

Revisão / Review

Importância dos carreadores de oxigênio livre de células

Oxygen carriers free of cells in transfusion medicine

Marcia Cristina Z. Novaretti

Os procedimentos necessários para redução de efeitos adversos associados à transfusão de sangue, em especial aqueles decorrentes da transmissão de agentes infecciosos e da aloimunização leucócito-mediada têm impacto nos custos de produção de hemocomponentes. Paralelamente, as necessidades transfusionais têm aumentado globalmente, ficando evidente a necessidade de um substituto seguro e amplamente disponível para o sangue, chamado de sangue artificial ou de substituto do sangue. Visto que o seu desenvolvimento tem se concentrado na função de carrear oxigênio aos tecidos, daí utilizarmos, nesse texto, a denominação “Carreadores de oxigênio livre de células”. Atualmente, dois tipos de carreadores de oxigênio livre de células têm sido testados: as soluções de hemoglobina modificadas (de origem humana ou bovina) e os perfluorocarbonos (PFCs). Entretanto, esses produtos não são isentos de efeitos adversos e um grande número de pesquisas clínicas está em andamento para testar sua eficácia e segurança. O maior conhecimento desses carreadores de oxigênio livre de células e seus mecanismos de ação permitiu que aplicações outras, até mesmo não clínicas, estivessem em teste com as novas gerações desses produtos, expandindo assim as fronteiras da medicina transfusional. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(4):394-405.

Palavras-chave: Sangue artificial; transfusão; perfluorocarbonos; hemoglobina; substitutos do sangue.

Introdução

No mundo todo, a necessidade de transfusões sanguíneas vem crescendo progressivamente. No Brasil, enquanto a demanda de sangue cresce à taxa de 1% ao ano, as expectativas de crescimento das doações de sangue variam de 0,5 a 0,7%/ano.¹ Conseqüentemente, a estimativa para o ano de 2030 é de um déficit de aproximadamente um milhão de unidades de sangue coletado, levando-se em conta o crescimento populacional projetado e as necessidades crescentes de transfusão, em especial para os que necessitam cronicamente, para cirurgias de grande complexidade e no atendimento às emergências.² Deve-se ressaltar que essa projeção não inclui situações de calamidade pública e desastres naturais.

Se estimarmos as necessidades internacionais de transfusão de sangue e componentes, tendo por base a estimativa de 0,05 unidades *per capita* por ano, pode ser projetada uma demanda de assustadoras 300 milhões de unidades de sangue por ano.³ Quando são computados os números disponíveis de transfusões de sangue em termos mundiais, temos cerca de 90 milhões de unidades transfundidas por ano. Caso esse número seja verdadeiro, há falta de 200 milhões de bolsas de sangue/ano.⁴ Obviamente essas estimativas estão sujeitas a críticas, mas é evidente que não há suprimento total de sangue, particularmente de alguns tipos (como os Rh-negativo) em situações emergenciais, e a sazonalidade é importante fator que compromete o fornecimento de sangue.⁵

Deve-se ressaltar que, apesar de os progressos para o aumento da segurança transfusional e da diminuição vertigi-

Professora colaboradora da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina da USP. Chefe da Divisão de Imuno-hematologia da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

Trabalho realizado na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

Correspondência: Marcia Cristina Zago Novaretti
Av. Dr. Enéias Carvalho de Aguiar, 155 - 1º Andar
05403-000 – São Paulo-SP – Brasil
E-mail: mnovaretti@prosangue.sp.gov.br

nosa da transmissão de agentes conhecidos – HCV, HIV e HBV – pelo sangue na última década, ainda há um risco residual que persiste.⁶ Além do mais, outros eventos adversos estão associados à transfusão de sangue, tais como as reações transfusionais agudas e tardias, e o risco de contaminação bacteriana de hemocomponentes, notadamente de concentrados de plaquetas.⁷

Pelas razões acima fica evidente a necessidade de um substituto seguro e amplamente disponível para o sangue, chamado de sangue artificial ou, mais comumente, de "substituto do sangue".⁸ Esses termos não são os mais adequados, visto que o seu desenvolvimento tem se concentrado na função de carrear oxigênio aos tecidos, daí utilizarmos nesse texto, a denominação "Carreadores de oxigênio livre de células - CAOLC".⁹ Essencialmente, os CAOLC são fluidos que, quando injetados na circulação sanguínea, contribuem significativamente para o transporte e liberação de oxigênio aos tecidos e podem ser classificados didaticamente em dois grandes grupos (Tabela 1), os biossintéticos e os abióticos.¹⁰ O desenvolvimento desses produtos tem tido progresso considerável ultimamente.^{11,12}

Tabela 1. Principais tipos de carreadores de oxigênio livre de células¹³

Biossintético	Imita a natureza usando produtos baseados em hemoglobina para a liberação de oxigênio aos tecidos ¹⁴	Produção de fluidos injetáveis baseados nas modificações químicas de soluções de hemoglobina (Hb) ¹⁵
Abiótico	Uso de produtos químicos totalmente sintéticos para liberar oxigênio aos tecidos	Produção de compostos injetáveis como as emulsões de perfluoroquímicos (PFCs)

Histórico

A história dos carreadores de oxigênio aos tecidos confunde-se com a da medicina transfusional, uma vez que outras substâncias foram infundidas na circulação com o mesmo propósito, como leite, água de coco e sangue de animais. Algumas soluções provaram ser desastrosas, com complicações imediatas, como a resultante da infusão intravenosa de solução de hemoglobina (Hb) livre humana.¹⁶ Em 1898, Von Stark foi o primeiro a usar a solução de Hb livre em paciente com anemia que evoluiu com quadro de insuficiência renal aguda fatal.¹⁷

Desde 1937, Amberson já defendia o desenvolvimento de substitutos do sangue.¹⁸ Em experimentos clínicos, Amberson *et al.* utilizaram solução de Hb preparada a partir de lisados simples de hemácias seguido pela filtração para remoção de debris estromais, porém a infusão de Hb não-modificada (sob a forma de tetrâmeros) rapidamente se dissocia formando dois dímeros (alfa e beta), que são excretados pelo rim.¹⁹ A toxicidade renal associada a esses compostos identificou a necessidade de modificação e estabele-

zação da Hb para que viesse a ser usada como carreador de oxigênio livre de células.^{20,21}

Modificações estruturais da Hb incluem: ligação química cruzada a fim de estabilizar os tetrâmeros de Hb; polimerização da Hb produzindo moléculas de alto peso molecular, encapsulação de vários preparados de Hb e moléculas de Hb recombinantes por engenharia genética.^{22,23,24}

Em 1957, Chang preparou Hb artificial encapsulada com o intuito de produzir glóbulos vermelhos artificiais.²⁵ O mesmo autor, em 1964, demonstrou que seria possível a produção de Hb ligada por pontes intermoleculares, estabilizando a Hb.²⁶ Posteriormente, em 1968, Bunn e Jandl mostraram que a Hb tetramérica ligada por pontes intramoleculares não apresentava a toxicidade renal da Hb livre.²⁷

Ainda na década de 1960, Clark começou a experimentar os compostos de uma classe de perfluorcarbonos (PFCs) como carreadores de oxigênio.^{28,29}

O oxigênio tem uma solubilidade aproximadamente cem vezes maior em soluções do perfluorcarbono do que no plasma. Conseqüentemente, a quantidade de oxigênio dissolvido no plasma pode ser suficiente para a oxigenação tecidual, sem a necessidade da Hb.³⁰ Como os PFCs são compostos de natureza hidrofóbica, foi necessário o desenvolvimento de emulsões para que esses compostos pudessem ser úteis como carreadores de oxigênio do plasma para os tecidos.^{31,32}

Apesar de necessária, as pesquisas para o desenvolvimento dos CAOLCs continuaram lentas e dependentes de altos investimentos. Somente a partir de 1981 voltou a ganhar relevância internacional, após a descoberta de que o vírus HIV bem como outros agentes infecciosos poderiam ser transmitidos pelo sangue.³³

Existem três motivos básicos pelos quais tem-se intensificado a busca por CAOLC: a perecibilidade do sangue, os custos crescentes de produção e a necessidade de compatibilização entre doador e receptor.^{34,35}

Características ideais dos CAOLC

Pesquisadores definiram as características ideais que os CAOLC deveriam ter:

- Permitir adequada captação de oxigênio nos pulmões e liberação de gás carbônico
- Adequada liberação de oxigênio aos tecidos
- Longo tempo de permanência na circulação sanguínea
- Não-tóxico
- Livres de agentes infecciosos e alérgenos
- Excreção rápida sem causar lesões orgânicas/funcionais
- Estável em temperatura ambiente e facilmente disponível para uso – não se deteriorando na estocagem e, idealmente, não necessitar de refrigeração, tornando possível a sua infusão em situações emergenciais, extra-hospitalares, em locais remotos e em situações de catástrofes públicas.

- Facilmente esterilizável
- Baixo custo de produção
- Longo período de validade
- Facilmente administrável
- Compatibilidade universal podendo ser transfundido a qualquer indivíduo a despeito de seu grupo sanguíneo, sem qualquer teste adicional prévio.
 - Livre de efeitos colaterais
 - Previsibilidade da composição de ingredientes que sejam completamente conhecidos, permitindo a sua manipulação adequadamente.^{36,37}

Das características acima, três vantagens potenciais e únicas são consideradas críticas para o desenvolvimento de um CAOLC.³⁸

1. Ao contrário dos glóbulos vermelhos do sangue, um CAOLC poderia ser esterilizado, removendo todo e qualquer possível agente infeccioso.
2. Estaria isento de risco de incompatibilidade sanguínea, podendo ser usado em qualquer indivíduo independentemente do seu tipo sanguíneo.
3. Um CAOLC estável poderia ser armazenado por muito tempo, permitindo o transporte a longas distâncias, a campos de batalha, ou a um local de desastre natural sem necessidade de refrigeração.^{39,40}

Carreadores de oxigênio baseados em hemoglobina

A escolha da Hb para transporte de oxigênio aos tecidos é uma opção natural dada a sua capacidade funcional.⁴¹ Vários grupos de pesquisa têm se dedicado à modificação química da Hb com o intuito de estabilizar e de reduzir os principais efeitos adversos da Hb livre, resultantes da deposição renal dos dímeros de Hb e de vasoconstrição associa-

do ao óxido nítrico.^{42,43} (Figura 1 e Tabela 2).

A Hb livre de células rapidamente se dissocia em dímeros que são depositados no rim. A ligação da diáspirina aos dímeros estabiliza a Hb. A conjugação de Hb+PEG produz tetrâmeros com alto peso molecular. A ligação estabiliza a Hb, formando multímeros de diferentes pesos moleculares.

Outra questão refere-se quanto à fonte de Hb, pois para superar a equação de produção/custo, além da Hb humana (não aceitável por alguns indivíduos devido a motivos religiosos) tem sido testada a Hb bovina (abundante, de baixo custo, porém tem risco de infecção por agentes vários como p. ex. príons) e a partir de animais transgênicos (processo de alto custo e tecnologicamente complexo até o momento).⁴⁴

Várias estratégias têm sido adotadas para possibilitar o uso da Hb como carreador de oxigênio livre de células:

Estabilização da Hb

A ligação dos dímeros de Hb por meio de pontes intramoleculares fortalece as pontes existentes estabilizando a Hb. Como exemplo dessa classe de carreadores de oxigênio baseados em Hb temos a Hb ligada a diácidos, de origem humana, apresenta efeito oncótico moderado, viscosidade relativamente baixa, entretanto é altamente vasoativa. Estudos clínicos evoluíram até fase III para uso em cirurgia cardiopulmonar, mas pelos efeitos colaterais observados foram descontinuados.⁴⁵ Outro exemplo é a Hb ligada a diáspirina, que chegou a ser usada em ensaios clínicos fase III em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, porém foram interrompidos após constatação de aumento de mortalidade no grupo que recebia a Hb-diaspirina.^{46,47,48} A Hb-diaspirina foi testada em pacientes em choque hemorrágico e em traumatismo craniano, com resultados surpreendentes.⁴⁹⁻⁵² Essa classe de carreadores de oxigênio livre de células é considerada de primeira geração.

Hemoglobina não modificada de células

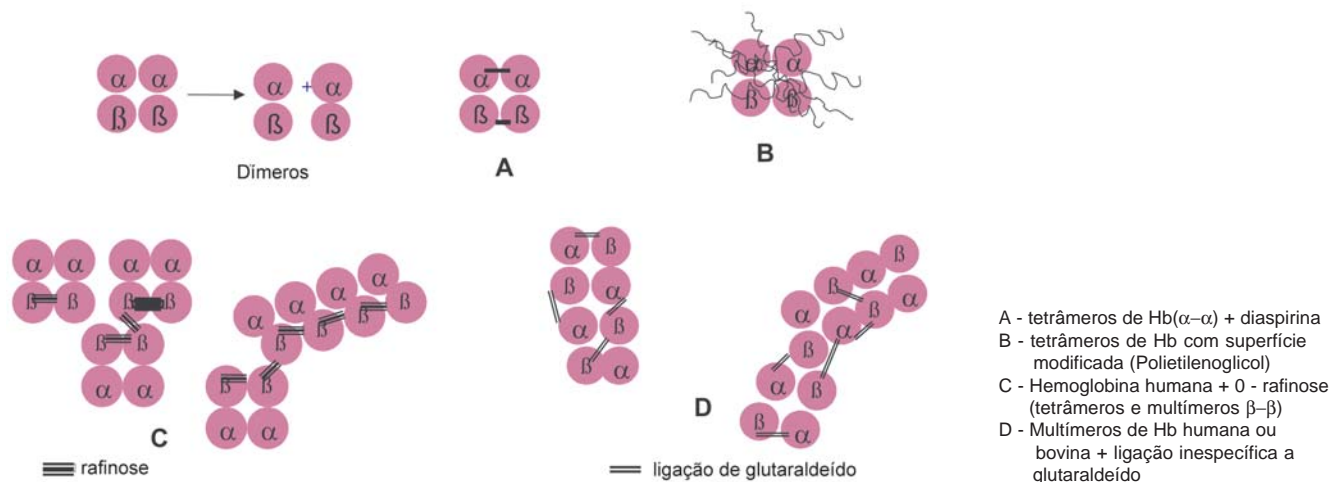


Figura 1. Comparação entre hemoglobina (Hb) humana (tetrâmero) e quatro diferentes carreadores de oxigênio livre de células (tetrâmeros de Hb+diáspirina, tetrâmeros de Hb com superfície modificada, Hb humana + O-rafinose e Multímeros de Hb+ glutaraldeído).

Tabela 2. Situação atual dos carreadores de oxigênio livre de células baseados em modificações da Hb

Classe do produto	Modificação da Hb	Nome comercial	Fonte de Hb	Estado de pesquisa clínica
Hb Tetramérica	Hb+diaspirina	HemAssist (Baxter)	humana	Descontinuado (segurança)
Hb Tetramérica	Hb+PEG piridoxilado	PHP-Hb (Apex/ Curacyte)	humana	Fase III-choque séptico em andamento
		Hb+PEG	PEG Hb (Enzon)	Bovina
	Hb+PEG	Hemospan (Sangart)	Humana	Fase III em andamento
Hb tetrâmero polimerizado	Hb+glutaraldeído polimerizado	HBOC201 Hemopure (Biopure)	bovina	Terminou Fase III
		Hb+glutaraldeído polimerizado	PolyHeme (Northfield)	humana
	Hb+o-rafinoose polimerizada	Hemolink (Hemosol)	humana	Fase III descontinuado (segurança)
Hb encapsulada	lipossomal	-	bovina	Pré-clínico
Hb recombinante	Cadeias Alfa-alfa Hb	RHb1.1 Optro (Somatogen)	Humana recombinante	Descontinuado (segurança)
	Hb com substituição de aminoácido	RHb2.0 (Baxter)	Humana recombinante	Descontinuado (segurança)
	Hb octamérica	RHb betaG83C-F41Y	Humana recombinante	Pré-clínico

Conjugação de substâncias químicas aos tetrâmeros de Hb

Inicialmente foram conjugadas à Hb substâncias derivadas do dextran. A seguir foram testadas várias moléculas como polietilenoglicol (PEG), polioxietileno e hidroxietilstarch conjugados à Hb por meio de pontes intermoleculares formando polímeros de Hb.⁵³⁻⁵⁶ Como características, esses compostos, que podem ser de origem humana ou bovina, têm meia vida prolongada, excreção renal lenta, elevada viscosidade, alta pressão oncótica e baixa vasoatividade.^{57,58} Um tetrâmero de Hb humana piridoxilada conjugada ao polioxietileno (PHP, Curacyte®, Munique, Alemanha e Durham, EUA) foi desenvolvido intencionalmente para uso em situações em que haja aumento de produção de óxido nítrico (P.ex.choque séptico). Foi demonstrado em estudo fase II que pacientes em choque séptico que receberam Hb+PHP necessitaram de menor quantidade de drogas vasoativas. Esse produto continua sendo testado, agora em fase III de pesquisa clínica. O PHP está em estudos fase II como terapêutica auxiliar em choque cardiogênico e na terapia do câncer com IL-2 (resultados não publicados, obtidos a partir do sítio www.curacyte.de).

Outro produto Hb+PEG (MP4), Hemospan® (Sangart, San Diego, EUA) está em fase II de pesquisa clínica, sendo testado em quarenta pacientes.^{59,60}

Polimerização da Hb

Os carreadores de oxigênio baseados em soluções de Hb desse grupo são moléculas polimerizadas de O-rafinoose ou glutaraldeído, que, ligados à Hb, estabelecem pontes intra e intermoleculares de alto peso molecular para

umentar a sua meia-vida.^{61,62} Esse processo produz soluções de Hb polimerizada de peso molecular variável, moderada pressão oncótica, alta viscosidade e vasoatividade moderada.⁶³

Estudos com Hb ligada ao glutaraldeído polimerizado mostraram resultados promissores, tanto é que culminaram com a liberação para uso clínico de um produto comercial denominado PolyHeme® (Northfield Laboratories, E.U.A) na África do Sul.⁶⁴ Esse produto, de origem humana, tem sido usado em situações emergenciais pré-hospitalares, onde a transfusão de sangue não está disponível e em situações de sangramento maciço com Hb<3,0g/dL.^{65,66,67} Outra solução de Hb-glutaraldeído polimerizado de origem bovina, chamado de HBOC201 (Hemopure®, Biopure Corporation, E.U.A.),⁶⁸ está atualmente sendo testado (fase III) em 23 centros hospitalares norte-americanos, ainda que tenha sido alvo de críticas recentes.⁶⁹⁻⁷³

A Hb ligada a O-rafinoose, (Hemolink®, Hemosol, Canadá) apesar de ter inicialmente apresentado bons resultados como carreador de oxigênio em cirurgia cardíaca e menor efeito vasoconstritor e toxicidade renal que outros produtos, a sua pesquisa (fase III) foi descontinuada por motivo de segurança.^{74,75} A empresa Hemosol está desenvolvendo outro produto conjugando Hb à molécula de hidroetanostarch de segunda geração, que tem alto peso molecular e maior capacidade de agir como expansor volêmico.⁷⁶

Encapsulação da hemoglobina

Inicialmente foram utilizadas vesículas de fosfolípidos para a encapsulação da Hb, porém pesquisas concluíram que a Hb encapsulada em fosfatidilcolina isoelétrica em quanti-

dades equimolares de colesterol na camada bilipídica tornavam o produto mais estável.^{77,78,79}

A encapsulação de Hb em lipossomos permite a produção de solução com alta concentração de Hb, baixa toxicidade renal e introdução de outros constituintes como catalase⁸⁰ e superóxido-dismutase.^{81,82,83} As pesquisas atuais estão focadas na esterilização de Hb lipossoma-encapsulada, no controle do tamanho do lipossoma, na eficiência da encapsulação e na estabilização do produto final.⁸⁴⁻⁸⁸ Os produtos resultantes da combinação de soluções de Hb+ enzimas são considerados CAOLCs de terceira geração.

A tecnologia de nanocápsulas empregando polímeros como ácido polilático e poliisobutilcianoacrilato são ainda promessas, classificados como CAOLCs de quarta geração.⁸⁹ Esses produtos têm viscosidade ligeiramente menor que o sangue humano, e a associação também ao PEG aumenta a meia-vida e a eficiência da encapsulação.^{90,91}

Hb recombinante

Desenvolvida com o uso de técnicas de engenharia genética em 1990 por Hoffman e cols. após métodos de purificação e aperfeiçoamento tecnológico, obteve-se a Hb recombinante tetramérica (rHb1.1 e rHb2.0); porém, devido à elevada incidência de efeitos adversos, em especial decorrentes da vasoatividade, foram abandonados.^{92,93} Recentemente foi produzida uma Hb octamérica estável, um dímero de tetrâmeros de Hb recombinante (rHb betaG83C-F41Y) para reduzir esse efeito indesejável.

Toxicidade relacionada aos carreadores de oxigênio baseados em hemoglobina

São vários os efeitos adversos relacionados ao uso de soluções de Hb; alguns foram reportados tanto experimentalmente como em seres humanos, dentre esses se destacam:

Nefrotoxicidade

É complicação freqüentemente observada. A Hb não modificada livre no plasma sabe-se, há muito, é nefrotóxica. Conseqüentemente, quaisquer produtos que envolvam a modificação de Hb não deve ter, na sua composição final, hemoglobina livre não modificada.

As soluções de Hb, alteradas quimicamente ou geneticamente, podem levar à deposição de dímeros em excesso, à obstrução tubular, à redução da taxa de filtração glomerular e lesão renal.⁹⁵

Vasoatividade

Tem sido documentado em praticamente todos os produtos baseados em Hb, tanto experimentalmente como em humanos.^{96,97,98} A etiologia dessa complicação ainda não foi totalmente esclarecida, mas o óxido nítrico que se liga avidamente à Hb livre tem papel relevante. Uma hipótese é a de que interações entre óxido nítrico, Hb livre e fator

relaxante derivado do endotélio possam desencadear uma resposta inflamatória e falência múltipla de órgãos.⁹⁹ Outros autores sugerem que a Hb livre possa modular a sensibilidade do receptor de resposta adrenérgica estimulando a endotelina-1 (peptídeo vasoconstritor). Foi também reportado que mesmo as Hbs modificadas que apresentam pequenos efeitos pressóricos clinicamente podem resultar em importante vasoconstrição e aumento da resistência vascular.^{100,101}

Nos casos das soluções de Hb encapsulada, os fragmentos lipídicos que envolvem a Hb e estromas celulares residuais levam à vasoconstrição, ativação do complemento e à geração de radicais livres.^{102,103,104}

Toxicidade cardíaca

Em animais (macaco Rhesus e em porcos) foram detectados casos de degeneração cardíaca focal ou moderada, ou ainda degeneração multifocal. Essas lesões têm sido observadas 24-48 horas após uma única infusão desses produtos. As regiões mais freqüentemente envolvidas têm sido a região basal do ventrículo esquerdo, próximo do músculo papilar, os septos interventriculares e ventrículo direito.¹⁰⁵

Alterações gastrointestinais

Desconforto abdominal, náuseas, vômitos, disfagia ou dor abdominal generalizada têm sido os sintomas comuns. Acredita-se que estejam relacionados ao óxido nítrico, levando a espasmos no trato gastrointestinal.¹⁰⁶

Atividade pró-inflamatória

A infusão de Hb em pequenos animais estimula a atividade procoagulante e, conseqüentemente, pode desencadear coagulação intravascular disseminada.¹⁰⁷ Estudos em coelhos *in vivo* demonstraram arterite pulmonar e lesões trombóticas. Estudos *in vitro* sobre o efeito da Hb em leucócitos mostraram que, na presença de outros componentes sanguíneos, os leucócitos liberam substâncias pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral e interleucina 8 (IL-8).¹⁰⁸⁻¹⁰⁹

Estresse oxidativo

Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que as soluções de Hb podem induzir estresse oxidativo que, em parte, pode ser explicado pela capacidade da Hb em servir como fonte de oxigênio tóxico e/ou pela capacidade da Hb em remover óxido nítrico, importante componente antioxidante natural e acarretar em aumento de radicais livres. Em humanos existe evidência indireta desse efeito adverso, uma vez que o aumento da atividade enzimática, incluindo aumento de creatina fosfoquinase (CK), desidrogenase láctica (DHL) e enzimas pancreáticas, lipases e amilase não é incomum.¹¹⁰⁻¹¹¹

Efeito sinérgico entre endotoxina e hemoglobina

Em modelos animais em septicemia foi reportado que níveis de Hb livre podem reduzir o clareamento de endotoxinas

da circulação, aumentando o risco de mortalidade. Esse evento adverso é particularmente preocupante, uma vez que esses produtos podem ser infundidos em pacientes com processos infecciosos em curso ou em vítimas de trauma com ferimentos contaminados. Em estudo publicado há pouco, não foi observado efeito no sistema imune decorrente da infusão de carreador de oxigênio livre de células baseado em Hb.¹¹²

Neurotoxicidade

Em modelos experimentais, a Hb livre pode ter ação tóxica direta em neurônios. Em estudos pré-clínicos, a adição de Hb livre pode levar neurônios à morte, deixando as células gliais intactas. Em um relato de caso, a infusão de Hb modificada foi considerada um preditor desfavorável de evolução três meses após a ocorrência de acidente vascular isquêmico. O mecanismo dessa complicação pode ser em parte devido ao efeito vasoconstritor da endotelina-1 que aumentou, de modo dose-dependente, pela administração do produto acelular de Hb.¹¹³

Perfluorcarbonos (PFCs)

Os PFCs pertencem a uma classe de moléculas caracterizada por um arcabouço de carbono cíclico ou linear que é altamente substituído por fluorino e, ocasionalmente, por outros halógenos. São química e biologicamente inertes, com uma característica única para transportar gases não-polares como oxigênio, gás carbônico, nitrogênio solubilizados nas moléculas de PFCs. O oxigênio tem uma solubilidade cem vezes maior em soluções de perfluorcarbonos do que no plasma; como conseqüência, a quantidade de oxigênio dissolvido no plasma pode ser suficiente para oxigenar os tecidos independentemente da Hb.¹¹⁴ Esse transporte depende da pressão parcial de oxigênio e da concentração de PFC no plasma, portanto, para uso clínico, o paciente deve receber oxigênio adicional para que os PFCs atuem transportando O₂. O exemplo clássico de seu potencial de transporte de O₂ é o experimento em que um camundongo foi mantido vivo durante a imersão em um béquer com perfluorocarbono oxigenado.^{28,31}

Esses compostos são imiscíveis em água, dependendo de emulsificação para uso intravenoso. Com esse intuito, o PFC é misturado a um surfactante (tipicamente um fosfolípido) produzindo uma emulsão estável. A concentração de PFC na emulsão é variável (serve para classificar as gerações de PFCs), sendo maior nas formulações atuais de PFCs (3ª geração). A primeira geração de PFC é representada pelo perfluorodecalino e pelo perfluorotripropilamina. O primeiro tinha meia vida curta, mas o segundo mantinha-se por meses nos tecidos.¹¹⁵ O Fluosol DA 20%® (Green Cross Corp., Japão), licenciado para uso clínico em 1989 em angioplastia percutânea transluminal para oxigenar o leito vascular distal, chegou a ser liberado no Japão para uso clínico.¹¹⁶⁻¹¹⁹ Foi retirado do mercado em 1994 por baixas vendas e reações adversas.

A segunda geração de PFCs apresentava maiores vantagens em relação à primeira, com maior capacidade de carrear oxigênio, excreção rápida e menos retenção nos tecidos, maior pureza e possibilidade de produção em grande escala. Três produtos foram desenvolvidos (perfluorodichlorooctano, brometo de perfluorooctil e perfluorobutil) e todos abandonados devido a eventos adversos significantes.¹²⁰

Outros PFCs de segunda geração têm solubilidade em O₂ mais alta que o Fluosol-DA®; são eles o PHEr-2® (Sanguine Corp, Pasadena EUA) e o perflubron. O Oxygent® (Alliance Pharmaceutical, EUA), uma emulsão de perflubron associado a fosfolípide que parecia altamente eficaz nas fases I e II de estudo clínico,¹²¹ em fase III foi decepcionante, pois os pacientes que receberam o Oxygent® tiveram maior prevalência de acidente vascular cerebral que os do grupo controle levando à interrupção das pesquisas.

Está liberado para uso clínico o Perftoran® (perfluorodecalina + perfluorometilciclohexipiperidina) produzido na Rússia desde 1996 e por uma empresa norte-americana (Oxycyte®, Synthetic Blood International, EUA).¹²² Perftoran® foi recém-aprovado para uso no México.

Efeitos adversos associados aos PFCs

Existem efeitos adversos clinicamente relevantes associados aos PFCs possivelmente relacionados à ativação de inúmeras enzimas ou sistema celulares.¹²³

Biologicamente o PFC é inerte, mas o principal efeito adverso relacionado à primeira geração de PFCs é a ativação do complemento.¹²⁴ As moléculas de PFC são seqüestradas no sistema reticuloendotelial, particularmente nas células de Kupffer e nos macrófagos e liberadas subsequentemente no plasma como gás dissolvido. O gás de PFC é exalado não modificado e não-metabolizado pelos pulmões. Enquanto os PFCs de primeira geração eram retidos em quantidade significativa no sistema reticuloendotelial, os PFCs atuais, tais como o Perflubron®, têm uma retenção de aproximadamente uma semana. Isto permite eliminação hepática e renal eficaz desse PFC, reduzindo o risco de disfunção significativa do órgão.¹²⁵

Um grande obstáculo ao uso de PFCs como carreador de oxigênio livre de células é o de que o tamanho das partículas de emulsão tem que ser cuidadosamente controlado e homogêneo, caso contrário há ativação do sistema macrofágico-monocítico, seqüestro de plaquetas no baço e liberação de citocinas inflamatórias.¹²⁶

A retenção de PFCs no sistema reticuloendotelial acrescenta um problema quanto ao número de doses de PFCs consideradas seguras. Os PFCs são relativamente evanescentes no plasma, com uma meia vida de aproximadamente 3-4 horas na fase plasmática. No sistema reticuloendotelial, entretanto, tem uma fase de retenção aproximada de 3-5 dias antes da exalação do PFC. Portanto, embora a fase plasmática seja extremamente curta, a administração adicional de PFCs pode não ser possível pelo risco de o sistema reticuloendotelial

não conseguir eliminar o PFC adequadamente. Assim os PFCs podem se transformar numa droga de dose única. Até o momento, essa limitação de dosagem é teórica, porque não há dado clínico que suporte se os resultados de novas infusões de PFC podem levar a efeitos adversos graves.

Os PFCs dependem das Leis de Pressões Parciais de Henry, que limitam também o uso eficaz desses produtos em situações em que a pressão parcial de oxigênio é supranormal, isto é, quando a tensão alveolar parcial do oxigênio aproxima-se de 400 mmHg ou mais. Portanto, pacientes com doença pulmonar significativa, ainda que com oxigênio suplementar e com ventilação controlada, podem ser incapazes de alcançar pressão parcial de oxigênio para permitir que o PFC funcione como um carreador eficaz de oxigênio.

Trombocitopenia

A explicação desse efeito colateral em animais e em humanos pode estar relacionada ao metabolismo e ao processo de clareamento normal dos PFCs, uma vez que compostos fluoroquímicos podem levar a deformações na superfície plaquetária e subsequentemente opsonização pelo baço e fígado. Alguns estudos demonstraram que as plaquetas parecem ter função normal em testes de agregação *in vitro*, outros que as plaquetas têm vida média menor, porém com produção normal pelo indivíduo.¹²⁷

Bloqueio reticuloendotelial

Especula-se que as emulsões de PFCs podem prejudicar o clareamento de bactérias na circulação, embora nenhum estudo clínico tenha demonstrado tal efeito adverso.¹²⁸⁻¹³¹

Sintomas flu-like

Administração de PFCs em humanos tem sido associada a sintomas tipo *flu-like* e elevações transitórias de citocinas pró-inflamatórias. A etiologia deste fenômeno é desconhecida.¹³²

Efeitos no Sistema Nervoso Central

Casos de acidente vascular cerebral possivelmente associado à infusão de PFCs foram descritos. A base fisiopatológica para esta associação não foi elucidada.

Aplicação clínica de soluções potenciais de carreadores de oxigênio

Várias informações de literatura são referentes a relatos de casos, todavia os CAOLC superaram em muito a indicação de substituto de transfusão de concentrado de hemácias /sangue total, podendo ser usados para fins diagnósticos e terapêuticos outros.^{133,134,135}

Finalidade terapêutica

• Choque hemorrágico; hemorragia aguda (guerra, cirurgia); anemia grave.^{136,137,138}

- Hemodiluição normovolêmica aguda.¹³⁹⁻¹⁴²
- Anemia hemolítica auto-imune.¹⁴³
- Exsanguíneotransfusão – para reposição de volume.¹⁴⁴
- Isquemia local: infarto agudo do miocárdio; insuficiência cardíaca; acidente vascular cerebral isquêmico; trombose e embolismo arterial agudos; artéria coronária.¹⁴⁵

p.ex.: Hemozyme®, (Synzyme Technologies LLC, EUA) que é um carreador de oxigênio livre de células da segunda geração (polinitroxil+Hb polimerizada), tem três ações: vasodilatador, mimitizando ação de enzimas antioxidantes e é um agente antiinflamatório. Conseqüentemente postula-se que o HemoZyme® pode ter indicação no tratamento de isquemia, na reperfusão, em processos inflamatórios e na falha múltipla de órgãos após isquemia/hemorragia grave e ressuscitação.¹⁴⁶

- Doença de descompressão aguda, intoxicação por monóxido de carbono, embolia gasosa.¹⁴⁷
- Terapia adjuvante: radioterapia de tumor; quimioterapia.^{148,149}
- Proteção de órgão durante cirurgia com desvio cardiopulmonar, hipotermia profunda, cardioplegia.¹⁵⁰
- Preservação de órgão doado.¹⁵¹
- Choque séptico.¹⁵²
- Quando a transfusão de sangue e componentes não é aceita por motivação religiosa.¹⁵³ Foram descritos casos clínicos de uso de PolyHeme® em paciente com anemia grave (Hb<3,0g/dL) que recusavam ser transfundidos com sangue homólogo.^{154,155}
- Síndrome torácica aguda¹⁵⁶

Fins diagnósticos

- Agente de contraste – o Perfluoro-octilbromideo pode ser usado no ultra-som, na tomografia computadorizada, na angiografia e na ressonância magnética.^{157,158,159}

Novas linhas de pesquisas

Linhas de pesquisas inovadoras outras têm sido desenvolvidas como alternativas para suprimento de hemocomponentes a partir da doação de sangue. Dentre essas, destacam-se:

- Expansão *ex-vivo* e diferenciação a partir de células-tronco hematopoéticas para produção de células sanguíneas maduras em grande escala, porém com altíssimo custo
- Uso de dendrímeros, que são tipos especiais de polímeros que têm estruturas moleculares ramificadas em nano-escala (pesquisa patrocinada pelo Exército dos Estados Unidos). Está em fase inicial de pesquisa clínica.¹⁶⁰
- Camuflagem de antígenos eritrocitários transformando os glóbulos vermelhos em concentrados universais, podendo ser usados em quaisquer indivíduos. Como desvantagem estão os riscos associados à segurança desse produto e a manutenção da necessidade de doadores de sangue.¹⁶¹

• Uso da porfirina como carreador de oxigênio aos tecidos. Pesquisadores britânicos incluíram no centro de um polímero hiperamificado uma molécula de porfirina (Fe²⁺) e demonstraram que esse produto pode ligar-se reversivelmente ao oxigênio. A diferença entre esse potencial carreador de oxigênio livre de células do sangue e os outros é o baixo custo de produção em larga escala.¹⁶²

Conclusão

Apesar de intensos esforços até o momento, a maioria dos pesquisadores considera que os CAOLC ainda estão em estágio de pesquisa e desenvolvimento, uma vez que várias questões precisam ser elucidadas, principalmente quanto à segurança e à eficácia em relação ao sangue humano.^{163,164} Esses fatores podem deslocar a indicação dos carreadores de oxigênio livres de células apenas como coadjuvantes das transfusões homólogas. Além do mais, soluções colóides e cristalóides têm sido utilizadas como expansores volêmicos no tratamento efetivo em situações de perdas sangüíneas expressivas, com pouco ou nenhum efeito adverso.

Atualmente, o *status* desses produtos tem sido restrito para uso em pesquisas clínicas, em terapias da reposição de sangue em situações emergenciais antes da chegada do paciente aos centros hospitalares, na hemodiluição peri-operatória ou para os que não aceitam a transfusão de sangue por questões religiosas.

Ainda é cedo para definir o papel da nova geração dos CAOLC, mas é certo que temos muito que aprender com esses produtos e procurar acompanhar de perto o seu desenvolvimento, pois a sua incorporação no arsenal terapêutico conferirá uma nova dimensão à medicina transfusional.

Abstract

The procedures needed to reduce transfusion-associated adverse effects, especially those related to transfusion-transmitted diseases and leukocyte-mediated alloimmunization, have a great impact on the production cost of blood components. Additionally, blood transfusion has increased worldwide making the need for a safe substitute for blood evident. These products have been named artificial blood or blood substitutes. Based on the fact that their focus has been oxygen delivery to tissues, "free oxygen carrying cells" is more appropriate. Two major groups of free oxygen carrying cells have been tested: modified hemoglobin solutions (bovine or human) and perfluorocarbons (PFCs). Even though not without adverse effects, extensive clinical trials are being conducted to test their safety and efficacy. The understanding of free oxygen carrying cell mechanisms has made testing of a new generation of these products for other applications possible thereby expanding transfusion medicine frontiers. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(4):394-405.

Key words: Artificial blood; transfusion; perfluorocarbon; hemoglobin; blood substitutes.

Referências Bibliográficas

1. www.anvisa.gov.br [página acessada em 01 de julho de 2006]
2. www.IBGE.gov.br [página acessada em 09 de julho de 2006]
3. www.who.int [página acessada em 04 de julho de 2006]
4. www.health.state.mn.us, 2005.
5. Davey RJ. Overcoming blood shortages: Red blood cell and platelet substitutes and membrane modifications. *Curr Hematol Rep* 2004; 3(2):92-6.
6. Fieber EW, Busch MP. Infection risks of transfusion. In: Preoperative transfusion medicine, Spiess BD, Spence RK, Shander A. 2ªed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins 2006.p. 131-52.
7. Davenport RD - Management of transfusion reactions. In Mintz PD, ed. *Transfusion Therapy: Clinical Principles and Practice*, 2ª ed, Bethesda, MD:AABB Press 2005, p. 515-39.
8. Spahn DR, Casutt M. Eliminating blood transfusions: new aspects and perspectives. *Anesthesiology*. 2000;93:242-55.
9. Winslow R. Oxygen Transport Agents: A new approach to red blood cell alternatives. *Transfusion. Alternatives in Transfusion Medicine*. 2004;5(6):498-504.
10. Kjellstrom BT. Blood substitutes: Where do we stand today? *J. Intern. Med*. 2003;253:495-7.
11. Stowell CP, Levin J, Spiess BD, Winslow RM. Progress in the development of RBC substitutes. *Transfusion*. 2001;41:28-9.
12. Chang TM. A new red blood cell substitute. *Crit. Care Med*. 2004; 32:612-23.
13. Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Onuma S. Takeoka, E. Tsuchida. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: Objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem*. 2000; 11:56-64.
14. Rabinovici R. The status of hemoglobin-based red cell substitutes. *Reviews*. 2001;3:691-7.
15. Stowell CP. Hemoglobin-based oxygen carriers. *Curr. Opin. Hematol*. 2002;9:537-43.
16. Cohn SL. Is blood obsolete? *Current opinion. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*. 1997;42(4):730-2.
17. Goorha YK, Deb P, Chatterjee T, Dhot PS, Prasad RS. Artificial blood. *MJAFI* 2003;59(1):45-50.
18. Amberson WR. Blood substitutes. *Biological Reviews of The Cambridge Philosophical Society*. 1937;12:48-52.
19. Amberson WR, Jennings JJ, Rhode CM. Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *J Appl Physiol*. 1949;1:469-89.
20. Tsai AG. Influence of cell-free Hb on local tissue perfusion and oxygenation in acute anemia after isovolemic hemodilution. *Transfusion*. 2001;41:1290-8.
21. Alayash AI. Oxygen therapeutics: Can we tame haemoglobin? *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:152-9
22. Standl T. Artificial oxygen carriers: Hemoglobin-based oxygen carriers – Current Status 2004. *Transfus. Med. Hemother*. 2004; 21:262-8.
23. Ogata Y. Evaluation of human hemoglobin vesicle as an oxygen carrier: Recovery from hemorrhagic shock in rabbits. *Polym. Adv. Technol*. 2000;11:301-6.
24. Carmichael FJ. Recent development in hemoglobin-based oxygen carriers – an update on clinical trials. *Transfus Apheresis Sci*. 2001;24:17-21.
25. Chang TM. Modified hemoglobin-based blood substitutes: cross-linked, recombinant and encapsulated hemoglobin. *Vox Sang*. 1998;74(suppl 2):233-41.
26. Chang TMS. Semipermeable microcapsules. *Science* 1964; 146:524-5.

27. Bunn HF, Jandl JH. The renal handling of hemoglobin. *Trans Assoc Am Physicians*. 1968;81:147-52.
28. Clark LC, Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science*. 1966;152:1755-6.
29. Scott MG, Kucik DF, Goodnough LT *et al*. Blood substitutes: evolution and future applications. *Clin Chem*. 1997;43:1724-31.
30. Hill SE. Oxygen therapeutics – Current concepts. *Can. J. Anesth*. 2001;48:S32-S40
31. Clark LC. Emulsion of perfluorinated solvents for intravenous gas transport. *Fed Proc*. 1981;34:1468-77.
32. Riess JG. Fluorocarbon-based oxygen carriers: new orientations. *Artif Organs*. 1991;15:408-13.
33. Lowe KC, Ferguson E. Benefit and risks perceptions in transfusion medicine: Blood and blood substitutes. *J. Inter. Med*. 2003;253: 498-507.
34. Riess JG. Oxygen carriers ("blood substitutes") – raison d'etre, chemistry and some physiology. *Chem. Rev*. 2001;101:2797-2919.
35. Winslow RM. Current status of blood substitute research: Towards a new paradigm. *J Intern. Med*. 2003;253:508-17.
36. Nüiler E. Setbacks for blood substitutes companies. *Naut Biotechnol* 2002;20:962-3.
37. Draft guidance for industry: Criteria for safety and efficacy evaluation of oxygen therapeutics as red blood cell substitutes; availability. FDA 2004 (69);208:62903-04
38. Winslow RM. Blood Substitutes. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2002;40:131-42.
39. Chen HS, Yang ZH. Perfluorocarbon as blood substitute in clinical applications and in war casualties. In: Chang TMS, ed. *Blood Substitutes*. New York, NY: Marcel Dekker; 1989:403-9.
40. Creteur J, Vicent JL. Hemoglobin solutions. *Crit Care Med*. 2003; 31(suppl):707.
41. Vane LA, Funston JS, Kirschner R *et al*. Comparison of transfusion with DCLHb or pRBCs for treatment of intraoperative anemia in sheep. *J Appl Physiol*. 2002;92:343-53.
42. Winslow RM, Gonzales A, Gonzales ML *et al*. Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes in a rat hemorrhage model. *J Appl Physiol*. 1998;85:993-1003.
43. Lee R, Neya K, Svizzero TA *et al*. Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Appl Physiol*. 1995; 79:236-342.
44. Sakai H, Masada Y, Takeoka S, Tsuchida E. Characteristics of bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin-vesicles for an artificial oxygen carrier. *J. Biochem*. 2002;131:611-17.
45. Haney CR, Buehler PW, Gulati A. Purification and chemical modifications of hemoglobin in developing hemoglobin based oxygen carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;40:153-69.
46. Barve A, Sen AP, Saxena PR *et al*. Dose response effects of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) on systemic hemodynamics and regional blood circulation in rats. *Artf Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1997;25:75-84.
47. Pape A, Kemming G, Meisner F *et al*. Diaspirin Cross-linked hemoglobin fails to improve left fluid resuscitation from hemorrhagic shock. *Eur Surg Res*. 2001;33:318-26.
48. Kumar A, Sen AP, Saxena PR *et al*. Resuscitation with diaspirin crosslinked hemoglobin increases cerebral and renal blood perfusion in hemorrhaged rats. *Artf Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1997;25:85-94.
49. Chappell JE, McBride WJ, Shackford SR. Diaspirin cross-linked hemoglobin resuscitation improves cerebral perfusion after head injury and shock. *J Trauma*. 1996;41:781-8.
50. Chappell JE, Shackford SR, McBride WJ. Effects of hemodilution with diaspirin cross-linked hemoglobin on intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, and fluid requirements after head injury and shock. *J Neurosurg*. 1997;86:131-8.
51. Schubert A, Przybelski RJ, Eidt JF *et al*. Diaspirin-crosslinked hemoglobin reduces blood transfusion in noncardiac surgery : a multicenter, randomized, controlled, double-blinded trial. *Anesth Analg*. 2003;97:323-32.
52. Von Dobschuetz E, Hoffmann T, Messmer K. Diaspirin crosslinked hemoglobin effectively restores pancreatic microcirculatory failure in hemorrhagic shock. *Anesthesiology*. 1999;91:1754-62.
53. Wettstein R, Tsai AG, Erni D *et al*. Resuscitation with polyethylene glycol-modified human hemoglobin improves microcirculatory blood flow and tissue oxygenation after hemorrhagic shock in awake hamsters. *Crit Care Med*. 2003;31:1824-30.
54. Kidane A, McPherson T, Shin HS, Park K. Surface modification of polyethylene terephthale using PEG-Polybutadiene-PEG triblock copolymers. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2000;3-4:347-53.
55. Winslow R, Kramer G. Malmeide-polyethylene glycol modified human hemoglobin. *Crit Care Med*. 2003;31(12):2815-6.
56. Manjula B, Tsai A, Upadhyaya R, Perumalsamy K, Smith P, Malavalli A *et al*. Site-specific PEGylation of hemoglobin at Cys-93 (beta): Correlation between the colligative properties of the PEGylated protein and the length of the conjugated PEG chain. *Bioconj Chem* 2003;14:464-72.
57. Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive polyethylene glycol-hemoglobin conjugate. *Artif Organs*. 2004;28:800-6
58. Kramer GC. Counterintuitive red blood cell substitute - Polyethylene glycol-modified human hemoglobin. *Critical Care Medicine*. 2003;31:1882-4.
59. Vandegriff K, Malavalli A, Wooldridge J, Lohman J, Winslow R. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion*. 2003; 43:509-16.
60. Wettstein R, Cabrales P, Erni D *et al*. Resuscitation from hemorrhagic shock with MalPEG-calalbumin: comparison with MalPEG-hemoglobin. *Shock*. 2004;22(4):351-7.
61. Lee DH, Bardossy L, Peterson N *et al*. O-raffinose cross-linked hemoglobin improves the hemostatic defects associated with anemia and thrombocytopenia in rabbits. *Blood*. 2000;96:3630-6.
62. Leytin V, Mazer D, Mody M *et al*. Hemolink, an O-raffinose activation and function of human platelets in whole blood in vitro. *Br J Haematol*. 2003;120:535-41.
63. Stowell CP. What happened to blood substitutes? *Tranfus Clin et Biol* 2005;12:374-9.
64. Gould SA, Moore EE, Moore FA *et al*. Clinical utility of human polymerized hemoglobin as a blood substitute after acute trauma and urgent surgery. *J Trauma*. 1997;43(2):325-31.
65. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB *et al*. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *J Am Coll Surg*. 1998;187(2):113-20.
66. Gould SA, Moss GS. Clinical development of human polymerized hemoglobin as a blood substitute. *World J Surg*. 1996;20(9):1200-7.
67. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB *et al*. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. *J Am Coll Surg*. 2002;195(4):445-52.
68. Levy JH, Goodnough LT, Greilich PE *et al*. Polymerized bovine hemoglobin solution as replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124(1):35-42.
69. Kipnis K, King NM, Nelson RM. An open letter to institutional review boards considering Northfield Laboratories' PolyHeme trial. *Am J Bioeth*. May-Jun 2006;6(3):18-21.

70. Katz LM, Manning JE, McCurdy S *et al.* HBCO-201 improves survival in a swine model of hemorrhagic shock and liver injury. Resuscitation. 2002;54(1):77-87.
71. McNeil CJ, Smith LD, Jenkins LD *et al.* Hypotensive resuscitation using a polymerized bovine hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC-201) leads to reversal of anaerobic metabolism. J Trauma. 2001;50(6):1063-75.
72. Sprung J, Kindscher JD, Wahr JA *et al.* The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. Anesth Analg. 2002;94(4):799-808.
73. Muir WW 3rd, de Morais HS, Constable PD. The effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on left ventricular systolic function in anesthetized dogs. Vet Surg. 2000; 29(5): 449-55.
74. Cheng DC, Mazer CD, Martineau R *et al.* A phase II dose-response study of hemoglobin raffimer (Hemolink) in elective coronary artery bypass surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 127(1):79-86.
75. Lieberthal W, Fuhro R, Freedman JE *et al.* O-*raffinose* cross-linking markedly reduces systemic and renal vasoconstrictor effects of unmodified human hemoglobin. J Pharmacol Exp Ther. 1999; 288(3):1278-87.
76. Inayat MS, Bernard AC, Gallicchio VS, Garvy BA, Elford HL, Oakley OR. Oxygen carriers: A selected review. Transf and Apher Sci 2006;34(1):25-32.
77. Chonn A, Semple SC, Cullis PR. Association of blood proteins with large unilamellar liposomes *in vivo* - relations to circulation lifetime. J. Biol. Chem. 1992;267(26):18759-65.
78. Rudolph AS, Sulpizio A, Hieble P, MacDonald V, Chavez M, Feuerstein G. Liposome encapsulation attenuates hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segments. J. Applied Phys. 1997;82(6):1826-35.
79. Philips WT, Klipper RW, Awashi VD, Rudolph AS *et al.* Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: A long circulating red cell substitute. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999; 288(2):665-70.
80. Teramura Y, Kanazawa H, Sakai H, Takeoda S, Tsuchida E. Prolonged oxygen-carrying ability of hemoglobin vesicles by coencapsulation of catalase *in vivo*. Bioconjugate Chem. 2003; 14(6):1171-6.
81. Juliano RL, Stamp D. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. Biochem Biophys Res Commun. 1975;63(3):651-8.
82. Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Prog. Lipid Res. 2003;42(6):463-78.
83. Rudolph AS. Biomaterial biotechnology using self-assembled lipid microstructures. J. Cell. Biochem. 1994;56(2):183-7.
84. Arifin DR, Palmer AF. Determination of size distribution and encapsulation efficiencies of liposomes encapsulated hemoglobin by asymmetric flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering. Biotech. Prog. 2003;19(6):1798-811.
85. Arifin DR, Palmer AF. Polymersomes encapsulated hemoglobin: a novel type of cellular-base artificial blood substitutes. Biomacromolecules. (in press) 2005;6(4):2172-81.
86. Arifin DR, Palmer AF. Stability of liposome encapsulated hemoglobin dispersions. Art Cells Blood Subs Immobil Biotech. 2005;33(2):113-36.
87. Arifin DR, Palmer AF. Physical properties and stability mechanisms of poly(ethylene glycol) conjugated liposome encapsulated hemoglobin dispersion. Art Cells Blood Subs Imm Biotech. 2005; 33(2):137-62.
88. Farmer MC, Gaber BP. Liposome-encapsulated hemoglobin as an artificial oxygen-carrying system. Methods Enzymol. 1987; 149: 184-200.
89. Chang TM. Future generations of red blood cell substitutes. J Int Med 2003;253(5):527-35.
90. McCarthy MR, Vandegriff KD, Winslow RM. The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin: implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. Biophys Chem. 2001;30:103-17.
91. Awasthi VD, Garcia D, Goins BA, Philips WT. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. Int. J. Pharm. 2003;253(1-2):121-32.
92. Hoffman SJ, Looker DL, Roehrich JM, Cozart PE, Durfee SL *et al.* Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87(21): 8521-5.
93. Zuckerman SH, Doyle MP, Gorczynski R *et al.* Preclinical biology of recombinant human hemoglobin rHb1.1. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotech. 1998;26(3):231-57.
94. Vasseur-Godbillon C, Sahu SC, Domingues E, Fablet C, Giovannelli JL, Tam TC *et al.* Recombinant hemoglobin betaG83C-F41Y. FEBS J. 2006;273(1):230-41.
95. Buehler PW, Alayash AI. Toxicities of hemoglobin solutions: in search of *in-vivo* model systems. Transfusion. 2004; 44(10): 1516-30.
96. Standl TG, Reeker W, Redmann G *et al.* Haemodynamic changes and skeletal muscle oxygen tension during complete blood exchange with ultrapurified polymerized bovine haemoglobin. Intensive Care Med. 1997;23(8):865-72.
97. Palaparthi R, Saini BK, Gulati A. Modulation of diaspirin crosslinked hemoglobin induced systemic and regional hemodynamic response by ethanol in normal rats. Life Sci. 2001;68(12):1383-94.
98. de Figueiredo LF, Nelson SH, Mathru M *et al.* Effects of hemoglobin-based blood substitutes on vasoactivity of rat aortic rings. Artif Organs. 2001;25(11):928-33.
99. Kavdia M, Pittman RN, Popel AS. Theoretical analysis of effects of blood substitute affinity and cooperativity on organ oxygen transport. J. Appl. Physiol. 2002;96(6):2122-8.
100. Saxena R, Wijnhoud AD, Man in't Veld AJ *et al.* Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on endothelin-1 and blood pressure in acute ischemic stroke in man. J Hypertens. 1998;16(10):1459-65.
101. Winslow R, Intaglietta M, Tsai A, Vandegriff K, Wettstein R. Autoregulation and vasoconstriction: Foundation for a new generation of blood substitutes. Blood 2002;100(11):210.11-16.
102. Alayash AI, Ryan BA, Fratantoni JC *et al.* Hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs): structural alterations that affect free radical generation. Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol. 1992;20(2-4):277-81.
103. Sellke FW, Shafique T, Ely DL *et al.* Coronary endothelial injury after cardiopulmonary bypass and ischemic cardioplegia is mediated by oxygen-derived free radicals. Circulation. 1993; 88:395-400.
104. Alayash AI, Fratantoni JC, Bonaventura C *et al.* Consequences of chemical modifications on the free radical reaction of human hemoglobin. Arch Biochem Biophys. 1992;298(1):114-20.
105. Burhop K, Gordon D, Estep T. Review of hemoglobin-induced myocardial lesions. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2004;32(3):353-74.
106. Baldwin AL, Wiley EB, Alayash AI. Comparison of effect of two hemoglobin-based O (2) carriers on intestinal integrity and microvascular leakage. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002; 283(4):H1292-H301.

107. Niwa K, Ikebuchi K, Fujihara M *et al.* Inflammatory cytokine production in whole blood modified by liposome- encapsulated hemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1998;26(5-6):559-70.
108. McFaul SJ, Bowman PD, Villa VM. Hemoglobin stimulates the release of proinflammatory cytokines from leukocytes in whole blood. *J Lab Clin Med.* 2000;135(3):263-9.
109. Kalfin RE, Engelman RM, Rousou JA *et al.* Induction of interleukin-8 expression during cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1993; 88(5 Pt 2):II401-6.
110. Kavdia M, Tsoukias NM, Popel As. Model of nitric oxide diffusion in an arteriole: impact of hemoglobin-based blood substitutes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(6):H2245-H53.
111. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem.* 1972; 247 (21):6960-2.
112. Dong F, Hall CH, Golech SA, Philbin NB, Rice JP, Gurney J *et al.* Immune effects of resuscitation with HBOC-201, a hemoglobin-based oxygen carrier, in swine with moderately severe hemorrhagic shock from controlled hemorrhage Shock. 2006; 25(1):50-5.
113. Ortegon DP, Davis MR, Dixon PS *et al.* The polymerized bovine hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC-201) is not toxic to neural cells in culture. *Journal of Trauma - Injury Infection & Critical Care.* 2002;53(6):1068-72.
114. Geyer RP, Taylor K, Duffett EB *et al.* Successful complete replacement of the blood of living rats with artificial substitutes. *Fed Proc.* 1973;32:927.
115. Gould SA, Rosen AL, Sehgal LR *et al.* Fluosol- DA as a red cell substitute in acute anemia. *N Engl J Med.* 1986;314(26):1653-6.
116. Stefaniszyn HJ, Wynands JE, Salerno TA. Initial Canadian experience with artificial blood (Fluosol-DA 20%) in severe anemic patients. *J Cardiovasc Surg.* 1985;26(4):337-42.
117. Spence RK, McCoy S, Costabile J *et al.* Fluosol-DA 20% in pre-hospital resuscitation. *Crit Care Med.* 1989;17:166-72.
118. Spencer RK, McCoy S, Constabile J, *et al.* Fluosol DA-20 in the treatment of severe anemia: randomized, controlled study of 46 patients. *Crit Care Med.* 1990;18(11):1227-30
119. Kerins DM. Role of perfluorocarbon Fluosol-DA in coronary angioplasty. *Am J Med Sci* 1994;307(3):218-21.
120. Winslow R. Blood substitutes. Academic Press, 2005;576pgs.
121. Wahr JA, Trowborst A, Spencer RK. A pilot study of the efficacy of an oxygen carrying emulsion, Oxygent, in patients undergoing surgical blood loss [abstract]. *Anesthesiology.* 1994;8:A313.
122. Maesvsky E, Ivanitsky G, Bogdanova L, Axenova O, Karmen N *et al.* Clinical results of Perftoran application: Present and future. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2005; 33(1):37-46.
123. Tremper KK, Vercelotti GM, Hammerschmidt DE. Hemodynamic profile of adverse clinical reactions to Fluosol-DA 20%. *Crit Care Med.* 1984;12(5):428-31.
124. Ingram DA, Forman MB, Murray JJ. Activation of complement by Fluosol attributable to the pluronic detergent micelle structure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22(3):456-61.
125. Fujita J, Suzuki C, Organa R. Effect of Fluosol-DA on the reticuloendothelial system function in surgical patients. In: Bolin RB, Geyer RP, Nemo GJ, Eds. *Advancer in blood substitute research. Progress in clinical and biological research.* Vol.122. New York, NY: Alan R Liss Inc; 1983:265.
126. Winslow RM. Current status of oxygen carriers (blood substitutes). *Vox Sang.* 2006;91(2):102-10.
127. Smith DJ, Lane TA. Effect of a high concentration perfluorocarbon emulsion on a platelet function. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1992;20(2-4):1045-9.
128. Hammerschmidt DE, Vercelotti GM. Limitation of complement activation by perfluorocarbon emulsions: superiority of lecithin-emulsified preparations. *Biomater Artif Cells Artif Organs.* 1988; 16(1-3):431-8.
129. Bottalico LA, Betensky HT, Min YB *et al.* Perfluorochemical emulsions decrease Kupffer cell Phagocytosis. *Hepatology.* 1991;14(1):169-74.
130. Hong F, Shastri KA, Logue GL *et al.* Complement activation by artificial blood substitute Fluosol: in vitro and in vivo studies. *Transfusion.* 1991;31(7):642-7.
131. Ingram DA, Forman MB, Murray JJ. Phagocytic activation of human neutrophils by the detergent component of Fluosol. *Am J Pathol.* 1992;140(5):1081-7.
132. FDA Guidance for industry. 2004;17:1-256.
133. Winslow R. Alternative oxygen therapeutics: products, status of clinical trials, and future prospects. *Curr Hematol Rep.* 2003;2(6):503-10.
134. Jahr JS, Nesargi SB, Lewis K *et al.* Blood substitutes and oxygen therapeutics: an current status. *Am J Ther.* 2002;9(5):437-43.
135. Tsai A, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow R. Targeted O₂ delivery by cell-free hemoglobin: A new basis for oxygen therapeutics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285 (4): H1411-9.
136. Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, Tsai AG, Intaglietta M, Tsuchida E. Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(3): H1191-9.
137. Moore EE. Blood substitutes: The future is now. *J Am Coll Surg.* 2003;196(1):1-17.
138. Moore EE, Cheng AM, Moore HB, Masuno T, Johnson JL. Hemoglobin based oxygen carriers in trauma care: scientific rationale for the US Multicenter prehospital trial. *World J Surg* 2006;30(7):1247-57.
139. Krieter H, Hagen G, Waschke KF *et al.* Isovolemic hemodilution with a bovine hemoglobin-based oxygen carrier: effects on hemodynamics and oxygen transport in comparison with a nonoxygen-carrying volume substitute. *J Cardiothor Vasc Anesth.* 1997; 11(1):3-9.
140. Pittman RN, Miller KB, Tait PH. Effect of hemoglobin solutions as hemodilutants on capillary oxygen tension. *Adv Exp Med Biol.* 2003;510:83-8.
141. Cabrales P, Sakai H, Tsai AG *et al.* Oxygen transport by low and normal P50 hemoglobin vesicles in extreme hemodilution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(4):H1885-92.
142. Meisner FG, Kemming GI, Habler OP *et al.* Diaspirin crosslinked hemoglobin enables extreme hemodilution beyond the critical hematocrit. *Crit Care Med.* 2001;29:829-38.
143. Mullon J, Giacoppe G, Clagett C *et al.* Transfusions of polymerized bovine hemoglobin in a patient with severe autoimmune hemolytic anemia. *N Engl J Med.* 2000;342(22):1638-43.
144. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T *et al.* Surface modification of hemoglobin vesicles with Poly (ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem.* 1997;8(1):23-30.
145. Daugherty WP, Levasseur JE, Sun D *et al.* Perfluorocarbon emulsion improves oxygenation and mitochondrial function after fluid percussion brain injury in rats. *Neurosurgery.* 2004; 54 (5): 1223-30.
146. Buehler PW, Haney CR, Gulati A, Ma L, Hsia CJ. Polynitroxyl hemoglobin: a pharmacokinetic study of covalently bound nitroxides to hemoglobin platforms. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(1):124-35.

147. Dromsky DM, Fahlman A, Spiess BD. Treatment of severe decompression sickness in swine with Oxygent, a perfluorocarbon emulsion. *Aviat Space Environ Med.* 2004;75(4):301-5.
148. Teicher BA. Use of perfluorochemical emulsions in cancer therapy. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1992;20(2-4):875-82.
149. Teicher BA. Combination of perfluorochemical emulsions and carbogen breathing with cancer chemotherapy. *Artif Cells Blood Substit Immobil biotechnol* 1994;22(4):1109-20.
150. Spiess BD, Cochran RP. Perfluorocarbon emulsions and cardiopulmonary bypass: a technique for the future. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1996;10(1):83-9.
151. Mun KC, Bae JH, Suh SI *et al.* Effect of modified polyhemoglobin on the oxidative damage after ischemia-reperfusion in the liver. *Transplant Proc* 2003; 35:126-7.
152. Creteur J, Zhang H, De Backer D *et al.* Diaspirin cross-linked hemoglobin improves oxygen extraction capabilities in endotoxic shock. *J Appl Physiol.* 2000;89(4):1437-44.
153. Anton N, Hitzler JK, Kavanagh BP. Treatment of life-threatening post-haemorrhagic anaemia with cell free haemoglobin solution in an adolescent Jehovah's Witness. *Br J Haematol.* 2002; 118(4):1183-6.
154. Cothrem CC, Moore EE, Long JS, Haenel JB, Johnson JL, Ciesla DJ. Large volume polymerizes haemoglobin solution in a Jehovah's Witness following abruptio placentae. *Transfus Med.* 2004;14(3):241-6.
155. Allison G, Feeney C. Successful use of a polymerized hemoglobin blood substitute in a critically anemic Jehovah's Witness. *South Med J.* 2004;97(12):1257-8.
156. Lanzkron S, Moliterno AR, Norris EJ *et al.* Polymerized human Hb use in acute chest syndrome: a case report. *Transfusion.* 2002; 42(11):1422-7.
157. Behan M, O'Connell D, Mattrey RF, Carney DN. Perfluoro-octylbromide as a contrast agent for CT and sonography: preliminary clinical results. *AJR Am J Roentgenol.* 1993 160(2): 399-405.
158. Fruman SA, Harned RK 2nd, Marcus D *et al.* Perfluorooctyl bromide as a blood pool contrast agent for computed tomographic angiography. *Acad Radiol.* 1994 Oct;1(2):151-3.
159. Caruthers SD, Neubauer AM, Hockett FD *et al.* *In vitro* demonstration using 19F magnetic resonance to augment molecular imaging with paramagnetic perfluorocarbon nanoparticles at 1.5 Tesla. *Invest Radiol.* 2006;41(3):305-12.
160. Kluger R, Zhang J. Hemoglobin dendrimers: functional protein clusters. *J Am Chem Soc.* 2003;21;125(20):6070-1.
161. Garratty G. Progress in modulating the RBC membrane to produce transfusable universal/stealth donor RBCs. *Transfus Med Rev.* 2004;18(4):245-56.
162. Twyman LJ, Ge Y. Porphyrin cored hyperbranched polymers as heme protein models. *Chem Commun (Camb).* 2006 21; (15): 1658-60.
163. Winslow RM. alphaalpha-crosslinked Hemoglobin: was failure predicted by preclinical testing? *Vox Sang.* 2000;79 (1):1-20.
164. Keipert PE. Oxygen therapeutics ("Blood Substitutes") where are they, and what can we expect? *Adv Exp Med. Biol.* 2003; 540:207-13.

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 15/09/2006

Aceito após modificações: 21/03/2007