

# Grado en Biología

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Revisión bibliográfica: alternativas médicas a la sangre natural**

**Revisión bibliográfica: alternativas médicas ao sangue natural**

**Literature review: medical alternatives to natural blood**



**Miguel Alonso Torreiro**

Junio, 2018

*Director: Antonio Manuel Castro Castro*



D. Antonio Manuel Castro Castro, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña,

INFORMA,

Que el Trabajo de Fin de Grado presentado por Miguel Alonso Torreiro y con título "Revisión bibliográfica: alternativas médicas a la sangre natural" ha sido realizado bajo mi dirección y, considerándolo finalizado, autorizo su envío y presentación al tribunal calificador correspondiente.

Y, para que así conste, expido el presente informe en A Coruña a 20 de junio de 2018.

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro.

## Índice

<b>Resumen/Resumo/ Abstract</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1. Componentes de la sangre .....	3
1.1.1. El plasma sanguíneo .....	3
1.1.2. Elementos formes .....	3
1.2. Terapia transfusional y donaciones de sangre.....	5
<b>2. Objetivos</b> .....	8
<b>3. Material y métodos</b> .....	8
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	8
4.1. Perspectiva histórica .....	8
4.2. Sustitutos de la sangre.....	8
4.2.1. Sustitutos de los glóbulos rojos .....	8
4.2.1.1. HBOC .....	9
4.2.1.2. Sistemas basados en emulsiones de perfluorocarburos.....	15
4.2.1.3. Otra alternativa médica a la sangre natural .....	18
4.2.2. Sustitutos de plaquetas.....	19
<b>5. Conclusión/Conclusión/Conclusion</b> .....	21
<b>6. Bibliografía</b> .....	22

## Resumen

Las necesidades hospitalarias de sangre obtenida a través de las donaciones y de los productos derivados de esta, han promovido la búsqueda de compuestos capaces de realizar las funciones de las células sanguíneas. Con esta finalidad han surgido una amplia variedad de compuestos sintéticos o semisintéticos fruto de diversas investigaciones. La mayoría de esfuerzos han ido dirigidos a sustituir a los eritrocitos, el tipo celular más transfundido y con mayor uso en la actualidad, habiendo dos clases principales de sustitutos: los HBOC (transportadores de oxígeno basados en la hemoglobina) y los basados en emulsiones de perfluorocarburos. Dentro de cada grupo nos encontramos con un gran número de productos con características distintas que han sido o están siendo sometidos a ensayos clínicos para la evaluación de seguridad en el consumo humano. Tampoco debemos obviar el segundo tipo celular sanguíneo más utilizado tanto para transfusiones como para producir hemoderivados, las plaquetas, cuyas investigaciones son más recientes y no han avanzado tanto. No obstante, también hay ciertos productos que pueden emular su función.

**Palabras clave:** sustitutos de la sangre, HBOC, sustitutos de eritrocitos basados en emulsiones de perfluorocarburos, productos sustitutivos de plaquetas, alternativas transfusionales.

## Resumo

As necesidades hospitalarias de sangue obtida a través das doazóns e dos produtos derivados desta, promoveron a búsqueda de compostos capaces de realizar as funcións das células sanguíneas. Con esta finalidade xurdiron unha ampla variedade de compostos sintéticos ou semisintéticos froito de diversas investigacións. A maioría de esforzos foron dirixidos a substituír aos eritrocitos, o tipo celular máis transfundido e cun maior uso na actualidade, habendo dúas clases principais de substitutos: os HBOC (transportadores de oxíxeno baseados na hemoglobina) e os baseados en emulsións de perfluorocarburos. Dentro de cada grupo atopámonos cun gran número de produtos con características distintas que foron ou están sendo sometidos a ensaios clínicos para á avaliación de seguridade no consumo humano. Tampouco debemos obviar o segundo tipo celular sanguíneo máis utilizado tanto para transfusións como para producir hemoderivados, as plaquetas, cuxas investigacións son máis recentes e non avanzaron tanto. Non obstante, tamén hai certos produtos que poden emular a súa función.

**Palabras clave:** substitutos ao sangue, HBOC, substitutos de eritrocitos baseados en emulsións de perfluorocarburos, produtos substitutivos de plaquetas, alternativas transfusionais.

## Abstract

Hospital needs for blood obtained through donations and blood products have promoted the search for compounds capable of performing the functions of blood cells. To this end, a wide variety of synthetic or semi-synthetic compounds have emerged as a result of various investigations. Most efforts

have been directed towards replacing erythrocytes, the most widely used and transfused blood cell type today, with two main classes of substitutes: HBOCs (hemoglobin-based oxygen carriers) and perfluorocarbon emulsions based ones. Within each group we find a large number of products with different characteristics that have been or are undergoing clinical trials for the evaluation of safety in human consumption. Nor should we ignore the second most commonly used blood cell type for both transfusions and blood products, platelets, whose research is more recent and not so advanced. However, there are also certain products that can emulate its function.

**Keywords:** blood substitutes, HBOC, erythrocytes substitutes based in perfluorocarbons emulsions, platelets substitutive products, transfusion alternatives.

## 1. Introducción

La sangre humana es un tejido conjuntivo especializado constituido por elementos formes (Figura 1) suspendidos en un componente líquido (matriz extracelular) conocido como plasma sanguíneo. Entre sus principales funciones destacan: el traslado de nutrientes desde el sistema digestivo al resto de células del cuerpo, el transporte de las sustancias de desecho provenientes de las células del cuerpo a órganos específicos para su eliminación, así como el reparto de metabolitos, productos celulares y electrólitos. También se encarga del transporte de oxígeno desde los pulmones a las células y de movilizar el CO<sub>2</sub> para su eliminación. Además tiene un papel importante en la regulación de la temperatura corporal y actúa como transporte de los leucocitos a través de los tejidos.

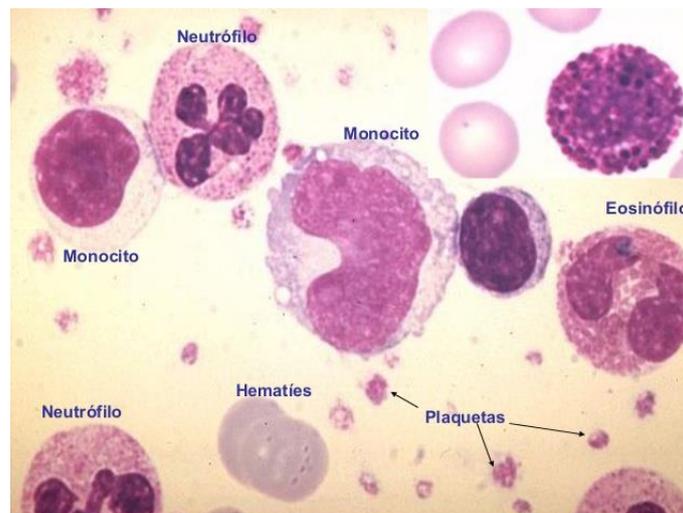


Figura 1. Elementos formes de la sangre.

### 1.1. Componentes de la sangre

#### 1.1.1. El plasma sanguíneo

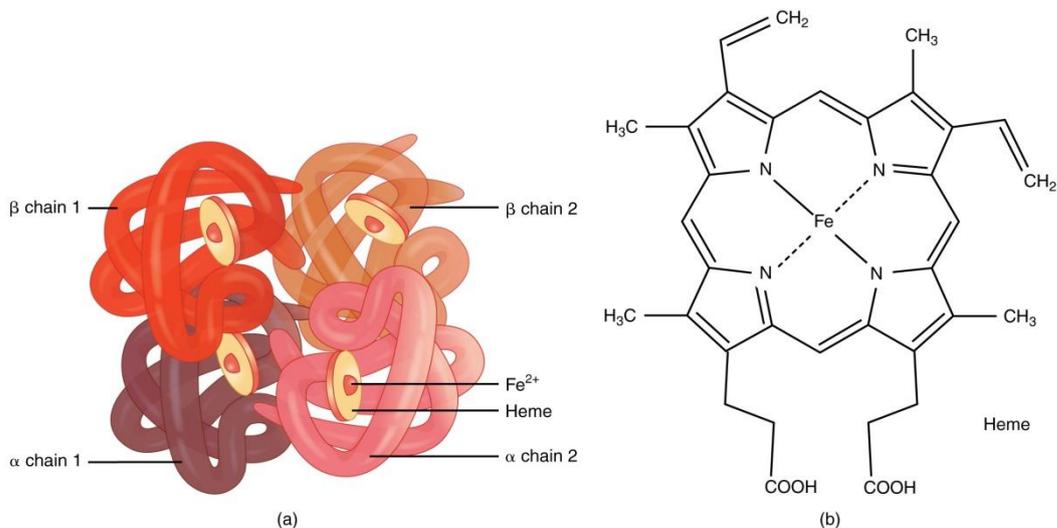
Es un fluido amarillento en el que están suspendidos o disueltos elementos formes, compuestos orgánicos y electrolitos. Su componente principal es el agua, que representa el 90% de su volumen, seguida por las proteínas, que constituyen el 9%. El 1% restante lo constituyen las sales inorgánicas, iones, compuestos nitrogenados, nutrientes y gases.

#### 1.1.2. Elementos formes

##### Eritrocitos

Son las células de mayor número en la sangre. Su función principal es el transporte de O<sub>2</sub> a todas células del cuerpo y la recogida de CO<sub>2</sub> proveniente de estas para su eliminación. Su capacidad para el intercambio de gases está determinada por su forma de disco bicóncavo que le proporciona una mayor relación superficie/volumen. Estas células pierden el núcleo durante su desarrollo y tampoco tienen orgánulos, aunque sí que poseen enzimas disueltas en su citoplasma con funciones específicas para el intercambio de

gases. Los eritrocitos poseen grandes concentraciones de hemoglobina, una proteína formada por cuatro cadenas polipeptídicas que se unen a un grupo hemo (Figura 2). La localización de este grupo con respecto a las cadenas es la que posibilita la unión con la molécula de  $O_2$ , siempre y cuando la presión parcial de  $O_2$  sea elevada (oxihemoglobina). En las partes del cuerpo donde la presión parcial de  $O_2$  es reducida sucede el fenómeno contrario, uniéndose la hemoglobina al  $CO_2$  (carbohemoglobina). Un aspecto importante sobre estas células es la presencia en la superficie extracelular de su membrana plasmática de cadenas de carbohidratos específicas y hereditarias, las cuales actúan como antígenos conformando el grupo sanguíneo de una persona. Los antígenos A y B determinan los cuatro principales grupos sanguíneos A, B, AB y 0 (ausencia de antígenos A y B). Si una persona recibe una transfusión de sangre con el o los antígenos ausentes en sus eritrocitos, su sistema inmunitario producirá anticuerpos que identificarán al antígeno como un agente extraño para el organismo y, al cabo de un tiempo, llevarán a la lisis de los eritrocitos transfundidos (rechazo). En las transfusiones sanguíneas en la que se empleen este tipo de células, otro aspecto fundamental a tener en cuenta es el grupo Rh, el cual es mucho más complejo que el anterior debido a que está formado por más de dos docenas de antígenos. Tres de ellos (C, D y E) son muy comunes en nuestra especie y las personas que los poseen son los denominados Rh+. De modo que los individuos que no los posean serán Rh-.



**Figura 2. Estructura molecular de la hemoglobina.**

### Leucocitos

Son células cuya principal función es la defensa del organismo frente a sustancias o agentes extraños. Se encuentran en mucho menor número que los eritrocitos y no realizan su función en el circuito sanguíneo, el cual solo utilizan como vehículo para desplazarse por el organismo. Una vez en la zona donde van a actuar, estas células realizan un proceso denominado diapédesis, por el cual abandonan el torrente sanguíneo pasando entre las células endoteliales, llegando a espacios del tejido conjuntivo donde llevarán a cabo su

función. Dentro de los leucocitos tenemos dos grandes grupos: los granulocitos y los agranulocitos.

Los granulocitos presentan 3 subgrupos diferenciados por su color tras su tinción:

**Neutrófilos.** Son los leucocitos más numerosos. Su función principal consiste en fagocitar patógenos para posteriormente destruirlos mediante las sustancias contenidas en sus gránulos.

**Eosinófilos.** Poseen gránulos específicos con una región interna y otra externa, asociándose con reacciones alérgicas, infecciones parasitarias e inflamaciones crónicas.

**Basófilos.** También tienen gránulos específicos con diferentes sustancias, participando en reacciones de hipersensibilidad y anafilaxia.

En los agranulocitos, se pueden distinguir dos subgrupos:

**Linfocitos.** Son también abundantes dentro de los leucocitos y están clasificados en tres grupos según su función. Los de tipo B, tras su diferenciación, dan lugar a células plasmáticas que producen anticuerpos sin la necesidad de contactar directamente con el antígeno. En cambio, los de tipo T necesitan contactar directamente con el antígeno (células T citotóxicas) para su eliminación. Estos últimos a su vez pueden actuar como mediadores en distintos procesos inmunitarios (células T colaboradoras y reguladoras). Una vez transcurrida la respuesta inmunitaria ante un determinado patógeno, algunos linfocitos de los grupos B y T se diferencian en células memoria, cuya función es producir una respuesta más rápida y eficiente ante una futura infección. El último grupo está formado por las células NK, las cuales pueden destruir células, anteriormente marcadas por las células T colaboradoras y reguladoras, que posean algún tipo de alteración mediante la liberación de enzimas como las perforinas y las granzimas.

**Monocitos.** Son las células de mayor tamaño de la sangre. Cuando la abandonan hacia los espacios del tejido conjuntivo para llevar a cabo su función reciben el nombre de macrófagos. Sus principales funciones son: la fagocitosis de sustancias particuladas que el organismo no necesita y la síntesis de citocinas, las cuales participan en procesos inmunitarios e inflamatorios.

### Plaquetas

Son pequeños fragmentos en forma de disco y anucleados de megacariocitos de la médula ósea. Actúan en caso de lesión, bloqueando la zona de hemorragia al unirse al endotelio de los vasos sanguíneos (1).

## **1.2. Terapia transfusional y donaciones de sangre**

El uso por excelencia de la sangre como terapia médica son las transfusiones. La sangre extraída en las donaciones se puede usar directamente, pasando los respectivos controles de seguridad para la comprobación de que no va suponer ningún riesgo para el receptor (sangre total). Sin embargo, la estrategia más

eficiente y utilizada es la separación de la sangre en distintas fracciones para la transfusión del componente o componentes que el paciente necesite. Las distintas fracciones en las que la sangre total es separada son:

**Paquete globular.** Contiene todos los glóbulos rojos junto con una pequeña parte de plasma, plaquetas y leucocitos no funcionales. El trasplante de esta fracción es la más utilizada para los pacientes que necesiten incrementar su número de eritrocitos, posibilitando el correcto transporte de oxígeno a sus células.

**Plasma fresco congelado.** El plasma, una vez separado, se congela a  $-30^{\circ}\text{C}$  antes de transcurrir 6 horas para conservar la funcionalidad de todos los factores de coagulación durante un periodo estimado de un año. Su transfusión debe de ser inmediata después de la descongelación, sino los factores de coagulación perderán su funcionalidad.

**Crioprecipitado.** Es muy similar a la anterior. Su descongelación se realiza de forma lenta con temperaturas de  $1-6^{\circ}\text{C}$  o con un microondas especial destinado a este propósito. Se usa para tratar deficiencias en los factores sanguíneos contenidos en el plasma así como en el tratamiento de pacientes que padecen de hemofilia A.

**Plaquetas.** Su uso ha aumentado en los últimos años para el tratamiento de pacientes que sufren algún tipo de cáncer hematológico o linfático o de pacientes con sangrado activo que tengan una producción insuficiente de plaquetas (trombocitopenia). Tras su separación, se almacenan en sistemas plásticos donde se preservan hasta 72 horas en agitación con anticoagulantes (2).

Todos estos componentes se separan por técnicas de aféresis. La técnica utilizada recibe un nombre distinto según el componente: plasmaféresis, eritroféresis y tromboféresis.

La realización de transfusiones es un proceso rutinario en cualquier hospital y su importancia es vital en muchos procedimientos médicos diarios. Debido a esto, es imprescindible disponer de información que nos permita conocer y evaluar su utilización facilitando la toma de decisiones, siendo necesaria la existencia de un número de donantes suficiente para mantener las reservas hospitalarias.

Con respecto a esto último, el número de donaciones en España del 2011 al 2014 experimentó un descenso, aumentando posteriormente en 2015 (Tabla1). La mayor parte de las donaciones (97%) provienen de la sangre total, separándose posteriormente en las distintas fracciones. En cambio, las donaciones en las que se separan directamente los componentes sanguíneos por aféresis son minoritarias (3).

	2011	2012	2013	2014	2015	% Variación 2014-2015
<b>Donaciones SC</b>	1.735.316	1.702.768	1.647.420	1.621.707	1.651.074	1,81
<b>Donaciones Aféresis</b>	61.379	53.039	50.677	54.601	55.899	2,38
<b>Total Donaciones</b>	1.796.695	1.755.807	1.698.097	1.676.308	1.706.973	1,83
<b>Índice de Donación</b>	39,08	38,16	36,16	36,21	36,90	

Tabla 1. Número de donaciones en España desde el 2011 al 2015 (3).

Los componentes más trasfundidos son a su vez los más obtenidos de acuerdo con su demanda hospitalaria (Tablas 2 y 3).

	2011	2012	2013	2014	2015	% Variación 2014-2015
<b>CH (U)</b>	1.691.365	1.672.095	1.613.075	1.586.106	1.607.859	1,37
<b>PQ (U)</b>	1.023.868	966.394	952.607	957.811	982.881	2,62
<b>PFC (L)</b>	455.779	445.938	430.414	434.214	432.227	-0,46

Tabla 2. Principales componentes sanguíneos obtenidos. CH (concentrado de eritrocitos), PQ (Plaquetas) y PFC (plasma fresco congelado) (3).

	2011	2012	2013	2014	2015	% Variación 2014-2015
<b>SC (U)</b>	93	95	123	55	107	94,55
<b>CH (U)</b>	1.578.316	1.578.032	1.531.749	1.489.696	1.512.697	1,54
<b>PQ (DT Adulto)</b>	193.496	192.326	192.592	193.347	198.464	2,26
<b>PFC (U)</b>	210.490	199.036	186.537	185.695	183.248	-1,32
<b>Criop (U)</b>	1.930	1.557	1.901	1.868	1.271	-31,96
<b>Índice CH (U x 1000 Hb)</b>	34,33	34,30	32,62	32,18	32,70	
<b>Índice PQ (DT x 1000 Hb)</b>	4,21	4,18	4,29	4,44	4,55	
<b>Índice PFC (U x 1000 Hb)</b>	4,58	4,33	3,97	4,01	3,96	
<b>Índice Criop (U x 1000 Hb)</b>	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	

Tabla 3. Principales componentes transfundidos. SC (componentes sanguíneos), CH (concentrado de eritrocitos), PQ (plaquetas), PFC (plasma fresco congelado) y Criop (Crioprecipitado) (3).

En cuanto al sistema de donantes de sangre en España, en el año 2015 existía una base suficiente para mantener la red de transfusiones, con un número medio de donantes activos de 25,52 por 1000 habitantes (3). Pero esto no sucede a nivel global, debido a este motivo los científicos se han interesado por nuevas alternativas a las terapias convencionales.

## 2. Objetivos

Los inconvenientes y problemas asociados a la terapia transfusional convencional tales como: el rechazo sanguíneo tras la transfusión, la sangre como vector de diversos virus y bacterias patógenas, la corta vida útil de muchos productos hemoderivados y la escasez de donaciones, han conducido al desarrollo de alternativas a la sangre natural. En este sentido, los objetivos planteados en la presente revisión bibliográfica han sido:

- 1- Conocer los tipos de sustitutos existentes
- 2- Aportar datos concretos de cada producto
- 3- Mostrar los distintos avances que se han hecho en este campo
- 4- Estudiar el estado de las investigaciones

## 3. Material y métodos

Para la búsqueda de información sobre alternativas médicas a la sangre natural se emplearon diversas bases de datos (Scopus, Web Of Science y PubMed central). En dicha búsqueda, se emplearon diversas palabras clave relacionadas obteniendo un gran número de resultados de búsqueda. Posteriormente se seleccionaron los artículos cuya información se consideró más relevante. Los artículos utilizados se mostrarán en el apartado de la bibliografía.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Perspectiva histórica

Los primeros intentos por obtener un producto que tuviese la misma función que un componente sanguíneo se realizaron a principios del siglo pasado pero no fue hasta la década de los 80, tras la crisis del VIH, cuando el interés científico por encontrar sustitutos de la sangre se disparó, ya que los productos sanguíneos utilizados en las transfusiones podían ser un foco de infección importante. Esto último, sumado a la falta de reservas, las dificultades para el almacenamiento y transporte y el alto coste que todo esto supone, ha hecho que la investigación en este campo sea muy prolífica. Hasta la fecha varios productos han sido sometidos a ensayos preclínicos y clínicos pero ninguno de ellos cuenta con la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos (4–6).

### 4.2. Sustitutos de la sangre

Comúnmente en la terapia transfusional, la sangre se divide en fracciones cada una con una utilidad específica. El mismo principio es aplicado a los sustitutos de la sangre, clasificándose los productos en función del componente celular al que sustituyen.

#### 4.2.1. Sustitutos de los glóbulos rojos

La función que tratan de conseguir es la misma que la de estas células sanguíneas, el transporte eficiente de O<sub>2</sub> a los tejidos. Dentro de este gran

grupo, existen varios tipos de sistemas basados en compuestos distintos que pueden lograr esta función: sistemas basados en la hemoglobina (HBOC) y sistemas basados en emulsiones de perfluorocarburos (PFC). Pero antes de hablar de ellos, se mencionarán las características que un sustituto ideal de eritrocitos debería tener (7):

1. Ser un producto seguro para el uso humano
2. Ser universal para todos los grupos sanguíneos
3. No ser susceptible a la contaminación por microorganismos
4. Ser capaz de transportar oxígeno a través del cuerpo y liberarlo donde sea necesario
5. Ser estable tanto en circulación como en almacenamiento, proporcionando un efecto prolongado durante su aplicación y tiempos de almacenamiento largos

#### 4.2.1.1. HBOC

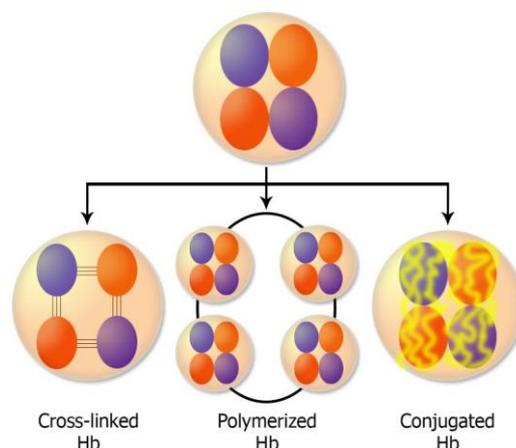
Son sistemas derivados de la hemoglobina humana o bovina (extraída mediante lisis celular y purificada por filtración y técnicas cromatográficas). También es posible utilizar hemoglobina recombinante, siendo el sistema de expresión de la bacteria *Escherichia coli* el más estudiado. Mediante este método de producción de hemoglobina es posible realizar mutaciones específicas de sitio para mejorar las funciones de esta. Sin embargo, debido al bajo rendimiento de expresión y al alto precio que este proceso supone, no es lo más habitual (8). El producto aplicado puede ser una suspensión libre de células, hemoglobinas modificadas químicamente o hemoglobinas encapsuladas.

#### Suspensiones libres de células

La hemoglobina es suspendida en una solución salina introducida intravenosamente, la cual no presenta antigenicidad; además no es obstaculizada en su paso a través de las membranas plasmáticas. Sin embargo, este producto cuenta con varias desventajas que pueden ocasionar graves daños en el organismo. Tiene un bajo tiempo de residencia en circulación debido a su rápida disociación. Las formas disociadas pueden unirse a las inmunoglobulinas del plasma por lo que sufrirán una rápida eliminación en el retículo endoplasmático de las células del bazo, riñón e hígado, produciendo toxicidad en estos órganos. También tienen una baja eficiencia ya que la ausencia de 2,3-difosfoglicerato (molécula que facilita la liberación de  $O_2$  a los tejidos) hace que sólo sean capaces de transportar un 5% de  $O_2$  a los tejidos a la presión parcial habitual a la que se ven sometidos los glóbulos rojos (4). Por otra parte, el pequeño tamaño de las moléculas de hemoglobina, provoca que estas difundan a la región subendotelial de los vasos sanguíneos secuestrando NO (molécula con función vasodilatadora), resultando en problemas cardiovasculares. Otro efecto secundario que estas suspensiones ocasionan es el aumento de la presión coloidosmótica, el cual produce que los fluidos penetren en el espacio vascular alternando su balance (9). Los experimentos realizados durante la primera mitad del siglo pasado con estas suspensiones fueron el punto de partida de numerosas investigaciones encaminadas a resolver los problemas presentados por este producto.

## Hemoglobina modificada químicamente

Con el propósito, antes mencionado, de solucionar los problemas ocasionados por las suspensiones libres de células, se realizaron varias modificaciones químicas de distinto tipo en la hemoglobina (Figura 3).



**Figura 3. Los tres tipos de modificaciones químicas más comunes aplicadas a la hemoglobina para mejorar su función como HBOC (6).**

Una práctica muy extendida fue el entrecruzamiento intramolecular de hemoglobina, con el fin de prevenir la disociación del tetrámero de esta molécula y consiguiendo a su vez reducir su afinidad por el  $O_2$ , aumentando su eficiencia en el reparto de este a los tejidos. Usando diaspirina como agente de entrecruzamiento, se entrecruzaron las subunidades  $\alpha$  de la hemoglobina humana mediante un proceso de acilación, creando un producto que Baxter Healthcare corporation bautizó como HemAssist. Durante los ensayos clínicos, este compuesto mostró un incremento en la circulación de hasta 12 horas y los ensayos clínicos avanzaron por las fases I y II sin mostrar ningún efecto adverso, salvo el aumento de la presión sanguínea. Durante los ensayos de fase III, se evidenció todavía más este problema. Estos ensayos también mostraron un incremento de la resistencia sistémica vascular en los pacientes que habían sido sometidos a dosis más altas (1,5 g de hemoglobina/kg), causando un aumento de la mortalidad del 72% comparado con las suspensiones libres de células. Debido a esto, los ensayos clínicos cesaron en 1998. Otro compuesto que se creó siguiendo la misma metodología fue Optro de la casa comercial Somatogen. Este producto era similar al anterior con las únicas diferencias del uso de glicina como agente de entrecruzamiento y del origen recombinante de la hemoglobina, la cual fue producida en *Escherichia coli*. Esta hemoglobina llevaba una mutación consistente en la sustitución del aminoácido Asn-108 de las dos cadenas  $\beta$  por el aminoácido Lys, lo que provoca que la presión parcial de  $O_2$  sea la suficiente como para conseguir la saturación de la hemoglobina en un 50% ( $P_{50}$ ), reduciéndose la excesiva afinidad de la hemoglobina por el  $O_2$  y permitiendo así un reparto más eficiente a los tejidos. Los ensayos clínicos en humanos avanzaron hasta la fase III donde se observaron riesgos de parada cardíaca y mortalidad altos (4, 8).

Usando reactivos bifuncionales de entrecruzamiento se crearon polímeros de hemoglobina con el propósito de reducir la presión colidosmótica y de aumentar su tamaño para prevenir su rápida excreción, incrementándose su vida media

en circulación. Empleando glutaraldehído como reactivo de entrecruzamiento la empresa Biopure corp. creó polímeros de varias tallas con hemoglobina purificada de origen bovino. Para eliminar la hemoglobina no polimerizada y los polímeros que no tenían el suficiente peso molecular fue necesario un procesamiento post-reacción. Este nuevo compuesto recibió el nombre de Hemopure (8). En los ensayos preclínicos y en los programas de investigación pertinentes a su evaluación como fármaco seguro, este compuesto demostró un transporte de oxígeno eficaz a los tejidos. Debido a que un producto similar fabricado por la misma empresa (HBOC-201) ha mostrado efectos secundarios en humanos, tales como aumentar la presión arterial y la disminución del ritmo cardiaco, Hemopure no cuenta con la aprobación clínica de la FDA (10). Sin embargo, este mismo compuesto sí que cuenta con la aprobación del gobierno de Sudáfrica para uso clínico como tratamiento contra la anemia aguda (11).

Otro polímero de hemoglobina usando glutaraldehído como agente de entrecruzamiento es PolyHeme sintetizado por la empresa Norfield Labs. La principal diferencia con respecto al anterior es que la hemoglobina utilizada para su fabricación es de origen humano (8). Los ensayos clínicos (Tabla 4) con este producto han avanzado hasta la fase III y han comprobado que reducen la necesidad de sangre alóctona en el tratamiento de traumas asociados con pérdidas de sangre pero también evidenció ciertos efectos secundarios. Cerca del 93% de los participantes en estos ensayos presentaron fiebre, anemia y/o desequilibrio electrolítico (12).

Patient Population	Control Dosage	HBOC Dosage	Physiologic Effects	Treatment Effects
Surgical/Trauma Patients <sup>23</sup>	Allogeneic PRBC transfusion (n=23), PRN	(n=21), Up to 6U <sup>a</sup>	None reported	Maintained total [Hb], but not RBC [Hb]
Trauma Patients <sup>35</sup>	Historical controls, declined transfusions	(n=171), Up to 20U	None reported	Maintained total [Hb], but not RBC [Hb]
Trauma Patients <sup>25</sup>	Standard hemorrhagic shock resuscitation fluids <sup>b</sup> (n=307), PRN	(n=279), Up to 6U	None reported	↑ cardiac adverse effects ↓ PRBC use

**Tabla 4. Ensayos clínicos realizados con PoliHeme (12).**

El glutaraldehído no es el único reactivo utilizado para la formación de estos compuestos. La empresa Hemosol ha desarrollado un polímero de hemoglobina con o-rafinosa como agente de entrecruzamiento, HemoLink. Aunque los ensayos con este fármaco llegaron a fase III, se cancelaron en 2003 por ser causante de efectos cardiacos adversos (4).

En general, la mayoría de los transportadores de O<sub>2</sub> artificiales constituidos por hemoglobina polimerizada reportaron en sus ensayos clínicos unos mayores riesgos de hipertensión transitoria, daño orgánico debido a la constricción vascular, disfunción o malestar gastrointestinal, nefrotoxicidad y aumento de la mortalidad en mayor o menor medida según el compuesto.

Otra forma de modificación química es la conjugación, que consiste en la unión de polímeros inertes a la superficie de la hemoglobina. El polietilenglicol (PEG) es el polímero más usado con este fin ya que presenta baja toxicidad y baja inmunogenicidad y antigenicidad. Esta común modificación en la industria farmacéutica está encaminada a aumentar el peso molecular de la hemoglobina de modo que al no disociarse tan rápidamente, se aumenta su vida media en circulación y se reduce la toxicidad en los órganos encargados

de eliminar los productos disociados (13). Existen varios productos a base de hemoglobina conjugada con PEG. El primero es Hemospan, fabricado por Sangart In. Este producto es elaborado mediante la conjugación de hemoglobina humana con maleimida-PEG. Los ensayos en animales y los de tipo I y II en humanos muestran una eficiente entrega de O<sub>2</sub> a la par que se aumenta la vida media del producto en circulación (6). Los resultados de un ensayo multicentro con el mismo producto en pacientes sometidos a cirugías ortopédicas severas, en el cual se probaron dos dosis (250ml y 500ml), parecen indicar que este producto es seguro para la administración en humanos pero se necesitan más estudios que confirmen esta afirmación (14).

Otro compuesto sintetizado por pegilación, pero en este caso con hemoglobina de origen bovino, es PEG-Hb del laboratorio Enzon inc (4). En los ensayos en ratas, los resultados indicaron que esta modificación aumenta la persistencia en sangre de este sustituto con respecto a las suspensiones libres de células y facilita la oxigenación de los tejidos (15). Los estudios realizados en cerdos con condiciones letales de anemia, indicaron que este producto ayuda a preservar la vida de estos animales (16). Los ensayos en humanos avanzaron hasta la fase IB pero cesaron hace más de 20 años debido a que causaba problemas cardiovasculares y renales (4).

Estos productos conjugados no resuelven del todo el problema del secuestro de NO, aunque sí que es cierto que lo limitan debido a que esta modificación aumenta el tamaño de las moléculas, reduciendo la posibilidad de que salgan de los vasos sanguíneos. Pero si el producto consiguiera abandonar el torrente sanguíneo, se podría producir el secuestro del NO ya que la pegilación no puede cambiar la afinidad de la hemoglobina por este compuesto. Las posibles soluciones a este problema que se están evaluando son: asociar varias moléculas de PEG para limitar la extravasación, modificar la molécula de hemoglobina para transformarla en un transportador de NO mediante la S-nitrosilación de sus residuos de cisteína y hacer más parecido el compuesto a la célula que intenta emular mediante su entrecruzamiento a enzimas presentes en los glóbulos rojos, como son la catalasa y la superóxido dismutasa (4, 17).

### **Hemoglobinas encapsuladas**

Muchos de los problemas causados por los anteriores productos evidenciaron la importancia de la estructura celular en el transporte de O<sub>2</sub>. De este modo muchos investigadores se han centrado en la forma de emular a los glóbulos rojos mediante la encapsulación de los HBOC de forma similar a como aparece la hemoglobina en estas células (Tabla 5).

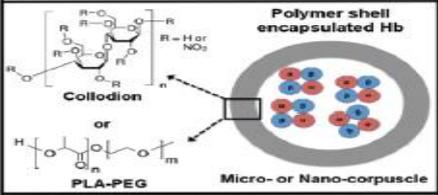
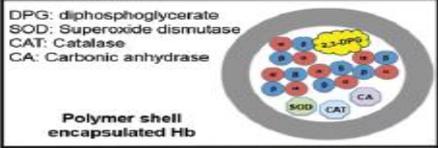
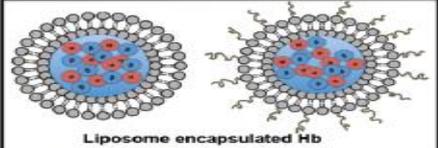
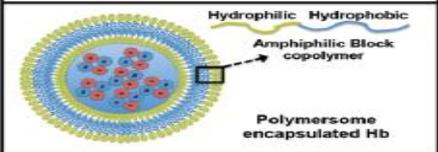
Encapsulated Hb based HBOCs	Materials used	Representative design names
 <p>Polymer shell encapsulated Hb</p> <p>Collodion or PLA-PEG</p> <p>Micro- or Nano-capsule</p>	<p>Hb encapsulated within Collodion (nitro-cellulose) membrane bound or PEG-PLA polymer membrane bound micro- or nanoparticles</p>	<p>Artificial Hb Corpuscle</p>
 <p>Polymer shell encapsulated Hb</p> <p>SOD CAT CA</p>	<p>Hb encapsulated along with various redox enzymes within Collodion or PEG-PLA based membrane bound micro- or nanoparticles</p>	<p>Artificial Hb Corpuscle</p>
 <p>Liposome encapsulated Hb</p>	<p>Hb encapsulated within sub-micron size lipid vesicles (liposomes) and PEG-ylated liposomes (i.e. 'Stealth' liposomes)</p>	<p>Liposome-encapsulated Hb (LEH), 'Neohemocyte', 'TRM-645 Neo Red Cells', Hb Vesicles (HbV) etc.</p>
 <p>Hydrophilic Hydrophobic</p> <p>Amphiphilic Block copolymer</p> <p>Polymersome encapsulated Hb</p>	<p>Hb encapsulated within sub-micron size polymeric vesicles (polymersomes) made from amphiphilic block copolymers like PEG-PBD, PEG-PLA, PEG-PCL etc.</p>	<p>Polymersome Encapsulated Hb (PEH)</p>

Tabla 5. Comparación entre los distintos HBOC basados en hemoglobinas encapsuladas (4).

Durante los primeros intentos, en los años 50, se usaron nitrato de celulosa, nylon, gelatina, goma arábica y otros compuestos, los cuales actuaban como membranas semipermeables. Los compuestos creados de esta forma presentaban dos principales problemas: la talla de la partícula para su correcto flujo por la sangre y la biocompatibilidad. Con el objetivo de solucionar estos problemas surgieron las hemoglobinas encapsuladas en liposomas (LEH), las cuales estaban constituidas por hemoglobinas envueltas en una membrana de fosfolípidos y colesterol que actúa de manera similar a la membrana celular. Una gran ventaja con la que cuentan es la incorporación, en el interior de esta membrana, de enzimas que aparecen en los eritrocitos con el propósito de crear el ambiente idóneo para el correcto funcionamiento de la hemoglobina en el intercambio de gases. Estos liposomas, al ser más pequeños que los glóbulos rojos, pueden llegar a los tejidos afectados por la isquemia (disminución del flujo sanguíneo arterial en una determinada zona) y realizar el intercambio de gases con ellos. Para intentar aumentar la vida en circulación de estas vesículas, ya que cuando son expuestos a un estrés hídrico se deforman o se destruyen, se llevó a cabo la modificación de su superficie con PEG (18, 19). El producto que ha tenido más relevancia en investigación siguiendo esta base es Neo Red Cell de Terumo corp. cuyos ensayos en animales han resultado exitosos, aumentando la vida a corto plazo en perros que sufrían anemia norvomolémica crónica. También se ha visto que en ratas ayuda a reducir el tamaño de los infartos cerebrales. Los ensayos *in vitro* en células de sangre humana muestran que este compuesto interacciona con los neutrófilos y por lo tanto su vida media en circulación, al contrario de lo esperado, sigue siendo reducida, además de producir radicales superóxido que pueden ser muy perjudiciales para la salud (20–22).

Las siguientes investigaciones fueron encaminadas a reducir la cantidad de lípidos de la membrana de la vesícula, siendo sustituidos por polímeros biodegradables. De esta manera se encapsuló polihemoglobina (varias moléculas de hemoglobina asociadas mediante entrecruzamiento) en nanovesículas de PEG-PLA con el fin de aumentar su vida media en circulación. Las investigaciones en ratas han mostrado que su tiempo de residencia medio es el doble que el presentado por la polihemoglobina entrecruzada con glutaraldehído y en humanos se espera que esta vida media sea aún mayor, ya que el retículo endoplasmático de las ratas es muy eficiente degradando estas vesículas. Al extrapolar los resultados obtenidos en ratas a humanos (Tabla 6) se estimó un tiempo de residencia medio de 41,5 horas. Sin embargo, esto tiene que ser evaluado con más ensayos clínicos. Al igual que en el caso de los liposomas, también pueden encapsularse diversas enzimas para incrementar su eficacia en el intercambio de gases. Al estudiar los efectos histológicos de este producto a largo plazo en ratas, no se encontraron efectos perjudiciales en los órganos analizados (riñones, bazo e hígado) (23).

Preparation	Max Hb (g/dl)	Time to 1.67 g/dl (h)	
		Rats	Human
PolyHb-10	3.10	10.4	17
PolyHb-17	3.35	14.0	24
Nanocap-10-1-5K	3.05	12.3	21
Nanocap-17-1-5K	3.58	17.1	29
Nanocap-17-1.5-5K	3.60	20.0	34
Nanocap-17-1-5K-XL	3.60	20.3	35
Nanocap-17-1-15K	3.57	21.2	36
Nanocap-17-1.5-15K	3.65	23.3	39.9
Nanocap-17-1.5-15K-XL	3.66	24.2	41.5

**Tabla 6. Extrapolación del tiempo de circulación de la polihemoglobina y las nanocápsulas de PEG-PLA en humanos a través de los valores obtenidos en ratas (23).**

También se ha creado vesículas formadas por copolímeros dibloque anfifílicos mediante la pegilación del 100% de la vesícula, lo que resulta en membranas más gruesas que los liposomas convencionales. Esta membrana más gruesa aporta a la vesícula una mayor estabilidad y fuerza mecánica. Englobando a la hemoglobina con estas vesículas surgen las hemoglobinas encapsuladas en polimersomas (PEH). El propósito de la creación de estas nuevas vesículas era aumentar la estabilidad de la hemoglobina encapsulada tanto en circulación como en almacenamiento. Se ha demostrado *in vivo* que la gruesa capa de PEG con la que cuentan previene de la fagocitosis por las células del sistema inmune, perdurando más tiempo en el torrente sanguíneo. Los bioensayos en ratas, examinadas tras 8 semanas de exposición a este fármaco experimental, no mostraron efectos negativos. Sin embargo, su gruesa membrana puede ser un factor limitante en el transporte de O<sub>2</sub>, lo que supone una gran desventaja con respecto a los liposomas convencionales. Para su uso en la especie humana, son necesarios ensayos *in vivo* que ayuden a evaluar la seguridad de este producto (24).

La forma bicóncava de los eritrocitos es fundamental en su función. Así pues, aplicando un enfoque racional, se buscó la manera de que las cápsulas tuviesen una forma similar a la de estas células. Una de las investigaciones más prometedoras que se han llevado a cabo con la finalidad de obtener más eficiencia en el intercambio gaseoso a la par que incrementar la vida media en

circulación a través de la consecución de una forma prácticamente bicóncava, fue la encapsulación en liposomas de actina-hemoglobina (LEAcHb). Esta modificación de los LEH consistió en la polimerización de actina monomérica en actina filamentosa dentro del núcleo acuoso del liposoma, consiguiendo así una forma similar a la de los eritrocitos. Los ensayos preclínicos con ratas han demostrado que esta modificación aumenta la vida media de los LEH hasta 8-10 horas con un intercambio eficiente de  $O_2$  (25).

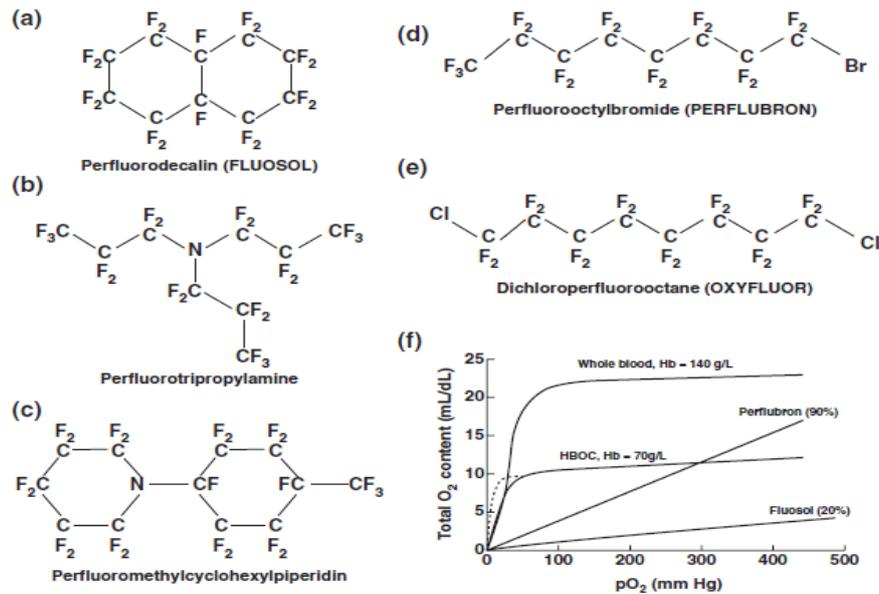
### Otro tipo de HBOC

Un enfoque distinto a la tendencia que están siguiendo los estudios de sustitutos de eritrocitos, es el basado en la singular hemoglobina (AmHb) del poliqueto *Arenicola marina*. Su hemoglobina de forma natural está envuelta por una membrana extracelular no glicosilada y tiene 10 subunidades a diferencia de la humana que tiene 4. Esta molécula puede ser interesante ya que es compatible con todos los grupos sanguíneos y al ser un organismo muy abundante puede llegar a solucionar los problemas de escasez de donaciones. Además, es fácilmente almacenable preservándose hasta 30 días a 4°C. La hemoglobina de este poliqueto tiene dos características diferenciales con respecto a los demás tipos de HBOC. La primera es su capacidad de disociarse en dodecámeros de alto peso molecular en contacto con el plasma sanguíneo de humanos o ratones. Estos compuestos resultantes no causan fenómenos de extravasación debido a su gran tamaño, lo que supone una gran ventaja. La segunda es su mayor capacidad intrínseca SOD (superóxido dismutasa) con respecto a la que poseen los eritrocitos humanos. Esta propiedad mitiga los efectos tóxicos que causan las especies reactivas de oxígeno en los organismos cuando la hemoglobina se oxida. En cuanto a su afinidad por el  $O_2$ , cabe destacar que es menor que la que presentan los eritrocitos humanos y bastante menor con respecto a la de las suspensiones libres de células. Pero esto no tiene por qué ser una desventaja, ya que muchos de los sustitutos anteriormente descritos podían provocar una saturación de  $O_2$  en los tejidos debido a su excesiva afinidad. La cantidad de oxígeno transportada por la AmHB es suficiente para mantener a los tejidos eficientemente oxigenados. Su vida media en circulación es aproximadamente de 50 horas, siendo mayor que los tiempos de residencia de las hemoglobinas humanas, bovinas y recombinantes (26). La empresa que más esfuerzos ha dedicado al estudio de estos sustitutos es Hemarina, la cual ha propuesto compuestos basados en la hemoglobina de *Arenicola marina* para múltiples usos médicos. Algunos de sus productos se encuentran actualmente en evaluación clínica (27).

#### 4.2.1.2. Sistemas basados en emulsiones de perfluorocarburos

A diferencia de los HBOC (semisintéticos), los perfluorocarburos (PFC) son compuestos líquidos o gaseosos totalmente artificiales. La propiedad más relevante que los hace aptos para la creación de compuestos que imiten la función de los eritrocitos es su gran estabilidad, proporcionada por sus enlaces intramoleculares C-F (los enlaces simples más fuertes encontrados en la química orgánica) y por la formación de enlaces débiles con otras moléculas. Esto último provoca que estos compuestos se asocien al oxígeno mediante interacciones de van der Waals, siendo capaces de transportarlo y repartirlo a

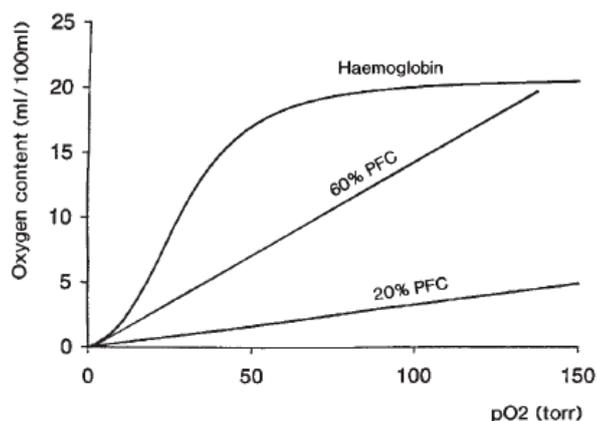
los tejidos. Su capacidad de descarga de O<sub>2</sub> es mayor que la presentada por los HBOC. Debido a su insolubilidad en agua es necesaria su administración en forma de emulsiones ya que si se inyecta directamente en los tejidos podría producir embolias pulmonares, fallos del ventrículo derecho del corazón y asfixia (28, 29).



**Figura 4. Estructura molecular de algunos sistemas transportadores de oxígeno basados en emulsiones de PFC (4).**

Así pues, varios productos derivados de emulsiones de PFC han sido investigados como posibles alternativas a la transfusión del paquete globular, habiendo dos generaciones de estos compuestos (Figura 4). Uno de los compuestos más estudiados de la primera generación de estas emulsiones fue Fluosol-DA, de Green cross corp. Este compuesto es una emulsión de perfluorodecalina y perfluorotripropilamina con fosfolípidos de yema de huevo y oleato potásico. Se trata del primer compuesto de este grupo de sustitutos de eritrocitos en ser intensamente evaluado en modelos animales donde mostró una mejoría hemodinámica en organismos que sufrieron una reanimación por choque hemorrágico. En cuanto a los ensayos clínicos en humanos, la fase I fue superada sin efectos adversos de gran importancia. Posteriormente se llevó a cabo un ensayo clínico de fase II/III en el que se examinaron 185 pacientes. Del total de las personas sometidas a estas pruebas, tres mostraron efectos secundarios graves y una perdió la vida. En este último caso, se produjo una violación del protocolo inyectándose al paciente 4000 ml de Fluosol (una dosis no establecida en el procedimiento). Otros efectos secundarios leves fueron el aumento de leucocitos, el descenso del número de plaquetas y la prolongación del sangrado. Pese a estos ensayos fuera de lo común, este compuesto fue aprobado por la FDA en el año 1989. Sin embargo, un estudio realizado en

1994 en el que se obtuvieron evidencias suficientes para decir que su uso como transportador de  $O_2$  no era efectivo, los efectos secundarios mostrados anteriormente y las dificultades para mantener su estabilidad durante su almacenamiento en congelación, llevaron a su retirada del mercado ese mismo año (30, 31).



**Figura 5. Comparación de las curvas de afinidad por el oxígeno de la hemoglobina y los PFCs de la primera y segunda generación a medida que aumenta la presión parcial de oxígeno (32).**

La segunda generación de emulsiones de PFC surgió para solucionar los problemas que presentaban los compuestos de la anterior generación. Con este fin se usaron otros tipos de perfluorocarburos, se aumentó la concentración de los mismos, se usaron otros emulsionantes y se cambiaron las condiciones de almacenamiento prescindiendo de la congelación (32, 33). Así se obtuvieron compuestos con mayor afinidad por el  $O_2$  aunque esta sigue siendo menor que la de la hemoglobina (Figura 5). Siguiendo estas nuevas pautas, la empresa AF0144, Alliance Pharmaceutical Corporation investigó un nuevo compuesto, Oxygent, capaz de transportar el oxígeno. Este consistía en una emulsión de perfluorocil bromida, perfluorodecil bromida y perfluorodichlorooctano en fosfolípidos de yema de huevo, que actuaban de moléculas surfactantes (30). Los ensayos preclínicos en animales mostraron las potenciales ventajas de este producto. En perros anestesiados que respiraban  $O_2$  al 100% a los que se le retiró la sangre total siendo sustituida por este producto, en un procedimiento conocido como hemodilución normovolémica aguda, aumentó su ritmo cardíaco y consiguió revertir parcialmente el descenso de la resistencia vascular sistémica (34). También ha habido numerosos estudios en otros animales, en los que se ha comprobado su efectividad ante diversos problemas relacionados con el reparto de oxígeno a los tejidos, cuyos resultados prometedores llevaron a emprender ensayos clínicos en humanos. Estos ensayos avanzaron hasta la fase III donde proporcionaron buenos resultados para su uso en cirugía sin apenas efectos secundarios (activación macrofágica, síntomas de gripe, dolor de la zona baja de la espalda y dolor de cabeza). Sin embargo, los ensayos en esta fase fueron suspendidos voluntariamente por parte del fabricante en 2001, debido a aparentes efectos adversos neuronales pero hoy en día se sabe que estos efectos eran debidos al protocolo del estudio (30).

Otro compuesto parecido al anterior fue Oxyfluor de HemaGen, una emulsión de perfluorodichlorooctano que usa como moléculas surfactantes fosfolípidos de la yema de huevo y triglicéridos. Este perfluorocarburo de la segunda generación tuvo efectos secundarios similares a Oxygent, siendo sus ensayos clínicos suspendidos en fase III (30).

Uno de los últimos sustitutos de los eritrocitos, recientemente investigado, es Oxycyte de Oxygen Biotherapeutics inc. Está compuesto por una emulsión del 60% de perfluoro-terc-butilciclohexano con fosfolípidos de yema de huevo. Los ensayos preclínicos en animales fueron superados exitosamente sin reportar efectos secundarios y actualmente están siendo realizados ensayos clínicos de fase II para encontrar la dosis adecuada en pacientes con lesiones cerebrales (30).

#### 4.2.1.3. Otra alternativa médica a la sangre natural

##### **Obtención de eritrocitos mediante una línea inmortalizada de eritroblastos**

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el uso de células madre para la obtención de eritrocitos *in vitro*. Sin embargo, estos métodos están limitados debido a que las fuentes de células progenitoras (células madre de cordón umbilical, pluripotentes o células sanguíneas periféricas desdiferenciadas) poseen una baja eficiencia de diferenciación en eritrocitos. Esto es debido a la complejidad del proceso, teniendo las células que consiguen diferenciarse serios problemas para la pérdida del núcleo. Además los costes de estos procedimientos son muy elevados y, por lo tanto, no son económicamente viables por el momento. Debido a estas dificultades se han explorado otras alternativas como la obtención de una línea celular inmortalizada adulta de progenitores de eritrocitos. Esto se ha conseguido mediante la transformación de células adultas de la médula CD34<sup>+</sup> (glucoproteína que actúa como molécula de adhesión, cuya expresión es selectiva de las células madre precursoras de la hematopoyesis) con el vector vírico HPV 16 que portaba los genes E6 y E7, oncogenes víricos. La expresión de estos genes está controlada por un promotor inducible dependiente de doxiciclina. De manera que cuando está presente en el medio de cultivo, la proliferación de estas células será continua, obteniéndose así la línea celular inmortalizada. Si estas células son cultivadas en un medio sin doxiciclina se producirá su maduración en eritroblastos y reticulocitos (eritrocitos inmaduros que terminan su diferenciación en el torrente sanguíneo). La línea celular BEL-A (Bristol Erithroid Line Adult), obtenida del modo anteriormente descrito, fue la primera en realizar la hematopoyesis *in vitro* y en perder el núcleo normalmente. Las células sanguíneas obtenidas tampoco mostraron diferencias moleculares ni funcionales con respecto a los reticulocitos *in vivo* y presentaban supervivencias similares a estos. Esta técnica es reproducible y ha demostrado que el uso de oncoproteínas víricas no supone un riesgo, ya que su expresión se pierde tras el proceso de diferenciación. Pese al progreso que todo esto supone, en el producto final se pudieron observar algunas células aún nucleadas y se necesitan más estudios para solventar los potenciales problemas que estas células puedan tener en su uso clínico. Esta prometedora alternativa puede ser muy valiosa en un futuro próximo y se espera que su primer uso sea en la obtención de eritrocitos que presenten antígenos de

superficie pertenecientes a grupos sanguíneos raros, ya que el fenotipo de estas líneas celulares es seleccionable (35).

#### 4.2.2. Sustitutos de plaquetas

Otro tipo de células sanguíneas que son esenciales en las transfusiones, son las plaquetas debido a que son el segundo tipo celular más utilizado en estas. Su uso ha crecido mucho en sus últimos años y su aplicación constituye un tratamiento efectivo frente a las hemorragias severas. Los principales problemas que tiene el uso de plaquetas obtenidas por tromboaféresis son su corto periodo de almacenamiento y los potenciales riesgos inmunológicos e infecciosos que su transfusión puede suponer. Para solucionar estos problemas se están explorando nuevas alternativas más seguras y que presenten mayores tiempos de almacenamiento. Muchas de las investigaciones en esta área han sido financiadas y promovidas por el ministerio de defensa de los Estados Unidos debido al interés que estos compuestos suscitan para la cicatrización de heridas de guerra. Además, el interés por estos potenciales productos sanitarios es muy reciente por lo que no hay mucha información disponible sobre ellos. Debido a esto, no existen unas características establecidas de cómo debe ser un sustituto ideal de estas células pero haciendo uso de las características, antes mencionadas, que un sustituto ideal de eritrocitos debe tener, junto con las características propias de las plaquetas podemos deducir las propiedades que debería tener:

1. Ser seguro y compatible con el ser humano
2. Ser transportado por la sangre
3. Localizar las zonas de hemorragia y favorecer su adhesión y agregación en estas.
4. Ser estable durante un largo periodo de almacenamiento y ser fácil de transportar para que sea económicamente viable.

Una de las primeras alternativas, surgida mediante la aplicación de un enfoque racional, fue el reciclado de plaquetas cuyo tiempo de almacenamiento máximo había expirado. Estas plaquetas suelen conservar aún complejos proteicos en su membrana, involucrados en los procesos hemostáticos. Utilizando técnicas de aislamiento, purificado y liofilización se consiguió aislar las membranas de estas plaquetas. Una vez conseguido esto, se formaron vesículas de 0,5  $\mu\text{m}$  con estas proteínas por sonicación (36). Estas preparaciones fueron realizadas por la compañía Cypress Bioscience y recibieron el nombre de IPM (Infusible Platelet Membrane). Actualmente no cuentan con la aprobación de la FDA debido a que es difícil demostrar su eficacia en el tratamiento de hemorragias, no obstante, los ensayos preclínicos en animales no mostraron grandes complicaciones y los ensayos clínicos en humanos llegaron hasta la fase III sin efectos negativos y en muchos casos mostraron un aumento en los recuentos de plaquetas (37). Después de los primeros intentos por conseguir un producto sustitutivo de las plaquetas, las investigaciones han tomado varios rumbos, creándose varios productos que intentan recrear su función, siendo los más relevantes los que a continuación se comentan.

## **Trombosomas**

Son plaquetas liofilizadas en una matriz de trehalosa. Las plaquetas utilizadas en la elaboración de este producto proceden de la aféresis de un grupo sanguíneo O. Su principal ventaja con respecto a las IPM, es que las plaquetas están en condiciones de ser usadas por lo que mantienen las propiedades necesarias para regular la hemostasis (se adhieren a la matriz del vaso dañado, formándose agregados de plaquetas y generando trombina para dar lugar a un coágulo estable). Además, debido a que se trata de un producto liofilizado, su estabilidad durante su almacenamiento a temperatura ambiente es mayor y es necesario resuspenderlo en agua destilada para su correcto uso. Los ensayos preclínicos en animales, los cuales habían sufrido una lesión en el hígado, no tuvieron ningún efecto adverso observable y se apreció una mejoría en la cicatrización de estas lesiones. Por lo tanto su potencialidad clínica es innegable y es necesario que se realicen ensayos para evaluar su seguridad en humanos (36, 38).

## **Plaquetosomas**

El enfoque utilizado en su desarrollo es parecido al empleado en las hemoglobinas encapsuladas en liposomas (LEH). En este caso, se asocian las proteínas de membrana de las plaquetas a la superficie de un liposoma. Se utilizaron para el estudio de estas proteínas y de su papel en la agregación. Posteriormente fue evaluado como un potencial sustituto plaquetario pero los estudios *in vitro* no mostraron ningún efecto significativo en la agregación. Sin embargo, los estudios preclínicos en ratas con heridas en la cola que no producían las plaquetas suficientes para la correcta cicatrización (trombocitopenia), mostraron que al administrarse plaquetosomas la hemorragia disminuía (39).

## **Trombosphere**

En los años 80, se observó que mediante la conjugación de fibrinógeno y acrilonitrilo, se estimulaba la agregación de plaquetas activadas con ADP. Basándose en este hallazgo se crearon varios productos siendo el más relevante Trombosphere (36).

La empresa Hemosphere desarrolló un producto consistente en albúmina humana entrecruzada y fibrinógeno humano unido a su superficie. Su característica más relevante en cuanto a la fabricación de este compuesto es que su elaboración se lleva a cabo sin el uso de plaquetas. El mecanismo de acción por el cual estimulan la agregación de las plaquetas no está claro aún. Actualmente se están realizando ensayos clínicos con este producto en Europa (38).

## **Syntoplate**

Un rumbo distinto que tomaron ciertas investigaciones es el basado en enmascarar el mecanismo hemostático de las plaquetas mediante la unión de péptidos sintéticos de fibrinógeno a la superficie de nanopartículas o nanovesículas con el fin de activar a las plaquetas. Esto se consigue mediante la interacción de la integrina GPIIb/IIIa de la superficie de las plaquetas y los

péptidos sintéticos de la superficie de las nanopartículas. Fruto de este nuevo enfoque surgió un nuevo producto llamado Synthoplate. Para la elaboración de este producto se utilizaron tres péptidos sintéticos unidos a la superficie de una nanopartícula: péptidos de unión vWF y péptidos de unión al colágeno, para su adhesión al vaso sanguíneo dañado y péptidos sintéticos de fibrinógeno de unión a la integrina GPIIb/IIIa, para enmascarar el mecanismo de agregación de las plaquetas (36).

De momento, debido a su reciente desarrollo, solo ha sido evaluado en ensayos preclínicos en ratones con hemorragias severas en la cola a los que se le había inducido la condición de trombocitopenia. Los resultados de estos ensayos mostraron que Synthoplate no tiene un efecto activador de las plaquetas inactivas del flujo sanguíneo del ratón; sin embargo, sí que favorece la agregación de las plaquetas activas en el proceso de coagulación. Estos resultados son muy prematuros y se esperan más ensayos e investigaciones con este producto en un futuro próximo (40).

## 5. Conclusión

Es un hecho que la terapia transfusional y el uso de hemoderivados salva vidas, por lo que es un problema primordial para la medicina moderna tener un abastecimiento constante y seguro, tanto de sangre como de los diferentes productos que se obtienen a partir de esta. Es debido a esto que el desarrollo de sustitutos de la sangre, sobre todo sustitutos de los eritrocitos, es un campo de investigación de gran interés, tanto comercial como médico. Pero la realidad es la siguiente, a pesar de que se han hecho grandes avances en la producción de compuestos que emulen la función de la sangre, ninguno cuenta con la aprobación de la FDA de Estados Unidos, siendo muchos de ellos cancelados tras ensayos clínicos con importantes efectos secundarios. Aunque actualmente la consecución de sustitutos ideales de los diferentes componentes de la sangre pueda parecer una utopía, es posible que en un futuro sean productos de uso general en cualquier centro médico por lo que no cabe la menor duda que tanto las investigaciones como los ensayos clínicos se seguirán realizando intensamente.

## 5. Conclusión

É un feito que a terapia transfusional e o uso de hemoderivados salva vidas, polo que é un problema primordial para a medicina moderna ter un abastecemento constante e seguro tanto de sangue coma dos diferentes produtos que se obteñen a partir deste. É debido a isto que o desenvolvemento de substitutivos do sangue, sobre todo substitutos dos eritrocitos, é un campo de investigación de grande interese tanto comercial como médico. Pero a realidade é a seguinte, a pesar de que se fixeron grandes avances na produción de compostos que emulen a función do sangue, ningún conta coa aprobación da FDA de Estados Unidos, sendo moitos deles cancelados tras ensaios clínicos con importantes efectos secundarios. Aínda que actualmente a consecución de substitutos ideais dos diferentes compoñentes do sangue poida parecer unha utopía, é posible que nun futuro sexan produtos de uso xeral en calquera centro médico polo que non cabe a menor dúbida que tanto as investigacións como os ensaios clínicos seguiranse realizando intensamente.

## 5. Conclusion

It is a fact that transfusion therapy and the use of blood products saves lives, so it is a major problem for modern medicine to have a constant and safe supply of both blood and the different products obtained from it. For this reason, the development of blood substitutes, especially erythrocyte substitutes, is a field of research of great commercial and medical interest. But the reality is as follows, although great strides have been made in the production of compounds that emulate blood function, none have been approved by the FDA, many of which have been cancelled after clinical trials with significant side effects. Although the achievement of ideal substitutes for the different blood components may seem utopian at present, it is possible that in the future may be a product of general use in any medical centre, so there is no doubt that both research and clinical trials will continue to be carried out intensively.

## 6. Bibliografía

1. Gartner LP, Hiatt JL. Texto atlas de histología. 3ª ed. México D.F.: McGraw Hill Interamericana; 2008.
2. Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz Delgado GJ. Fundamentos de hematología. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2014.
3. Unidad de hemoterapia. Actividad centros y servicios de transfusión: Informe 2015. Subdirección General de Promoción de la Salud y Epidemiología; Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación. 2017. Disponible en: <https://www.msssi.gob.es>.
4. Sen Gupta A. Bio-inspired nanomedicine strategies for artificial blood components. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2017;9(6):e1464. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/wnan.1464>.
5. Giangrande PL. The history of blood transfusion. *Br J Haematol*. 2000;110(4):758-67. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02139.x>.
6. Moradi S, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. Artificial blood substitutes: first steps on the long route to clinical utility. *Clin Med Insights Blood Disord*. 2016;9:33-41. Disponible en: <https://doi.org/10.4137/CMBD.S38461>.
7. Sarkar S. Artificial blood. *Indian J Crit Care Med*. 2008;12(3):140-4. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/0972-5229.43685>.
8. Riess JG. Oxygen carriers ("blood substitutes") – Raison d'etre, chemistry, and some physiology *Blut ist ein ganz besonderer Saft*. *Chem Rev*. 2001;101(9):2797-920. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/cr970143c>.
9. Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(4):697-705. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000204350.44226.9a>.

10. Winslow RM. New transfusion strategies: red cell substitutes. *Annu Rev Med.* 1999;50(1):337-53. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.337>.
11. Lok C. Blood product from cattle wins approval for use in humans. *Nature.* 2001;410(6831):855. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/35073775>.
12. Chen JY, Scerbo M, Kramer G. A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(8):803-13. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1807-59322009000800016>.
13. Taguchi K, Yamasaki K, Maruyama T, Otagiri M. Comparison of the pharmacokinetic properties of hemoglobin-based oxygen carriers. *J Funct Biomater.* 2017;8(1):11. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/jfb8010011>.
14. Olofsson C, Ahl T, Johansson T, Larsson S, Nellgård P, Ponzer S, et al. A multicenter clinical study of the safety and activity of maleimide-polyethylene glycol-modified Hemoglobin (Hemospan) in patients undergoing major orthopedic surgery. *Anesthesiology.* 2006;105(6):1153-63. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122578>.
15. Conover CD, Linberg R, Shum KL, Shorr RGL. The ability of polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin (PEG-Hb) to adequately deliver oxygen in both exchange transfusion and top-loaded rat models. *Artif Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* 1999;27(2):93-107. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10731199909117685>.
16. Conover CD, Malatesta P, Lejeune L, Chang CL, Shorr RG. The effects of hemodilution with polyethylene glycol bovine hemoglobin (PEG-Hb) in a conscious porcine model. *J Investig Med.* 1996;44(5):238-46. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8763974>.
17. Kluger R. Red cell substitutes from hemoglobin — Do we start all over again? *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14(4):538-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.021>.
18. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artif Organs.* 2009;33(2):139-45. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00698.x>.
19. Sharma A, Arora S, Grewal P, Dhillon V, Kumar V. Recent innovations in delivery of artificial blood substitute: a review. *Int J App Pharm.* 2011;3(2):1-5. Disponible en: <http://www.ijaponline.org/Vol3Issue2/157.pdf>.
20. Pape A, Kertscho H, Meier J, Horn O, Laout M, Steche M, et al. Improved short-term survival with polyethylene glycol modified hemoglobin liposomes in critical normovolemic anemia. *Intensive Care Med.* 2008;34(8):1534-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00134-008-1082-z>.

21. Abe H, Ikebuchi K, Niwa K, Inanami O, Kuwabara M, Fujihara M, et al. Superoxide generation from human polymorphonuclear leukocytes by liposome-encapsulated hemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2001;29(4):275-83. Disponible en: <https://doi.org/10.1081/BIO-100104230>.
22. Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, Ogata Y, Yamano M, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in the rat: evaluation with photochemically induced thrombosis of the middle cerebral artery. *Stroke.* 2007;38(5):1626-32. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.467290>.
23. Chang TMS. Blood replacement with nanobiotechnologically engineered hemoglobin and hemoglobin nanocapsules. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010;2(4):418-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/wnan.95>.
24. Arifin DR, Palmer AF. Polymersome encapsulated hemoglobin: a novel type of oxygen carrier. *Biomacromolecules.* 2005;6(4):2172-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/bm0501454>.
25. Li S, Nickels J, Palmer AF. Liposome-encapsulated actin-hemoglobin (LEAChb) artificial blood substitutes. *Biomaterials.* 2005;26(17):3759-69. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.015>.
26. Rousselot M, Delpy E, La Rochelle CD, Lagente V, Pirow R, Rees JF, et al. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J.* 2006;1(3):333-45. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/biot.200500049>.
27. Hemarina - Welcome on Hemarina website [Internet]. [cited 2018 Jun 12]. Disponible en: [http://www.hemarina.com/index.php?rub=welcome\\_on\\_hemarina\\_website](http://www.hemarina.com/index.php?rub=welcome_on_hemarina_website).
28. Krafft MP, Riess JG. Perfluorocarbons: life sciences and biomedical uses. *J Polym Sci Part A Polym Chem.* 2007;45(7):1185-98. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/pola.21937>.
29. Keyhanian S, Ebrahimifard M, Zandi M. Investigation on artificial blood or substitute blood replace the natural blood. *Iran J Ped Hematol Oncol.* 2014;4(2):72-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002929>.
30. Castro CI, Briceno JC. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials. *Artif Organs.* 2010;34(8):622-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00944.x>.
31. Lane TA. Perfluorochemical-based artificial oxygen carrying red cell substitutes. *Transfus Sci.* 1995;16(1):19-31. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0955-3886\(94\)00067-T](https://doi.org/10.1016/0955-3886(94)00067-T).
32. Lowe KC. Perfluorinated blood substitutes and artificial oxygen carriers.

- Blood Rev. 1999;13(3):171-84. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1054/blre.1999.0113>.
33. Kuznetsova IN. Perfluorocarbon emulsions: stability *in vitro* and *in vivo* (a review). Pharm Chem J. 2003;37(8):415-20. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1023/A:1027355913348>.
  34. Habler O, Kleen MS, Hutter JW, Podtschaske AH, Tiede M, Kemming GI, et al. Effects of hyperoxic ventilation on hemodilution-induced changes in anesthetized dogs. Transfusion. 1998;38(2):135-44. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1998.38298193095.x>.
  35. Trakarnsanga K, Griffiths RE, Wilson MC, Blair A, Satchwell TJ, Meinders M, et al. An immortalized adult human erythroid line facilitates sustainable and scalable generation of functional red cells. Nat Commun. 2017;8:14750. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ncomms14750>.
  36. Etchill EW, Myers SP, Raval JS, Hassoune A, SenGupta A, Neal MD. Platelet transfusion in critical care and surgery: evidence-based review of contemporary practice and future directions. Shock. 2017;47(5):537-49. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000794>.
  37. Nasiri S. Infusible platelet membrane as a platelet substitute for transfusion: an overview. Blood Transfus. 2013;11(3):337-42. Disponible en: <https://doi.org/10.2450/2013.0209-12>.
  38. Fitzpatrick GM, Cliff R, Tandon N. Thrombosomes: a platelet-derived hemostatic agent for control of noncompressible hemorrhage. Transfusion. 2013;53(S1):100S-106S. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1111/trf.12043>.
  39. Blajchman MA. Novel platelet products, substitutes and alternatives. Transfus Clin Biol. 2001;8(3):267-71. Disponible en:  
[https://doi.org/10.1016/S1246-7820\(01\)00127-6](https://doi.org/10.1016/S1246-7820(01)00127-6).
  40. Shukla M, Sekhon UDS, Betapudi V, Li W, Hickman DA, Pawlowski CL, et al. *In vitro* characterization of SynthoPlate (synthetic platelet) technology and its *in vivo* evaluation in severely thrombocytopenic mice. J Thromb Haemost. 2017;15(2):375-87. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1111/jth.13579>.