

# Fracciones plasmáticas de acción hemostásica

Dra. L. Barbolla

Hospital Puerta de Hierro. U.A.M. Madrid.



CONFERENCIA

HEMATOLOGIA, Vol. 1 N° 3: 79-83  
Setiembre - Diciembre, 1997

## 1 - INTRODUCCION

La sangre total, desde el punto de vista transfusional, ha dejado de ser un elemento útil, considerándose que su fraccionamiento es diversos componentes, tiene ventajas importantes. A ello han contribuido diferentes motivos, entre los cuales los mas importantes han sido el desarrollo de los métodos de separación, el conocimiento preciso de las diferentes proteínas del plasma, con sus características y funciones y la aplicación concreta de cada una de ellas.

El empleo de componentes de la sangre adecuada a cada situación clínica es hoy la práctica habitual en los servicios de transfusión. De manera simple podemos dividirlos en Componentes Sanguíneos (CS), aquellos que se obtienen de manera rutinaria en el fraccionamiento primario, células y plasma, y Fracciones Plasmáticas (FP), aquellos elementos plasmáticos de elaboración mas compleja, para la cuya obtención, es necesario generalmente el empleo de métodos industriales.

En los últimos años, el Plasma, habitualmente denominado como Plasma Fresco Congelado (PFC), ha pasado a tener importancia capital, no tanto por su valor como elemento hemoterápico en si mismo, sino como materia prima para la obtención de las numerosas proteínas que contiene; éstas, si bien en su concentración en el plasma nativo tienen un valor escaso como elementos terapéuticos, con la metodología actual que permite su purificación y concentración, adquieren un papel capital en el tratamiento de deficiencias específicas de estos factores.

Otro hecho que ha dado relevancia al fraccionamiento plasmático ha sido el creciente temor a las

enfermedades infecciosas transmisibles por la transfusión. Dado que para el fraccionamiento industrial se ha de partir de grandes conjuntos de PFC, el riesgo que entre todos ellos haya uno contaminado, incluso en periodo ventana de una infección y que contamine el lote entero de hemoderivados obtenidos, condujo al temor del uso de estos productos.

El hecho de que el PFC sea un conjunto de proteínas tan complejo y variable en su estructura, hace que no sea fácil el someterlo a un proceso de inactivación viral que sea útil para todos los virus y afecte minimamente a todos los componentes. Sin embargo, la posibilidad de purificar y concentrar las distintas proteínas, permite someterlas a procesos específicos de inactivación, con control de su efectividad y del deterioro que cada proceso puede llevar sobre el producto final obtenido.

Los procesos de purificación o inactivación viral, que representan una enorme ventaja, han llevado consigo un problema; el hecho de que estos procesos hagan que la proteína plasmática tenga una cierta disminución en su rendimiento, variable de unas a otras, y con unos u otros procedimientos, ha supuesto que, para obtener la misma cantidad de sustancia final, hayamos de partir de mayor cantidad de materia prima, con los consiguientes repercusiones sobre los problemas que plantea en la consecución de la autosuficiencia de PFC para hemoderivados de un país o comunidad.

En cualquier caso, el margen de confianza y seguridad que representan hoy tanto el PFC en sus diferentes formas como los hemoderivados industriales, hacen irrenunciable su uso aunque ello plantee a veces discusiones en cuanto a su transcendencia ética o legal.

## 2 - COMPONENTES PLASMÁTICOS.

En el fraccionamiento plasmático podemos considerar como CS aquellos que se obtienen en el Banco de Sangre, y como FP las que partiendo del PFC como materia prima, se procesan de forma industrial. Dentro de éstas, que son mucho más purificadas, se pueden obtener fracciones de acción oncótica, defensiva y hemostásica.

### 2.1 COMPONENTES PLASMÁTICOS DE ACCIÓN HEMOSTÁSICA

Los principales son: PFC, Crioprecipitado (Crio), Fracción Sobrenadante de Crioprecipitado (FSC) y las Colas Hemostásicas.

#### 2.1.1 PLASMA FRESCO CONGELADO.

Se obtiene en el Banco de Sangre mediante centrifugación de las unidades de Sangre Total (ST) y retirada del PF que se conserva congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$  para conservar todos sus elementos.

Su volumen varía dependiendo de si se ha obtenido de ST destinada a recolección de Concentrado de Hematias (CH) y Concentrado de Plaquetas (CP), solamente al primero de ellos, y del sistema de separación utilizado, standard, top-botom etc. Esto tiene una importancia decisiva cuando se calculan las necesidades de PFC de un país para alcanzar la autosuficiencia. Tabla 1

En principio se daba gran importancia al tiempo transcurrido entre la extracción de la ST y la separación del PFC para considerarlo como tal, siendo este tiempo teórico de 6-8 horas. Actualmente se considera PFC aquel componente con al menos 0,7 UI de F VIII coagulante/ml, independientemente del tiempo transcurrido entre separación y congelación, aun cuando, para que la conservación sea idónea no deben transcurrir más de 24 horas, y se haya mantenido en condiciones idóneas.

Se conserva a  $-30^{\circ}\text{C}$  y se descongela a  $37^{\circ}\text{C}$  inmediatamente antes de su uso. Si no se usa tras la descongelación, pierde algunos de los factores lábiles de la coagulación, pudiendose utilizarse como Plasma

Congelado (PC) para pacientes que no precisen Factor VIII o Factor V.

Contiene todas las proteínas del plasma nativo, en dilución dependiendo de la proporción de anticoagulante.

En cuanto a los riesgos de su transfusión, además de los propios de los componentes hemoterápicos de reacciones inmediatas, febriles o hemolíticas, están los retardados, principalmente debidos a transmisión de enfermedades infecciosas, sobre todo virales. A este respecto, existe una tendencia cada vez mayor a considerar si la administración de PFC sometido a procesos de mayor garantía que el resto de los CS, como pueden ser la cuarentena o la inactivación viral, pueden tener efecto beneficioso importante en la transfusión de este componente.

#### 2.1.2 CRIOPRECIPITADO.

Es un Componente con elevada concentración protéica que se obtiene tras la congelación rápida del PF a  $-80^{\circ}\text{C}$  y su descongelación lenta a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se conserva a  $-30^{\circ}\text{C}$  descongelándose a  $37^{\circ}$  inmediatamente antes de su uso. Contiene fundamentalmente Fibrinógeno, Factor VIII coagulante, Fac. von Willebrand, Factor XIII y Fibronectina.

#### 2.1.3. PLASMA SOBRENADANTE DE CRIOPRECIPITADO.

Como su nombre indica es el componente plasmático sobrenadante de la descongelación de plasma al retirar el crioprecipitado. Contiene las proteínas que no han sido crioprecipitables. En concreto, es una fracción menos rica que el PFC en Fibrinógeno, F. VIII y Factor von Willebrand, principalmente los multimeros grandes de este factor. Puede utilizarse como fuente de proteínas o de factores de coagulación salvo los crioprecipitables. Su uso principal en los últimos tiempos ha sido en la Púrpura Trombótica Trombocitopénica, bien en transfusión simple o como reposición en el caso de recambio plasmático, precisamente por su menor concentración de grandes multimeros de F. von Willebrand.

TABLA 1  
CARACTERÍSTICAS DE LAS UNIDADES DE PFC CONTENIDO/UNIDAD

PFC	Vol. (ml)	Fibrin. (mg)	F. VIII (UI)	Pro. Tot. (Gr)	Leu.	Pla.	Hties
CH+CP	223	600	196	14,7	0.04	4000	0
Triples top-bot	258	693	230	15,3	0.1	2000	0
Cuadru. top-bot	229	580	204	14.2	0.05	4000	0

### 2.1.4 COLA DE FIBRINA

Es una sustancia con propiedades hemostáticas y adhesivas compuesta por fibrinógeno y trombina, que se produce directamente en las superficies en las que se quiere ejercer la hemostasia: lugares de sangrado, sellado de anastomosis, reintervenciones cardíacas etc. El fibrinógeno puede proceder de PFC o de Crioprecipitado y la trombina es de origen bovino o humano.

Actualmente existe la posibilidad de usar como fuente de fibrinógeno PFC o Criop. autólogo. Sus indicaciones principales son en cirugía cardíaca, torácica y traumatología.

## 3 - FRACCIONES PLASMATICAS.

Aprovechando las características de la diversidad de las proteínas que contiene el Plasma Humano, se han llevado a cabo numerosos métodos de separación, que comenzaron a partir del año 1944, en que Cohn describió el primer sistema. Su objetivo principal es el disponer de proteínas purificadas, homogeneizadas, de fácil conservación, administración, con dosificación precisa y que en su mayoría pueden ser sometidas a diferentes métodos de inactivación viral, lo que supone un gran aumento en la seguridad transfusional.

Al método propuesto por Cohn, que se basa principalmente en la precipitación proteica por etanol frío, se han sumado diferentes procedimientos que fundamentalmente incluyen modificaciones en la separación, como la precipitación por sulfato de amonio, Rivanol, ácido caprílico o polietilenglicol. Otro procedimiento de purificación de la proteína es la cromatografía, mediante el cual, basados en la diferente carga electrostática de la misma, esta puede ser absorbida a una sustancia intercambiadora de iones, siendo recuperada posteriormente por elución. Como sustancias de intercambio iónico se han utilizado, DEAE Sefadex o Sefarosa.

En cuanto a la cromatografía de afinidad, se basa en el aislamiento de una proteína mediante su unión a una sustancia afín que se encuentra unida a una matriz insoluble, arrastrándose el resto de proteínas por lavado; esto supone una elevada purificación. Posteriormente la proteína se puede separar de su ligando. Este método se utiliza con gran éxito en el caso de unión de diversos factores de coagulación a Ac monoclonales de origen murino, siendo necesario posteriormente la elución de la matriz del complejo Factor-Ac murino y posteriormente la separación del factor y el Ac.

Tras la obtención de las diferentes proteínas, generalmente factores de coagulación, viene el proceso de concentración y de inactivación viral. Si bien los sistemas de purificación ya suponen una medida de seguridad en el aislamiento de las proteínas de los vi-

rus, la mayoría de las FP son sometidas a procedimientos adicionales específicos de inactivación viral de los que los más comunes son el tratamiento por calor, en producto líquido o liofilizado, el tratamiento por solvente/detergente, la b-propiolactona combinada con irradiación ultravioleta, los tratamientos fotodinámicos mediante psoralenos, porfirinas o azul de metileno, la ultrafiltración y la irradiación gamma.

La materia prima puede ser PFC, Crioprecipitado o Plasma Sobrenadante de Crioprecipitado, dependiendo de la proteína a purificar.

Las FP con carácter hemostático son fundamentalmente:

- Factor VIII (de alta purificación o purificación intermedia)
- Factor IX
- Preparados del complejo protrombinico
- Preparados específicos de Fac. V, VII, X, proteína C y Proteína S.
- Antitrombina III

Otros preparados de acción hemostática, sobre todo fibrinolíticos, como pueden ser la uroquinasa, PIA etc, pueden ser de origen humano pero su fuente de obtención no es el Plasma.

### 3.1 PREPARADOS DE FACTOR VIII.

El F. VIII es la proteína más importante desde el punto de vista de su uso clínico, así como de los avances realizados en su estudio, en cuanto a su purificación, concentración, características de antigenicidad y transmisión de viriasis.

En la actualidad se usan distintos preparados a partir de PFC o de Criop. denominados alta pureza o intermedia, cuya diferencia principal es el contenido de UI de proteína coagulante por mg de proteína total. Los de pureza intermedia tienen <10 mg UI F VII/mg de proteína, y los de elevada pureza desde >50 UI hasta algunos preparados con 1000 UI. En estos últimos la purificación se consigue mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico o de Ac Mo de ratón frente al F VIII o al F. von Willebrand, lo que plantea el uso continuado, a pesar de los métodos de retirada, de proteínas animales de manera sistemática.

No existe una opinión generalizada en cuanto ventajas absolutas en el producto a utilizar

Con la llegada del Factor VIII recombinante (F VIIIr) se han planteado numerosos problemas en cuanto a la comparación entre el F VIII de origen humano o los obtenidos mediante ingeniería genética, llamados recombinante. Los puntos más relevantes son la comparación de ambas proteínas en cuanto a su concentración, potencia, identidad, pureza y actividad específica así como su integridad estructural y la presencia de contaminantes.

En la obtención del FVIII humano existe el problema de la mezcla de PFC en grandes cantidades, su purificación e inactivación viral. El proceso de obtención incluye, tras partir de PFC o Crio, su purificación, bien mediante inmunopurificación en columna con Ac Mo de ratón anti F VIII o anti F vW, o por cromatografía por filtración en gel. Posteriormente es sometido a un proceso de inactivación viral, esterilización, solvente detergente o propiolactona UV. Tras este proceso la cantidad obtenida es variable según las metodologías seguidas, pero la molécula parece íntegra e idéntica a la de partida.

En la obtención del F VIIIr, el proceso seguido consiste en la clonación de la molécula de FVIII, mediante la obtención del DNAC codificador de la proteína F VIII, la selección de una célula huésped, siendo elegida generalmente la célula de ovario o riñón de Hamster, la transfección, inserción del gen y su amplificación para la síntesis de F VIII. Las células transfectadas son mantenidas en un biorreactor, y alimentadas en un medio de cultivo fresco, de donde es retirada la proteína una vez producida. Posteriormente ha de ser purificada para eliminar los posibles restos celulares o de ADN del cultivo, proceso que se lleva a cabo en columna de afinidad con anticuerpo murino, eliminándose finalmente los restos del Ac monoclonal. Tras esto, es sometida a un proceso de estabilización con albúmina humana, PEG, histidina o polisorbato.

### 3.1a COMPARACIÓN ENTRE EL F. VIII h Y r.

Ambos procesos, obtención de Factor VIII humano y recombinante son complejos. Para la purificación y estabilización de la molécula de F VIII es necesario el uso de diferentes sustancias químicas o de origen animal, por lo que existen gran número de ensayos clínicos a fin de poder determinar en el receptor su farmacocinética o respuesta tras su infusión, efectividad, la tolerancia, seguridad viral y sobre todo sus efectos deletéreos tanto en la infusión de estas sustancias sobre el sistema inmune de forma continuada, como sobre la formación de inhibidores. Estos estudios se están llevando a cabo tanto en pacientes en los que se les aplica solamente una forma de tratamiento, FVIII h o r, como aplicación de FVIII recombinante sobre pacientes con inmunidad previamente alterada, bien con inhibidores previos o su acción sobre las poblaciones linfocitarias en pacientes infectados por VIH.

### 3.2 PREPARADOS DE USO ALTERNATIVO EN DEFICIENCIAS DE F. VIII

En los pacientes con Hemofilia A que han desarrollado inhibidores, además de la administración de F

VIII de uno u otro tipo, existen otras alternativas terapéuticas, como son la administración de F VIII porcino, aunque en general de forma temporal, debido a su poder inmunogénico, concentrados del complejo protrombinico, o componentes de factores activados (FEIBA o Autoplex) y actualmente el F VII a.

### 3.3 PREPARADOS DE F v WILLEBRAND CONCENTRADO.

El F. v Willebrand se encuentra en elevada concentración en los preparados de F. VIII de pureza intermedia, ya que F. VIII y F v Willebrand están unidos de forma covalente; por tanto en la enf. de v. Willebrand se puede utilizar este preparado, que, además, está sometido a inactivación viral. No obstante existe un preparado específico que contiene una elevada proporción de multímeros de F. v. Willebrand y que se emplea en determinados casos de indicación en esta enfermedad. Hasta el momento no se ha demostrado su superioridad con respecto a los concentrados de F VIII de pureza intermedia.

### 3.4 PREPARADOS DEL COMPLEJO PROTROMBINICO.

La propiedad química común a las proteínas de producción hepática dependientes para su síntesis de la vit. K, de ser absorbibles por  $SO_4Ba$  hizo que se obtuvieran este conjunto de proteínas en forma de complejo, y pueda aplicarse tanto en el tratamiento de pacientes deficientes de F IX como en todos aquellos que precisan este grupo de factores en conjunto.

La materia prima para su obtención es tanto el PFC como el PC, llevándose a cabo su separación mediante precipitación en  $SO_4Ba$  y pudiéndose inactivar tanto por calor como mediante método de solvente detergente. Contiene los factores II, VII, IX y X, así como proteína C y S. Un problema asociado a su obtención es la activación de determinados factores, fundamentalmente X y VII, lo que le confiere elevada trombo-genicidad. Esta además puede verse incrementada por la presencia de fosfolípidos que contaminan el preparado. Este riesgo es mayor en los enfermos hepáticos, ya que en ellos existe una tasa baja de AT III.

Su indicación preferente es el déficit de F IX, aún cuando otras indicaciones precisas pueden ser determinados casos de hepatopatías, siempre con la limitación expuesta, intoxicaciones por anti vit. K, en aquellos casos específicos de hemorragia intensa, o preparaci6n urgente para cirugía en los que no de tiempo a la actuaci6n de vit K intravenosa (6-8 h) o riesgo de sobrecarga circulatoria que contraindique la administraci6n de PFC.

### 3.5 CONCENTRADOS DE FACTOR IX PURIFICADO

A partir de los preparados de Complejo protrombínico se puede obtener F IX aislado y purificado mediante absonción en  $So_4Ba$  y purificación por cromatografía en columna de afinidad.

Posteriormente puede ser inactivado mediante solvente detergente, isotiocianato o ultrafiltración.

### 3.6 CONCENTRADOS DE FACTOR VII ACTIVADO.

Es una Fracción obtenida mediante ingeniería recombinante, con acción sobre las células tisulares endoteliales en las que produce una liberación de F Xa, ejerciendo una acción de cortocircuito de la actividad fisiológica del F VIII. Por ello se ha utilizado no como fuente de F VII en pacientes con esta deficiencia, sino como tratamiento en hemofilia A con inhibidores.

### 3.7 OTRAS FP DE ACCION HEMOSTÁSICA

Además de las descritas existen otros concentrados de factores purificados entre los que se encuentran los

Concentrados de Fibrinógeno, Factor XIII y proteína C. Los dos últimos están inactivados por calor. No son de aceptación universal, estando admitidos en determinados países.

### 3.7.a CONCENTRADOS DE ANTITROMBINA III

La AT III es un inhidor fisiológico de la trombina y del F Xa, teniendo por ello un papel fundamental en la reguñación de la hemostasia. Además, desde el punto de vista farmacológico, su acción es necesaria para la actividad de la heparina, lo que le confiere un papel importante en la clínica, no solo en los estados de deficiencia congénita de AT III, que son poco frecuentes, sino en las alteraciones adquiridas como es el caso de los anticonceptivos orales, casos de administración de heparina en estados trombóticos, enfermos hepáticos, y mas recientemente en estados sépticos.

La materia prima para su obtención puede ser el PFC o el Crio. separándose la proteína por fraccionamiento en etanol y purificándose en medios de baja fuerza iónica. Puede ser inactivada por calor.