



Inactivación de patógenos en productos sanguíneos

Julieta Rojo,^{1,2} Susanne M Picker,³
Juan José García García,² Birgit S Gathof³

RESUMEN

Los estándares de seguridad de la sangre y sus productos han alcanzado un elevado nivel en la actualidad debido a la normatividad internacional vigente con la que funcionan los Bancos de Sangre. Ésta implica el control de donadores, los avances en la inmunohematología y la implementación de pruebas de tamizaje modernas. La radiación con rayos gamma y la filtración han minimizado la transmisión de agentes virales (hepatitis B y C, virus de la inmunodeficiencia humana, citomegalovirus) y las reacciones no hemolíticas. Las pruebas de ácidos nucleicos (NAT, *acid nucleic tests*) han sido las principales en aumentar la seguridad de productos sanguíneos. Sin embargo, siguen persistiendo riesgos en la transfusión sanguínea debido a la falta de referencia de estos factores por parte de los donadores, donadores infectados que se presentan en el período de ventana diagnóstica, falta de pruebas de tamizaje para otros virus, bacterias y parásitos, lo cual se ha convertido en un problema a partir del aumento de la migración y el turismo "ecológico", así como de la aparición de nuevos patógenos como por ejemplo los virus del Nilo, de la neuroencefalitis esponjiforme y el de la insuficiencia respiratoria aguda. Por lo anterior, se han desarrollado métodos para reducir o eliminar a los agentes patógenos transmisibles por la transfusión, que a su vez no alteren las funciones de las células transfundidas; sin embargo la mayoría de tales métodos se encuentra en proceso de validación. El presente artículo presenta una revisión sobre el estado actual de los métodos fotoinactivadores (fotoquímicos y fotosensibilizadores) de patógenos para productos sanguíneos.

Palabras clave: Transfusión, banco de sangre, inactivación de patógenos.

ABSTRACT

Improvements of blood donor selection, blood processing, histocompatibility, immunohematology, serologic screening for infectious markers, and more recently, the introduction of nucleic acid testing (NAT-tests) for different virus genomes increased the safety of blood transfusion. To date, the transfusion-associated risk of HIV, HBV or HCV (human immunodeficiency virus, hepatitis B or hepatitis C- virus) infection has become negligible in Western communities. However, blood transfusion is not without risk. Transfusion-transmitted infections based on emerging viruses, parasites or mainly bacterial contamination still exist and can lead to severe morbidity and death of the recipient. Techniques with the potential to directly target the possible pathogen, are expected to diminish this residual risk of blood transfusion. Only recently, procedures for pathogen inactivation (PI) of cellular blood components targeting a broad variety of enveloped and non-enveloped viruses, bacteria, parasites as well as leucocytes by targeting nucleic acids have been developed. The mechanism is based on activation of a so-called photosensitizer with defined light sources. The most intensively studied dyes with photodynamic properties are phenothiazines, porphyrins, cyanins, and riboflavin (vitamin B₂). Psoralens like S-59 (amotosalen-HCl) have photochemical properties. Other compounds interfere with nucleic acids without an external energy sources (ethylene imine PEN 110) or upon pH-shift (S-303). Because of the possibility to use visible or UV light for treatment, studies on PI of platelet concentrates and plasma are more advanced than with red blood cell concentrates strongly absorbing light of this energy. Other drawbacks of PI procedures for red blood cell concentrates are cellular damage increasing during prolonged storage in case of porphyrins (partly prevented by the addition of oxygen scavengers) and cyanins, the necessity of an integrated, time consuming washing step in addition to unresolved toxicologic questions in case of PEN 110, and antibody formation in case of S-303. PI techniques may become available for blood services and clinicians in the near future. Before implementation, open questions on safety profile of rest substances, cost effectiveness, and the real extent to which PI procedures affect cell function should be answered.

Key words: Transfusion, blood bank, pathogen inactivation.

¹ Banco de Sangre, Hospital General de México.

² Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

³ Medicina Transfusional y Banco de Sangre, Clínica de la Universidad de Colonia, Alemania.

INTRODUCCIÓN

Los estándares de seguridad de la sangre y sus productos han alcanzado un elevado nivel en la actualidad. Esto se debe a la normatividad con la que funcionan los bancos de sangre, el control de donadores ya conocidos, las correcciones que se han hecho a los cuestionarios del donador de sangre, la exploración física, los avances en la inmunohematología y en las pruebas de histocompatibilidad, así como en la implementación de pruebas serológicas de tamizaje modernas. La radiación con rayos gamma y las técnicas de filtración han minimizado la proporción de leucocitos contaminados responsables de la transmisión de agentes asociados a células, tales como el citomegalovirus (CMV) y eventualmente también los priones,¹ así como de las reacciones injerto contra huésped a través de linfocitos T, de la reacción febril posttransfusional no hemolítica por liberación de citocinas, de estados refractarios por inducción de anticuerpos HLA (antígeno linfocitario de histocompatibilidad) clase 1 y procesos inmunomoduladores que implican un posible riesgo de infección y de gradiente de progresión tumoral en el paciente receptor. Las pruebas de áci-

dos nucleicos (NAT, del inglés *nucleic acid tests*) han sido las que han aumentado principalmente la seguridad de los productos sanguíneos.² Los genomas virales (ADN/ARN) son actualmente demostrables incluso antes de la detección de los antígenos virales o de los anticuerpos antivirales en la sangre de los donadores, de tal manera que el riesgo de transmisión de los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), de la hepatitis B (HBV) y de la hepatitis C (HCV) ha disminuido considerablemente en los países industrializados (*Cuadro I*).^{3,4}

A pesar de lo anterior, existen riesgos restantes en la transfusión sanguínea. En términos generales, el 2% de todos los donadores de sangre no refieren factores de riesgo de infecciones virales previas.⁵ Los donadores de sangre infectados que se presentan a donar en el periodo entre el inicio de la infección y la posible detección del agente infeccioso en sangre (ventana diagnóstica), no pueden ser detectados (*Cuadro II*).^{3,6-8} Por otra parte, no existen pruebas de tamizaje de rutina para muchos de los virus asociados a transfusión conocidos, tales como el parvovirus B19 o para parásitos, lo cual se ha convertido en un problema a partir del incremento en la inmigración y en el turismo

Cuadro I. Estado actual de riesgo de transmisiones virales.^{3,5-7} Causa: Donación en el momento de la ventana diagnóstica.

Virus	Riesgo por unidad transfundida (posNAT)		
	EUA	Francia	Alemania
HIV	1:1'576,000	1:1'000,000	1:1'900,000
HCV	1:223,00	1:200,000	1:< 350,000
HBV	1:135,000	1:180,000	1:220,000
Riesgo acumulado	1:79,806	1:86,505	1:126,121

Abreviaturas: NAT = *Nucleic acid tests* (pruebas de ácidos nucleicos). HIV = Virus de la inmunodeficiencia humana. HCV = Virus de la hepatitis C. HBV = Virus de la hepatitis B.

Cuadro II. Riesgos restantes: Ventana diagnóstica.⁴ NAT/PCR acorta significativamente este periodo.

Virus	Elisa	Promedio (días) hasta la seroconversión	NAT/PCR ¹ positivo (días)
HIV	Antígeno p24	16	11
	Anti-HIV	22	
HCV	Anti-HCV	70	12
HBV	HBsAg	56	40

Abreviaturas: NAT = *Nucleic acid tests* (pruebas de ácidos nucleicos). PCR = Reacción en cadena de la polimerasa. HIV = Virus de la inmunodeficiencia humana. HCV = Virus de la hepatitis C. HBV = Virus de la hepatitis B.

Cuadro III. Pruebas de tamizaje para patógenos asociados a transfusión.

Familia	Patógeno	Enfermedad	Estudios rutina	
			Sí	No
Virus de hepatitis	HBV, HCV HEV, HGV	Hepatitis Hepatitis	X	X
Retrovirus	HIV-1 & -2 HTLV-I & -II	SIDA Linfoproliferación maligna Neuropatía	X (X)	
Virus herpes	CMV EBV HHV-8	CMV, retinitis, hepatitis, neumonía Síndrome Epstein-Barr Sarcoma de Kaposi	(X) (X)	 X
Parvovirus	B19	Anemia aplástica		X
Bacterias	Gram negativas, Gram positivas <i>Treponema pallidum</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Rickettsia rickettsii</i> <i>Ehrlichia chafeensis</i>	Sepsis Sífilis Enfermedad de Lyme Fiebre de las Montañas Rocosas Ehrlichiosis	 X (X)	 X X
Parásitos	<i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Babesia microti</i> <i>Leishmania donovani</i> <i>Plasmodium spp.</i>	Enfermedad de Chagas Babesiosis Leishmaniasis Malaria	(X)	 X X X

Medidas prácticas en EUA/UE. *Abreviaturas:* HBV = Virus de la hepatitis B. HCV = Virus de la hepatitis C. HEV = Virus de la hepatitis E. HGV = Virus de la hepatitis G. HIV = Virus de la inmunodeficiencia humana. SIDA = Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. HTLV = Virus humano linfotrópico de células T. CMV = Citomegalovirus. EBV = Virus Epstein-Barr. HHV-8 = Virus herpes humano-8.

que actualmente viaja a regiones endémicas de infecciones potencialmente transmisibles por vía sanguínea. Se reportan al año tres casos de malaria y 0.1% casos de enfermedad de Chagas en Estados Unidos de Norteamérica son transmitidos por transfusión.⁹ Cada dos o tres años se presenta la aparición de un nuevo patógeno (por ejemplo, virus de la neuroencefalitis espongiiforme, virus del Nilo de occidente, virus del síndrome agudo respiratorio severo o SARS). Todavía estamos lejos de implementar todas las pruebas de tamizaje necesarias para la detección de estos agentes. En la actualidad, el problema epidemiológico microbiológico mayor asociado con la transfusión lo constituye la contaminación bacteriana de productos sanguíneos.¹⁰ A excepción del *Treponema pallidum* y de la brucella en algunos países de América Latina,¹¹ en la mayoría de los países no se lleva a cabo ningún tipo de tamizaje bacteriano (*Cuadro III*). Según reportes de estudios norteamericanos, uno de cada 2,000 concentrados plaquetarios (CP) presenta un

número significativo de bacterias,¹² que conllevan a la sepsis en uno de cada seis pacientes receptores de las plaquetas,¹³ y resulta mortal para uno de cada cuatro de ellos. El 12.5% de las muertes asociadas a transfusión se deben actualmente a contaminación bacteriana.¹⁴

Inactivación de patógenos

Por lo anterior, no sorprende el hecho de que la búsqueda de métodos para reducir o eliminar a los agentes en la transfusión sea, desde hace mucho tiempo, tema central de la investigación en medicina transfusional. Debe de haber un método adecuado que proporcione mayor seguridad al paciente que va a ser transfundido y que al mismo tiempo no altere las funciones o la vitalidad de las células transfundidas y convenga desde el punto de vista económico. Dicho método debe orientarse tanto a la eliminación de bacterias (Gram positivas y Gram negativas), como de virus (con y sin cápside), así como de parásitos. Es

de considerarse, que los virus como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) pueden existir, tanto en forma libre en el plasma, como asociados a la célula en su forma proviral latente en el genoma de los leucocitos. Debe, por lo tanto, desarrollarse un método de inactivación de patógenos que cubra todos los agentes mencionados.

Desde mediados de los años 40 se practica la inactivación viral de los productos plasmáticos.¹⁵ Posteriormente, los métodos dependientes de los cambios en la temperatura fueron sustituidos por los del empleo de la combinación del solvente-detergente (Tri-n-butil fosfato + triton x 100, con extracción final a través de aceite vegetal y cromatografía), y el tratamiento con betapropiolactón y nanofiltración.¹⁶ El espectro de acción de la nanofiltración abarca también, según el tamaño de los poros, a los virus sin cápside, tales como el virus de la hepatitis A (VHA) o el parvovirus B19, mientras que todos los demás métodos se concentran en la eliminación de virus encapsulados. Con la utilización del método de solvente-detergente en grandes cantidades (500 litros) de "pools" plasmáticos (concentración de plasma de diferentes donadores); la limitación en cuanto al espectro de acción es de menor consideración, ya que en los pools se detectan también generalmente anticuerpos protectores. Como desventaja de este método debe considerarse la labilidad de las proteínas plasmáticas sensibles, tales como el factor VIII, la proteína S, la α 2-antiplasmina y el multímero del factor de von Willebrand.¹⁶

Estos métodos de inactivación no pueden ser utilizados en todos los productos sanguíneos, ya que se altera la membrana de lípidos, dañando así la función celular en forma irreversible. La capacidad de supervivencia de los patógenos y de los leucocitos depende de los ácidos nucleicos, mientras que la función terapéutica de plaquetas, eritrocitos y de

proteínas plasmáticas no depende de ellos. Por lo anterior, los métodos que tienen como meta molecular el ADN y ARN pertenecen a los procesos inactivadores de patógenos que tienen como propósito inhibir la supervivencia y la infectividad de células dependientes de ácidos nucleicos, mediante la interrupción irreversible de la replicación, transcripción y biosíntesis de proteínas.

La mayoría de los mecanismos inactivadores de patógenos para células sanguíneas se basan en procesos fotoactivadores a través de los llamados fotosensibilizadores (*Cuadro IV*). Los métodos fotosensibilizadores comprenden el empleo de moléculas orgánicas con propiedades de absorción de luz. La radiación con luz ultravioleta (UV) o luz visible lleva a cabo inicialmente la activación y después la reacción con moléculas celulares. Algunos agentes recientemente descubiertos, funcionan a través de una fuente de energía externa. Los métodos de inactivación de patógenos se diferencian según el mecanismo de acción en: fotodinámicos y fotoquímicos. En el caso de los fotodinámicos se generan a través de los radicales libres de oxígeno fotosensibilizadores que dañan las membranas de las bacterias, las cápsides virales o los ácidos nucleicos (reacción tipo II) o reaccionan directamente con el sustrato gracias a su elevado potencial de óxido-reducción (redox), dando como resultado la formación de radicales libres (reacción tipo I). Los métodos fotoquímicos se basan, a diferencia de los anteriores, en alianzas covalentes entre bases de ácidos nucleicos y fotosensibilizadores activados. Los de espectro fotodinámico incluyen a la riboflavina, las fenotiazinas (tionina y azul de dimetileno) y la cianina y los de espectro fotoquímico, principalmente al psoraleno (Amotosalen=S-59). Paralelamente, existen moléculas que pueden formar redes covalentes con ácidos nucleicos sin necesidad de procesos externos de activación. A éstos pertenecen el S-303

Cuadro IV. Sustancias inactivadoras de patógenos de productos sanguíneos, actualmente en proceso de validación.

<i>Producto sanguíneo</i>	<i>Método fotodinámico</i>	<i>Método fotoquímico</i>	<i>Otro método</i>
Concentrado plaquetario	Riboflavina, Fenotiazina (Tionina)	Amotosalen-HCl (S-59)	
Concentrado eritrocitario	Riboflavina, Fenotiazina (1,9-dimetil-azul de metileno)		PEN110 (Inactiva) S-303 (FRALE)
Plasma fresco congelado	Fenotiazina (azul de metileno)	Amotosalen-HCl (S-59)	Solvente-detergente

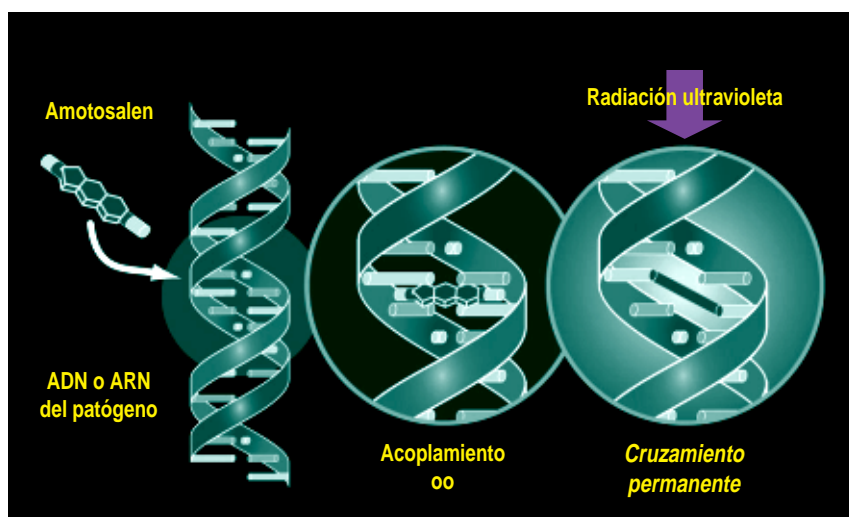


Figura 1.

*Amotosalen (S-59).
Mecanismo de acción.*

Fuente: Lin L et al.
Inf Ther Trans Med 1998; 25: 39-48.

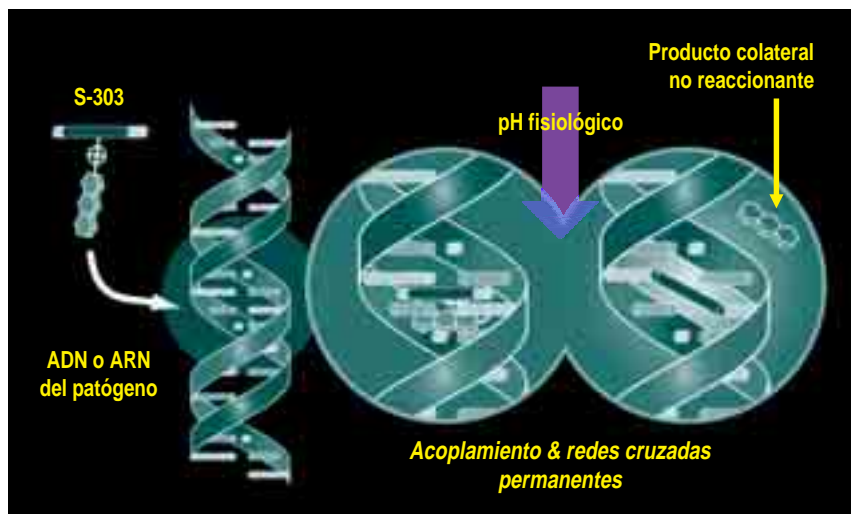


Figura 2.

*S-303 (FRALE).
Mecanismo de acción.*

Fuente: Cook D. *Blood 1997; 90: 409a.*

(FRALE, *frangible anchor-linked effector*) y el Inactine™ (Etilenimina=PEN110) (Figuras 1 y 2).^{17,18}

En comparación con el plasma y los concentrados plaquetarios, la elevada viscosidad de los concentrados eritrocitarios (CE) implica un problema mayor para los métodos fotosensibilizadores, ya que la hemoglobina adsorbe fuertemente la luz visible. Por otra parte, se potencia el daño celular ya que el tiempo de almacenamiento es mucho más largo que en el caso de los concentrados plaquetarios. La agregación de radicales libres captadores de oxígeno puede dar como consecuencia principal hemólisis y liberación de potasio.

A continuación se hace una breve descripción de los métodos de inactivación de patógenos fotodinámicos y fotoquímicos y su estado actual.

Fenotiazinas

Azul de metileno

Se trata de una molécula de carga positiva con elevado potencial redox. Junto con luz visible se utiliza como inactivador de patógenos en plasma fresco congelado. Reacciona con las proteínas y lipoproteínas de las membranas celulares y con ácidos nucleicos; sin embargo, debido a su fuerte hidrofilia, penetra difícilmente a la célula. Tiene efecto contra virus encapsulados y contra algunos virus sin cápsida, como el parvovirus B19.¹⁹ Debido a su efecto dañino sobre el factor VIII y a su potencial genotóxico, hasta la fecha está prohibido su uso en algunos países tales como Alemania. Por el contrario, el azul de metileno es ampliamente hidrofóbi-

co con 10 veces más afinidad hacia los ácidos nucleicos, lo que aclara también su efecto sobre los virus intracelulares.²⁰ Ante la necesidad de captadores de radicales de oxígeno, se ha utilizado el 1,9 dimetil-azul de metileno, que es menos dañino para los eritrocitos que el azul de metileno,²¹ y sus propiedades fotodinámicas en relación con el tratamiento del plasma fresco congelado (PFC), se encuentran actualmente en investigación en la fase preclínica.

Tionina

Las propiedades fotodinámicas de la tionina en combinación con la luz ultravioleta para el tratamiento de los concentrados plaquetarios, se encuentran actualmente en la fase preclínica de investigación. El concentrado plaquetario es radiado durante 30 minutos con luz visible (595 nm), luego con luz ultravioleta por cuatro minutos (300-330 nm), posterior a la administración de 1-3 μ M de tionina. El método se basa en la alteración de los ácidos nucleicos. El espectro de acción abarca tanto a leucocitos, virus con y sin cápside y a bacterias (reducción de gérmenes de 4 a 6 escalas logarítmicas). La funcionalidad *in vitro* de plaquetas parece alterarse mínimamente.²²

Porfirinas

La hematoporfirina, dihematoporfirina, benzoporfirina y el silseno (fósforo (P) catiónico), son moléculas que se "anclan" en las membranas de las células. Posterior a la activación a través de luz visible (> 600 nm) se supone que se inactivan virus con cápside, en menor proporción virus sin cápside, así como bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las porfirinas son recomendables para la inactivación de patógenos de sangre total y concentrados eritrocitarios. Las lesiones eritrocitarias son mínimas y se presentan al agregar radicales captadores de oxígeno tales como el dipiridamol (hemólisis < 1% a las cinco semanas de almacenamiento).²¹

Cianinas

La ptalocianina, ptalocianina de aluminio y los derivados sulfonados inactivan a los virus con cápside. La hemólisis en los concentrados eritrocitarios no puede ser evitada, de tal forma que no se han planeado estudios clínicos. Sin embargo, La merocianina 540 tiene un amplio espectro de acción antiviral, principalmente con reacción fototóxica concomitante sobre los eritrocitos y plaquetas, de tal manera que no parece recomendable realizar más estudios con este fotosensibilizador.¹⁶

Inactinas

PEN110

Las inactinas son moléculas con gran afinidad por los ácidos nucleicos, cuando no están unidas a ellos muestran poca reactividad. Se activan inicialmente a través de la unión electrostática con los ácidos nucleicos,²³ sin que para ello sea necesaria una activación previa mediante fuente de energía externa. La interacción covalente entre el grupo aciridino y la posición N-7 de la guanina, induce a la apertura del anillo de imidazol, inhibiendo así la acción de las polimerasas de ARN y de ADN con la consecuente interrupción de los mecanismos de transcripción y replicación bacteriana.²³ El espectro de acción abarca bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como virus con y sin cápside.²⁴ La reducción de gérmenes va de 4-7 escalas logarítmicas (log);²⁵ la reducción de una escala log significa reducción del 90% (una décima), de dos escalas log del 99% (una centésima), de tres escalas log del 99.9% (una milésima), de gérmenes respectivamente, etcétera. También los leucocitos son inactivados. Para llevar a cabo la inactivación de patógenos en los productos sanguíneos (concentrados eritrocitarios y plasma fresco congelado), éstos se incuban con PEN110 a temperatura ambiente (18-22 horas en caso de concentrados eritrocitarios) y después se lavan mediante un proceso automatizado con tiosulfato de sodio.²⁵ En un estudio clínico fase I no se encontraron diferencias significativas entre los eritrocitos de concentrados eritrocitarios tratados con PEN110 y los no tratados, en cuanto a sus niveles de recuperación, hemólisis y neoantigenicidad.²⁶⁻²⁸ Sin embargo, los riesgos y el perfil toxicológico de las sustancias restantes no han sido aún determinados. Existen pocos datos sobre el diseño y los resultados actuales de los estudios clínicos con inactinas.

Riboflavinas = Vitamina B₂

La riboflavina constituye un elemento nutricional y como coenzima participa en varios pasos previos a la cadena respiratoria mitocondrial. Se trata de una molécula de estructura plana con una cadena de azúcares. Su propiedad hidrosoluble le permite atravesar rápidamente las membranas celulares intercalándose entre las cadenas que forman la doble hélice del ADN. El mecanismo una vez activado por luz visible o luz ultravioleta en dosis de 5-10 J/cm² se basa en la inducción de uniones cruzadas de ácidos nucleicos.

cos y rupturas de bandas mediante electrotransferencias directas (independientes de oxígeno), entre sustrato y sensibilizador (oxidación de restos de guanosina). La riboflavina (10 μM) ha demostrado ser efectiva para los leucocitos, así como en gran cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y contra virus con y sin cápside. La reducción de gérmenes va de 4-7 escalas logarítmicas.^{29,30} La riboflavina se recomienda para la inactivación de patógenos de concentrados plaquetarios, concentrados eritrocitarios (luz visible), así como de plasma (luz ultravioleta). La sustancia y sus fotoproductos no se separan del producto al final del proceso de fotoinactivación debido a que, tanto *in vitro* como *in vivo* (modelos animales), se encontraron niveles de genotoxicidad o toxicidad aguda.³¹ La fotodegradación de la riboflavina ha sido ampliamente estudiada en recién nacidos con hiperbilirrubinemia tratados con fototerapia. En un estudio retrospectivo de 55,000 niños, no se demostraron efectos tóxicos. La riboflavina se une inespecíficamente a las proteínas plasmáticas; sin embargo, si se agrega ácido ascórbico, se pueden preservar las funciones de la coagulación. En estudios *in vitro* se encontró una reducción moderada de la función plaquetaria, en promedio en un 20% comparada con la de grupos controles no tratados,²⁹ y en estudios *in vivo* (modelo con primates), los rangos de la recuperación y de supervivencia de plaquetas se encontraron ligeramente reducidos.³² Hasta el momento no se ha podido aclarar el incremento en la hemólisis de los eritrocitos secundaria a tratamiento con riboflavina en combinación con aminofilina.³³

Psoralenos

S-59 (amotosalen)¹⁷

Los psoralenos son furocumarinas que se encuentran en muchas sustancias alimenticias, principalmente en vegetales (apio, perejil). La ingesta diaria con los alimentos está muy por encima de 1 mg. Algunos psoralenos (como los de producción sintética: Amotosalen o S-59) tienen afinidad especialmente elevada por los ácidos nucleicos. Se intercalan entre las regiones de los ácidos nucleicos, ya sea de cadena simple o de doble hélice. Se trata aun de uniones reversibles. A través de la activación final del proceso, con breve radiación con luz ultravioleta de onda larga, se forman uniones covalentes cruzadas irreversible, con las bases de pirimidina de los ácidos nucleicos. De forma parecida al psoraleno, reacciona el S-303 (FRALE) aunque no es considerado psoraleno.

En vez de ser activado con luz ultravioleta, la activación se lleva a cabo mediante el cambio de pH; esta alteración conlleva a la división de la molécula de S-303 en dos partes, una de las cuales reacciona con los ácidos nucleicos formando redes cruzadas de bases y la otra se disuelve nuevamente como molécula de carga negativa (*Figura 2*).^{18,34}

La inactivación de patógenos con psoralenos tiene un amplio espectro de acción contra virus encapsulados y sin cápside, virus asociados o no asociados a células, bacterias Gram positivas y Gram negativas y contra protozoarios. El rango de reducción de gérmenes va de 4-6 escalas logarítmicas. La inactivación de los leucocitos en los productos almacenados se determina a partir de la represión completa de la liberación de citocinas. En comparación con la radiación con rayos gamma, el tratamiento fotoquímico demuestra mayor efectividad y al mismo tiempo ofrece mayor seguridad en la inactivación de los leucocitos.

Respecto a la inactivación de patógenos de concentrados plaquetarios, la unión inespecífica de psoralenos a las proteínas plasmáticas, tales como la albúmina, se lleva a cabo mediante la reducción de una porción plasmática que es sustituida en aproximadamente dos tercios por una solución aditiva sin contenido proteico, para lograr así las condiciones óptimas que requiere el proceso. Una alternativa sería la elevación de la dosis de luz ultravioleta, que tendría efecto altamente fototóxico en la función celular. Al iniciar el tratamiento fotoquímico, el plasma o los concentrados plaquetarios, se deben mezclar con 150 μM de amotosalen y el concentrado eritrocitario con 100 μM de S-303 (FRALE).¹⁸ Después de la radiación con luz ultravioleta (320-400 nm) en dosis de 3 J/cm² (3-6 minutos), los fotoproductos que quedaron libres, así como el amotosalen restante (< 1%), o en su caso el resto de S-303 cargado negativamente, entran en un proceso de adsorción (CAD, *Compound Adsorption Device*) durante varias horas; el producto sanguíneo ya inactivado de patógenos se almacena posteriormente. En el caso del plasma fresco congelado, el proceso de adsorción (CAD) dura unos pocos minutos, ya que el producto se somete a un procedimiento parecido al del filtrado en la leucodepleción.

La utilización de S-59 en la inactivación de patógenos de concentrados plaquetarios y plasma y de S-303 en el caso de concentrados eritrocitarios ha sido probada en numerosos estudios preclínicos y clínicos, tanto en voluntarios sanos como en pacientes, ya sea con trombocitopenia secundaria a quimioterapia (fase III con plaquetas tratadas con S-59), con

deficiencias congénitas o adquiridas de factores de la coagulación, o con púrpura trombocitopénica trombótica (fase III con plasma fresco congelado tratado con S-59). El S-59 en combinación con 3 J/cm² de luz ultravioleta demostró tener un buen perfil de seguridad, sin toxicidad orgánica específica.³⁵ La genotoxicidad se demostró hasta que se incrementó la dosis clínica 40,000 veces. Aun incrementando la dosis clínica 1,000 veces, no se demostró oncogenicidad (ausencia de gen supresor tumoral p53) en modelos de ratones sometidos a seis meses al tratamiento. Se encontraron niveles bajos postransfusionales de S-59 en el plasma, que desaparecieron rápidamente sin encontrarse diferencias entre pacientes y personas sanas.^{17,35,36}

Los eritrocitos tratados *in vitro* con S-303 no presentaron datos de incremento de hemólisis, ni de liberación de iones de potasio, pérdida de ATP o elevación de 2,3DPG-, en comparación con los no tratados.³⁶ En estudios *in vivo* (modelos con ratones y con perros), los restos postransfusionales de S-303 (79% *versus* 84%), así como rangos de supervivencia mayores al 75% fueron comparables. Los estudios de fase clínica III han sido descontinuados debido a la presencia de anticuerpos.^{34,37}

La actividad de la coagulación en los plasmas tratados *in vitro* con S-59 se mantuvo en buenos niveles. El factor VIII fue el que mostró la caída mayor, posterior al tratamiento, pero incluso así en niveles terapéuticos aceptables.³⁷ Los estudios de fase clínica III están aún por concluirse y no han sido publicados todavía.

Algunos autores reportan que la funcionalidad *in vitro* de las plaquetas tratadas fotoquímicamente ha sido aceptable con este método, en comparación con las plaquetas no tratadas,^{38,39} incluso posterior a siete días de su almacenamiento.⁴⁰ Se pueden mencionar diferencias significativas en cuanto al valor del pH, consumo de glucosa, producción de lactato y tensión parcial de oxígeno como indicio de un metabolismo oxidativo disminuido, consecuencia de un probable daño mitocondrial. Estos datos son apoyados por dos de los grandes estudios controlados fase III actualmente concluidos en pacientes con trombocitopenia. En relación con efectividad hemostática, seguridad, complicaciones hemorrágicas y necesidades de sustitución de concentrados eritrocitarios, así como reacciones transfusionales y estados refractarios, no se encontraron diferencias entre los tratados y los no tratados. La terapia con plaquetas fotoquímicamente tratadas demanda, sin embargo, un mayor número de transfusiones a intervalo de transfusión

más corto debido a su menor número concentrado.^{38,40} Estas diferencias se deben a que el tratamiento conduce a una pérdida aproximada del 10% en el número de plaquetas, posiblemente debido al cambio metabólico mitocondrial.⁴¹

Finalmente, algunos de los argumentos a favor de utilizar los métodos de inactivación de patógenos de productos sanguíneos son:

- El interés en elevar la seguridad de los productos sanguíneos.
- La inactivación de gérmenes de importancia clínica, tales como: virus sin cápside como el virus de la hepatitis A (HAV) y el parvovirus B19.
- El efecto contra contaminación bacteriana, especialmente de concentrados plaquetarios.
- El efecto contra los virus asociados a células: principalmente el citomegalovirus (CMV) y las formas provirales del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).
- La reducción de la inmunomodulación dependiente de los leucocitos con la eventual eliminación de los rayos gamma.

Sin embargo, debe tomarse en consideración que muchos de estos métodos se encuentran todavía en fase de validación y que faltan estudios que permitan aseverar que la viabilidad celular no es afectada durante el proceso de la inactivación de patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown P. B lymphocytes and neuroinvasion. *Nature* 1997; 390: 662-663.
2. Seyfried E, Roth WK. Optimal blood donation screening. *Br J Haematol* 2000; 109: 694-698.
3. Allain JP. Will genome detection replace serology in blood screening for microbial agents? *Baill Clin Haematol* 2000; 13: 615-629.
4. Bush MP, Kleinman SH. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. *Transfusion* 2000; 40: 143-159.
5. Dodd RY. The safety of the blood supply: Current concepts. In: *Blood supply monography*. Hiller CD (ed). Atlanta, Georgia: Fenwal-Baxter, 1999; 1-17.
6. Stramer SL. Pathogeninaktivierung. Pathogenreduktion. *Curr Op Hematol* 2000; 7: 387-391.
7. Pillonel J, Saura C, Couroucé AM. Dépistage des marqueurs d'une infection par le VIH et les virus des hépatites B et C chez les donneurs de sang en France et risque résiduel de transmission de ces virus par transfusion sanguine. *Eurosurveillance* 1998; 3: 76-79.
8. Williams AE et al. Estimates of infectious disease risk factors in U.S in blood donors. *JAMA* 1997; 277: 967-972.
9. Chamberland ME, Alter HJ, Busch MP. Emerging infectious disease issues in blood safety. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 552-553.

10. Perez P, Salmi LR, Follea G. Determinants of transfusion-associated bacterial contamination: Results of the French BACTHEM case-control-study. *Transfusion* 2001; 41: 862-872.
11. Hernández BA, García RP, Cruz EA, Rojo J. Seroprevalencia de brucelosis en disponentes de sangre del Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen Mex* 1999; 62 (2): 107-112.
12. Blajchman MA. Incidence and significance of the bacterial contamination of blood components. *Dev Biol Basel Karger* 2002; 108; 59-67.
13. Jacobs MR, Palavecino E, Yomtovian R. Don't bug me: The problem of bacterial contamination of blood components – challenges and solutions. *Transfusion* 2001; 41: 1331-1334.
14. Love EM, Jones H, Williamson LM et al. On behalf of the SHOT steering group. Serious hazards of transfusion annual report 1999-2000 (March, 2001).
15. Ballou GA, Boyer PD, Luck JM. Chemical, clinical, and immunological studies on the production of human plasma fractionation. *J Clin Invest* 1994; 23: 454-457.
16. Council of Europe expert committee in blood transfusion study group on pathogen inactivation of labile blood components. Pathogen inactivation of labile blood products. *Transf Med* 2001; 11: 149-175
17. Lin L, Alfonso R, Behrman B, Corten L, Damonte PB, DiKeman R, Dupuis M et al. Photochemical treatment of platelet concentrates with a novel Psoralen an UVA to enhance the safety of platelet transfusion. *Inf Ther Trans Med* 1998; 25: 39-48.
18. Cook D, Stassinopoulos A, Merritt J, Lin C, Reames A, Liu W, Schott M et al. Inactivation of pathogens in packed red blood cell (PRBC) concentrates using S-303. (Presented at the 39th Annual Meeting of the American Society of Hematology). *Blood* 1997; 90: 10 (S1): 409a.
19. Iudicone P, Andreoni M, Lavorino C. Photodynamic treatment of fresh frozen plasma by methylene blue: effect on HIV, HCV and parvovirus B19. *Infus Ther Transfus Med* 1999; 26: 262-266.
20. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D. Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylene blue. *Transfusion* 1998; 38: 729-737.
21. Stevenick van J, Trannoy LL, Besselink GA. Selective protection of red blood cells against photodynamic damage by band 3 ligand dipyrindamole. *Transfusion* 2000; 40: 1330-1336.
22. Mohr H, Knuever-Hopf J, Lambrecht B. Platelet functions are maintained after pathogen inactivation by photodynamic treatment with UV-B irradiation. *Infus Ther Transfus Med* 2001; 28: 66.
23. Chapman J. Progress in improving the pathogen safety of red cell concentrates. *Vox Sang* 2000; 78: 203-204.
24. Lazo A, Tassello J, Aytay S. Inactivation of non-enveloped viruses in red cell concentrates using the INACTINE™ compound PEN110. *Blood* 2001; 98: 540.
25. Lazo A, Tassello J, Jayarama V, Ohagen A, Gibaja V, Kramer E. Broad spectrum virus reduction in red cell concentrates using INACTINE PEN110 chemistry. *Vox Sang* 2002; 83: 313-323.
26. AuBuchon JP, Pickard CA, Herschel LH. Production of pathogen-inactivated RBC concentrates using PEN110 chemistry: a phase I clinical study. *Transfusion* 2002; 42: 146-152.
27. Purma A, Valeri CR, Dzik W. Process for the preparation of pathogen-inactivated RBC concentrates by using PEN110 chemistry: Preclinical study. *Transfusion* 2002; 42: 139-145.
28. Snyder, Mintz P, Burks S. Pathogen inactivated red blood cell using INACTINE™ technology demonstrate 24-hour post transfusion recovery equal to untreated red cells after 42 days of storage. *Blood* 2001; 98: 709.
29. Janssens M. The use of riboflavin for pathogen inactivation in platelets, plasma and red blood cells. *Infus Ther Transfus Med* 2001; 28: 1-70.
30. Corbin F. Pathogen inactivation of blood components: Current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. *Int J Hematol* 2002; 76: 253-257.
31. Piper JT, Hansen ET, Woolum MD. Evaluation of genotoxicity and acute toxicity risks associated with a riboflavin based pathogen inactivation process. *Blood* 2001; 98: 108b.
32. Goodrich RP, Woolum A, Hansen E. Recovery and survival of radiolabelled platelets following treatment with a riboflavin based pathogen inactivation procedure. *Blood* 2001; 98: 541.
33. Ali L, Naseem I. Hemolysis of human red blood cells by combination of riboflavin and aminophylline. *Life Sci* 2002; 15: 2013-2022.
34. Cook D, Stassinopoulos A, Merritt J. Inactivation of pathogens in packed red blood cell (PRBC) concentrates using S-303. *Blood* 1997; 90: 409a.
35. Ciaravino V. Preclinical safety of a nucleic acid-targeted Helinx compound. A clinical perspective. *Semin Hematol* 2001; 38: 12-19.
36. Greenwalt TJ, Hambleton J, Wages D. Viability of red blood cells treated with a novel pathogen inactivation system. *Transfusion* 1999; 39: 109S.
37. Wages D, Hambleton J, Viele M. RBCs treated with Helinx™ pathogen inactivation show comparable recovery and survival to standard RBCs in a randomized crossover trial. *Blood* 2001; 98: 449a.
38. Rhenen van DJ, Vermeij J, Mayaudon V, Hind C, Lin L, Corash L. Functional characteristics of S-59 photochemically treated platelet concentrates derived from buffy-coats. *Vox Sang* 2000; 79: 206-214.
39. Janetzko K, Klinger M, Mayaudon V, Lin L, Eichler H, Klüter H. Storage characteristics of split double-dose platelet concentrates derived from apheresis and treated with amotosalen-HCl and UVA light for pathogen inactivation. *Infus Ther Transfus Med* 2002; 29: 193-198.
40. Slichter S. Intercept platelets provide effective hemostasis increments: Comparison to conventional platelets in two phase clinical trials. Poster presented at the 7th Annual Congress of the European Hematology Association, Florence, Italy, June 2003.
41. Picker SM, Speer R, Gathof BS. Functional characteristic of platelets photochemically-treated with amotosalen-HCl for inactivation. *Transfusion* 2003; 44 (3): 320-329.

Correspondencia:

Prof. Dra. med. Julieta Rojo Medina
 Hospital General de México
 Banco de Sangre
 Dr. Balmis 148,
 Col. Doctores.
 06726 México, D.F.
 Tel: (55) 2789-2000, ext. 1309 y 1310
 E-mail: julieta.rojomx@yahoo.com.mx