígeno Australia (HbsAg) negativo, anticuerpos anti-core total (HBcAc) positivos (IgM no reactivo) y anticuerpos anti-antígeno de superficie (HBsAc) positivos con un título de 1297 UI/ml. Se solicita amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) para virus de hepatitis B.

En suma, se trata de un RN de pretérmino que desarrolla una EHP por un anticuerpo anti-D materno que es tratado con doble luminoterapia intensiva, inmunoglobulina endovenosa y transfusiones de hemocomponentes con aparente buena evolución y que al mes de vida desarrolla una intolerancia digestiva. Los estudios paraclínicos muestran una alteración de las enzimas hepáticas con una hiperbilirrubinemia a predominio de directa y anticuerpos anti-core y anti-s de hepatitis B por lo cual se decide solicitar una PCR para virus B.

La madre está muy nerviosa porque piensa que su hija está infectada con

el virus de la hepatitis B y le dijeron que tenía que esperar el resultado de la PCR. Como tiene el antecedente transfusional se piensa en una transmisión sanguínea del virus B.

Sin embargo, desde el punto de vista paraclínico el RN no presenta marcadores serológicos de infección aguda como HbsAg o HBcAc IgM. Si fuera una transmisión transfusional el RN tendría que tener marcadores de infección aguda y al mes de vida, es imposible que un RN desarrolle anticuerpos de la fase crónica o de curación como HBcAc IgG y HBsAc. Por tanto, el diagnóstico probable que realizamos fue el de transferencia pasiva de anticuerpos del virus de la hepatitis B. En primer lugar, pensamos que esta transferencia pasiva podría provenir de la madre ya que si bien se había estudiado durante la gestación sólo tenía un resultado negativo para HbsAg. La madre podía haber tenido una infección hace años o meses y en este momento presentar marcadores de fase crónica o de curación que pueden pasar hacia el feto. Para demostrarlo solicitamos se le realizaran los estudios de anticuerpos para el virus B los cuales fueron no reactivos. Una vez descartada la madre, pasamos a analizar la segunda posibilidad que hubiera recibido una transferencia pasiva de anticuerpos de algunos de los donantes de hemocomponentes. Si bien se realiza obligatoriamente a todos los donantes de sangre los HBcAc podría haber la posibilidad de un falso resultado negativo. Los anticuerpos HBsAc no se determinan en los donantes de sangre. Reanalizados todos los donantes en muestra de seroteca y en segunda muestra por citación, tanto los anticuerpos HBcAc y los HBsAc fueron no reactivos. Por tanto, se descarta la transferencia por vía transfusional estableciéndose una coincidencia con el cuadro clínico pero no una incidencia por los hemocomponentes transfundidos. ¿Y ahora? ¿Cómo resolvemos este caso? ¿Qué le decimos a la madre que ha quedado mucho más tranquila con nuestro diagnóstico probable de transferencia pasiva de anticuerpos ?.

Existe una tercera posibilidad que se desprende del análisis detallado de la historia clínica.

El RN recibió un hemoderivado, la inmunoglobulina polivalente intravenosa, para disminuir la hemólisis producida por la EHP. Este es un hemoderivado de origen humano que se prepara a partir de grandes mezclas de plasma. El fraccionamiento industrial concentra las inmunoglobulinas y dentro de ellas un gran número de anticuerpos presentes en el plasma de los donantes por ejemplo aglutininas del sistema ABO u otros anticuerpos de otros sistemas antigénicos de eritrocitos, anticuerpos anti-parvovirus B19 u otros virus como el de la hepatitis B. Para demostrarlo se realizó el estudio de los marcadores serológicos para hepatitis B de un frasco de la misma marca y lote del inyectado al RN.

Los resultados fueron HBsAg no reactivo, HBcAc reactivo y HBsAc reactivo es decir un espejo de lo que presentaba el RN. Sin embargo, para confirmar el diagnóstico de transferencia pasiva faltaba aún realizar la contra-

prueba in vivo. Los anticuerpos pasivos desaparecen progresivamente de la circulación. Como la mayoría tienen una vida media de 21 días pensamos que a los tres meses deberían estar ausentes en el lactante. Sin embargo, en un estudio realizado a los tres meses de haber recibido la inmunoglobulina intravenosa seguía habiendo reactividad para ambos anticuerpos pero la concentración del HBsAg había descendido notoriamente desde 1297 UI/ml a 34UI/ml. Si bien esto era lo esperado y confirmaba el diagnóstico de transferencia pasiva buscamos bibliografía sobre el tema en RN para saber cuanto tiempo podía durar la reactividad en sangre utilizando pruebas de enzimoimmunoanálisis. Mientras tanto se obtuvo el resultado de la PCR que fue, como esperábamos negativa.

No encontramos trabajos científicos previos a 1994 que examinaran la transferencia pasiva de anticuerpos para hepatitis B o C en neonatos por la infusión de inmunoglobulina endovenosa. En 1994 se publica el seguimiento de 10 pretérminos que habían recibido inmunoglobulina intravenosa debido a indicaciones variadas (1). Alícuotas de los cuatro lotes de las inmunoglobulinas usadas fueron analizadas para detectar anticuerpos anti core de hepatitis B (HBcAg) y anticuerpos para el virus de hepatitis C (HCV) mediante técnicas de enzimoimmunoanálisis (ELISA). Los cuatro lotes analizados presentaban anticuerpos para ambos virus. La concentración de anticuerpos descendió gradualmente en los pretérminos que recibieron inmunoglobulina endovenosa con una media de 2 a 7 meses.

Las PCR realizadas fueron negativas. En ningún caso se detectó una infección activa. Estos resultados nos llevaron a realizar el segundo estudio de control a los 8 meses de la infusión con el fin de evitar más punciones venosas al lactante.

Una última pregunta nos queda por hacer. ¿El lote de inmunoglobulina utilizado cumplía con las exigencias para su uso clínico?. Lo primero que analizamos fue el repartido que el fabricante incluye en cada vial. Allí se establece que “todo el plasma utilizado en la preparación es testeado y no presenta evidencia serológica del antígeno HBsAg”. Por tanto, no se realiza el estudio de anticuerpos anti-core del virus de la hepatitis B como en los donantes de sangre. En la sección de “efectos colaterales y reacciones adversas” no se menciona la transferencia pasiva de anticuerpos virales que no son testeados en los lotes de plasma como hepatitis B y C. En segundo lugar, investigamos si el lote de inmunoglobulina reunía los requisitos de las autoridades nacionales para aprobar su uso clínico. En el Reglamento Técnico del Mercosur para la producción y control de calidad de hemoderivados de origen plasmático (resolución 33/99) se establece en el numeral C Inmunoglobulinas inciso C.4.4.3. Pruebas Serológicas que “durante la fabricación de hemoderivados el primer pool homogéneo de plasma, debe ser ensayado para Antígeno de superficie del virus de Hepatitis B (HBsAg), anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (a-HCV) y anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2

(a-HIV 1y2).

Estas determinaciones deben llevarse a cabo utilizando métodos de sensibilidad y especificidad adecuadas y la mezcla inicial debe ser no reactiva para estos marcadores”.

Con respecto al producto terminado (inciso C.4.7.1.8) establece que “una muestra debe ser sometida a la determinación de anticuerpos para HBsAg”. En suma, el producto utilizado en nuestro caso clínico cumplía con los requisitos establecidos para el Mercosur ya que era negativo para los anticuerpos de HBsAg y no tiene obligación, según esta resolución mencionada, de realizar estudios de anticuerpos anti-core y anti-s del virus de la hepatitis B.

Por tanto, debemos tener presente la posibilidad de transferencia pasiva de anticuerpos para hepatitis B en pacientes que reciben inmunoglobulina intravenosa con el fin de realizar una correcta interpretación de los resultados paraclínicos más aún cuando esta evaluación se puede complicar con niveles de enzimas hepáticas anormales que también puede ocurrir luego de la administración de inmunoglobulina intravenosa (1).

(1) Karna P, Murria DL, Valduss D et al. Passive transfer of hepatitis antibodies during intravenous administration of immune globulin. *J Pediatr* 1994;125:463-465.

HISTORIA CLÍNICA

Mujer de 23 años, primigesta 0 Rh D negativa con test de Coombs indirecto (TCI) negativo realizados en el primer trimestre y a las 26 semanas de gestación. Cursando embarazo bien tolerado y controlado. A las 33 semanas se le realiza una ecografía que muestra un hidrops fetal. Ecocardiograma fetal normal. Se realiza cesárea. RN de sexo femenino, con 4000g con apgar 1-3-6. Se reanima, se intuba vía aérea se realiza drenaje de ambos hemitorax extrayéndose abundante líquido sanguinolento (100cc hemitorax derecho y 60cc de hemitorax izquierdo). Abdomen distendido imposible de palpar. Se realiza punción abdominal y se extraen 3cc de líquido serofibrinoso. Se realiza cateterismo venoso umbilical. No se observan malformaciones externas. 140 cpm, tonos alejados y pulsos difíciles de palpar. Se traslada a unidad de cuidados intensivos.

Grupo sanguíneo A Rh positivo TCD positivo. El hemograma muestra una hemoglobina de 7,2 g, plaquetas 181.000 mm³, glóbulos blancos 63.600. Bilirrubina total de sangre de cordón 2,07 mg%. Se coloca en fototerapia. A las ocho horas de vida se le realiza una exsanguinotransfusión con valores posteriores de BT 2,83 mg% y Hto de 36%. A las 10 horas de vida petequias en tronco. Hemograma 28.000 plaquetas por lo cual recibe una

transfusión de un concentrado plaquetario. A las 48 horas descenso de la hemoglobina se transfunde con sangre desplasmatazada. Se administra albúmina a las 24 horas de vida en dosis única para forzar diéresis junto con furosemide i/v hasta el sexto día.

A los 16 días de vida tiene un peso de 2020g, reactivo, bien coloreado, sin ictericia, sin SDR. En cara, tronco y miembros erupción maculopapulosa, eritematosa en vías de regresión. Resto del examen normal. Se le otorga el alta de la UCI.

Al mes y 28 días es enviado del centro materno infantil de control por anemia. Al examen palidez cutáneo mucosa con síndrome funcional anémico con taquicardia y polipnea. Hemograma Hb 7,89g Hto 22,2% GB 11,300 y plaquetas 443.000. Anemia normocrómica y normocítica. BI 0,3%. Comienza con eritropoyetina subcutánea 3000UI tres veces por semana y se transfunde con 30cc de sangre desplasmatazada leucoreducida. Una semana después presenta una Hb de 10,7 Hto 30,3 GB10400 y plaquetas 300.000.

Se trata de un RN con hidrops diagnosticado a las 33 semanas de gestación en una gestante no aloimmunizada. Cuando el TCD aparece positivo se repiten los estudios a la madre confirmando los resultados obtenidos durante la gestación. El TCD positivo se debe a un conflicto ABO (madre 0 y RN A) pero es excepcional que los conflictos ABO desarrollen hidrops.

Además, en un hidrops inmunológico se produce por una anemia por hemólisis por lo cual hay cifras elevadas de bilirrubina indirecta al nacer. En este caso no se relacionaba el grado de anemia con el nivel de bilirrubina 2,07mg%. Por tanto, el diagnóstico probable es de hidrops no inmunológico. Este tipo de hidrops pueden ser clasificados para su estudio en los que ocurren sin anemia y los que presentan anemia. Los hidrops sin anemia pueden ser producidos por infecciones como chagas, toxoplasmosis, citomegalovirus o sífilis, alteraciones cardiovasculares, malformaciones congénitas, alteraciones cromosómicas y anomalías linfáticas. Los hidrops no inmunológicos con anemia se pueden dividir a su vez en hemolítico y no hemolíticos. Los no inmunológicos que cursan con anemia hemolítica la alteración puede ser intracorpúscular (hemoglobinopatías o enzimopatías). En nuestro caso, se trata de un hidrops no inmune que cursa con anemia sin hemólisis y en estos casos la causa puede ser una transfusión feto-fetal en los embarazos múltiples o infección por el parvovirus B19. Con este simple razonamiento fisiopatológico hemos llegado al diagnóstico probable de hidrops no inmune causado por infección de parvovirus B19.

En el hemograma al nacer existe una cifra de GB de 63.600. Los contadores hematológicos separan los elementos nucleados (leucocitos) de los elementos formes no nucleados (eritrocitos y plaquetas) y estos a su vez se separan por tamaño celular. Cuando hay una anemia intensa como en el caso que presentamos se liberan a la sangre periférica elementos inmaduros nucleados (eritroblastos) y por ello la EHP fue llamada al inicio eritro-

blastosis fetal. Estos elementos formes de la serie roja son contados dentro de la serie blanca por tener núcleo. Para diferenciarlos hay que realizar una lámina periférica. Con este caso clínico vemos que ya no es correcto denominar a la EHP como eritroblastosis fetal pues hay otras situaciones clínicas que se pueden acompañar con eritroblastos en sangre. Sin embargo, el número de GB es excesivo aunque se hayan contado eritroblastos lo cual nos está sugiriendo una infección congénita. Además, el RN al alta de la UCI presenta una erupción maculopapulosa eritematosa en cara, tronco y miembros inexplicada. Recordemos que el parvovirus B19 produce una enfermedad eruptiva (la quinta) caracterizada por un rash cutáneo. El parvovirus B19 fue descubierto en 1975 (1) y en 1983 fue asociado al eritema cutáneo (2). En 1984 se establece la primera relación entre la infección por parvovirus B19 gestacional y el desarrollo de hidrops fetal (3). Luego, múltiples trabajos han descrito esta asociación lesional (4) (5).

Para confirmar el diagnóstico se solicitó un estudio serológico para parvovirus B19 hallándose una IgM reactiva lo que muestra una infección aguda además de una IgG antiparvovirus B19 diagnosticadas por enzoinmunoanálisis. Entrevistando a la puérpera nos comenta que durante la gestación tuvo un cuadro gripal pero lo que le llamó la atención fue una erupción cutánea. La IgM aparece por lo general al tercer día de los síntomas y se mantiene durante cuatro meses o más. La IgG puede persistir por años. La transmisión vertical del parvovirus B19 ocurre en aproximadamente un tercio de las gestantes infectadas.

La replicación del parvovirus B19 ocurre en los eritroblastos pero sólo en aquellos que tienen el antígeno P en su membrana (6). Los individuos que carecen del antígeno P descubierto por Landsteiner y Levine en 1927 (7) son naturalmente resistentes a la infección por el parvovirus B19. La infección de las células progenitoras hematopoyéticas fetales genera una anemia de causa central y durante la etapa intrauterina la intensidad de la anemia puede generar el hidrops. La anemia fetal puede ser diagnosticada por un método no invasivo como es la medición de la velocidad del flujo sanguíneo en el pico sistólico de la arteria cerebral media (8). Este estudio sirve para realizar el seguimiento y medir la intensidad de la anemia con el fin de indicar tratamientos prenatales como la transfusión intrauterina (TIU) por cordocentesis. La corrección de la anemia, de forma similar a la EHP, evita el hidrops fetal. Pero, el tratamiento de elección de la infección por parvovirus B19 es la inmunoglobulina polivalente intravenosa que se puede realizar junto a la TIU por cordocentesis o en el período neonatal. La mayoría de las preparaciones comerciales de inmunoglobulinas polivalentes contienen anticuerpos anti-parvovirus B19 que son neutralizantes. En los casos de anemias persistentes, como en nuestro caso clínico, la administración de inmunoglobulina polivalente intravenosa puede ser curativa. En Holanda, las transfusiones neonatales sólo se realizan con estudios serológicos negativos para el parvovirus B19 (9).

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Cossart YE, Field AM, Cant B, Windows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975;1:72-73.
- 2- Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP et al. Human parvovirus the cause of erythema infectiosum (fifth disease)?. *Lancet* 1983;1:1378.
- 3- Brown T, Anand A, Ritchie LD et al. Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet* 1984;2:1033-1034.
- 4- Xu J, Raff T, Muallem N, Neubert G. Hydrops fetalis secondary to Parvovirus B19 infections. *J Am Board Fam Pract* 2003;16:63-68.
- 5- Sahakian V, Weiner C, Naides S, Williamson R, Scharosch L. Intrauterine transfusion treatment of nonimmune hydrops fetalis secondary to human parvovirus B19 infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1090-1091.
- 6- Brown K, Hibbs J, Gallinella G et al. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (Erythrocyte P antigen). *N Engl J Med* 1994;330:1192-1196.
- 7- Landsteiner K, Levine P. Further observations on individual differences of human blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1927;24:941-942.
- 8 - Moise K. The usefulness of middle cerebral artery Doppler assessment in the treatment of the fetus at risk for anemia. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198: 161e1-161e4. www.AJOG.org
- 9- International Forum: Neonatal Transfusions. *Vox Sanguinis* 2009;96:62-85

CAPÍTULO 10 – SÍNDROMES HEMORRAGÍPAROS DE LA GESTACIÓN, PARTO Y PUERPERIO.

Durante una gestación normal el equilibrio hemostático fisiológico cambia en dirección de la hipercoagulabilidad con el objetivo de disminuir el riesgo de hemorragia durante el parto. El factor hemostático más importante para prevenir una hemorragia aguda, inmediatamente después del parto, es la contracción de la musculatura uterina con el fin de interrumpir el flujo sanguíneo. Los estudios paraclínicos muestran estos cambios hacia la hipercoagulabilidad al estar aumentada la generación de trombina, la resistencia a la proteína C y los niveles del complejo protrombínico lo cual se traduce en un ligero acortamiento del APTT y un INR menor a 0,9 (1). Todos los factores de la coagulación se encuentran aumentados en sangre a excepción del factor V y el factor IX que no sufren cambios en su concentración al igual que la precalicreína y el quininógeno de alto peso molecular.

Las plaquetas se encuentran en un rango normal excepto en el tercer trimestre donde puede existir una trombocitopenia gestacional entre 80.000 y 150.000 plaquetas por mm^3 con una funcionalidad normal.

El nivel de la mayoría de los inhibidores de la coagulación se muestra incambiado durante la gestación normal aunque la concentración de proteína S está descendida y el inhibidor del factor tisular se encuentra aumentado. La actividad del sistema fibrinolítico se encuentra disminuida durante la gestación quizá por el aumento de los inhibidores de la activación del plasminógeno el PAI-1 producido por la célula endotelial y el PAI-2 liberado por la placenta.

En el momento del parto existe un consumo de plaquetas y de factores de la coagulación incluyendo el fibrinógeno. La fibrinólisis aumenta rápidamente luego del parto y de la expulsión de la placenta lo cual se traduce en un aumento de los D-dímeros. Estos cambios hemostáticos que se producen durante la gestación se normalizan entre las cuatro y seis semanas después del parto.

La presencia de coagulopatías pre-existentes pueden afectar el curso de la gestación y a su vez, la naturaleza de la coagulopatía puede ser modificada por el estado gestacional. Estos cambios en el sistema de coagulación pueden modificar el modo de realizar el parto así como la analgesia o anestesia en las gestantes con riesgo de hemorragia.

Para su estudio se pueden dividir en coagulopatías congénitas de aparición más rara y coagulopatías adquiridas más frecuentes.

Dentro de las **coagulopatías congénitas**, las mujeres portadoras de hemofilia A o B con niveles bajos de factor VIII o IX pueden presentar síndromes hemorragíparos durante la gestación, cesárea o procedimientos invasi-

vos sobretodo en las portadoras de hemofilia B dado que el factor IX como ya vimos no aumenta durante la gestación (2).

Una historia de sangrado durante la gestación nos debe sugerir la probabilidad de una coagulopatía pre-existente. La presencia de menorragia nos puede estar indicando una alteración de la coagulación y un diagnóstico precoz de esta puede evitar futuros problemas durante la gestación. En un estudio sobre 150 mujeres que presentaron menorragia una coagulopatía congénita fue diagnosticada en 26 (17%) de ellas (3). También una hemorragia inmediata o tardía después de un parto o aborto puede ser indicadora de la presencia de una coagulopatía pre-existente. En un trabajo reciente, se ha reportado hemorragias post-parto en cuatro de cinco portadoras de hemofilia B (4). El procedimiento de elección para realizar el diagnóstico en las mujeres portadoras de hemofilia es la biopsia de la vellosidad coriónica que ofrece como ventaja frente a la amniocentesis que se puede realizar precozmente entre la semana 11 y 14 de la gestación (5). Pero, debemos tener presente que es un procedimiento invasivo por lo cual si la madre es RhD negativa debe recibir inmunoglobulina anti-D para prevenir la hemorragia fetomaterna que se puede producir y además se deben dosificar los factores VIII y IX dado que el factor VIII en esta etapa de la gestación todavía no ha aumentado significativamente y puede ser necesario un soporte hemostático previo al procedimiento (6).

La enfermedad de Von Willebrand (EVW) tiene una prevalencia del 1% en la población general. El factor von Willebrand (FvW) es producido por la célula endotelial, es la molécula adhesiva más potente del organismo y es esencial para la adhesividad plaquetaria. Normalmente circula unido al factor VIII evitando que este sea degradado por la proteína C. Típicamente la EVW se presenta con un síndrome hemorrágico mucocutáneo, menorragias o sangrados ante métodos invasivos como cirugías o extracciones dentarias. Se pueden presentar hemorragias gastrointestinales sobre todo cuando se asocia a la presencia de malformaciones vasculares como los angiomas.

Durante la gestación, los niveles de FvW y FVIII aumentan espontáneamente principalmente durante el tercer trimestre (2) por lo cual es raro que se necesite un soporte hemostático (6). Por tanto, no existiría riesgo de hemorragia en un parto vaginal en mujeres portadoras de hemofilia A o EVW tipo 1 (alteración cuantitativa) que es la más frecuente. Sin embargo, los niveles de FvW pueden no aumentar significativamente en el primer o segundo trimestre por lo cual las finalizaciones precoces gestacionales pueden acompañarse de hemorragias importantes. Las mujeres con EVW tipo 2 (alteración cualitativa) y tipo 3 tienen mayor riesgo de desarrollar hemorragias postparto inmediatas (24 horas) o tardías por lo cual es prudente chequear el nivel de FvW dos o tres días después del parto (6).

El tratamiento y/o profilaxis de los síndromes hemorrágicos congénitos durante la gestación depende del tipo del defecto hemostático y del nivel

sanguíneo del factor de la coagulación.

En las mujeres portadoras de hemofilia A o EVW tipo 1 que tienen un nivel inferior al 40% del factor de la coagulación y que van a ser sometidas a un procedimiento invasivo o parto por cesárea pueden ser tratadas con desmopresina (DDAVP). Este fármaco (Octostim), análogo sintético de la vasopresina, puede ser administrado de forma intranasal, subcutáneo o intravenoso. Luego de una dosis estándar de 0,3 mcg/Kg intravenosa (máximo 20 mcg) el FvW y el FVIII aumentan su concentración de 2 a 6 veces dado que la desmopresina estimula la liberación del FvW de los depósitos de la célula endotelial (cuerpos de Weidel-Palade) y del FVIII de las células sinuosas del hígado aunque el verdadero mecanismo de acción (directo o indirecto) aun no se conoce. El nivel máximo de los factores en sangre se adquiere a los 30-60 minutos de la infusión intravenosa y entre los 30 y 120 minutos de la intranasal. La dosis puede repetirse 1 o 2 veces con intervalos de 6 a 12 horas. La DDAVP puede ser utilizada para el tratamiento de la EVW tipo IIA pero está contraindicada en el IIB. No produce efecto en la EVW tipo 3. Se emplea además para pacientes con disfunción plaquetaria inducida por medicamentos (AAS, AINE) que no pueden ser suspendidos antes de una cirugía por ejemplo o los trastornos de la coagulación producidos en uremia o cirrosis.

Durante la administración debe controlarse la presión arterial y el pulso y deben adoptarse medidas para evitar una sobrecarga de líquido e hiponatremia dado que tiene un efecto antidiurético que dura aproximadamente 24 horas. Pueden presentarse también efectos adversos leves como fatiga, cefaleas, náuseas, dolor abdominal y rubor facial.

Otros efectos de la desmopresina, aunque de breve duración, son la hipotensión y el aumento de la fibrinólisis (7). Estos se producirían dado que la DDAVP al liberar FvW de los cuerpos de Weidel-Palade de la célula endotelial también libera el activador tisular del plasminógeno (t-PA) que se encuentra almacenado junto al FvW. A su vez, se estimula la producción de óxido nítrico (NO) por la NO-sintetasa de la célula endotelial y cuya liberación produce vasodilatación. A pesar de ser efectos transitorios cuando la hiperfibrinólisis producida por la DDAVP se asocia a la hiperfibrinólisis del paciente producida por el mecanismo patogénico o la cirugía se debe asociar el uso de antifibrinolíticos como el ácido tranexámico (transamina) que puede ser administrada intravenosa 10 mg/Kg cada 6 horas (8). La administración intravenosa de la desmopresina debe realizarse en posición supina.

La DDAVP debe usarse con precaución en pacientes con riesgo coronario o en los que existen condiciones protrombóticas congénitas como factor V Leiden o anticuerpos antifosfolípidos o adquiridas como cirugía, anticonceptivos o fumadores (9).

En un estudio reciente, realizado en 32 gestantes (27 portadoras de hemofilia A y 5 con EVW tipo 1) se demostró que el uso de la desmopresina

puede ser utilizada de forma segura durante la gestación para prevenir sangrados durante procedimientos invasivos (10).

La DDAVP no se encuentra en la leche materna en cantidades significativas por lo cual puede ser usada también durante el parto y el postparto con seguridad (11).

En los casos en que la DDAVP no es efectiva o está contraindicada puede ser necesaria la reposición con factores de la coagulación para prevenir las hemorragias del parto, en especial si se realiza cesárea, o del postparto inmediato. Dado que la DDAVP no tiene efecto sobre el factor IX y este no aumenta durante la gestación, la terapia con factores de la coagulación durante la gestación o el parto es más frecuente en este tipo de portadoras aunque su incidencia es mucho menor que la hemofilia A o la EVW. En nuestro país contamos con un concentrado comercial de factor IX (Octanine) de origen humano liofilizado y doblemente inactivado para evitar la transmisión de virus con cubierta lipídica o sin ella por lo cual debe ser considerado el tratamiento de elección en este tipo de pacientes.

Por el contrario, en las portadoras de hemofilia A o EVW rara vez se necesita infundir los factores en déficit. En un estudio realizado en Suecia sobre un total de 117 gestaciones en portadoras de hemofilia solamente cuatro necesitaron transfusiones luego del parto (12). En otro estudio, el concentrado de factor FVIII fue administrado en una gestante y la DDAVP en otra en un total de 48 gestaciones estudiadas (13). A veces es necesario administrar factor VIII en este tipo de pacientes cuando existe algún síndrome hemorrágico durante la gestación como un hematoma retroplacentario por ejemplo. Es de elección administrar concentrados de factor VIII de origen humano doblemente inactivados. Existen también en nuestro país, concentrados de factor VIII recombinantes que carecen de riesgo de transmitir infecciones.

Para el caso de las mujeres con EVW que no respondan a la desmopresina o su uso esté contraindicado, podemos realizar concentrados de factor vW de alta pureza, de origen humano, doblemente inactivado (Wilate) que contiene 450 UI de factor VIII y 400 UI de FvW.

En caso de no contar con factores de la coagulación comerciales se puede utilizar el crioprecipitado que contiene FVIII y FvW pero sabiendo que no tiene una cuantificación precisa, no es un producto virus inactivado y puede producir reacciones alérgicas y pulmonares severas (TRALI).

En suma, la gestación no está contraindicada en mujeres que tienen una coagulopatía pero su seguimiento requiere de un equipo multidisciplinario. Durante la gestación algunos factores de la coagulación como el VIII y el FvW se incrementan sensiblemente alcanzando su nivel máximo entre las 29 y 35 semanas de gestación. Sin embargo, pérdidas gestacionales y/o procedimientos invasivos tempranos durante la gestación pueden ser causa de hemorragia en estas pacientes por lo cual se aconseja la dosificación del factor previo al procedimiento. Otros factores de la coagulación como el

IX no sufren cambios durante la gestación por lo cual mujeres portadoras con niveles bajos pueden tener hemorragias ante procedimientos invasivos o durante el parto y/o postparto por lo cual un dopaje del factor antes de los procedimientos invasivos y en el tercer trimestre es recomendado.

La presencia de una coagulopatía no es indicación de realizar el parto por cesárea. La decisión se debe basar en indicaciones obstétricas. El parto debe ser lo menos traumático posible. La anestesia epidural o espinal están contraindicadas si hay una alteración de la coagulación. No hay contraindicación para la anestesia regional si la alteración de la coagulación pre-existente se ha normalizado. En el RN, con riesgo de una coagulopatía congénita, las inyecciones intramusculares, cirugía y/o circuncisión deben ser pospuestas hasta que se realice el diagnóstico o hasta que una adecuada preparación de la hemostasis sea posible (14).

Las pérdidas sanguíneas durante el parto normal o una cesárea generalmente no necesitan transfusión de eritrocitos ni reposición de volumen. En un parto vaginal se pierden alrededor de 200 ml y hasta 500 ml en una cesárea.

Durante la gestación, hay un aumento del volumen plasmático del 40 al 50% el cual alcanza su valor máximo a las 32 semanas de gestación. El aumento de la masa eritrocitaria es del 18 al 25% pero se produce más lentamente por lo cual existe una anemia relativa durante la gestación.

Sin embargo, algunas situaciones clínicas durante el embarazo y/o parto como la atonía uterina, placenta previa, desprendimiento de placenta, embarazo ectópico, placenta ácreta o ruptura uterina pueden provocar hemorragias masivas. En estas situaciones, mucho más frecuentes que las coagulopatías congénitas que acabamos de describir, el sangrado puede ser imprevisible y se debe actuar rápidamente para evitar las consecuencias maternas y/o fetales.

Al término, el flujo sanguíneo de la placenta es aproximadamente de 700 ml por minuto. El volumen sanguíneo completo de la paciente puede perderse en 5 o 10 minutos a menos que el miometrio se contraiga adecuadamente en el sitio placentario.

En otras ocasiones el sangrado puede producirse lentamente por lo cual es importante reconocer los signos clínicos en las distintas etapas según la cantidad de sangre perdida.

La hemorragia postparto se define como la pérdida de sangre superior a 500 ml durante las 24 horas siguientes al nacimiento.

Se considera una **hemorragia grave** cuando la pérdida sanguínea es superior a 1000 ml o la tolerancia materna se encuentra alterada. Esta puede ocurrir aproximadamente en el 1% de las gestaciones y puede producir riesgo vital. La histerectomía para detener sangrados graves se realiza aproximadamente en el 50% de los casos.

La hemorragia perinatal aguda es una de las principales causas de mortali-

dad materna. La definición de una **hemorragia masiva** es subjetiva. Prácticamente la podemos definir como la hemorragia sintomática que requiere una intervención urgente para salvar la vida de la paciente o una hemorragia aguda que requiere una reposición del 50% de la volemia en tres horas o una pérdida sanguínea de 150 ml/hora. En la práctica estas situaciones son las que requieren mayor aporte de hemocomponentes y hemoderivados por lo cual revisaremos sus indicaciones, sus beneficios y sus riesgos.

Una pérdida sanguínea aguda del 15% de la volemia (hemorragia clase I) puede producir palpitaciones, mareos y cambios mínimos en la frecuencia cardíaca, respiratoria y presión arterial. Entre el 15 y 30% de la volemia (hemorragia clase II) produce debilidad, sudor, taquicardia, taquipnea e hipotensión leve. En la hemorragia clase III, pérdida de entre el 30 a 40% de la volemia, se produce una marcada hipotensión, palidez, inquietud y oliguria.

En la clase IV, pérdida sanguínea de más del 40%, se presenta con una hipotensión profunda, colapso, disnea y anuria.

Es importante que un equipo multidisciplinario aplique rápidamente un protocolo común para el tratamiento de las hemorragias perinatales masivas.

Las primeras medidas serán tratar la causa que origina la hemorragia manteniendo la vía aérea permeable aportando oxígeno, dos vías venosas con catéteres de buen calibre para tomar las muestras de sangre iniciales para estudios de laboratorio e iniciar la reposición con fluidos intravenosos. Se debe avisar precozmente al servicio de Medicina Transfusional quien obtendrá una muestra de la paciente en un tubo con anticoagulante (EDTA-K3) para evitar las demoras de la coagulación sanguínea o los falsos resultados positivos por la presencia de fibrina. De esta manera rápidamente se puede realizar el grupo sanguíneo y las pruebas de compatibilidad pretransfusionales. Debemos saber que una unidad de eritrocitos demora en estas condiciones entre 20 y 30 minutos según los servicios. Paralelamente se deben colocar a descongelar a 37° centígrados unidades de plasma fresco y/o crioprecipitados para los cuales no son necesarias las pruebas de compatibilidad pero si la descongelación por lo que el tiempo de disponibilidad es prácticamente el mismo. Cuando más precoz sea la alerta al servicio de Medicina Transfusional más adecuada será la disponibilidad de hemocomponentes y a su vez el médico hemoterapeuta integrará el equipo terapéutico multidisciplinario.

Si aún con el tratamiento de la causa y sintomático, la hemorragia continúa se deberá examinar el cuello uterino y la vagina en busca de laceraciones o si hay productos de la gestación retenidos. Si el útero está hipotónico o atónico se realizará compresión bimanual y administración de ocitocina, ergometrina y prostaglandinas. Si la hemorragia no cesa considerar la cirugía y/o histerectomía más temprano que tarde (15). Si el útero no se contrae quedan los vasos sanguíneos abiertos y este tipo de sangrado no es posible

detenerlo con la administración de hemocomponentes y/o hemoderivados coagulantes. La continuidad del sangrado aumenta la coagulopatía dilucional y puede transformarse en CID lo cual agrava aún más el cuadro clínico. En este momento, la hemostasis quirúrgica es fundamental ya sea mediante la ligadura de vasos sanguíneos o finalmente la histerectomía que remueve el origen del sangrado.

En estas situaciones clínicas, es necesario administrar una cantidad importante y rápida de hemocomponentes. Las prioridades son detener el sangrado, mantener la volemia, asegurar un adecuado transporte de oxígeno a los tejidos y controlar la hemostasis. Es importante saber que la sangre tiene, al igual que el resto de los órganos, una reserva funcional por lo cual no es necesario mantener un 100% de los niveles celulares y/o factores de la coagulación para cumplir con las prioridades mencionadas.

Esta forma rápida de administrar varias unidades de hemocomponentes puede ocasionar varios efectos adversos que en un conjunto integran el síndrome de transfusión masiva.

Se define clásicamente una transfusión masiva como el reemplazo de una volemia o más en un período de 24 horas (16). Sin embargo, nosotros preferimos una definición más aplicable a las situaciones clínicas obstétricas que es la reposición de la mitad o más de la volemia en un período de tres horas.

El factor más importante para la preservación de la oxigenación tisular es el mantenimiento del flujo y la tensión arterial adecuados, infundiendo el volumen necesario de cristaloides y/o coloides para corregir o prevenir el shock hipovolémico.

La administración de eritrocitos debe realizarse en función del volumen de sangre perdido, del volumen total circulante y de la sintomatología clínica. Las pérdidas sanguíneas menores del 20% de la volemia son bien toleradas en gestantes previamente sanas y en ellas el tratamiento estará dirigido principalmente a restaurar la volemia con soluciones cristaloides y/o coloides pero, en pacientes previamente afectadas por enfermedades cardiovasculares o pulmonares y/o anemia es conveniente monitorizar la aparición de síntomas de hipoxemia. En caso de estar presentes la transfusión de eritrocitos estaría indicada. En las hemorragias mayores se debe transfundir concentrados de glóbulos rojos rápidamente para asegurarnos una buena oxigenación tisular procurando mantener cifras de hemoglobina por encima de 7g/dl (17).

Extrayendo una muestra sanguínea con EDTA-K3 como anticoagulante se puede realizar rápidamente el grupo sanguíneo de la paciente de manera que en la mayoría de las urgencias se pueden transfundir eritrocitos ABO y RhD específicos. No se debe administrar eritrocitos 0 RhD negativos "sangre universal". Las situaciones de urgencia no deben interpretarse como una justificación para excepciones en la determinación del grupo sanguíneo del receptor así como la reclasificación de la bolsa y la paciente

inmediatamente antes de la transfusión. Ambos procedimientos duran segundos y nos permite por un lado mantener el stock adecuado de eritrocitos RhD negativos para las gestantes y/o púerperas de ese grupo. Por otro lado, aumenta la seguridad transfusional evitando la hemólisis intravascular por incompatibilidad ABO que puede agravar el cuadro clínico de sangrado con riesgo vital. Además, la transfusión de varias unidades de grupo 0 puede complicar los resultados e interpretaciones de las pruebas inmunohematológicas ulteriores.

Es importante que la gestante y el médico tratante cumplan el protocolo de seguimiento inmunohematológico de la gestación (18) dado que en caso de presentar uno o varios anticuerpos anti-eritrocitarios, estos puedan ser identificados precozmente. De esta manera, se cumplen dos objetivos. Uno, determinar la probabilidad de que el o los anticuerpos hallados puedan producir enfermedad hemolítica perinatal, sin son del tipo IgG que pasan la placenta hacia el feto. En segundo lugar, con fines transfusionales, ya que la identificación del o los anticuerpos no se puede determinar en la urgencia pues es una técnica que lleva tiempo, no todos los servicios de hemoterapia cuentan con paneles eritrocitarios de identificación y el laboratorio de referencia en inmunohematología del Servicio Nacional de Sangre (SNS) no funciona las 24 horas los 365 días del año. Aquí, a diferencia del primer objetivo, entran en juego desde el punto de vista clínico todos los anticuerpos hallados tanto los del tipo IgG como los IgM.

Luego de identificar el anticuerpo, el segundo paso, que también consume tiempo es encontrar productos eritrocitarios compatibles y disponibles lo cual va a depender en primer lugar de la cantidad de unidades en stock. Cuando mayor es el número de unidades que se pueden compatibilizar mayor es la probabilidad de encontrar productos disponibles. En segundo lugar, de la especificidad del o los anticuerpos hallados. Por ejemplo si el anticuerpo es un anti-Kell encontraremos eritrocitos compatibles más frecuentemente que si el anticuerpo es un anti-c del sistema Rh (19). Si el diagnóstico de estos anticuerpos se realiza en la primera consulta de la gestación, por lo general tenemos tiempo suficiente para planificar probables urgencias transfusionales de la gestante, del feto y/o RN.

Sin embargo, en algunos casos, existe una dificultad transfusional aún mayor cuando se identifican una mezcla de aloanticuerpos o un anticuerpo contra un antígeno público (presencia en más del 99% de los individuos de la población). Aquí también es fundamental el diagnóstico precoz en la gestación (primera consulta) para programar la obtención de unidades de sangre autóloga tanto para la madre como para el feto y/o RN dado que en nuestro país carecemos de un Banco de Sangres raras. En estos casos, cuando existe una hemorragia materna, la utilización de un recuperador de sangre del campo quirúrgico es controversial (20) por la probabilidad de introducir a la circulación materna células fetales o producir embolia de líquido amniótico y/o coagulación intravascular diseminada (CID) (21). La

utilización de un lavado y filtración puede reducir el riesgo de administrar componentes indeseables pero reduce la cantidad de eritrocitos a transfundir (22). A su vez estos equipos no están disponibles en todos los centros materno-infantiles del país.

En estudios de seguimiento inmunohematológicos de la gestación (23) (24) la mayoría (más del 90%) de los anticuerpos encontrados son de los sistemas Rh y Kell. En algunos países se transfunde a todas las gestantes con sangre fenotipada y compatibilizada para estos antígenos dado que es la única forma, en el momento actual, de prevenir la aloinmunización materna lo cual, si no se realiza, puede tener consecuencias futuras gestacionales y/o transfusionales en el resto de la vida de la mujer.

En los casos de hemorragia perinatal aguda con riesgo vital cuando la gestante presenta una aloinmunización y no se encuentra sangre compatible o se terminaron las disponibles la mujer debe ser transfundida con eritrocitos aún incompatibles pero isogrupo ABO. Estableciendo un balance riesgo beneficio, si no se administran eritrocitos a la paciente aumenta el compromiso vital, la mayoría de los anticuerpos encontrados en gestantes son del tipo IgG que producen hemólisis extravascular el cual es un procedimiento lento con consecuencias clínicas benignas (fiebre, ictericia) que generalmente no requieren tratamiento. A su vez, en la hemorragia se pierden anticuerpos y eritrocitos sensibilizados por lo cual el grado de hemólisis potencial es menor (25).

Las mujeres jóvenes RhD negativas que presentan una hemorragia masiva debe ser transfundidas con eritrocitos RhD positivos y luego cuando la paciente esté estable sin sangrado con glóbulos RhD negativos (25). Entre un 25 a 50% pueden desarrollar anticuerpos anti-D por lo cual al día siguiente se le puede realizar una eritraféresis con glóbulos rojos RhD negativos y luego administrar una dosis menor de inmunoglobulina anti-D intravenosa (26).

La hemorragia no controlada puede producir una **coagulopatía por pérdida** de plaquetas y factores de la coagulación (27). Por otro lado, el trauma o la injuria expone el factor tisular (FT) que induce la activación de la coagulación lo cual puede producir una **coagulopatía por consumo** de los factores plasmáticos. Un caso típico de coagulopatía por consumo es el que se produce en el hematoma retroplacentario por el desprendimiento de la placenta de la pared uterina.

La reposición con fluidos intravenosos, cristaloides y/o coloides, para mantener el volumen sanguíneo puede producir a su vez una **coagulopatía dilucional**.

Las pruebas paraclínicas utilizadas de rutina para establecer una coagulopatía son el recuento plaquetario, el tiempo de tromboplastina activado (APTT), el tiempo de trombina (PT) y la dosificación del fibrinógeno. El APTT es sensible a las modificaciones de los factores VIII, IX, XI, XII,

V, II y fibrinógeno así como a la heparina, productos de degradación del fibrinógeno (pdf), hipotermia e inhibidores. El PT o el INR son sensibles a la deficiencia de factores II, VII, X, V y fibrinógeno.

Valores de APTT, PT o INR superiores a 1,5 veces el valor normal son considerados de riesgo de hemorragia y deben ser corregidos con factores de la coagulación. Similarmente, un recuento plaquetario inferior a 50.000 por mm^3 o un fibrinógeno menor a 100 mg/dl pueden producir hemorragia o agravar la ya existente (28). Por tanto, la reposición hemoterápica en una hemorragia aguda tendrá como objetivos 1) administrar plasma fresco (PF) en dosis de 20 ml/kg de peso para mantener el APTT o INR por debajo de 1,5 veces el valor normal, 2) infundir concentrados plaquetarios (CP) 1 cada 10 Kg de peso o un concentrado de donante único obtenido por aféresis (CPA) para mantener la concentración de las plaquetas circulantes por encima de 50.000 por mm^3 y 3) administrar crioprecipitados (C)1 cada 10 Kg de peso para elevar el fibrinógeno por encima de 100 mg/dl. El crioprecipitado aporta además factor VIII, FvW y FXIII.

Si bien las plaquetas no poseen los antígenos del sistema Rh en su membrana, los productos plaquetarios, sobretodo los obtenidos por centrifugación diferencial, pueden tener eritrocitos contaminantes. En caso de mujeres RhD negativas que reciban plaquetas de donantes RhD positivos deberá prevenirse la inmunización mediante la administración de inmunoglobulina anti-D intravenosa (29).

Los eventos hemorrágicos en sala de partos por lo general ocurren rápidamente. Sin embargo, las pruebas de la coagulación realizadas en un Laboratorio central demoran en obtenerse los resultados por lo menos 30 minutos. Por lo general, se transfunde a la paciente empíricamente de acuerdo a la situación clínica. Cuando se obtienen los resultados de laboratorio quizá la situación de la paciente haya cambiado completamente. A su vez las pruebas de rutina utilizadas, como el APTT o PT, se modifican por la alteración de uno o varios factores de la coagulación pero no identifica cual o cuales. Tampoco hacen diagnóstico de la causa como hipotermia, exceso de heparina, hiperfibrinólisis, drogas, etc. Por ello, se han desarrollado últimamente pruebas de diagnóstico de la hemostasis para realizar al lado del paciente (Point of Care) como la tromboelastometría rotacional (Rotem). Esta nueva tecnología, no disponible en nuestro país, aporta rápidamente lo que está sucediendo con la hemostasis del paciente y permite establecer diagnósticos diferenciales sobre los distintos mecanismos que producen la hemorragia. Es una herramienta útil para monitorear las alteraciones de la hemostasis, realizar un correcto diagnóstico de situación lo cual contribuye a establecer una terapéutica específica y racionalizar el uso de hemocomponentes y hemoderivados (30).

La coagulación intravascular diseminada (CID) es una condición patológica asociada a situaciones clínicas que se presentan con una inapropiada

activación sistémica de la coagulación y de la fibrinólisis con consumo de factores de la coagulación e inhibidores, daño tisular e insuficiencia multiorgánica. Las causas obstétricas más comunes de CID son feto muerto y retenido, embolia de líquido amniótico, pre-eclampsia, eclampsia, síndrome de HELLP, placenta previa y hematoma retroplacentario.

La CID es un síndrome que se manifiesta por un consumo excesivo de plaquetas y factores de la coagulación (síndrome hemorrágico) y por la formación exagerada de trombina y fibrina (síndrome trombótico). El síndrome hemorrágico predomina generalmente en la CID de causa obstétrica. Los estudios de laboratorio muestran un APTT y PT prolongados con un recuento plaquetario inferior a 50.000 y un fibrinógeno muy descendido. El cuadro hemorrágico puede agravarse al producirse un aumento de la fibrinólisis por lo cual aparecerán productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina (pdf/PDF) y D-dímeros. Los pdf/PDF tienen a su vez un efecto antiagregante plaquetario. La microtrombosis puede producir isquemia y fallas orgánicas como insuficiencia renal aguda.

El disparador de este síndrome de CID parece ser el factor tisular (FT) el cual generalmente se encuentra encriptado en las células o membranas para evitar el contacto con el factor VII circulante con el cual forma un complejo en la fase de iniciación del nuevo modelo celular de la hemostasis.

Este FT se expone cuando hay una lesión vascular a través de la célula endotelial o el subendotelio, por activación celular mediante citoquinas inflamatorias (célula endotelial, monolitos y macrófagos) como ocurre en la sepsis o a través de su liberación de células neoplásicas. En las situaciones obstétricas como feto muerto y retenido, embolia de líquido amniótico o desprendimiento de placenta, la CID se puede desarrollar por el FT presente en el líquido amniótico o la placenta.

El diagnóstico clínico de este síndrome se realiza principalmente por la presencia de signos hemorrágicos como sangrado difuso en napa de área quirúrgica o lesional, hemorragias mucosas o en los sitios de punción.

En estas situaciones, el tratamiento de la causa que produce la CID es fundamental asociado a tratamientos sustitutivos en base a PF, CP o C en las dosis que ya se han mencionado.

La heparina generalmente no está indicada en la CID cuando hay un sangrado activo y severo o una herida quirúrgica. Su utilización es adecuada en caso de embolismo de LA, feto muerto y retenido, en CID con isquemia clínica o con tromboembolismo pulmonar. Con trombocitopenia o un APTT muy prolongado la heparina puede aumentar el sangrado por lo cual se debe realizar terapia de reposición previamente.

En caso de hiperfibrinólisis puede usarse ácido tranexámico (Transamina) 1 g intravenoso cada 8 horas (ampollas de 250 mg).

La hemorragia masiva de causa obstétrica es un proceso activo y progresivo que puede conducir a la muerte de la mujer. En un estudio so-

bre 763 mujeres embarazadas que fallecieron por hemorragia, 141 (19%) tenían desprendimiento placentario, 125 (16%) ruptura uterina, 115 (15%) atonía uterina, 108 (14%) coagulopatías, 50 (7%) placenta previa, 44 (6%) placenta ácreta, 44 (6%) sangrado uterino y 32 (4%) retención de placenta (31).

En obstetricia, el factor VII recombinante y activado (rFVIIa-NovoSeven) emerge como una terapia nueva para el tratamiento de las hemorragias masivas que no responden a la terapia convencional e inclusive puede prevenir la necesidad de realizar histerectomía. Al ser recombinante no tiene riesgos de transmitir infecciones como los de origen humano y al estar activado actúa rápidamente sobre el sistema de coagulación.

El rFVIIa tiene dos vías de acción sobre el sistema hemostático. En la primera, en la fase de iniciación, se une rápidamente al factor tisular (FT) en el lugar de la lesión produciendo pequeñas cantidades de trombina la cual activa las plaquetas, rompe la unión del FVIII con el FvW activándolo y estimula las fases siguientes de la coagulación. En la segunda, factor tisular independiente, activa directamente el factor X en la superficie de las plaquetas activadas produciendo grandes cantidades de trombina la cual convierte rápidamente el fibrinógeno en fibrina (fase de propagación). Por ello, es necesario para que el rFVIIa actúe correctamente que exista un recuento de plaquetas superior a 50.000 y un fibrinógeno por encima de 100 mg/dl. Es necesario también mantener una adecuada concentración de eritrocitos Hb mayor a 7g/dl o Hto superior a 25% dado que esto favorece la marginación de las plaquetas contra las paredes de los vasos sanguíneos y de esta manera están disponibles para actuar en los sitios de daño vascular. Los glóbulos rojos también intervienen en la modulación de la respuesta química y funcional de las plaquetas. El rFVIIa es menos eficaz en presencia de acidosis por lo cual es necesario mantener el pH por encima de 7.10 mientras que la hipotermia no afecta la respuesta (32)

Dado que el rFVIIa es un rápido formador de trombina, independiente de los niveles de factores VIII y IX por ejemplo, también se utiliza para el tratamiento de pacientes hemofílicos con inhibidores. Está disponible en nuestro país donde ya se ha usado para la realización de cirugía en un paciente hemofílico con inhibidor y en otro paciente con un déficit congénito de FVII sometido también a cirugía de coordinación.

En una reciente revisión, se evaluó el uso de rFVIIa en una serie de síndromes hemorrágicos incluyendo un número pequeño de hemorragias obstétricas y se concluyó que el uso de rFVIIa en la hemorragia masiva del postparto es apropiado luego del reemplazo con plaquetas, eritrocitos y factores de la coagulación por hemocomponentes (33). La dosis promedio utilizada en las hemorragias obstétricas es de 90 mcg/Kg (40-120) (34) aunque puede repetirse a los 30 minutos, si la hemorragia persiste después de 15 a 20 minutos (35). El producto viene liofilizado en una presentación en nuestro país de 1,2 mg y debe ser mantenido entre 2-8° centígrados.

Previo a la infusión intravenosa se reconstituye con agua estéril y se administra en bolo en tres a cinco minutos.

La vida media es de 2,3 horas por lo cual la hemostasis efectiva se logra en la mayoría de los pacientes luego de 2 o 3 dosis (60). Una dosis única en bolo de más de 200 mcg/kg (megadosis) puede reducir la necesidad de inyecciones repetidas pero aumenta considerablemente los riesgos de trombosis (61). Para prolongar su vida media, se ha desarrollado un rFVIIa pegilado asociado a liposomas (rFVIIa-PEGLip) que estudios en animales han demostrado un aumento de la eficacia hemostática y de la vida media comparado con el rFVIIa (62). El estudio farmacocinético del rFVIIa-PEGLip muestra una vida media 1.4 veces superior al rFVIIa.

Recientemente, se ha propuesto un algoritmo para el uso del rFVIIa en las hemorragias de causa obstétrica (34) que consiste primero en aplicar medidas de tratamiento médico (tratar hipovolemia, masaje y compresión uterina, drogas que estimulan la contracción del útero), terapia de reposición y hemostasis quirúrgica. Si la hemorragia continúa a pesar de estas medidas y luego de la reposición de 10 unidades de glóbulos rojos considerar la infusión de rFVIIa en una o dos dosis separadas 30 minutos cada una.

Si responde, el sangrado desaparece o disminuye en el 72% de los casos de hemorragia masiva (32). Si la hemorragia continúa después de las dos dosis de rFVIIa se debe considerar la histerectomía.

Hasta el momento actual, más de 60 casos muestran que el uso de rFVIIa puede ser beneficioso para el tratamiento de la hemorragia obstétrica.

Dos revisiones suman los trabajos sobre el uso del rFVIIa en la hemorragia masiva. En una, las Guías por Consenso Europeas (55), se establece que el uso del rFVIIa puede ser beneficioso para el tratamiento de la hemorragia postparto (recomendación E) lo cual se basa en un grado de evidencia IV y V es decir, sobre trabajos no randomizados, estudios no controlados, series de casos u opinión de expertos. Por ejemplo, en una reciente serie de 12 casos de hemorragia postparto tratados con rFVIIa se logró una respuesta parcial o buena en 11 casos (56). En la mujer sin respuesta al rFVIIa fue necesaria la ligadura de la arteria uterina derecha.

En otra revisión, las Recomendaciones por Consenso en USA (57), el panel de expertos establece que el uso de rFVIIa en la hemorragia postparto corresponde a un grado III de evidencia es decir, basado en la experiencia clínica, en estudios descriptivos o en reportes de comités de expertos. En estas guías se recomienda el uso del rFVIIa para el tratamiento de la hemorragia postparto sólo después de haber realizado una correcta reposición con factores de la coagulación manteniendo por ejemplo las plaquetas por encima de 50.000 y el fibrinógeno en más de 100 mg. El panel de expertos considera que el uso del rFVIIa profiláctico es inapropiado.

En un trabajo reciente, el objetivo fue detectar factores predictivos para la buena respuesta al tratamiento de la hemorragia severa con rFVIIa e incorporar estos a un sistema de score que sirviera como pronóstico (58). Este

trabajo detalla el uso de rFVIIa para el manejo de la hemorragia quirúrgica, traumática u obstétrica en 36 pacientes durante un período de 45 meses. En el sistema de score pronóstico se le asignó un punto por la presencia de coagulopatía, falla renal, hipotermia, la reposición de más de 10 unidades de eritrocitos y la edad mayor de 60 años. Un punto negativo fue asignado por la indicación obstétrica. Los pacientes fueron divididos en grupos de riesgo de acuerdo al score: bajo riesgo (igual o menor a 1), riesgo intermedio (mayor de 1 y menor de 3) y riesgo alto (igual o mayor de 3).

De los 36 pacientes (19 hombres y 17 mujeres) con una edad promedio de 38 años que recibieron rFVIIa para el tratamiento de una hemorragia severa, se obtuvo una respuesta clínica (disminución o cese del sangrado) en 26 (72%).

32 de los 36 pacientes mostraron un acortamiento del tiempo de protrombina y una disminución del APTT. Se encontró una reducción significativa en los requerimientos de hemocomponentes sobretodo en las primeras 24 horas de la infusión de rFVIIa. Tres de cinco pacientes que recibieron rFVIIa por hemorragia obstétrica requirieron histerectomía. 19 pacientes (53%) fallecieron dentro de las 24 horas postinfusión de rFVIIa pero en ningún caso la causa de muerte fue vinculada a la infusión del hemoderivado o por eventos tromboticos. De análisis de los pacientes que sobrevivieron y que fallecieron se estableció que los factores de los pacientes que predicen una supervivencia son la menor edad y la ausencia de co-morbilidad como ocurre en las pacientes obstétricas. El promedio de unidades de eritrocitos transfundidas fue menor en el grupo de sobrevivientes que en los fallecidos lo cual fundamenta la teoría que el tratamiento precoz con rFVIIa en la hemorragia severa mejora la supervivencia y evita las complicaciones de la hemorragia masiva.

En un caso de hemorragia postparto tratada con rFVIIa se diagnostica en el curso de la hospitalización una trombosis arterial (infarto esplénico)(59).

Sin embargo, su origen no puede ser asignado directamente al uso del hemoderivado dado que existían causas multifactoriales en la paciente como hipovolemia y sepsis. El uso de dosis elevadas de rFVIIa puede asociarse a un riesgo elevado de tromboembolismo. A su vez, ciertas condiciones clínicas como la CID, sepsis y embolia del LA aumentan el riesgo de desarrollar trombosis. En estos casos dosis profilácticas de heparina de bajo peso molecular deben ser aplicadas a las 12 a 24 horas después del cese de la hemorragia. En las gestantes donde existe un riesgo aumentado de desarrollar trombosis la decisión de infundir rFVIIa se debe basar en un estricto balance riesgo-beneficio.

En toda hemorragia obstétrica es importante saber que es altísima la posibilidad que se repita en otra situación similar por lo cual esa mujer debe ser evaluada para descartar causas hematológicas que pueden estar colaborando con estos sangrados.

Dado que el mecanismo de la coagulación se basa en una serie de reaccio-

nes enzimáticas, los cambios de temperatura y del pH originan profundas alteraciones en su cinética conduciendo a un estado de hipocoagulabilidad a pesar de que las concentraciones de los factores de la coagulación se encuentren en un rango fisiológico. Aun cuando existe una coagulopatía in vivo esta no se detecta dado que las pruebas de coagulación in vitro se realizan a 37° centígrados. Por ello, es importante mantener la temperatura corporal así como calefaccionar los sueros y hemocomponentes a administrar. Para la infusión rápida no pueden utilizarse calefactores con guías de 5 metros. Nosotros utilizamos calefactores tipo Animec que permite la infusión rápida de sueros y hemocomponentes o baños a 37° centígrados.

La gestación puede inducir la producción de autoanticuerpos contra el factor VIII de la coagulación. Esta hemofilia A adquirida puede ser causa primaria de hemorragia postparto. Si bien esta coagulopatía es un evento raro, el 14% de los casos se identifican usualmente debido a hemorragias en el postparto o a sangrados incoercibles luego de intervenciones quirúrgicas (36). El cuadro clínico por lo general es severo con una mortalidad entre el 10 y 22% (37).

Se presenta en mujeres sin antecedentes personales ni familiares de sangrados. Puede asociarse a síndromes linfoma o mieloproliferativos, tumores sólidos, enfermedades autoinmunes o reacciones inmunoalérgicas a medicamentos.

La paraclínica muestra un APTT muy prolongado que no corrige con el agregado de plasma normal lo cual demuestra la presencia del inhibidor.

Los niveles de actividad del FVIII se encuentran descendidos y el inhibidor se titula en unidades Bethesda para determinar si el anticuerpo es de baja o alta respuesta. Cuando el título del inhibidor es menor a 5 unidades Bethesda se considera de respuesta baja.

En una revisión reciente (37), 14 nuevos casos de hemofilia adquirida postparto fueron estudiados. Estas pacientes presentaron 80 episodios de sangrados de los cuales 34 fueron severos y en un caso de hemorragia postparto se tuvo que realizar histerectomía. El promedio de sangrados por paciente fue de tres. Más de la mitad de las hemorragias fueron espontáneas. Sólo dos pacientes no recibieron terapia de reposición con hemocomponentes. Esta patología generalmente afecta la primera gestación pero se presenta raramente en las siguientes (38).

Los cuadros clínicos idiopáticos, producidos por la gestación, con anticuerpos de títulos bajos tienen un pronóstico más favorable.

Los autoanticuerpos (inhibidores de FVIII) producidos por gestación son por lo general una mezcla policlonal de IgG1 e IgG4 (39). La patogénesis de estos anticuerpos no está aun determinada. Se desarrollan más frecuentemente en el período postparto debido quizá a que la gestante se expone durante el parto al FVIII fetal. Sin embargo, esta teoría no explicaría porque no se produce una respuesta anamnésica del sistema inmunitario

materno en las gestaciones siguientes (41).

Los inhibidores de FVIII adquiridos rara vez se presentan durante la gestación. Esto explicaría porqué no hay afectación fetal a pesar de que los autoanticuerpos son del tipo IgG que pasan la placenta. Sin embargo, cuando el inhibidor persiste por un cierto período de tiempo puede alcanzar la siguiente gestación con pasaje transplacentario al feto (42).

El pasaje transplacentario de los anticuerpos anti-FVIII ha sido demostrado en un caso donde el neonato presentó una hemorragia intracraneal (38) aunque en otro caso el RN presentó un FVIII normal sin secuelas hemorrágicas (36). En este caso el inhibidor de FVIII desapareció espontáneamente en la mujer seis meses después del parto aunque en otra serie de pacientes la media de la desaparición del anticuerpo fue de 27 meses (37). Estos estudios confirman el buen pronóstico de los autoanticuerpos anti-FVIII producidos por la gestación.

El tratamiento consiste en la administración de hemocomponentes para reponer la pérdida sanguínea, factores de la coagulación, inmunosupresores e inmunoglobulina intravenosa. El recambio plasmático no ha sido eficaz para el tratamiento de esta patología (40). Sin embargo, puede ser de utilidad asociado o no a inmunoadsorción en los casos de inhibidores de alta respuesta cuando han fallado otros agentes terapéuticos. En la reciente revisión sobre las indicaciones del recambio plasmático terapéutico realizada por la Asociación Americana de Aféresis (ASFA), se incluyó esta terapéutica para el tratamiento de los inhibidores de los factores de la coagulación, en la categoría III (no existe evidencia suficiente para establecer la eficacia de esta terapéutica ni para determinar claramente un balance riesgo-beneficio y costo-beneficio) (43).

El concentrado de complejo protrombínico (factores vitamina K dependientes II, VII, IX y X) disponible en nuestro país (Octaplex 500UI), produce un bypass en el sistema de coagulación, evitando el factor VIII. Los productos de segunda generación poseen además inhibidores fisiológicos de la coagulación, también vitamina K dependientes como la proteína C, S y Z más heparina lo cual disminuye el riesgo de efectos tromboticos. La dosis es entre 25 a 50 UI por Kg de peso. Este concentrado estaría contraindicado cuando la gestante o puerpera presenta una CID o riesgo aumentado de trombosis.

La prednisona puede utilizarse a una dosis de 50mg/día y la inmunoglobulina intravenosa 1 a 2 g/día durante dos días o 0,4 g/Kg durante 5 días (47). El tratamiento con inmunosupresores para los autoanticuerpos anti-FVIII del postparto no es claro. Varios estudios no han presentado evidencia de su beneficio (44) (45).

La desmopresina (DDAVP) fue utilizada en dos pacientes en una serie de 14 que presentaban inhibidores adquiridos de FVIII pero no se obtuvo una respuesta terapéutica adecuada (37). Sin embargo, los casos de inhibidores de baja respuesta (menos de 5 unidades Bethesda) pueden ser manejados por

lo general con la administración de concentrados de FVIII y DDAVP (39).

El rFVIIa es el tratamiento de elección para controlar el sangrado obstétrico en las mujeres con inhibidor de FVIII adquirido dado que la acción sobre el sistema de la coagulación, independiente del FT, produce grandes cantidades de trombina activando el factor X en las plaquetas activadas sin necesidad de los factores VIII y IX (36).

Para disminuir la concentración del inhibidor últimamente se están utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD20, antígeno que está presente en la membrana de las células de la progenie de los linfocitos B responsables de la respuesta humoral. Este agente farmacológico (rituximab) inicialmente desarrollado para el tratamiento de los linfomas no Hodgkin a células B, se ha extendido para la terapéutica de varias enfermedades autoinmunes (púrpura trombocitopénica, crioglobulinemias, anemias hemolíticas, inhibidores de la coagulación, etc). En una revisión reciente, se estudiaron 65 casos de inhibidores adquiridos de FVIII tratados con este agente a la dosis habitual de 375mg/m² por semana durante cuatro semanas, con una buena respuesta en más del 90% de los casos sin embargo en la mayoría de los casos los pacientes recibieron agentes inmunosupresores en forma concomitante (46).

Utilizando un modelo in vitro, se ha demostrado recientemente que el polifosfato (PF), presente en los gránulos densos de las plaquetas, estimula la coagulación e inhibe la fibrinólisis (48). El PF presente también en bacterias, hongos, plantas y animales, actuaría sobre la coagulación activando el factor V, estimulando la fase de contacto y disminuyendo la acción del inhibidor del factor tisular (TFPI). A nivel de la fibrinólisis estimula la acción del inhibidor activable por trombina (TAFI) (49). El polifosfato es degradado en horas por las fosfatasas plasmáticas. Los síndromes hemorrágicos que ocurren en pacientes con alteraciones de los gránulos densos plaquetarios sostienen el concepto de que el PF juega un rol importante en la hemostasis normal. A pesar de que la acción del PF no se ha demostrado aún en un modelo animal, sería un interesante agente terapéutico por ejemplo en las hemorragias del postparto donde se presentan, como ya vimos, una hipocoagulabilidad seguida de un aumento de la fibrinólisis.

Como ya se ha dicho, **la hemorragia perinatal puede ser causa de muerte materna**. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se entiende por muerte materna aquella que se produce durante una gestación o dentro de los 42 días posteriores al parto por cualquier causa relacionada o agravada por la gestación o su manejo pero no por causas accidentales o incidentes (50).

Más de medio millón de mujeres mueren anualmente en el mundo como resultado de la gestación, el parto o complicaciones relacionadas. En el año 2005, se produjo un estimado de 536.000 muertes maternas a nivel mundial. El 99% (533.000) ocurren en países en vías de desarrollo y más

de la mitad (270.000) en países de África al sur del Sahara (51). El riesgo de muerte materna es 200 veces mayor en países pobres que en países de Europa occidental o de América del Norte. Un tercio de las muertes maternas ocurren en países del sur de Asia. En las dos regiones juntas (África y Asia) se presentan más del 85% de las muertes maternas que ocurren mundialmente.

Por ello, uno de los ocho objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) adoptados tras la Cumbre del Milenio de la ONU (52) consiste en mejorar la salud materna (ODM-5). La comunidad internacional se comprometió a reducir las tres cuartas partes de la mortalidad materna mundial para el año 2015.

Las causas que producen muerte materna varían según las regiones y países del mundo. La hemorragia es la principal causa en los países de África al sur del Sahara y del sur de Asia mientras que los desórdenes hipertensivos (25.7%) durante la gestación y el parto son la principal causa de muerte en los países de América Latina y el Caribe (53). En estos países la hemorragia constituye la segunda causa con un 20,8%.

Las muertes por aborto muestran cifras elevadas (12%) en los países de América Latina y el Caribe mientras que las muertes por sepsis son más frecuentes en los países de África y Asia.

En los países desarrollados las muertes maternas ocurren principalmente por otras causas como son las complicaciones de la anestesia y la cesárea seguidos por los desórdenes hipertensivos y el embolismo. En estos países raramente la hemorragia de la gestación parto o puerperio resulta en muerte materna.

En Inglaterra por ejemplo, el riesgo de muerte materna es de 1 en 100.000 nacimientos.

La mayoría de las mujeres que presentan una hemorragia postparto pueden morir rápidamente (dentro de las dos primeras horas) si no reciben un inmediato y adecuado cuidado médico. Cada minuto de retraso en el tratamiento médico aumenta el riesgo de muerte materna.

En la mayoría de los países de África y Asia donde la hemorragia es la principal causa de muerte esta se produce principalmente porque:

1- la mayoría de las mujeres tienen el parto en el hogar y este es atendido por familiares o idóneos, 2- cuando la hemorragia es reconocida generalmente el transporte de emergencia a un centro asistencial no está disponible o el centro está muy lejano al lugar del parto y 3- inclusive, si la mujer llega a tiempo al centro asistencial puede no existir personal disponible entrenado para tal situación clínica o puede faltar instrumental o material necesario para el tratamiento de la causa de la hemorragia.

La principal causa de hemorragia postparto es la atonía uterina. Otras causas frecuentes de hemorragia son desgarros o laceraciones vaginales o del cuello uterino o problemas placentarios (placenta ácreta, placenta previa, desprendimiento prematuro). Las alteraciones congénitas o adquiridas de

la hemostasis tienen una incidencia mucho menor.

La administración de drogas que contraen el útero inmediatamente después del parto pueden prevenir el sangrado excesivo por ello la OMS ha establecido recientemente las “Recomendaciones para la prevención de la hemorragia postparto” (54).

El nivel de referencia del número de plaquetas circulantes en una población de individuos normales es de entre 150.000 y 400.000 por mm^3 . Durante la gestación las plaquetas por lo general se mantienen dentro de este rango normal. Sin embargo, aproximadamente en el 10% se produce un descenso el cual es más pronunciado en el tercer trimestre con recuentos inferiores a 150.000. Las causas más comunes de **trombocitopenias asociadas a la gestación** se pueden dividir en tres categorías. En el 75% de los casos se presenta una trombocitopenia moderada benigna, con recuentos plaquetarios entre 70.000 y 150.000, que se deben al descenso fisiológico producido por la activación de las plaquetas a nivel de la circulación placentaria. Usualmente se presenta a partir del segundo semestre, es más pronunciada en el momento del parto y por lo general, no tiene manifestaciones clínicas ni justifica modificaciones en el manejo obstétrico de la gestación. Luego de parto el número de plaquetas retorna a valores normales entre los 7 días y seis semanas siguientes.

En segundo lugar, en un 21% las trombocitopenias de la gestación se asocian a estados hipertensivos o a microangiopatías trombóticas.

La destrucción acelerada de plaquetas por causa inmunológica representa el 3% de las trombocitopenias relacionadas al embarazo. Otras causas más raras, que ocurren en menos del 1%, son un déficit de la producción o un aumento de la secuestación esplénica (63).

La microangiopatía trombótica (MAT) se manifiesta por una lesión de la pared de los vasos sanguíneos, principalmente de la microcirculación, con trombosis plaquetaria intraluminal que puede producir obstrucción parcial o total de la luz vascular. La trombocitopenia se asocia a una hemólisis mecánica caracterizada por la aparición de esquistocitos en la lámina de sangre periférica. La MAT adquirida incluye cuadros clínicos asociados a la gestación como pre-eclampsia, eclampsia, síndrome de HELLP, síndrome urémico hemolítico (SUH), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y CID. En todos estos casos se puede asociar un síndrome hemorrágico (63). En el HELLP, SUH y PTT los estudios de la coagulación como el tiempo de tromboplastina (APTT) o el de protrombina (TP) se encuentran por lo general dentro de límites normales a diferencia de la CID.

La MAT se puede asociar también en la gestación a hígado graso, anticuerpos antifosfolípidos, enfermedades sistémicas (lupus, esclerodermia, hipertensión maligna y cáncer), a infecciones (VIH, E.Coli o Shigella), medicamentos (quimioterapia, ticlopidina o quinina) y a trasplante renal o de médula ósea (64).

Dentro de las MAT congénitas se describen anomalías intrínsecas del sistema complemento debidas a la deficiencia del factor H que es una proteína plasmática que inhibe la activación de la vía alterna del complemento o por deficiencia de la proteasa ADAMTS 13 que fragmenta los multímeros del factor von Willebrand (64).

En las formas de MAT adquiridas, más frecuentes que las congénitas, dependiendo de si prevalecen las lesiones renales, cerebrales o hepáticas se han descrito tres entidades clínicamente diferentes pero patológicamente indistinguibles llamadas SUH que habitualmente debuta en el puerperio, PTT que generalmente se presenta en las etapas iniciales del embarazo y el síndrome de HELLP que se produce por lo general cercano al término pero que en un 30% de los casos está presente también en el puerperio.

El **síndrome de HELLP** se caracteriza por la tríada de hemólisis, trombocitopenia y elevación de la concentración de las enzimas hepáticas en sangre (**H**emolysis, **E**levated **L**iver enzymes and **L**ow **P**latelet). Puede acompañarse también de hipertensión arterial, edemas, proteinuria, leucocitosis, insuficiencia renal y edema pulmonar (65). El diagnóstico de HELLP se realiza en base a cuatro alteraciones de laboratorio: aumento de la concentración de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) por encima de 600 UI/litro, anemia con valores de hemoglobina inferiores a 10g/dl, recuento plaquetario inferior a 100.000 por mm³ y elevación de las enzimas hepáticas AST mayor a 70 UI/litro y ALT mayor a 50 UI/litro (66). La severidad de la trombocitopenia se puede clasificar en clase 1 o severa con cifras inferiores a 50.000, clase 2 o moderada entre 50.000-100.000 y clase 3 leve mayor de 100.000 (67). La trombocitopenia neonatal ocurre entre un 15 al 38% de los casos (65).

El síndrome de HELLP gestacional se trata de una forma severa de preeclampsia con presencia de hipertensión arterial, disfunción renal, MAT y compromiso hepático. La mortalidad materna y perinatal varían del 0 al 24% y del 7,7 al 60% respectivamente (64).

La finalización del embarazo es el tratamiento de elección. Pero, la sintomatología puede aparecer o prolongarse al puerperio. Las transfusiones de plaquetas sirven para controlar el sangrado clínico o para el tratamiento de la trombocitopenia severa. Se deben mantener recuentos de plaquetas superiores a 50.000 para el parto vaginal o a 80.000 cuando se realiza cesárea. El recambio plasmático (RP) es el tratamiento de elección en el PTT, debe ser considerado una terapéutica de urgencia, y se le adjudica una categoría I según la última revisión realizada por las American Society for Apheresis (ASFA) (68). Sin embargo, el recambio plasmático está menos indicado en el SUH (categoría III) o en el síndrome de HELLP (69) salvo que se presenten cuadros clínicos severos.

En un trabajo reciente, se ha demostrado que en la fase aguda del síndrome de HELLP los niveles de antitrombina III (AT-III) se encuentran descendidos a diferencia del SUH y el PTT que se manifiestan con niveles

normales de AT-III. Por el contrario, los D-Dímeros se encuentran elevados por encima de los valores de la gestación (70). En la misma publicación, se demostró que las gestantes con HELLP presentaban niveles reducidos pero con actividad detectable de la enzima ADAMTS 13 sin una relación evidente entre la severidad del cuadro clínico y el nivel de la proteasa.

En gestaciones normales la concentración sanguínea de ADAMTS 13 fue menor que en mujeres normales no embarazadas pero superior a las gestantes con HELLP. Los niveles de la enzima retornan a valores normales seis meses después de la remisión del síndrome.

Los niveles bajos de ADAMTS 13 en el HELLP no se acompaña de la presencia de autoanticuerpos contra la enzima ni de la presencia de grandes multímeros de factor von Willebrand como en el PTT.

El descenso de los niveles de ADAMTS 13 en el HELLP podría explicarse por dos mecanismos: por una disminución de la producción o un aumento de su eliminación (clearance). No se plantean defectos genéticos dado que los valores retornan a sus niveles normales seis meses después. La proteasa se sintetiza en el hígado por lo cual su concentración en sangre es muy baja en pacientes con cirrosis (71). A pesar que en el HELLP se produce un toque hepático este no es severo dado que los test de coagulación se mantienen dentro de rangos normales.

Una relación significativa se ha encontrado entre el aumento mantenido de multímeros de FvW (sustrato) y el descenso, por consumo aumentado, de la enzima ADAMTS 13 en pacientes en el postoperatorio, estados inflamatorios crónicos, gestación o luego de la infusión de desmopresina (DDAVP) (71). Por tanto, el mecanismo más aceptado para los descensos de la concentración de la enzima ADAMTS 13 durante la gestación y/o el HELLP sería un consumo por el aumento de los niveles de multímeros de FvW (70).

Esto explicaría porqué el recambio plasmático realizado con plasma mejoraría la recuperación del HELLP (72) al igual que el tratamiento mediante la sola infusión de plasma que aportaría ADAMTS 13, AT-III e inclusive factor H (73) (74). Debemos tener presente las complicaciones que se pueden presentar con la terapia plasmática como reacciones alérgicas, sobrecarga de volumen, infecciones o insuficiencia respiratoria aguda (TRALI).

Para finalizar, en una revisión retrospectiva reciente (75) de 14 estudios con un total de 4594 pacientes transfundidos masivamente, se llega a la conclusión, de que en aquellos que tienen un sangrado importante es mejor realizar una reposición precoz e intensa con una relación sangre desplasmatizada-plasma fresco-plaquetas de por los menos 1:1:1.

Esta relación entre los hemocomponentes mejoraría la coagulopatía aguda aportando principalmente fibrinógeno y plaquetas que de acuerdo al nuevo modelo celular de la hemostasis son fundamentales para la interacción del resto de los factores de la coagulación en la formación de fibrina. Recor-

demostramos, que para que la utilización del rFVIIa sea efectiva para detener la hemorragia se necesita también de una concentración mínima basal de fibrinógeno y plaquetas. A su vez, la reposición inmediata e intensa con hemocomponentes reduce las necesidades de soluciones cristaloides y coloides lo cual evita por un lado la dilución de los factores de la coagulación y la interferencia con la polimerización de la fibrina por otro (76) (77). La administración precoz y agresiva de plasma fresco y plaquetas reduciría además la necesidad global de hemocomponentes mejorando la hemostasis y la sobrevida en pacientes con hemorragia masiva (78).

Si luego de la reposición inicial con hemocomponentes, en dosis y relación adecuadas no se produce una mejoría hemodinámica y de la hemostasis se debe plantear una causa quirúrgica la cual debe ser corregida lo antes posible para evitar cuadros clínicos irreversibles.

Otro componente importante de la coagulopatía aguda que se produce en una hemorragia masiva es la hiperfibrinólisis que no es resuelta por el aporte de hemocomponentes sino por la administración de drogas antifibrinolíticas. En un estudio donde esta condición fue evaluada por tromboelastografía (TEG) rotacional la presencia de hiperfibrinólisis se asoció a una peor evolución (79).

El estudio de las propiedades viscoelásticas de la sangre total (TEG) demostró tener un valor diagnóstico y de guía para la reposición de hemocomponentes superior a los estudios de hemostasis convencionales (80). En un trabajo donde los pacientes con hemorragias masivas fueron estudiados y tratados de acuerdo a los resultados del TEG rotacional la sobrevida fue superior (80% vs. 68%) (81).

En un futuro, estudios randomizados controlados deberán ser realizados para valorar si los pacientes con hemorragia masiva responden mejor a una terapia de reposición individualizada basada en resultados de TEG o en base a recomendaciones fijas con relaciones determinadas entre los hemocomponentes.

Bibliografía

- 1- Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Women Issues in Thrombophilia 2003;29:125-130.
- 2- Stirling Y, Wolf L, North WRS, Seghatchian MJ, Meade TW. Hemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemostas* 1984;52:176-182.
- 3- Kadir RA, Economides DL, Sabin CA, Owens D, Lee CA. Frequency of inherited bleeding disorders in women with menorrhagia. *Lancet* 1988;351:485-489.
- 4- Yang MY, Ragni MV. Clinical manifestations and management of labor and delivery in women with factor IX deficiency. *Haemophilia* 2004;10:483-490.
- 5- Gringeri A. Congenital bleeding disorders and pregnancy. *Haematologica* 2005;1:43-46.
- 6- Giangrande PLF. Pregnancy in women with inherited bleeding disorders. *Treatment of Hemophilia* nro 29,2003. Published by the World Federation of Hemophilia.
- 7- Kaufmann JE, Vischer UM. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* 2003;1:682-689.
- 8- Ozal E, Kuralay E, Bingol H, Cingoz F, Ceylan S, Tatar H. Does tranexamic acid reduce desmopressin-induced hyperfibrinolysis?. *J Thorac Cardiovasc Surgery* 2002;123:539-543.
- 9- Fraser I, Porte R, Kouides P, Lukes A. A benefit-risk review of systemic haemostatic agents. Part 1: in major surgery. *Drug Safety* 2008;31:217-230.
- 10- Mannucci PM. Use of desmopressin (DDAVP) during early pregnancy in factor VIII-deficient women. *Blood* 2005;105:3382.
- 11- Lee CA, Chi C, Pavord SR, Bolton-Magg PHB, Pollard D, Hinchcliffe-Wood A, Kadir RA. The obstetric and gynaecological management of women with inherited bleeding disorders-review with guidelines produced by a taskforce of UK Haemophilia Centre Doctors Organization. *Haemophilia* 2006;12:301-336.
- 12- Ljung R, Lidgren A, Petrini P, Tengborn L. Normal vaginal delivery is to be recommended for haemophilia carrier gravidae. *Acta Paediat* 1994;83:609-611.
- 13- Kadir RA, Economides DL, Braithwaite J, Goldman E, Lee CA. The obstetrics experience of carriers of haemophilia. *Brit J Obstet Gynecol* 1997;104:803-810.
- 14- Demers C, Derzko C, David M, Douglas J. Gynaecological and obstetrics management of women with inherited bleeding disorders. *SOG Clinical Practice Guidelines* 2005;163:707-718.
- 15- World Health Organization (WHO) and Blood Transfusion Safety. *The Clinical Use of Blood: handbook*. Geneva, Switzerland 2001 p 122-132.
- 16- American Association of Blood Bank (AABB). *Manual Técnico*. 15 edición en español. Buenos Aires-Argentina, 2007 p 523.
- 17- Santoso JT, Saunders BA, Grosshart K. Massive blood loss and transfusion in obstetrics and gynecology. *Obstetrical and Gynecology* 2005;60:827-837.
- 18- Recomendación para la Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad hemolítica feto-neonatal en la gestación y para la inmunoprofilaxis anti-D. *Arch Gin Obstet* 2005;43:169-176.
- 19- Francois A, Courtois F. Gestion des produits sanguins labiles dans le cadre des hemorrhagies du post-partum immédiat. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004 ;33(suppl 8):4s120-4s129.
- 20- Boulay G, Hamza J. Prise en charge anesthésique en cas d'hémorragie du post-partum qui persiste ou qui s'aggrave malgré les mesures initiales. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004 ;33(suppl 8):4s80-4s88.
- 21- Weiskopf RB. Erythrocyte salvage during cesarean section. *Anesthesiology* 200;92:1519-1522.
- 22- Catling SJ, Williams S, Fielding AM. Cell salvage in obstetrics: an evaluation of the ability of cell salvage combined with leukocyte depletion filtration to remove amniotic fluid from operative blood loss at cesarean section. *Int J Obstet Anesth* 1999;8:79-84.
- 23- Pereira A, Silveira S, Hernandez C, Varela A, Gaggero M, Olivera P, Dilorenzi N, Gualarte M, Larrosa V, Miller A y Decaro J. Erythrocyte antibodies in Pregnant Women. XXXI World Congress of de International Society of Hematology (ISH) 20-24 marzo,2007. Punta del Este-Uruguay.
- 24- Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of

screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion* 2008;48:941-952.

25- Kakaiya R. Emergency Transfusion: Uncrossmatched or incompatible blood. *Transfusion Medicine Update*. Institute for Transfusion Medicine issue 1, 2006.

26- Nester TA, Rumsey DM, Howell DM et al. Prevention of immunization to D positive red blood cells with red blood cell exchange and intravenous Rh immunoglobulin. *Transfusion* 2004;44:1720-1723.

27- Kozek-Langenecker S. Management of massive operative blood loss. *Minerva Anestesiologica* 2007;73:401-415.

28- Cortina LD. Terapia transfusional en la hemorragia obstétrica mayor. Síndrome de transfusión masiva. *Rev Cubana Obstet Ginecol* 2007;33:58-65.

29- Lozano M, Cid J. The clinical implications of platelet transfusions associated with ABO or Rh(D) incompatibility. *Transfus Med Rev* 2003;17:57-68.

30- Hardy JF, de Moerloose P, Samama CM. Massive transfusion and coagulopathy: pathophysiology and implications for clinical management. *Can J Anaesth* 2006;53:S40-58.

31- Chichakli LO, Atrash HK, Mackay AP, Musani AS, Berg BJ. Pregnancy related mortality in the United States due to hemorrhage: 1979-1992. *Obstet Gynecol* 1999;94:721.

32- Martinowitz U, Michaelson M, et al. Guideline for the use of recombinant activated factor VII (rFVIIa) in uncontrolled bleeding: a report by the Israeli Multidisciplinary rFVIIa Task Force. *J Thromb Haemost* 2005;3:640-648.

33- Shander A, Goodnough LT, Ratko T et al. Consensus recommendations for the off-label use of recombinant human factor VIIa (NovoSeven) therapy. *Pharma Ther* 2005;30:644.

34- Welsh A, McLintock C, Gatt S, Somerset D, Popham P, Ogle R. Guidelines for the use of recombinant activated factor VII in massive obstetric haemorrhage. *Australian and New Zealand Journal Of Obstetrics and Gynaecology* 2008;48:12-16.

35- Courtois L, Becher P, Miot S, Maissonette-Escot Y, Sautière JL, Berthier F, Samain E, Maillat R, Riethmuller D. Hémorragie de la délivrance « menaçant la vie » et utilisation du facteur VII recombinant activé rFVIIa NovoSeven. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2007;36:78-82.

36- Borna S, Hantoushzadeh S. Acquired hemophilia as a cause of primary postpartum hemorrhage. *Arch Iranian Med* 2007;10:107-110.

37- Solymoss S. Postpartum acquired factor VIII inhibitors: Results of a survey. *Am J Hematol* 1998;59:1-4.

38- Howland EJ, Palmer J, Lumley M, Keay SD. Acquired factor VIII inhibitors as a cause of primary postpartum hemorrhage. *Eur J Obstet Gynecol* 2002;103:87-98.

39- Franchini M. Postpartum acquired factor VIII inhibitors. *American Journal of Hematology* 2006;81:768-773.

40- Hauser I, Schneider B, Lechner K. Postpartum factor VIII inhibitors. A review of the literature with special reference to the value of steroid and immunosuppressive treatment. *Thromb Haemost* 1995;73:1-5.

41- Coller BS, Hultin MB, Hoyer LW et al. Normal pregnancy in a patient with a prior postpartum factor VIII inhibitor: with observations on pathogenesis and prognosis. *Blood* 1981;58:619-624.

42- Ries M, Wolfed D, Maier-Brandt B. Severe intracranial hemorrhage in a newborn infant with transplacental transfer of an acquired factor VIII:C inhibitor. *J Pediatr* 1995;127: 649-650.

43- Szczepiokowski ZM, Shaz BH, Bandarenko N, Winters JL. The new approach to assignment of ASFA categories-introduction to the fourth special issue: Clinical applications of therapeutic apheresis. *Journal of Clinical Apheresis* 2007;22:96-105.

44- Michiels JJ, Hamulyak K, Niewenhuis HK et al. Acquired haemophilia A in women postpartum : management of bleeding episodes and natural history of the factor VIII inhibitor. *Eur J Haematol* 1997;59:105-109.

45- Michiels JJ. Acquired hemophilia in woman postpartum: clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2000;6:82-86.

46- Franchini M, Veneri D, Lippi G, Stenner R. The efficacy of rituximab in the treatment of inhibitor-associated hemostatic disorders. *Thromb Haemost* 2006;96:119-125.

47- Franchini M, Lippi G. Acquired factor VIII inhibitors. *Blood* 2008;112:250-255.

48- Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *PNAS* 2005;103:903-908.

49- Morrissey JH, Mutch NJ, Smith SA, Waters EK, Docampo R. Tissue factor, platelets and polyphosphate: new ways to modulate blood clotting and fibrinolysis. *Haematologica Reports* 2005;2:13.

50- WHO International Statistical Classification of Disease and Related Health, Tenth Revision, 1992 (ICD-10).

51- WHO Maternal mortality in 2005: estimates developed by WHO, UNICEF, UNFPA and The World Bank. www.who.int/whosis/mme-2005.

52- United Nations General Assembly. United Nations Millennium Declaration. A/Res/55/2, 1-9-2000. UN General Assembly 55th Session, Agenda item 60 (b).

53- Khan Ks, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006;367:1066-1074.

54- WHO Recommendations for the Prevention of Postpartum Haemorrhage. Geneva 2007. www.who.int

55- Vincent JL, Rossaint R, Riou B, Ozier Y, Zideman D, Spahn Dr. Recommendations on the use of recombinant activated factor VII as an adjunctive treatment for massive bleeding- a European perspective. *Critical Care* 2006;10:1-12.

56- Ahonen J, Jokela R. Recombinant factor VIIa for life-threatening post-partum haemorrhage. *Br J Anaesth* 2005;94:592-595.

57- Shander A, Goodnough LT, Ratko T et al. Consensus Recommendations for the off-label use of recombinant human factor VIIa (NovoSeven) therapy. *Pharma Ther* 2005;30:644-658.

58- Biss TT, Hanley JP. Recombinant activated factor VII (rFVIIa/NovoSeven) in intractable haemorrhage: use of a clinical scoring system to predict outcome. *Vox Sanguinis* 2006;90:45-52.

59- Courtois L, Becher P, Miot S et al. Life-threatening postpartum hemorrhage and recombinant activated factor rFVIIa NovoSeven use. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2007;36:78-82.

60- Fridberg MJ, Hedner U, Roberts HR, Erhardtson E. A study of the pharmacokinetics and safety of recombinant activated factor VIII in healthy Caucasian and Japanese subjects. *Blood Coagul Fibrinol* 2005;16:259-266.

61- Kenet G, Lubetsky A, Luboshitz J, Martinowitz U. A new approach to treatment of bleeding episodes in young hemophilia patients: a single bolus megadose of recombinant activated factor VII (NovoSeven). *J Thromb Haemost* 2003;1:450-455.

62- Yatur R, Dayan I, Carmel-Goren L, Robinson M, Aviv I, Goldenberg-Furmanov M, Baru M. Enhancement of factor VIIa haemostatic efficacy by formulation with PEGylated liposomes. *Haemophilia* 2008;14:476-483.

63- Strong J. Bleeding disorders in pregnancy. *Current Obstetrics and Gynaecology* 2003;13:1-6.

64- Chiurciu C, Remuzzi G. Síndrome hemolítico urémico. *Microangiopatía trombótica*. *Nefrología* 2003;XXIII (supl 3):13-20.

65- Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: Clinical signs and management. A Review. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2009;9: 1-15.

66- Sibai BM, Ramadan MK, Usta I et al. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1000-1006.

67- Martin JN Jr, Blake PG, Lowry SL et al. Pregnancy complicated by preeclampsia-eclampsia with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: how rapid is postpartum recovery? *Obstet Gynecol* 1990;76:737-741.

68- Szczepiokowski ZM, Shaz BH, Bandarenko N, Winters JL. The new approach to assignment of ASFA categories-Introduction to the fourth special issue: Clinic Applications of Therapeutic Apheresis. *J Clin Apheresis* 2007;22:96-105.

69- Martin JN Jr, Files JC, Blake PG et al. Postpartum plasma exchange for atypical preeclampsia-eclampsia as HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets) syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1107-1115.

70- Lattuada A, Rossi E, Calzarossa C, Candolfi R, Mannucci PM. Mild to moderate reduc-

tion of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica* 2003;88:1029-1034.

71- Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001;98:2730-2735.

72- Eser B, Guven M, Unal A, Coskun R et al. The role of plasma exchange in HELLP syndrome. *Clin Appl Thrombosis and Hemostasis* 2005;11:211-217.

73- Fakhouri F, Jablonski M, Lepercq J et al. Factor H, membrane cofactor protein, and factor I mutations in patients with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome. *Blood* 2008;112:4542-4545.

74- Montoya JM, Pacheco RM, Cortes R, Hernandez R. Relación entre la administración de plasma fresco y morbilidad en pacientes con HELLP. *Ginecol Obstet Mex* 2008;76:582-586.

75- Johansson PI, Stensballe J. Hemostatic resuscitation for massive bleeding: the paradigm of plasma and platelets - a review of the current literature. *Transfusion* 2010;50:701-710.

76- Johansson PI, Hansen MB, Sorensen H. Transfusion practice in massively bleeding patients: time for change? *Vox Sang* 2005;89:92-96.

77- Hess JR, Holcomb JB, Hoyt DB. Damage control resuscitation: the need for specific blood products to treat coagulopathy of trauma. *Transfusion* 2006;46:685-686.

78- Cotton BA, Au BK, Nuñez TC et al. Predefined massive transfusion protocols are associated with reduction in organ failure and postinjury complications. *J Trauma* 2009;66:41-49.

79- Schochl H, Frietsch T, Pavelka M, Jambor C. Hyperfibrinolysis after major trauma: differential diagnosis of lysis patterns and prognostic value of thromboelastometry. *J Trauma* 2009;67:125-131.

80- Di Benedetto P, Baciarello M, Cebetti L et al. Thromboelastography. Present and future perspectives in clinical practice. *Minerva Anestesiol* 2003;69:501-515.

81- Johansson PI, Stensballe J. Effect of haemostatic control resuscitation on mortality in massively bleeding patients : a before and after study. *Vox Sang* 2009;96:111-118.

CAPÍTULO 11 - TRANSPLANTE CON CÉLULAS DE CORDÓN UMBILICAL

En el 2007, se cumplieron cincuenta años desde que Donnal Thomas describe la primera infusión endovenosa en humanos de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) alogénicas obtenidas de la médula ósea de donantes normales en seis pacientes que habían recibido quimio y radioterapia (1). Thomas se basó en los experimentación animal previa realizada por Leon Jacobson en 1949 quien demostró que cuando un ratón era expuesto a una irradiación letal este podía sobrevivir si luego se le administraban células del bazo (2) o en posteriores estudios de la médula ósea. Esta sobrevida fue debida a un efecto celular más que humoral lo cual fue demostrado algunos años después cuando algunos investigadores irradiaron ratas y luego le infundieron células de la médula ósea con cromosomas marcados. De esta manera, se demostró que la recuperación de la rata se debió exclusivamente a células del donante.

En la década de 1970, el trasplante autólogo de médula ósea, demostró ser efectivo en pacientes con linfomas no Hodgkin los cuales fueron curados utilizando altas dosis de quimioterapia seguido de la infusión de CPH autólogas obtenidas de su propia médula ósea, criopreservadas y reinfundidas en el período de aplasia medular.

A finales de esta década, el grupo de Seattle, liderado por Thomas, realizó el primer trasplante alogénico no relacionado en un paciente con leucemia lo cual estimuló la formación en USA del National Marrow Donor Program que en la actualidad cuenta con más de 11 millones de donantes voluntarios registrados y tipificados para el sistema de histocompatibilidad (HLA) (3).

En 1990, Thomas y Joseph Murray quien realizó el primer trasplante renal entre gemelos, recibieron el Premio Nobel por sus investigaciones relacionadas al trasplante de células y órganos para el tratamiento de enfermedades en humanos.

Actualmente, el trasplante con CPH se realiza en más de 500 centros a nivel mundial en más de 50 países incluido Uruguay, tanto en pacientes adultos como pediátricos. Se utiliza como terapéutica tanto para enfermedades hematológicas, alteraciones congénitas o adquiridas de la médula ósea o para el tratamiento de tumores sólidos como el cancer de mama, testículo, neuroblastoma, meduloblastoma, retinoblastoma, etc. Esta terapéutica fue realizada en más de 50.000 personas en el año 2006 (3).

Tradicionalmente, las CPH eran obtenidas, para realizar trasplantes autólogos o alogénicos, por aspiración de la médula ósea primero y de sangre periférica después, mediante la estimulación previa de la médula ósea y su recolección posterior por aféresis utilizando separadores celulares.

A finales de la década de 1980 las células del cordón umbilical surgen

como una fuente alternativa para la obtención de CPH.

El primer trasplante de donante relacionado humano, utilizando CPH alogénicas de cordón umbilical, fue realizado por Eliane Gluckman en el Hospital St Louis de París en 1988 en un niño de cinco años que padecía una anemia de Fanconi y que recibió CPH del cordón umbilical de su hermana recién nacida HLA idéntica (4). Existen dos publicaciones que describen luego los resultados del trasplante de células de cordón de **donantes relacionados en niños** para el tratamiento de enfermedades malignas o no (28) (29). La recuperación de la médula ósea fue de 82 y 79% respectivamente con un tiempo de recuperación de neutrófilos de 22 y 30 días. La prevalencia de enfermedad de injerto versus huésped fue baja en ambos estudios (6 y 14%) lo cual se debe a que la sangre de cordón es un producto naturalmente depleccionado para la población de linfocitos T.

Las CPH de cordón umbilical tienen algunas ventajas sobre las obtenidas de la médula ósea. No necesitan como las células del adulto una compatibilidad HLA total para que el trasplante se realice con éxito. Pueden ser obtenidas sin ningún riesgo para la madre y el recién nacido. Anteriormente la placenta, el cordón umbilical y la sangre contenida en ellos eran un material de descarte.

Tienen menor riesgo de transmitir enfermedades infecciosas y se ha demostrado que causan menos enfermedad de injerto versus huésped la cual constituye una de las mayores complicaciones en los trasplantes alogénicos (5).

Las limitantes del trasplante con células de cordón serían una dosis insuficiente de CPH para tratar adultos y niños mayores, una más lenta recuperación medular, la posibilidad de transmitir enfermedades genéticas y en contraste con las CPH obtenidas de médula ósea o sangre periférica que pueden ser obtenidas de un mismo donante para un segundo trasplante por falla del injerto o por recaída de la enfermedad, en el cordón umbilical no relacionado no se puede realizar (6).

Uno de los mayores obstáculos en los trasplantes de CPH alogénicas es la disponibilidad de donantes compatibles. Sólo el 25% encuentran un donante no relacionado HLA compatible a través de los registros internacionales pero en algunos grupos étnicos sólo es posible en un porcentaje menor al 10%.

Dado que, las células de cordón umbilical, pueden ser obtenidas sin ningún riesgo para la madre y el recién nacido, es más fácil obtener su consentimiento para integrar bancos de cordón públicos que para integrar una lista de donantes voluntarios adultos.

El primer Banco de Células de Cordón Umbilical fue creado por el Dr. Pablo Rubinstein en el New York Blood Center. Actualmente integra un registro internacional (Netcord) con otros 25 bancos lo que proporciona un inventario de más de 150.000 cordones. De todos ellos el banco de cordón de New York es el que tiene el mayor stock y ya ha aportado más de 1400 cordones para la realización de trasplantes alrededor del mundo.

La colecta de la sangre de cordón puede realizarse in situ antes de que se produzca el alumbramiento de la placenta o ex vivo 10 a 15 minutos después de la expulsión de la placenta. Mediante una punción de la vena umbilical luego de ligar y cortar el cordón lo más cerca posible del recién nacido se obtiene la sangre de cordón por gravedad en una bolsa que contiene 35 ml de anticoagulante (CPD). Previamente se debe limpiar la zona de punción con alcohol y yodo y esperar 20 a 30 segundos para su secado. El drenaje dura aproximadamente 5 a 8 minutos. Luego se retira la aguja y se clampea la tubuladura de la bolsa. La sangre puede ser mantenida a temperatura ambiente (18-22° centígrados) durante 48 a 72 horas sin que exista una pérdida celular.

Algunos trabajos muestran que la colecta in utero sería el mejor método de obtención de CPH de cordón (7) e inclusive una segunda extracción luego de la infusión con solución salina por la arteria umbilical aumentaría el volumen de extracción (8).

Un paso crítico en el procesamiento de la sangre de cordón umbilical es la reducción a un volumen uniforme de 20 ml para facilitar la estandarización de la criopreservación y maximizar el número de unidades que se pueden almacenar. El objetivo es reducir el volumen y la cantidad de eritrocitos pero manteniendo una alta recuperación de CPH.

La mayoría de los bancos de cordón reducen el volumen obtenido mediante un agente que sedimenta los eritrocitos por gravedad, el hydroxiethylstarch (almidón) isotónico al 6% en una relación de 1 a 5 (9), que es la técnica que usamos en nuestro país. Recientemente, se han desarrollado filtros para reducir el volumen y la cantidad de eritrocitos de las colectas de sangre de cordón. Dos estudios han demostrado que este nuevo sistema (Procord-TF4-Terumo) es comparable con otros métodos ya utilizados para reducir el volumen y los glóbulos rojos con una buena recuperación de CPH con habilidad de producir una buena regeneración medular en animales (10) (11).

Un segundo filtro, StemQuick E, Asahi Medical, produce una rápida y estandarizada reducción de volumen con una depleción parcial de granulocitos, eritrocitos y plaquetas (12).

La empresa Termogénesis ha desarrollado últimamente un método automatizado para la reducción del volumen y el hematocrito de la sangre de cordón (AXP-AutoXpress Platform) manteniendo una recuperación del 98,2% de células CD34, de 94,6% para unidades formadoras de colonia (CFU) y del 97,9% para células mononucleadas (MNC) (www.gehealthcare.com/cellprep).

Más de la mitad de las unidades de sangre de cordón obtenidas no son criopreservadas para trasplante debido al bajo volumen de extracción (13).

Según el Cord Blood Transplantation Study (COBLT) (14), las unidades de cordón deben tener, para la realización de trasplantes en enfermedades hematológicas con regímenes mieloablativos, en pacientes pediátricos, una concentración mayor a $2,5 \times 10^7$ de células nucleadas totales por Kg de

peso del receptor previo a la criopreservación.

Para la conservación, se realiza un congelamiento mediante un descenso programado de temperatura en nitrógeno líquido utilizando el dimethylsulfoxide (DMSO), en una concentración del 5 al 10%, como crioprotector celular. Hasta ahora no se ha determinado el tiempo de conservación o la fecha de vencimiento para las células de cordón pero el mantenimiento en nitrógeno líquido a temperaturas de -180° centígrados puede ser por décadas (5). Esta técnica es similar a la que usamos en nuestro país para las CPH obtenidas de médula ósea o sangre periférica pero con un volumen menor.

Los **controles de laboratorio** que se deben realizar son un hemocultivo, hemograma, recuento de células CD34, hemoglobinopatías, enfermedades infecciosas, grupo sanguíneo ABO y Rh(D), búsqueda de anticuerpos inmunes y tipificación HLA. La sangre de CU es descartada si existe reactividad para hepatitis B, C, HIV1-2, HTLV-I/II, sífilis o chagas. También si la madre ha viajado o residió en países endémicos para malaria o HIV (5). Entre un 40 y 90% de las madres presentan una IgG anti-CMV lo cual representa una respuesta inmunológica luego de una infección por CMV en años anteriores pero no representa una infección durante la gestación. Si la madre tiene IgG anti-CMV probablemente el cordón también las tenga por transferencia pasiva a través de la placenta pero no indica que el feto haya estado expuesto o esté infectado con CMV. Lo que se determina es la presencia de IgM anti-CMV que estaría indicando una infección aguda. Sin embargo, sólo el 3% de las unidades de CU con IgM anti-CMV contiene el virus demostrable por test de ácidos nucleicos (NAT) (34).

Las complicaciones por **incompatibilidad ABO** entre donante y receptor como el síndrome del linfocito pasajero (donante grupo 0 y receptor grupo A) que produce una hemólisis intravascular masiva en los trasplantes alogénicos con CPH obtenidas de sangre periférica parece no producirse con la sangre de cordón umbilical. No hay reportes sobre esta complicación lo cual sugiere diferencias inmunológicas fundamentales entre las células de cordón y las obtenidas de sangre periférica (15). La diferencia estaría dada por la menor presencia de linfocitos inmunológicamente competentes en la sangre de cordón lo cual también explicaría la menor incidencia de la reacción de injerto versus huésped (6).

En algunos casos la incompatibilidad ABO puede afectar el tiempo de recuperación plaquetaria y la cantidad de transfusiones (16).

Los primeros 25 casos de trasplante de CPH de cordón umbilical con **donantes no relacionados en niños** fueron publicados por Kurtzberg en 1996 (17). Veinticuatro de los 25 pacientes tuvieron una discordancia donante-receptor para uno o tres antígenos del sistema HLA. En 23 de los 25 receptores el injerto produjo la recuperación medular. Dos de 21 pacientes presentaron una enfermedad de injerto versus huésped (GVHD) aguda grado III y en dos pacientes la GVHD fue crónica. A los 100 días la

sobreviva fue del 64%.

Recientemente, se ha publicado el primer trabajo prospectivo y multicéntrico (COBLT study) de trasplante no relacionado de células de cordón en 191 pacientes pediátricos con enfermedades hematológicas malignas (14). La supervivencia de los pacientes a los seis meses y a un año fue de 67,4% y 57,3% respectivamente. Las causas más comunes de muerte fueron la recaída (40%), GVHD 27% con o sin infección y falla del injerto (17%). El tiempo promedio de salida de la médula injertada (más de 500 neutrófilos y más de 50.000 por mm^3) fue de 27 y 174 días respectivamente. La incidencia de la recuperación de neutrófilos a los 42 días fue de 79,9%. Las dosis mayores de CPH fueron las que mejoraron los tiempos de recuperación de neutrófilos y plaquetas. Los autores recomiendan, para aquellos pacientes con enfermedades hematológicas malignas que reciben un trasplante de CPH de cordón con un régimen mieloablatoivo, que el injerto contenga más de $2,5 \times 10^7$ células nucleadas totales antes de la criopreservación.

Por tanto, niños que tienen leucemia de alto riesgo o que han recaído luego de la terapia, que no tienen donantes de médula ósea relacionados o no relacionados, deben ser referidos y evaluados inmediatamente para un trasplante con CPH de cordón umbilical no relacionado antes de que su estado clínico empeore y se reduzcan las chances de su mejoría con un trasplante alogénico.

En general, los resultados pediátricos indican que el trasplante con CPH de cordón umbilical es efectivo inclusive en pacientes con incompatibilidad HLA en dos antígenos. Por tanto, los cordones aumentan considerablemente el pool de donantes no relacionados. La incidencia de GVHD es menor que cuando se utilizan CPH de médula o sangre pero el tiempo de recuperación medular es más prolongado en especial el de plaquetas. No parece haber una disminución en el efecto injerto versus leucemia. La dosis infundida es un factor importante para el tiempo de recuperación medular y la supervivencia.

En un estudio de los grupos Eurocord y European Blood Marrow Transplant (EBMT) 682 **adultos** con leucemia aguda recibieron, entre 1998 y 2002, trasplante de CPH de **donante no relacionado** de los cuales 98 fueron con células de cordón umbilical (CU) y 584 con médula ósea (MO) (18).

Los receptores de sangre de cordón tuvieron menor edad y peso y un estadio más avanzado de enfermedad. Todos los trasplantes de MO fueron HLA compatibles mientras que en el 94% de los de CU no eran compatibles con algún antígeno HLA. El promedio de células nucleadas infundidas fue de $0,23 \times 10^8$ x Kg de peso del receptor en las unidades de CU y de $2,9 \times 10^8$ en las de MO. El promedio de células CD34+ en las infusiones de CU fue de $1,1 \times 10^5$ x Kg de peso. Los resultados de este estudio mostraron un menor riesgo de desarrollar GVHD con las células de CU pero con un mayor tiempo de recuperación medular para neutrófilos (26 versus 19 días). En la incidencia de GVHD crónica, mortalidad relacionada al trasplante,

recaída y superviva fueron similares en ambos grupos. Se concluye que el trasplante con células de CU es una alternativa válida para trasplante de CPH en aquellos pacientes adultos con leucemia aguda que no tienen donante de MO HLA compatible.

Al mismo tiempo, el Registro Internacional de Trasplantes, reporta resultados de un estudio donde se comparan 116 adultos con leucemia que reciben trasplante de CPH de CU con 1 o 2 antígenos HLA no compatibles con 367 adultos que reciben CPH de MO de donantes no relacionados y 83 pacientes que recibieron CPH de MO no compatibles en 1 antígeno del sistema HLA. (19). El promedio de células nucleadas por Kg de peso infundidas fue de $2,2 \times 10^7$. Las muertes relacionadas a infección fueron mayores en los receptores de CU pero la incidencia de GVHD fue menor en este grupo de pacientes. La superviva libre de enfermedad a los tres años fue de 33% en los receptores de MO HLA compatibles, de 23% en los de CU y 19% en los de MO con un antígeno HLA incompatible.

El grupo japonés, compara 65 adultos que reciben CU de donantes no relacionados con 45 adultos que reciben MO. El 94% de los pacientes recibieron una dosis mayor de $2,0 \times 10^7$ células nucleadas por Kg de peso. La recuperación de neutrófilos y plaquetas fue más tardía en el grupo de CU pero la mortalidad relacionada con el trasplante fue del 9% en este grupo y del 29% en el de MO. La superviva libre de enfermedad a dos años fue de 74% para CU y 44% para MO (20). Estos resultados son superiores a los mostrados anteriormente debido al menor tamaño y uniformidad genética de la población estudiada.

Estos estudios muestran que en los trasplantes de donantes no relacionados de CU la recuperación medular de neutrófilos es más tardía lo cual influye directamente en el riesgo de infección.

El grupo español (21), precisamente analiza las infecciones en 27 adultos que recibieron trasplante de CU de los cuales 55% desarrollan bacteriemia, 58% CMV y 11% infecciones por hongos.

Ante la menor incidencia de GVHD aguda en los trasplantes con CU podemos preguntarnos si existe una menor incidencia del efecto injerto versus leucemia ya que ambos son producidos por las células CD3 del injerto alogénico. Sin embargo, los estudios clínicos con trasplante de células de CU alogénicas no muestran un aumento de la tasa de recaídas (27). Los mecanismos inmunológicos de las células de CU por los cuales se produce la recuperación medular con discrepancia de antígenos HLA entre donante y receptor y la menor incidencia de GVHD aguda pero con un efecto injerto versus leucemia adecuado hasta el momento actual no han sido determinados con exactitud.

Un problema adicional de los trasplantes de CPH de CU es que el donante original no puede ser recontactado para la obtención de linfocitos (CD3+) para mejorar el efecto injerto versus leucemia o para obtener un segundo injerto (13).

La mayor cantidad de células infundidas (células nucleadas totales o células CD34) se correlaciona con un acortamiento de la recuperación medular de neutrófilos y plaquetas en los injertos de CU. Por lo tanto, cinco estrategias se están desarrollando para mejorar la respuesta de los pacientes adultos con trasplantes de CU de donantes no relacionados: 1) infusión de varias unidades o de una secuencia de células de cordón, 2) la expansión celular ex vivo, 3) co-infusión de células de CU y stem cells haploidenticas o de CU y células mesenquimales, 4) utilización de regímenes no mieloablativos o reducción de la intensidad de regímenes de condicionamiento y 5) infusión intraósea de CU.

1) En un trabajo previo se demostró que la infusión de múltiples unidades de células de CU no producían reacciones inmunológicas cruzadas (22).

Para aumentar la dosis de células infundidas en CU de donantes no relacionados Barker y colaboradores (23) evaluaron la infusión de dos unidades de CU HLA parcialmente compatibles en 23 pacientes adultos y adolescentes (edad promedio 24 años) con enfermedades hematológicas malignas. El promedio de células infundidas fue de $3,6 \times 10^7$ células nucleadas luego de un condicionamiento mieloablativo. No hubo aumento significativo de la incidencia de GVHD aguda comparado con la infusión de una unidad de CU. El promedio de recuperación medular en este estudio fue de 23 días lo cual es un tiempo menor al observado previamente con la infusión de una unidad de CU (34 días).

Al tiempo de recuperación medular, el quimerismo revela la presencia de células de ambos donantes pero a los 100 días aparece una unidad como predominante en todos los pacientes. Esta unidad predominante tendría una cantidad significativamente mayor de células CD3 (linfocitos).

Los estudios preliminares sobre la infusión de dos unidades de cordón umbilical en pacientes adultos parecen indicar que ocurre una selección in vivo y sólo una de las unidades infundidas produce la recuperación medular a largo plazo (24).

Los resultados clínicos del estudio de Barker y colaboradores suponen la hipótesis de que la recuperación medular del receptor sería determinada no sólo por la cantidad de células CD34 del injerto sino además por el número de células CD3 presentes.

2) En un estudio, 28 pacientes recibieron una unidad de CU convencional seguida de la infusión al día más 12 de células expandidas ex vivo (25).

Estas células fueron bien toleradas pero el tiempo de recuperación medular no se modificó.

En otro trabajo del Department of Blood and Marrow Transplantation del hospital MD Anderson de la Universidad de Texas, en USA (26) se comparan dos métodos de expansión ex vivo de CU. En el primero, se realiza una selección de células CD133 seguido de un cultivo líquido ex vivo. En el segundo, las células de CU se cultivan con células mesenquimales (MSC) derivadas de MO. Los cultivos ex vivo fueron realizados en un medio

suplementado con factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de stem cells y factor estimulante del crecimiento de megacariocitos. El co-cultivo de células de CU con MSC resulta en un promisorio mejoramiento de la recuperación medular en los receptores de trasplante de células de CU.

Estos estudios crean algunas preguntas para investigaciones futuras como por ejemplo cual es el rol de las poblaciones accesorias de células linfoides así como del estroma de la MO en el mantenimiento de las células inmaduras así como como la capacidad de multiplicación de estas en los cultivos líquidos con citoquinas (27).

3) El trasplante de CPH de donante haploideéntico es una alternativa en los casos que no se tienen donantes no relacionados ni sangre de CU. Cuando se trata de pacientes que no pueden esperar, esta técnica es una nueva opción.

De momento ha demostrado ser efectiva para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y parece ser también una opción válida en la leucemia linfocítica pediátrica. En el momento actual se están desarrollando ensayos también en neuroblastoma y rhabdomyosarcoma.

La técnica se conoce como trasplante haploideéntico ya que el donante, en general uno de los padres del paciente, comparte un haplotipo del sistema HLA, es decir, que comparte la mitad de los genes implicados.

Las ventajas de este método es la disponibilidad inmediata del donante y que el efecto injerto versus tumor se produce aun con una disparidad parcial en el sistema HLA. Las desventajas son las consecuencias inmunológicas para cruzar la barrera del sistema HLA como ser GVHD, el rechazo del injerto o la reconstitución medular retrasada o incompleta (30).

La incidencia de GVHD, luego de trasplantes haploideénticos con regímenes mieloablativos, puede reducirse usando la depleción ex vivo de células T pero la prevalencia de falla del injerto o de recaída de la enfermedad sigue siendo alta (31).

El Clinimacs plus es un sistema automático de selección celular mediante la utilización de columnas con microesferas (50nm) con anticuerpos monoclonales específicos. Permite obtener productos enriquecidos en células madres o CPH CD34 pero deplecionados para células T CD3 para su uso en trasplantes haploideénticos (62).

Las primeras experiencias clínicas en nuestro país con trasplantes haploideénticos utilizando esta tecnología fueron realizadas en el Hospital Pereira Rossell por el servicio de Hemoterapia, el servicio Hematológico pediátrico y la Fundación Peluffo Giguens.

Actualmente, esta tecnología se está desarrollando a nivel mundial para obtener poblaciones celulares para su aplicación en medicina regenerativa (células CD133 para el infarto de miocardio) o para mejorar la terapia contra las células cancerosas (células Natural Killer o células dendríticas). El grupo español ha sido pionero en la co-infusión de pacientes adultos

con CU junto con células CD34+ haploideénticas obtenidas de un donante familiar (63). Los 11 pacientes del estudio alcanzaron la recuperación hematológica de neutrófilos a los doce días y cuatro pacientes desarrollaron GVHD de grado II o mayor. Cinco pacientes presentaron una sobrevida libre de enfermedad con una quimera completa de las células de CU entre los seis y 43 meses del trasplante.

Similarmente, la co-infusión de células mesenquimales junto con células de CU se encuentra bajo investigación como nueva estrategia para acortar el tiempo de recuperación hematológica y reducir la mortalidad relacionada con el trasplante. El Servicio de Hematología del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid recientemente ha publicado los resultados de un estudio piloto sobre esta co-infusión en nueve pacientes (64).

4) Algunos trabajos recientes están evaluando los regímenes de condicionamiento no mieloablativos en trasplantes haploideénticos para evitar las complicaciones inmunológicas (32) (33). Los objetivos reducir los efectos tóxicos sobre la MO de los regímenes mieloablativos, prevención de la GVHD mediante la depleción de células T y lograr un óptimo efecto injerto versus leucemia (GVL) mediante la infusión diferida de linfocitos del injerto (Delayed Lymphocyte Infusión, DLI). Mapara y colaboradores demostraron que el efecto de la DLI para producir GVL era más potente en quimeras mixtas que en quimeras totales con células del donante (32). La preservación de las células presentadoras de antígeno del receptor parecen ser las responsables de este aumento del efecto GVL (33).

Los linfocitos citolíticos o natural killer (NK) según su denominación en inglés, participan activamente de la defensa del organismo frente a infecciones, principalmente del tipo viral, y frente al crecimiento de células tumorales. Actúan tanto en la defensa innata como en los mecanismos de defensa adquirida o adaptativa. La principal función de estas células hematopoyéticas es identificar y destruir células dianas. También son importantes en su actividad reguladora del sistema inmune debido a su capacidad de secretar citoquinas y quimiocinas. La lisis de las células tumorales por los NK estaría mediada en parte a través de una incompatibilidad del Killer Immunoglobulin like Receptor (KIR) entre el NK y la célula blanco. La probabilidad de recaída a los cinco años en 57 pacientes con leucemia mieloide aguda que recibieron un trasplante KIR compatible o KIR incompatible fue de 75% versus 0% (35).

En suma, en el trasplante haploideéntico el objetivo es obtener una gran celularidad CD34 para sobrepasar la barrera del HLA, una gran cantidad de células NK CD 56 para lograr el efecto antileucémico y para facilitar el injerto por aclaración de las CPH del huésped con una máxima reducción de las células T para disminuir la aloreactividad.

Estas modificaciones en los trasplantes haploideénticos aparecen como promisorias sin embargo, otros problemas como la reconstitución tardía de la MO o la reaparición de la enfermedad particularmente en pacientes con

un estadio avanzado al momento del trasplante, limitan en el momento actual, el éxito de esta técnica a largo plazo (30).

5) La infusión intraósea de células de CU ha sido propuesta por el grupo italiano del Hospital San Martino de Génova. Recientemente han publicado un trabajo clínico en 32 pacientes con leucemia que recibieron un trasplante no relacionado de células de cordón por vía intraósea (65). Las células de CU fueron concentradas en cuatro jeringas de 5 ml e infundidas mediante punciones de la cresta ilíaca pósterio superior utilizando una anestesia general rápida. El promedio de la dosis infundida fue de 2,6 por $10^7/\text{Kg}$ de células nucleadas. El objetivo de la infusión intraósea es mejorar la recuperación hematológica sin GVHD con una rápida repoblación linfocitaria.

Así la inyección intraósea sería una solución potencial a la limitación de la dosis celular del CU para la realización de trasplantes no relacionados en adultos. Sin embargo, trabajos randomizados futuros son necesarios para probar esta hipótesis.

La **donación dirigida de sangre de CU** está destinada específicamente a un paciente determinado que deberá ser un familiar de primer grado (padre, madre, hijo o hermano) de la donante y que padezca una enfermedad considerada subsidiaria de trasplante alogénico con CPH. Dentro de estas patologías se incluyen enfermedades adquiridas como las hematoncológicas o no malignas como la aplasia medular o la hemoglobinuria paroxística nocturna. Dentro de las congénitas la aplasia medular de Fanconi, Talasemia mayor, anemia falciforme, anemia de Blackfan-Diamond, ciertas enfermedades metabólicas e inmunodeficiencias entre otras.

Otra aplicación adicional de las células de cordón umbilical es su utilización, en un futuro cercano, para la **terapia celular y medicina regenerativa** de tejidos no hematopoyéticos. Estudios preclínicos presentes identificaron en la sangre de CU a una población de células pluripotenciales CD45 negativas que pueden diferenciarse en osteoblastos, condroblastos, adipositos, CPH y células neurales (astrocitos y neuronas) (36) (37). Estos estudios sustentan la hipótesis de que stem cell multipotenciales presentes en el CU tienen características similares a las células madres adultas obtenidas de la MO con capacidad de regenerar tejidos no hematopoyéticos. Se define como medicina regenerativa a una terapia médica innovadora que tiene como función reparar, reemplazar, reconstituir y regenerar células o tejidos dañados o enfermos (38). Esto puede lograrse a través de terapia celular que la FDA define como la prevención, tratamiento, cura o mejoría de enfermedades o injurias en humanos mediante la administración de células autólogas, alogénicas o xenogénicas que pueden ser manipuladas o alteradas ex vivo.

El CU es considerado actualmente una rica fuente de células madres hematopoyéticas. Estas células madres son menos maduras que otras células

madres del adulto por lo cual tienen una mayor capacidad de proliferación en cultivos y pueden diferenciarse en células de una variedad de tejidos (plasticidad). Células precursoras endoteliales (EPC) obtenidas a partir del cultivo de células CD34 de CU fueron expandidas in vitro para obtener una cantidad significativa para estudios clínicos. In vivo estas células proliferan, forman estructuras vasculares y mejoran la función del ventrículo izquierdo en modelos experimentales de infarto de miocardio. Las células obtenidas de CU migran hacia la zona infartada pero no al miocardio normal. Las células del injerto participan en neoangiogénesis e influyen de manera beneficiosa la remodelación del tejido injuriado (39). De manera similar, infartos de miocardio producidos en ratas por ligadura de la arteria coronaria confirman que la infusión de células CD34 de CU aumentan significativamente la función miocárdica comparado con la infusión de citoquinas en los animales de control (40).

La íntima asociación entre los precursores endoteliales (EPC) y las CPH a llevado a la hipótesis de que derivan de un progenitor común el hemangioblasto (41). Teóricamente la sangre de CU tendría hemangioblastos dada la capacidad funcional de repoblar tejido hematopoyético y regenerar vasos sanguíneos (42). Sin embargo, hasta el momento actual, no se ha podido dilucidar exactamente cual es el rol que juegan, en condiciones fisiológicas o patológicas, los EPC derivados de la MO versus los EPC circulantes y los EPC residentes en diversos tejidos.

En nuestro país hemos hecho, en base a la experiencia de distintos grupos en el trasplante de CPH, la infusión de células madres adultas autólogas obtenidas de la MO por aspiración, en pacientes con cardiopatía isquémica severa con insuficiencia cardíaca en etapa dilatada. Todos los pacientes fueron revascularizados mediante cirugía sin circulación extracorporea y a la mitad de ellos se les realizó inyecciones epicárdicas con células madres autólogas obtenidas por aspiración de MO en el mismo acto quirúrgico.

Los pacientes que recibieron células madres autólogas mejoraron la fracción de eyección ventricular (FEVI) y la conectina 43 determinada por inmunohistoquímica sin aumento de fibroblastos (43).

En otro estudio (44), se realizó la revascularización miocárdica biológica complementaria a la revascularización miocárdica quirúrgica convencional utilizando para ello células de la médula ósea autólogas para aumentar la densidad capilar en todo el espesor parietal ventricular izquierdo y restaurar la perfusión de los sistemas coronarios. Los resultados preliminares de la evaluación por SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) muestran un incremento de la perfusión del 10% en los pacientes que recibieron MO intramiocárdica.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la cantidad y función de las células madres circulantes derivadas de la MO están disminuidas en pacientes añosos o con riesgo de enfermedad cardiovascular (ateroesclerosis, diabetes) (58) (59). El uso de células madres derivadas de CU

puede ser una alternativa para la medicina regenerativa cardiovascular en esta población de pacientes enfermos con edad avanzada. Las células de CU se obtienen fácilmente, tienen un potencial intacto de regeneración y diferenciación, pueden expandirse *ex vivo* y pueden ser almacenadas para su uso en un futuro. En un trabajo científico publicado en la revista *Stem Cells* (60) se obtuvieron células progenitoras endoteliales CD133 (EPC) a partir de células mononucleadas de CU utilizando columnas con microesferas magnéticas (MACS) con anticuerpos anti-CD133. Siete días después de producir un infarto de miocardio artificial en ratas mediante la ligadura de la coronaria izquierda, se inyectaron las células de CU por vía intravenosa. Un mes después del trasplante se demostró la presencia de células humanas (por cromosomas sexuales o antígenos HLA) cerca de las paredes de los vasos o en el ventrículo izquierdo en 6 de los 9 animales tratados pero ninguna en el grupo control. A su vez, células madres mesenquimales (MSC) de CU fueron exitosamente diferenciadas a cardiomiocitos *in vitro* por lo cual el CU constituye una promisorio fuente de células para la terapia regenerativa cardiovascular (61).

En Uruguay, la Facultad de Medicina en el año 2004 declara el área de la medicina regenerativa de interés institucional (Resolución del Consejo nro 57 del 01/09/2004). En el año 2006, el Poder Ejecutivo promulga el decreto 106/006 donde se establecen normas de control, calidad y seguridad para el trasplante de células y tejidos humanos tomando como base científica la directiva 23 del Parlamento y Consejo Europeo de fecha 31/03/2004.

La normativa del presente decreto se aplica tanto a células hematopoyéticas de sangre periférica, de médula ósea, de cordón umbilical y a células troncales embrionarias y adultas.

En la Facultad de Medicina existen grupos que tienen gran experiencia clínica en el trasplante de MO ya que aplican este procedimiento en nuestro país desde hace varios años. Esta experiencia incluye todas las fases vinculadas a este procedimiento, desde la cosecha de CPH, ya sea por aspiración de MO o por hemaferesis, su procesamiento posterior, su criopreservación, su infusión hasta el soporte postrasplante. De igual modo existe experiencia en su cuantificación por diferentes métodos (citometría de flujo, cultivos) y en la caracterización molecular y celular de diferentes tejidos y células.

Con el objetivo de reunir toda esta experiencia nacional, en el año 2008, el Departamento Básico de Medicina, la Cátedra de Histología, la Cátedra de Medicina Transfusional, el Instituto Nacional de Donación y Trasplante (INDT) junto con otras cátedras y servicios proponen un proyecto para la creación de una Unidad de Terapia Celular (factoría) en el Hospital de Clínicas. Dicho proyecto fue aprobado para su realización en el Hospital de Clínicas por la Comisión Intersectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, contando para su desarrollo con el ase-

soramiento internacional del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona.

La avalancha de conocimientos científicos que se han producido en los últimos años, muchos de los cuales han trascendido por la prensa o internet, ha hecho que la población general tenga ciertas expectativas presentes y futuras en la aplicación de esta terapia celular para la cura de enfermedades crónicas como la diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, tumorales, osteoarticulares, cardiovasculares, entre otras. No se debe perder de vista que los resultados son aún preliminares y falta un largo camino por recorrer.

Sin embargo, varias empresas a nivel mundial ofrecen a las gestantes la posibilidad de guardar la sangre del CU al nacer como una especie de seguro biológico para cuando el niño la necesite para un trasplante de CPH o para terapia celular como cura de diversas enfermedades. Estas empresas cobran un monto determinado por obtener y congelar el CU así como una cuota por la conservación.

En el momento actual no existe certeza durante cuanto tiempo estas células de CU mantienen su viabilidad (6). Es difícil de estimar si esta donación autóloga va a ser usada en el futuro. El riesgo que el niño necesite un trasplante de CPH autólogo antes de los diez años está entre 1 en 200.000 a 1 en 10.000 (45). De acuerdo con estas estimaciones menos del 5% de los CU autólogos serían utilizados clínicamente lo cual ocurriría en 1 de cada 20.000 colectas (46).

El primer trasplante autólogo de CU se realizó en el Hospital Albert Einstein de San Pablo, Brasil. Los padres de un niño de cinco años afectado por leucemia decidieron, asesorados por los médicos tratantes, tener un segundo hijo con la esperanza de que fuera HLA idéntico con el fin de realizar un trasplante de CPH dirigido a su hermano. Por tal razón, se guardaron las células del cordón umbilical. Pero, cuando ella, la donante tenía un año y dos meses desarrolló un neuroblastoma estadio IV. Se decidió entonces usar las células de CU para realizar un trasplante de MO autólogo con buen resultado a los 14 meses postrasplante (47).

En el 2007, se describe el primer caso de trasplante autólogo de células de CU para el tratamiento de una niña de 3 años de edad que presentaba una leucemia aguda linfoblástica y que sus padres habían guardado el CU al nacer (48). La paciente se encontraba en remisión completa 20 meses después del trasplante.

En un foro internacional sobre los usos de la sangre de CU desarrollado recientemente (49), en los países que intervinieron, ninguno de los bancos de cordón públicos guardan CU para uso autólogo. En la mayoría de los países participantes, a excepción de Holanda e Italia, uno o más bancos privados de CU operan para uso autólogo. En Italia los bancos privados de CU están prohibidos. Sin embargo, agentes internacionales de bancos privados actúan en Holanda e Italia realizando la cosecha y exportación de los CU.

En Turquía, los bancos privados de CU están regulados por ley y supervisados por el Ministerio de Salud. Están obligados a ofrecer el 25% de su stock para uso alogénico.

En Alemania, los bancos de sangre de CU autólogos no son recomendados por la autoridad sanitaria sin embargo estos existen.

En otros países, los bancos autólogos reciben licencias y acreditaciones locales pero ninguno es supervisado por una autoridad externa o internacional.

Ninguno de los participantes de este foro internacional estuvo a favor de guardar CU autólogos para un trasplante de CPH futuro. El conservar las células madres de CU para regenerar tejidos no hematopoyéticos fue considerada una decisión inmadura dado que hasta el momento actual no existe una información científica detallada de qué y cómo conservar.

Sin embargo, todos los participantes, estuvieron de acuerdo en las donaciones dirigidas de CU sobre todo para aquellos pacientes con enfermedades congénitas como por ejemplo las hemoglobinopatías.

Otro inconveniente para fomentar el uso de sangre de CU autóloga es que la mayoría de las enfermedades que pueden ser tratadas en un futuro pueden ya existir como cambios pre-malignos en las células madres del CU (50). Existe evidencia de mutaciones del ADN de CU obtenidos de niños que luego desarrollan leucemia (51) por lo cual, el trasplante autólogo de CU estaría contraindicado en aquellos niños que desarrollan leucemia (50).

El Registro Internacional de la World Marrow Donor Association (WMDA) muestra un sucesivo aumento del uso de las células de CU para el trasplante no relacionado de CPH al igual que ocurrió a finales de la década del noventa con la obtención de CPH por hemaferesis de sangre periférica con respecto a la aspiración de MO (www.wmda.org).

En adición a la cosecha, procesamiento y almacenamiento de la sangre de CU la infusión de las CPH es un paso importante en el trasplante y que presenta ciertas particularidades.

Generalmente, el producto a infundir se encuentra congelado en fase gaseosa del nitrógeno líquido a una temperatura de -180° centígrados. Para manipular estos productos hay que usar guantes especiales para evitar quemaduras en la piel del operador. A su vez, el recinto donde se encuentra el tanque de nitrógeno líquido tiene que tener una buena ventilación con corriente de aire y un extractor dado que el nitrógeno consume oxígeno, al igual que las estufas de llama, por lo cual puede producir mareos o pérdidas de conocimiento en ambientes cerrados. Un sensor de oxígeno ambiental es recomendado.

Para conservar las células congeladas y viables se utiliza un crioprotector, el dimethylsulfoxide (DMSO) mediante el cual el injerto se puede guardar por años en nitrógeno líquido. El DMSO, que deriva del procesamiento de la madera, fue inicialmente utilizado como solvente químico hasta que

en 1959 se demostró su utilidad como crioprotector celular (52). Pero, si bien el DMSO protege la membrana celular de las CPH y las plaquetas los granulocitos se rompen y los eritrocitos se hemolizan. Por tanto, los productos congelados de CPH contienen además restos de estromas de granulocitos (fragmentos de membrana celular y enzimas) así como restos de eritrocitos y hemoglobina libre. Estos contaminantes pueden producir algunos efectos adversos en el receptor. Para prevenirlos, nosotros utilizamos en la etapa de pre-congelado un agente sedimentante de los glóbulos rojos el hydroxiethylstarch (HAES) isotónico al 6% en una relación 1/5 que nos permite además reducir el volumen del producto.

El DMSO se metaboliza principalmente en el hígado y se excreta por la orina. Cuando se administra intravenoso tiene una vida media de 9 horas. Es liposoluble por lo cual se elimina también por la piel y los pulmones.

Puede producir reacciones adversas en el receptor como náuseas y/o vómitos, cefaleas, calor y rubor, dolor abdominal, bradicardia, hipo o hipertensión, olor corporal y ambiental y sabor desagradable. La mayoría de ellas, cuando se presentan ceden disminuyendo la velocidad de infusión o con tratamiento sintomático. Las reacciones severas ocurren en sólo 0,4% de 1410 pacientes (53). Sin embargo, las reacciones asociadas a la infusión de CPH de CU son menos frecuentes y menos severas que cuando se infunden productos criopreservados de MO o sangre periférica (54) debido al menor volumen de infusión. Para la prevención de las reacciones adversas un esquema de pre-medicación es adoptado de rutina en base a hidrocortisona, antihistamínicos, antieméticos y buena hidratación. Inclusive, la sedación del paciente puede ser beneficiosa para evitar un evento estresante.

En algunos centros de trasplante con CPH realizan el lavado celular previamente a la infusión (55). Sin embargo, el lavado celular se realiza con máquinas especiales, es costoso, consume tiempo y el porcentaje de recuperación de las CPH es del 85%.

Las bolsas criopreservadas serán descongeladas en un baño con agua estéril a 37° centígrados cerca de la cama del paciente para evitar demoras entre el descongelado y la infusión.

Las unidades de CU deben ser trasladadas desde el lugar de criopreservación a la sala de infusión en el canister de metal para su protección y en un recipiente térmico de paredes rígidas para evitar caídas y golpes externos.

En casos raros las bolsas pueden romperse durante la descongelación por lo cual es recomendable colocarla en una segunda bolsa estéril dentro del baño y estar atento al proceso de descongelado dado que es un producto único y muy valioso desde el punto de vista clínico (56). Previo al descongelado, es importante chequear personalmente la identidad del paciente y los datos de la unidad para establecer su coincidencia. Luego del descongelado es oportuno observar la integridad de la bolsa, el color y la turbidez previo a la infusión. Esta generalmente se realiza directamente por goteo o través de una jeringa en un cateter central de doble lumen. No se utilizan

las bombas de infusión. Menos claro es si debe usar un filtro de 170 micras, como el que se utiliza para los hemocomponentes, o no. Nosotros usamos un filtro estándar pero algunos prefieren realizar la infusión sin él debido a que los filtros pueden bloquear los elementos celulares y los microagregados o restos celulares pueden entorpecer y diferir la infusión de las CPH (57). La infusión debe ser lo más rápida posible. Una velocidad de 5 a 6 ml por minuto es adecuada aunque en la literatura varía entre 5 a 20 ml / minuto.

Es importante el monitoreo del paciente durante la infusión con mediciones de pulso, presión arterial, ECG y saturación de oxígeno.

En nuestro país hemos realizado, en la Asociación Española, los dos primeros trasplantes con células progenitoras hematopoyéticas alogénicas de cordón umbilical de donantes no relacionados, en dos niños uno de seis meses de edad con un síndrome mielodisplásico que se le infundió un cordón histocompatible enviado desde la Universidad de Denver, Colorado-USA y otro de 4 años, con una leucemia aguda linfoblástica, con un cordón enviado desde Francia.

El 23 de marzo de 2009, realizamos el primer trasplante relacionado de células progenitoras hematopoyéticas cosechadas de un cordón umbilical en Uruguay en un niño de 7 años con mielodisplasia. Este trasplante fue producto de un trabajo multicéntrico dado que la cosecha del cordón umbilical se realizó en el Hospital Pereira Rossell, la criopreservación en nitrógeno líquido y el conteo de células por citometría de flujo en el Hospital Maciel, la histocompatibilidad en el Instituto Nacional de Donación y Trasplante y el descongelado e infusión en la Unidad de Trasplante Pediátrica de la Asociación Española.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-496.
- 2- Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ, Gaston EO, Zirkle RE. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med* 1949;34:1538-1543.
- 3- Appelbaum FR. Hematopoietic-Cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007;357:1472-1475.
- 4- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood for an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178.
- 5- Kurtzburg J. Umbilical-cord-stem-cell transplantation. En *Neonatal Hematology*. De Alarcón P y Werner E Ed Cambridge University Press, UK, 2005, cap 15 pag 376.
- 6- Umbilical Cord blood Banking: Implications for perinatal care providers. SOGC Clinical Practice Guidelines. JOGC 2005, March: 263-274.
- 7- Solves P, Moraga R, Sancedo E, Perales A, Soler MA, Larrea L et al. Comparison between

- two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant* 2003;4:269-273.
- 8- Elchalal U, Fasouliotis SJ, Shroekheim D, Brautbar C, Schenker JG, Weinstein D et al. Postpartum umbilical cord collection for transplantation: a comparison of three methods. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:227-232.
- 9- Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield R, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor P, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental /umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:10119-10122.
- 10- Yasutake M, Zheng Y, Inoue-Nagamura T, Akagawa E, Tokushima Y, Terashima S, Takahashi TA. SCID-repopulating activity of human cord blood-derived hematopoietic stem and/or progenitor cells in a nonobese diabetic/Shi-SCID mice serial xenotransplantation model and immune cell activities in vitro: a comparative study of the filter method and the Hydroxyethyl starch method. *Transfusion* 2005;45:1899-1908.
- 11- Dal Cortivo L, Robert I, Mangin C, Sameshima T, Kora S, Gluckman E, Benbunan M, Marolleau JP. Cord blood banking : Volume reduction using "Procord" Terumo filter. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research* 2000;9:885-890.
- 12- Eichler H, Kern S, Beck C, Zieger W, Kluter H. Engraftment capacity of umbilical cord blood cells processed by either whole blood preparation or filtration. *Stem Cells* 2003;21:208-216.
- 13- Ballen KK. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood* 2005;105:3786-3792.
- 14- Kurtzberg J, Prasad VK, Carter SL, Wagner JE, Baxter-Lowe LA, Wall D, Kapoor N, Guinan EC, Feig SA, Wagner EL, Kernan N. Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood* 2008;112:4318-4327.
- 15- Snel M, Chau C, Hendrix D, Fox R, Downes KA, Creger R, Meyerson H, Telen MJ, Laughlin MJ, Lazarus HM, Yomtovian R. Lack of isohemagglutinin production following minor ABO incompatible unrelated HLA mismatched umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:135-140.
- 16- Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Konuma T, Kobayashi T, Iseki T, Yamaguchi T, Tojo A, Asano S. Impact of ABO incompatibility on engraftment and transfusion requirement after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:523-528.
- 17- Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocci G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996;335:157-166.
- 18- Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, Jacobsen N, Rautu T, de Lima M, Finke J, Frassoni F, Gluckman E. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2276-2285.
- 19- Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2265-2285.
- 20- Takahashi S, Iseki T, Ooi J et al. Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adults patients with hematologic malignancies. *Blood* 2004;104:3813-3820.
- 21- Saavedra S, Sanz GF, Jarque I et al. Early infections in adults patients undergoing unrelated donor cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:937-943.
- 22- Weinreb S, Delgado JC, Clavijo OP et al. Transplantation of unrelated cord blood cells. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:193-196.
- 23- Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Vermaillie CM, Wagner JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005;105:1343-1347.
- 24- Laughlin MJ. Transplantation of 2 UCB units in adults. *Blood* 2005;105:915-916.
- 25- Jaroscak J, Goltry K, Smith A et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells. Results of a phase I trial using the AastromReplicell System. *Blood* 2003;101:5061-5067.
- 26- Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, Kaur I, Fu P, Del Angel M, Messinger R, Flagg E, de Lima M, Decker W, Xing D, Champlin R, Shpall EJ. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal

- stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 2006;37:359-366.
- 27- Tse W, Laughlin MJ. Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology* 2005; 377-383.
- 28- Wagner JE, Kernan NA, Steibuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995;346:214-219.
- 29- Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R et al. Outcome of cord-blood- transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med* 1997;337:373-381.
- 30- Spitzer TR. Haploidentical stem cell transplantation: The always present but overlooked donor. *Hematology* 2005; 390-395.
- 31- Henslee Pj, Thompson JS, Romond EH et al. T cell depletion of HLA haploidentical marrow reduces graft-versus-host disease but it may impair a graft-versus-leukemia effect. *Transplant Proc* 1987;19:2701-2708.
- 32- Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Brunson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting-cells. *Blood* 2002;100:1903-1909.
- 33- Marx J, Sykes M. DLI-mediated GL effects in mixed chimeras established with non-myeloablative conditioning regimen: extinction og GVL effects coincides with loss of alloreactive cells following conversion to full donor chimerism. *Transplantation* 2003;76:297-305.
- 34- Kurtzberg J, Issit L, Waters-Pick B et al. Nucleic acid testing (NAT) by PCR for cytomegalovirus (CMV) in umbilical cord blood (UCB) offers a superior detection method for CMV viremia when compared to screening of maternal serum antibodies to CMV. *Cytotherapy* 2003;5:471.
- 35- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100.
- 36- Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potencial. *J Exp Med* 2004;200:123-135.
- 37- Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood* 2003; 102:3483-3493.
- 38- Korblyng M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair- A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570-582.
- 39- Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W et al. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res* 2005;66:45-54.
- 40- Hirata Y, Sata M, Motomura N et al. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327-609-614.
- 41- Baron MH. Hemangioblasts in adults?. *Blood* 2004;103:1-2.
- 42- Cogle CR, Wainman DA, Jorgensen ML, Guthrie SM, Mames RN, Scout EW. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood* 2004;103:133-135.
- 43- Paganini JJ, Brusich D, Fronzuti A, Paganini R, Abaz F, Martinez L, Decaro J, Patel A, Benetti F. Terapia celular para la insuficiencia cardíaca: estudio prospectivo y randomizado del trasplante autólogo de células madres adultas para la cardiopatía isquémica severa. 32 Congreso de la Sociedad Brasileira de Cirugía Cardiovascular y Primer Encuentro Latinoamericano de Cirugía Cardiovascular 27-30 abril 2007, Vitoria-Brasil.
- 44- Lorier G, Touriño C, Rodriguez I et al. Revascularización miocárdica biológica complementaria a la revascularización miocárdica quirúrgica convencional. Comunicación preliminar de estudio prospectivo de casos y controles, randomizado y doble ciego. *Rev Med Urug* 2008;24:246-257.
- 45- Kline RM. Whose blood is it anyway? *Sci Am* 2001;284:42-49.
- 46- Annas GJ. Waste and longing the legal status of placental-blood-banking. *N Engl J Med* 1999;340:1521-1524.
- 47- Ferreira E, Pasternak J, Bacal N, de Campos Guerra JC, Watanabe FM. Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1999;24:1041.
- 48- Hayani E, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D, Salvi S. First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leucemia. *Pediatrics* 2007;119: 296-300.

- 49- International Forum: Cord blood banking. *Vox Sanguinis* 2008;95:335-348.
- 50- Cairo MS, Kurtzberg J, Lubin B, Shearer W. Cord blood banking for potential future transplantation. *Pediatrics* 2007;119:165-170.
- 51- Rowley JD. Backtracking leukemia to birth. *Nat Med* 1998;4:150-151.
- 52- Loveloch JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 1959;183:1394-1395.
- 53- Graves V, Danielson CFM, Abonour R, McCarthy LJ. How to ensure safe and well tolerated stem cell infusions. *Transfusion* 1998; 38(suppl):30S.
- 54- Mc Kenna DH, Wagnr JE, Mc Cullough JJ. Umbilical cord blood infusions are associated with mild reactions and are overall well tolerated. Phoenix (AZ): International Society for Cellular Therapy May 2003.
- 55- Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion* 2004;44:907-916.
- 56- Larrea L, Sanz G, Solves P, Mirabet V, Roig R. A broken cord blood bag: placinmg the unit in a sterile zip-lock bag before thawing prevents catastrophic events. *Transfusion* 2008;48:1282-1283.
- 57- Treleaven JG. Bone marrow harvesting and reinfusion. In Gee AP editor. *Bone marrow processing and purging*. Boston:CRC Press; 1991:31-38.
- 58- Fadini GP, Miorin M, Facco M et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1449-1457.
- 59- Heiss C, Keymel S, Niesler U et al. Impaired progenitormcell activity in age-related endothelial dysfunction. *J AM Coll Cardiol* 2005;45:1441-1448.
- 60- Leor J, Guetta E, Feinberg MS; Galski H, Bar I, Holbova R, Miller L, Zarin P, Castel D, Barbash I, Nagler A. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells* 2006;24:772-780.
- 61- Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Teral M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant cardiomyogenic potencial of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007;25:2017-2024.
- 62- Dykes J, Toporski J, Juliusson G, Békássy A, Lenhoff S, Lindmark A, Schedi S. Rapid and effective CD3 T-cell depletion with magnetic cell sorting program to peripheral blood progenitor cell products for haploidentical transplantation in child and adults. *Transfusion* 2007;47:2134-2142.
- 63- Fernandez M, Regidor C, Cabrera R et al. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults : early recovery of neutrophils by supportive cotransplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol* 2003;31:535-544.
- 64- Gonzalo –Daganzo R, Regidor C, Martin-Donaire T et al. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy* 2009;11:278-288.
- 65- Frassoni F, Gualandi F, Podestá M et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in Leukaemia: a phase I/II study. *The Lancet Oncology* 2008;9:831-839.