

Substâncias Carreadoras de Oxigênio à Base de Hemoglobina: Situação Atual e Perspectivas *

Hemoglobin-Based Blood Substitutes: Current Status and Perspectives

Pedro Paulo Tanaka, TSA¹; Maria Aparecida Almeida Tanaka²

RESUMO

Tanaka PP, Tanaka MA - Substâncias Carreadoras de Oxigênio à Base de Hemoglobina: Situação Atual e Perspectivas

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Soluções alternativas à transfusão de sangue têm sido estudadas desde a década de 50. O objetivo deste estudo é apresentar a situação atual e as perspectivas futuras das substâncias carreadoras de oxigênio à base de hemoglobina.

CONTEÚDO: São apresentadas as potenciais áreas de aplicação, bem como estudos clínicos envolvendo as principais moléculas de hemoglobina desenvolvidas, suas vantagens e limitações.

CONCLUSÕES: Vários estudos aleatórios demonstraram eficácia com o propósito de evitar ou reduzir a transfusão sanguínea; entretanto, algumas limitações existem, sendo que o futuro substituto sanguíneo deverá, no mínimo, retratar a segurança e a eficácia do sangue em si.

Unitermos: SANGUE: carreadores artificiais de oxigênio

SUMMARY

Tanaka PP, Tanaka MAA - Hemoglobin-Based Blood Substitutes: Current Status and Perspectives

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Alternatives to red blood cells transfusion have been studied since the fifties. This study aimed at presenting current status and perspectives of hemoglobin-based blood substitutes.

CONTENTS: Potential application areas are presented, in addition to clinical studies involving major hemoglobin molecules developed, their advantages and limitations.

CONCLUSIONS: Several randomized trials have shown efficacy in avoiding or decreasing red blood cells transfusions, however there are some limitations and the future blood substitute shall at least have the same safety and efficacy of blood itself.

Key Words: BLOOD, artificial oxygen carriers

INTRODUÇÃO

A pesquisa por um substituto sanguíneo ideal foi motivada principalmente pelo desejo em atenuar os principais problemas relacionados com a transfusão sanguínea: a necessidade de prova cruzada, o tempo de armazenamento relativamente curto das células sanguíneas, e a transmissão de doenças infecciosas^{1,2}. Recentemente, Schreiber e col.³, baseados em doadores sadios, analisaram o risco de transmissão de doenças. Incluíram no cálculo a possibilidade de doação durante a janela imunológica, onde os testes ainda são negativos, apresentando os seguintes resultados de risco por unidade de hemáceas transfundida:

- HIV 1/493.000;
- Hepatite B 1/63.000;
- Hepatite C 1/103.000.

Embora o risco de transmissão de infecção seja baixo, este somente será nulo quando for possível esterilizar o sangue a ser transfundido. Outro problema da transfusão alogênica está relacionado com o fenômeno de imunomodulação⁴. Como resultado, a incidência de infecções pós-operatórias é elevada nesta faixa de pacientes^{5,6}, bem como a recorrência de lesões tumorais^{7,8}.

Uma das preocupações em relação ao sangue provém do aumento da demanda em relação ao estoque. De acordo com projeções⁹ para os Estados Unidos, no ano de 2030, mantendo-se constante o número de doações, haverá uma demanda superior a 4 milhões de unidades além das coletadas. Os principais fatores envolvidos são o envelhecimento da população e o aumento da expectativa de vida. O desenvolvimento da ciência e biotecnologia em muito progrediu nestes últimos anos, entretanto ainda é incapaz de produzir o sangue artificial. Um dos motivos se deve ao fato de o sangue desempenhar importante papel em nosso organismo, tendo como principais funções¹⁰: transporte de oxigênio, energia e neuromediadores, manutenção do volume vascular, imunidade e coagulação. Por estas razões, torna-se muito difícil a preparação de um agente substituto ideal com as mesmas propriedades.

CARREADOR IDEAL PARA O OXIGÊNIO

Duas estratégias para o desenvolvimento do carreador artificial de oxigênio foram consideradas¹¹. A primeira envolve as soluções carreadoras à base de hemoglobina, em que a molécula de oxigênio está ligada ao carreador. Na segunda, a molécula de oxigênio está dissolvida na substância carreadora, representando o grupo dos perfluorocarbonos.

* Recebido do (Received from) CET/SBA do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC - UFPR), Curitiba, PR
1. Professor Adjunto da Disciplina de Anestesiologia da UFPR. Co-responsável CET/SBA do HC da UFPR
2. Anestesiologista do HC da UFPR

Endereço para correspondência (Correspondence to)
Dr. Pedro Paulo Tanaka
Rua Justiniano de Mello e Silva, 355
82530-150 Curitiba, PR
E-mail: tanaka@bsi.com.br

Apresentado (Submitted) em 10 de outubro de 2002
Aceito (Accepted) para publicação em 12 de dezembro de 2002

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2003

Características ideais para estas soluções ¹⁰:

- Universal (sem incompatibilidade);
- Isenta de desencadear alergia;
- Sem riscos de transmissão de doenças (p. ex. Vírus);
- Propriedades fisiológicas normais (p. ex. osmolaridade, viscosidade);
- Sem outras atividades que não o transporte e liberação de oxigênio;
- Longo tempo de permanência vascular;
- Capacidade de armazenamento por tempo prolongado;
- Estável a alterações de temperatura;
- Custos reduzidos na produção;
- Capacidade de produção em larga escala;

POTENCIAIS ÁREAS CLÍNICAS DE APLICAÇÃO

A maior parte dos estudos ¹²⁻¹⁴ com substitutos sangüíneos tem sido conduzidas em cirurgia cardiovascular, com o propósito primário de evitar a transfusão alogênica neste grupo de pacientes. O método visa à utilização da substância carreadora ou placebo (colóides) em combinação com doação autóloga per-operatória prévia à necessidade de transfusão sangüínea. Em outro método, o composto do estudo (ou placebo) é administrado somente quando os limites para transfusão são atingidos.

Várias aplicações ¹⁵⁻¹⁷, além da cirurgia cardíaca, têm sido descritas, entre elas a reposição e estabilização da volemia em pacientes politraumatizados; em cirurgia eletiva (ortopedia, oncologia) associada a hemodiluição normovolêmica ou como reposição volêmica per-operatória; ou em condições que necessitem do aumento do transporte de oxigênio, como na doença vascular periférica e na angioplastia.

SITUAÇÃO ATUAL

Carreadores de oxigênio à base de hemoglobina (COBH) *Hemoglobin Based Oxygen Carriers* utilizam como substrato ¹¹ a molécula de hemoglobina obtida de unidades de sangue com data de validade expirada, do sangue bovino ou obtidas por meio da engenharia genética ¹⁸.

A molécula de hemoglobina ¹⁹ é composta de quatro subunidades: duas subunidades alfa e duas subunidades beta (Figura 1).

No interior do eritrócito (Figura 2) esta formação tetramérica da molécula de hemoglobina carrega oxigênio em sua forma conhecida como oxihemoglobina. Para liberar este oxigênio, a molécula sofre uma modificação geométrica com rotação de 15 graus, passando para o estado de deoxihemoglobina. Esta modificação estrutural é facilitada pela presença de um co-fator, o 2-3 difosfoglicerato, mesmo em altas pressões parciais de oxigênio nos tecidos.

A hemoglobina livre no plasma é decomposta de sua forma tetramérica em duas subunidades diméricas ¹¹ (Figura 3). Estas subunidades deixam rapidamente a circulação, sendo eliminadas pelo rim. Savitsky e col. ²⁰ demonstraram que a hemoglobina livre de estroma apresenta efeitos adversos em relação ao sistema renal (nefrotoxicidade) e cardiovas-

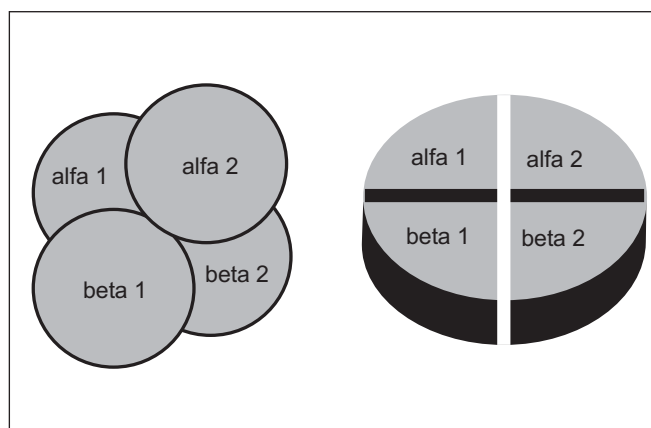


Figura 1 - Molécula de Hemoglobina

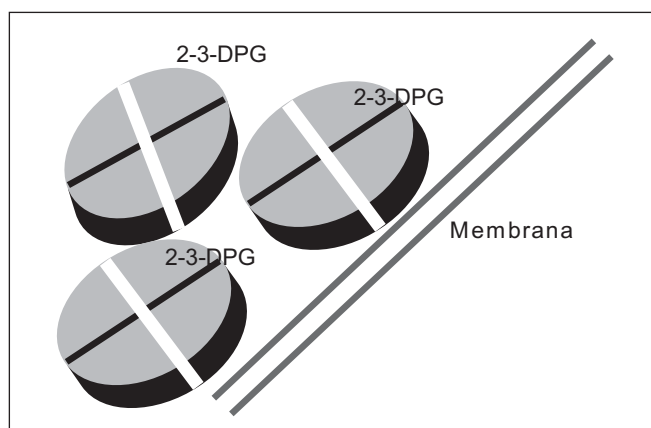


Figura 2 - Molécula de Hemoglobina no Interior do Eritrócito

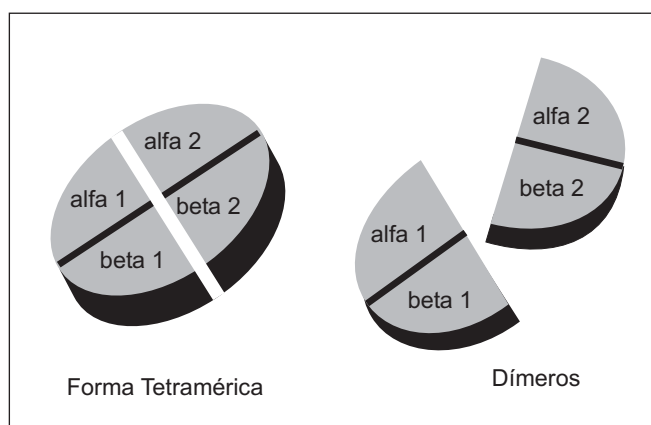


Figura 3 - Molécula de Hemoglobina no Plasma

cular (efeito vasomotor). A ausência do co-fator 2-3 DPG aumenta a afinidade da ligação entre a hemoglobina e o oxigênio, dificultando sua liberação para os tecidos. Estas foram algumas das razões pelas quais a hemoglobina livre deixou de ser utilizada como substituto sangüíneo.

Para evitar as inconveniências descritas com a hemoglobina livre, e com intuito de obter um substituto sangüíneo ideal, a molécula de hemoglobina foi modificada para prolongar seu tempo de meia vida intravascular, diminuir a eliminação renal, e manter a afinidade normal pelo oxigênio¹¹. As modificações apresentadas foram: ligação intramolecular, conjugação ou polimerização da molécula de hemoglobina²¹.

Ligação Intramolecular da Hemoglobina

A estrutura tetramérica da hemoglobina é mantida por meio de uma ponte intramolecular através da ligação entre as cadeias alfa ou beta²² (Figura 4).

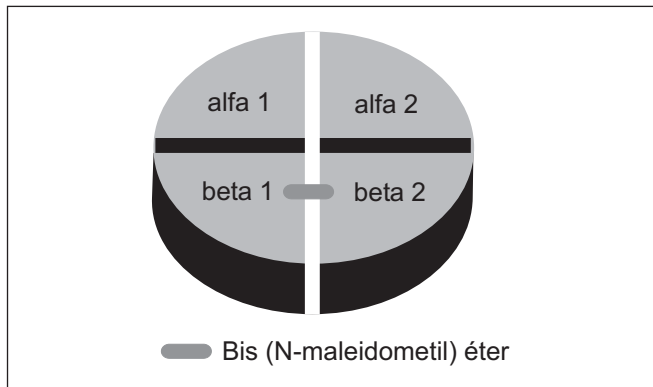


Figura 4 - Ligação Intramolecular entre as Cadeias Beta

A diaspirina ligada à hemoglobina *Diaspirin Cross-Linked Hemoglobin* (DCLHb) é uma hemoglobina humana tetramérica com ligação entre as cadeias alfa. Em estudo²³ envolvendo 209 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, foi demonstrado que, embora os pacientes do grupo DCLHb apresentassem menor índice de transfusão nos primeiros 7 dias (19% vs 0%), não houve diferença significativa no número de unidades de sangue administrada. Os pacientes tratados com DCLHb apresentaram maior incidência de eventos adversos (elevados níveis de pressões sistêmicas e pulmonares, icterícia, aumento de enzimas hepáticas e pancreáticas, anemia e hematúria) que os do grupo controle, não havendo diferença em relação à mortalidade.

A solução de DCLHb foi comparada à infusão de solução fisiológica em volumes equivalentes durante a reanimação inicial em pacientes politraumatizados²⁴. Um percentual significativo de pacientes do grupo DCLHb (46%) foi a óbito até o 28º dia contra 17% do grupo que recebeu solução fisiológica. A principal causa foi relacionada ao aumento da pressão arterial no grupo tratado com DCLHb, fato corroborado por outros estudos^{25,26}, inclusive com aumento do consumo de oxigênio²⁷. O laboratório responsável pelo desenvolvimento do produto anunciou em setembro de 1998 o término das pesquisas clínicas envolvendo a DCLHb²⁸.

Hemoglobina Conjugada

A hemoglobina conjugada é formada por meio da ligação entre a hemoglobina livre e polímeros solúveis¹⁹ (p. ex: dextran, polietileno glicol) (Figura 5).

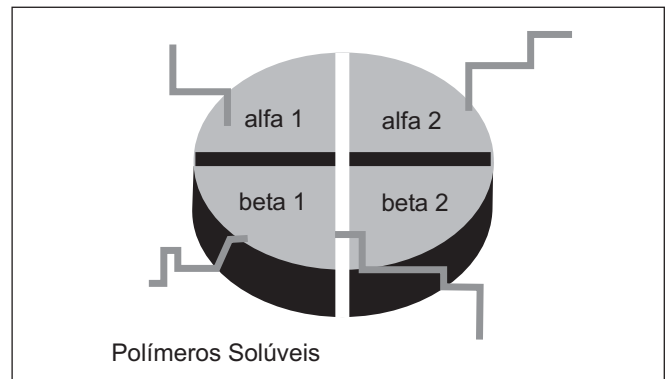


Figura 5 - Hemoglobina Conjugada

A hemoglobina de origem bovina conjugada ao polietileno glicol (PEG) está sendo estudada na terapia do câncer com a finalidade de aumentar a oxigenação do tumor e com isto melhorar a eficácia da radiação e quimioterapia. Serna e col.²⁹ relataram que a PEG hemoglobina apresenta potencial para estudo como componente da solução de preservação do coração. Outros estudos³⁰⁻³² que envolvem modelo de ressuscitação após choque hemorrágico em animais revelaram as mesmas inconveniências descritas anteriormente com as outras soluções carreadoras à base de hemoglobina.

Poliemoglobinas

A criação de uma ligação covalente³³, formando uma ponte entre os dímeros da hemoglobina, auxiliou na prevenção ou retardo em sua dissociação. A polimerização da molécula de hemoglobina foi possível por meio da ligação glutaraldeído entre as moléculas de hemoglobina¹⁹. Adição de um análogo do 2,3 DPG, o piridoxal fosfato, à molécula de hemoglobina aumentou a P50 favorecendo a liberação de oxigênio para os tecidos³⁴ (Figura 6).

Entre as polihemoglobinas, podem-se destacar:

- Polihemoglobina pirodoxilada humana - PolyHeme®;
- Polihemoglobina bovina - Hemopure®;
- Polihemoglobina humana - Hemolink®.

Poliemoglobina Pirodoxilada Humana

PolyHeme® é uma solução modificada da hemoglobina proveniente de sangue estocado. A hemoglobina é extraída do eritrócito e filtrada para remover as impurezas. A purificação é feita quimicamente através de um processo que visa criar a

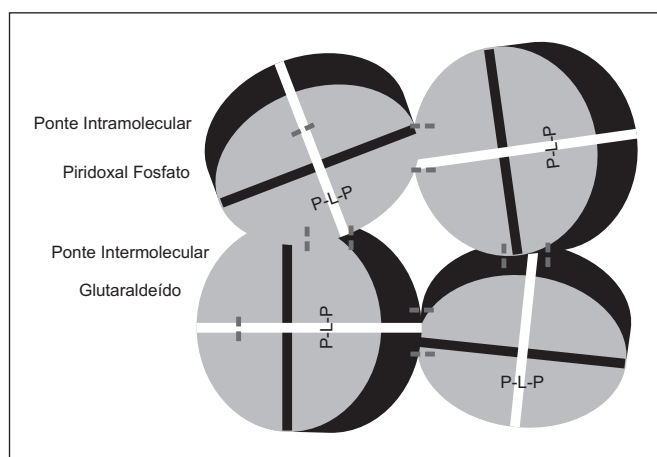


Figura 6 - Estrutura da Polihemoglobina

forma polimerizada da molécula, evitando com isto os efeitos indesejáveis da fração livre, entre eles a vasoconstrição e a disfunção renal. A hemoglobina modificada é então incorporada a uma solução para poder ser administrada como alternativa ao sangue. Uma unidade da solução contém 50 gramas de hemoglobina modificada, aproximadamente a mesma quantidade de uma unidade de concentrado de hemáceas³⁵.

Em estudo³⁶ que teve como objetivo comparar os benefícios terapêuticos do PolyHeme[®] em relação à transfusão alogênica, foram selecionados 44 pacientes, com idades que variavam entre 19 e 75 anos, vítimas de lesão traumática. Os pacientes receberam concentrado de hemáceas ou até 6 unidades de PolyHeme[®] para reposição sangüínea após o trauma ou durante a cirurgia de emergência. Os níveis de circulantes de hemoglobina, durante e após perda volêmica, foram mantidos com PolyHeme[®], sendo sugerida sua utilização clínica como substituto sangüíneo nestas condições.

Os mediadores biológicos apresentam potencial para exacerbar a resposta inflamatória pós-trauma e a falência múltipla de órgãos. O volume de sangue transfundido foi postulado como um fator de risco independente³⁷. Diante deste fato, a infusão de até 20 unidades de PolyHeme[®] foi comparada ao sangue estocados em pacientes politraumatizados que necessitaram de transfusão³⁸. Como resultado, houve uma menor sensibilização dos neutrófilos no grupo que recebeu PolyHeme[®], propiciando uma explicação para a menor incidência ou gravidade da síndrome da falência múltipla de órgãos.

A polihemoglobina piridoxilada humana após completar a Fase III dos estudos clínicos aguarda a aprovação pelo órgão regulamentar americano *Federal Drug Administration* (FDA), para comercialização como substituto sangüíneo em situações de perda volêmica aguda, principalmente no trauma.

Poliemoglobina Bovina

A hemoglobina polimerizada bovina³⁹ *Polymerized Bovine Hemoglobin-Based Oxygen-Carrying* (HBOC 201) é uma solução estéril purificada de eritrócito bovino. Cada unidade

contém 30 gramas de hemoglobina polimerizada, equivalente a aproximadamente metade do conteúdo de hemoglobina de uma unidade de concentrado de hemáceas. Apresenta meia-vida circulante em torno de 9 a 24 horas, menor afinidade ao oxigênio ($p50 = 34$ mmHg), podendo ser armazenada em temperatura ambiente por até dois anos.

Uma das preocupações com o uso de um produto animal é a disseminação de doenças cuja forma de transmissão ainda é desconhecida. Epidemias recentes levantaram a suspeita de uma possível transmissão de agentes infecciosos por meio da ingestão de tecidos infectados (ou sangue)⁴⁰. A erradicação do rebanho bovino no Reino Unido, em 1996, foi realizada para prevenir o possível desenvolvimento da forma humana da encefalopatia espongiforme bovina. Entretanto, o laboratório responsável pela produção do Hemopure[®] afirma possuir métodos seguros de purificação⁴⁰.

A HBOC 201 - Hemopure[®] foi avaliada em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca¹⁴ e vascular⁴¹. Nos pacientes submetidos à revascularização do miocárdio, a transfusão sangüínea foi evitada em 34% contra 0% no grupo controle. A quantidade de unidades transfundidas foi significativamente menor no grupo que recebeu HBOC. No grupo de pacientes vasculares, os resultados referentes ao número de unidades transfundidas foi semelhante. A segurança e os eventos adversos relatados sugerem menor efeito vasoconstritor e aumento dose-dependente nas concentrações de bilirrubina não conjugada.

Estudos⁴²⁻⁴⁴ pré-clínicos envolvendo a ressuscitação hipovolêmica em modelo animal sugerem que o uso de Hemopure[®] restaura rapidamente a função cardiovascular, o que permite suficiente perfusão tissular e transporte de oxigênio. Outros autores⁴⁵ relataram que o Hemopure[®] foi bem tolerado em doses de até $2,5 \text{ g.kg}^{-1}$. O estudo envolveu 55 pacientes submetidos a diversos procedimentos cirúrgicos. Administração do HBOC-201 foi associada a um aumento dose dependente da concentração plasmática de metahemoglobina atingindo 7,1% nos pacientes que receberam a maior quantidade do produto. Entretanto, embora bem tolerado, não houve diferença no número de unidades de sangue autólogo administrado aos pacientes.

Jahr e col.⁴⁶ demonstraram em pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas uma redução na transfusão em 59,4% no grupo Hemopure[®] 42 dias após a cirurgia. Este percentual alcançou 96,3% dos pacientes no dia da cirurgia. Estes resultados, segundo os autores, significam a efetividade do composto em eliminar a necessidade de transfusão em um grande percentual de pacientes submetidos à cirurgias ortopédicas. A Biopure solicitou ao FDA autorização para a comercialização do Hemopure com a finalidade de tratamento de sinais e sintomas de anemia aguda em pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas, bem como eliminar, postergar ou reduzir a necessidade de transfusão autóloga neste grupo de pacientes.

Poliemoglobina Humana

Hemolink[®] - é uma o-Rafinose ligada à hemoglobina humana proveniente de sangue com validade expirada. Apresenta

meia-vida entre 14 e 20 horas, podendo ser armazenada a 4 °C por aproximadamente um ano.

Em estudo⁴⁷ fase II, 60 pacientes submetidos à revascularização do miocárdio receberam Hemolink® (até 1000 ml) ou colóide associados à doação autóloga per-operatória. O efeito colateral mais freqüente foi o aumento da pressão arterial, sendo no conjunto bem tolerada. Houve redução significativa no número de pacientes que necessitaram de transfusão sangüínea no grupo Hemolink®, em relação ao grupo controle até o quinto dia de pós-operatório (10% vs 46,7%; p < 0,0034).

A fase III dos estudos⁴⁸ foi completada no Canadá e Reino Unido, onde 299 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca receberam 750 ml do produto. Os resultados sugerem um perfil favorável em relação a segurança e eficácia. Hemolink® surge como uma importante alternativa à transfusão alogênica de sangue em razão da facilitação da doação autóloga per-operatória em cirurgias cardíacas⁴⁹. A aprovação clínica do produto foi solicitada no Canadá, ainda que dois estudos em cirurgia cardíaca (uso de altas doses em cirurgias primária e doses regulares em re-operações) estejam em andamento conjunto entre Estados Unidos e Reino Unido.

LIMITAÇÕES DAS SOLUÇÕES CARREADORES DE OXIGÊNIO

Algumas limitações em relação às soluções existentes ainda persistem, entre elas pode-se destacar:

- Auto-oxidação rápida e irreversível para metahemoglobina com nível máximo ocorrendo entre o segundo e terceiro dia pós infusão, podendo atingir até 30%. O efeito é geralmente passageiro, dependendo da eliminação pelo sistema reticuloendotelial⁵⁰;
- A meia-vida intravascular curta na maioria das soluções, não ultrapassando 24 horas;
- Efeito vasoconstritor - o óxido nítrico possui importante papel no controle do tônus vascular, promovendo vasodilatação e conseqüente redução da pressão arterial pelo relaxamento da musculatura lisa vascular⁵⁰. Alguns autores atribuem este efeito aos carreadores de oxigênio a base de hemoglobina por sua afinidade química ao óxido nítrico liberado pelo endotélio vascular⁵¹ (Figura 7). A ligação do carreador do óxido nítrico aumenta a sensibilidade da endotelina, alterando a regulação dos receptores alfa-adrenérgicos; Stamper e col.⁵² demonstraram o papel da molécula de hemoglobina no transporte e atividade do óxido nítrico (ON). A deoxihemoglobina no pulmão se ligaria ao oxigênio e a uma forma de ON, potencializando com isto sua oferta de oxigênio para os tecidos. A hemoglobina no interior do eritrócito teria função de transporte e disseminação do ON (Figura 8). Esta nova função sugerida, desde que confirmada por outros estudos, deverá repercutir no desenvolvimento de novas pesquisas com os substitutos sangüíneos.

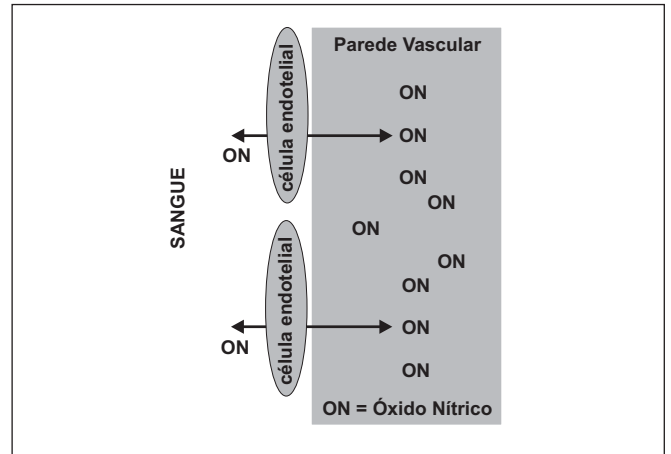


Figura 7 - Efeito Vasoconstritor

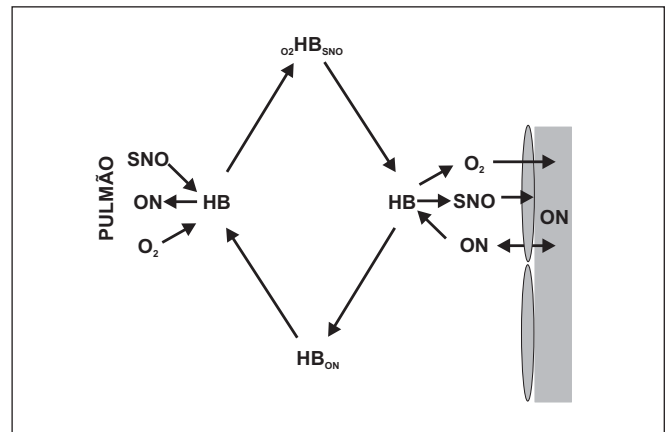


Figura 8 - Transporte de Óxido Nítrico pela Hemoglobina

- O radicais livres - A biodistribuição e o metabolismo dos COBH ainda não é bem conhecida. São depositados no sistema retículo endotelial do fígado, baço e outros tecidos. Uma vez armazenada, a hemoglobina sofre um processo com produção de radicais tóxicos⁵³. A falta de suprimento de oxigênio causa isquemia tissular, aumentando a produção de hipoxantina. Logo após a reperusão, a xantina oxidase converte a hipoxantina em superóxidos, que por vários mecanismos resultam na formação de radicais livres de oxigênio, causando lesão tecidual. As enzimas eritrocitárias, através da conversão destes superóxidos em peróxido de hidrogênio, auxiliam na prevenção da lesão tecidual⁵⁴ (Figura 9). Para evitar estes problemas com os novos agentes, foram incorporadas substâncias com propriedades antioxidantes⁵⁷.

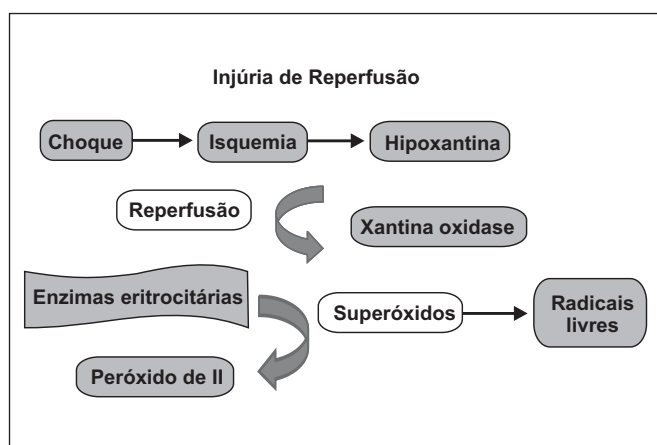


Figura 9 - Mecanismo Esquemático da Injúria de Reperusão

VANTAGENS DAS SOLUÇÕES CARREADORES DE OXIGÊNIO

Podem-se destacar: 1) virtualmente, não transmitirem doenças; 2) não há necessidade de prova cruzada por serem destituídas de antígenos; 3) apresentam um tempo de armazenamento prolongado; 4) possuem p50 próximo ao fisiológico; 5) possuem mínimo efeito na coagulação; 6) a menor viscosidade e tamanho molecular favorecem a distribuição de oxigênio na microcirculação.

CONCLUSÃO

Vários estudos aleatórios demonstraram eficácia com o propósito de evitar ou reduzir a transfusão sanguínea. Alguns problemas ainda permanecem, as soluções à base de hemoglobina possuem capacidade suficiente para carrear oxigênio; no entanto, estão limitadas por sua meia-vida curta e toxicidade. Novos estudos serão necessários para esclarecer o papel dos substitutos sanguíneos em situações clínicas como o trauma. O futuro substituto sanguíneo deverá, no mínimo, retratar a segurança e a eficácia do sangue em si.

Hemoglobin-Based Blood Substitutes: Current Status and Perspectives

Pedro Paulo Tanaka, TSA, M.D.; Maria Aparecida Almeida Tanaka, M.D.

INTRODUCTION

The search for an optimal blood substitute was primarily motivated by the desire of attenuating major blood transfusion-related problems: need for cross test, relatively short storing time of blood cells, transmission of infectious diseases^{1,2}. Recently, Schreiber et al.³, based on healthy donors, have analyzed the risk for disease transmission. They have in-

cluded in their computation the likelihood of donation during the immune window in which tests are still negative and have reached the following risk results by unit of transfused red blood cells:

- HIV 1/493,000;
- Hepatitis B 1/63,000;
- Hepatitis C 1/103,000.

Although there is a low infection transmission risk, it will only be null when blood to be transfused could be sterilized. Another allogenic transfusion problem is related to the immune-modulation phenomenon⁴. As a result, there is a high incidence of postoperative infections in this range of patients^{5,6}, as well as recurrence of tumor lesions^{7,8}.

One concern with blood is a function of the increased demand as compared to stocks. According to USA projections⁹ for the year 2030, if the number of donors is kept constant there will be a demand exceeding 4 million units in addition to collected units. Major factors involved are population aging and increased life expectation.

Science and biotechnology have progressed in recent years, but there is still no artificial blood. One of the reasons is that blood plays an important role in our body, having as major functions¹⁰: oxygen, energy and neuromediators transport, maintenance of vascular volume, immunity and coagulation. For those reasons, it is very cumbersome to prepare an optimal substitute with the same properties.

IDEAL OXYGEN CARRIER

Two strategies to develop an artificial oxygen carrier were considered¹¹. The first involves hemoglobin-based carrier solutions, where the oxygen molecule is bound to the carrier. In the second, the oxygen molecule is dissolved in the carrier solution, representing the perfluorocarbon group. Ideal characteristics for such solutions would be¹⁰:

- Universality (w/o incompatibilities);
- Not triggering allergies;
- No risk for disease transmission (ex. viruses);
- Normal physiological properties (ex. osmolarity, viscosity);
- With no activity except oxygen transportation and release;
- Long vascular permanence time;
- Prolonged storing time;
- Stable to temperature variations;
- Low production costs;
- Large-scale production.

POTENTIAL APPLICATION AREAS

Most blood substitutes studies¹²⁻¹⁴ have been carried out in cardiovascular surgeries with the primary purpose of avoiding allogenic transfusion in this group of patients. The method aims at using a carrier substance or placebo (colloids) in combination with perioperative autologous donation previous to the need for blood transfusion. In a different method, the

compound (or placebo) is administered only when blood transfusion thresholds are reached.

Several applications¹⁵⁻¹⁷ in addition to heart surgeries have been described, among them volume replacement and stabilization in polytraumatized patients; in elective surgeries (orthopedics, oncology) associated to normovolemic hemodilution or as perioperative volume replacement; or in conditions requiring increased oxygen transportation, such as peripheral vascular disease and angioplasty.

CURRENT STATUS

Hemoglobin-based oxygen carriers (HBOC) use as substrate the hemoglobin molecule obtained from expired blood units, from bovine blood or obtained via genetic engineering¹⁸.

Hemoglobin molecules¹⁹ are composed of four subunits: two alpha subunits and two beta subunits (Figure 1).

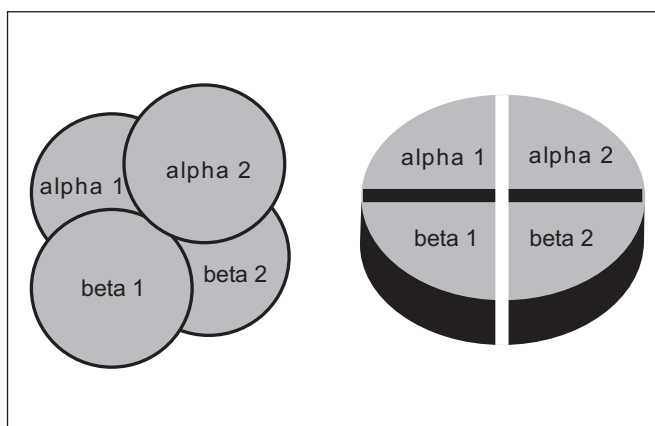


Figure 1 - Hemoglobin Molecule

This tetrameric formation (Figure 2) of hemoglobin molecules carries oxygen in the erythrocytes, in its form known as oxyhemoglobin. To release this oxygen, the molecule undergoes a geometric change with 15-degree rotation and becoming deoxyhemoglobin. This structural change is helped by a co-factor - 2-3 diphosphoglycerate - even at high oxygen partial pressures in tissues.

Free plasma hemoglobin is decomposed into two dimeric subunits¹¹ (Figure 3). These subunits promptly leave circulation being excreted by the kidney. Savitsky et al.²⁰ have shown that stroma-free hemoglobin has adverse effects in renal (nephrotoxicity) and cardiovascular (vasomotor effect) systems. The absence of the 2-3 DPG factor increases binding affinity between hemoglobin and oxygen, making difficult its release to tissues. These are some reasons why free hemoglobin is no longer used as blood substitute.

To prevent inconveniences described with free hemoglobin and aiming at obtaining an optimal blood substitute, hemoglobin molecule was modified to prolong its intravascular half-life, decrease renal excretion and maintain normal oxygen affinity¹¹. Changes were: intramolecular binding, hemoglobin molecule conjugation or polymerization²¹.

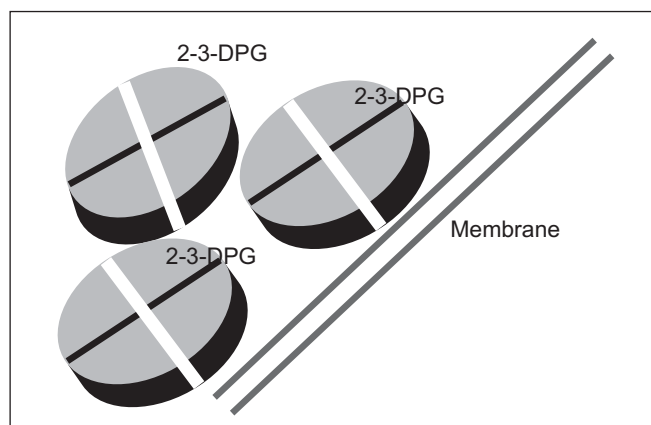


Figure 2 - Hemoglobin Molecule Inside the Erythrocyte

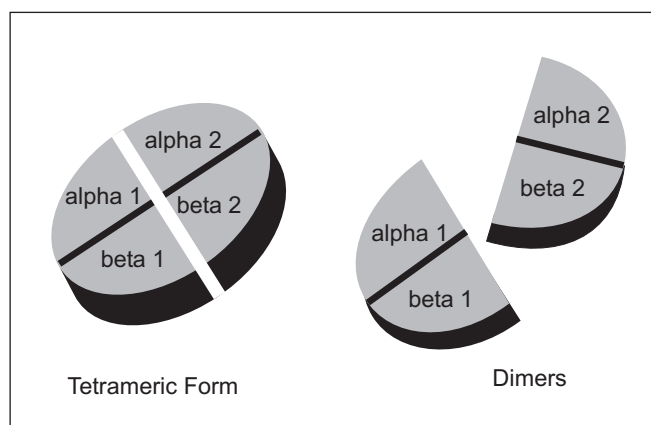


Figure 3 - Hemoglobin Molecule in Plasma

INTRAMOLECULAR HEMOGLOBIN BINDING

An intramolecular bridge maintains tetrameric hemoglobin structure through the binding to alpha or beta chains²² (Figure 4).

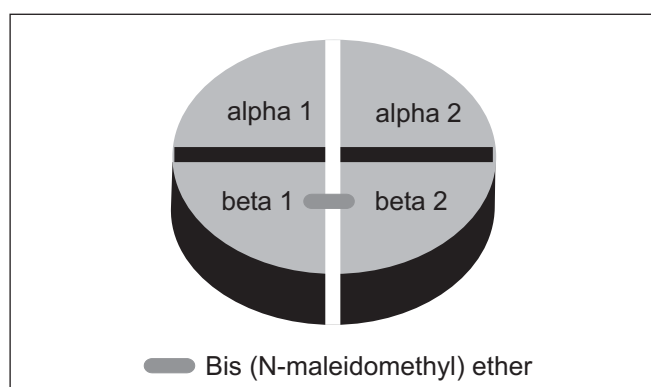


Figure 4 - Intramolecular Binding to Beta Chains

Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) is a human tetrameric molecule that binds to alpha chains. In a study²³ involving 209 patients submitted to heart surgery, it was shown that although DCLHb group patients had a lower transfusion rate in the first 7 days (19% versus 0%), there were no significant differences in the number of blood units transfused. Patients treated with DCLHb had a higher incidence of adverse events (high systemic and pulmonary pressure, jaundice, increased liver and pancreas enzymes, anemia and hematuria) as compared to the control group, without difference in mortality rate.

DCLHb was compared to saline solution infused in equivalent volumes during initial resuscitation in polytraumatized patients²⁴. A significant percentage of DCLHb group patients (46%) died in 28 days as compared to 17% of the group receiving saline solution. Major cause was related to increased blood pressure in the DCLHb group, fact which was confirmed by other studies^{25,26}, even with increased oxygen consumption²⁷. The laboratory in charge of developing the product has announced in September 1998 the end of DCLHb-related trials²⁸.

CONJUGATED HEMOGLOBIN

Conjugated hemoglobin is formed by the binding of free hemoglobin to soluble polymers¹⁹ (ex.: dextran, polyethylene glycol) (Figure 5).

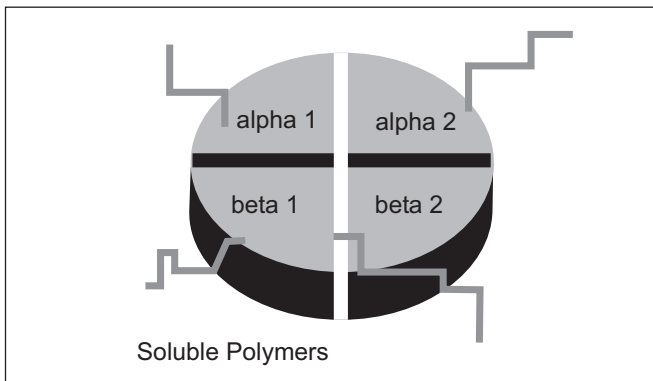


Figure 5 - Conjugated Hemoglobin

Bovine hemoglobin conjugated to polyethylene glycol (PEG) is being studied to treat cancer aiming at increasing tumor oxygenation, thus improving radio and chemotherapy efficacy. Serna et al.²⁹ have reported that PEG hemoglobin has potential to be studied as a component of heart preservation solution. Other studies³⁰⁻³² involving resuscitation after hemorrhagic shock in animals have observed the same inconveniences previously described for other hemoglobin-based carrier solutions.

Polyhemoglobins

The development of a covalent binding³³ forming a bridge between hemoglobin dimers has helped in the prevention or de-

lay of its dissociation. Hemoglobin molecule polymerization was possible through the glutaraldehyde binding among hemoglobin molecules¹⁹. The addition of a 2,3 DPG analog - pyridoxal phosphate - to hemoglobin molecules has increased P50 favoring oxygen release to tissues³⁴ (Figure 6).

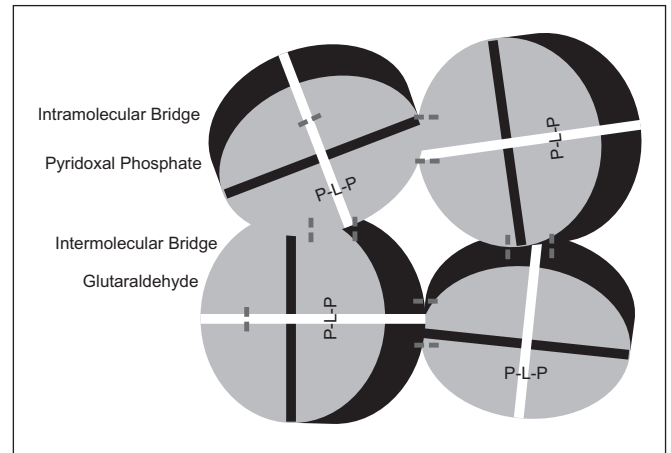


Figure 6 - Polyhemoglobin Structure

Major polyhemoglobins are:

- Human pyridoxilated polyhemoglobin - PolyHeme[®]
- Bovine polyhemoglobin - Hemopure[®];
- Human polyhemoglobin - Hemolink[®].

Human Pyrodoxilated Polyhemoglobin

PolyHeme[®] e is a modified hemoglobin solution obtained from stored blood. Hemoglobin is extracted from the erythrocyte and filtered to remove impurities. Purification is chemical through a process aiming at creating a polymerized molecule, thus avoiding undesirable effects of the free fraction, among them vasoconstriction and renal dysfunction. Modified hemoglobin is then incorporated to a solution to be administered as blood substitute. One solution unit contains 50 grams of modified hemoglobin, approximately the same amount of a red cell concentrate unit³⁵.

In a study³⁶ comparing PolyHeme[®] therapeutic benefits as compared to allogenic transfusion, 44 patients, aged 19 to 75 years, victims of trauma injuries were selected. Patients received red cell concentrate or up to 6 PolyHeme[®] units for blood replacement after trauma or during emergency surgery. Circulating hemoglobin levels during and after volume loss were maintained with PolyHeme[®], being suggested its clinical use as blood substitute in such conditions.

Biological mediators have potential to worsen post-trauma inflammatory response and multiple organ failure. Transfused blood volume was considered an independent risk factor³⁷. After this fact, the infusion of up to 20 PolyHeme[®] units was compared to stored blood in polytraumatized patients needing transfusion³⁶. The result was less neutrophils sen-

sitization in the group receiving PolyHeme[®] explaining the lower incidence or severity of multiple organ failure syndrome.

Human pyridoxilated hemoglobin, after completion of Phase III studies is waiting for the FDA approval to be commercialized as blood substitute in situations of acute volume loss, especially trauma.

Bovine Polyhemoglobin

Polymerized Bovine Hemoglobin-based Oxygen Carrier³⁹ (HBOC 201) is a sterile solution purified from bovine erythrocytes. Each unit contains 30 grams of polymerized hemoglobin, equivalent to approximately half the hemoglobin content of one red cell concentrate unit. Its circulating half-life is 9 to 24 hours, with lower oxygen affinity ($p50 = 34$ mmHg) and may be stored at room temperature for up to 2 years.

A concern with the use of animal products is the spread of diseases with unknown transmission pathways. Recent epidemics have raised the suspicion of a possible transmission of infectious agents through the ingestion of infected tissues (or blood)⁴⁰. Bovine herd eradication in the United Kingdom in 1996 aimed at preventing a possible development of the human form of bovine spongiform encephalopathy. However, the laboratory in charge of developing Hemopure[®] states having safe purifying methods⁴⁰.

HBOC 201 - Hemopure[®] was evaluated in patients submitted to heart¹⁴ and vascular⁴¹ surgeries. Transfusion was prevented in 34% of patients submitted to myocardial revascularization, as compared to 0% in the control group. The number of transfused units was significantly lower in the group receiving HBOC. Similar results were obtained in the group submitted to vascular surgeries. Reported safety and adverse events suggest a lower vasoconstrictor effect and dose-dependent increase in non-conjugated bilirubin concentrations.

Preclinical studies involving hypovolemic resuscitation in animal models suggest that Hemopure[®] promptly restores cardiovascular function allowing satisfactory tissue perfusion and oxygen transportation.

Other authors⁴⁵ have reported that Hemopure[®] was well tolerated in doses up to $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The study involved 55 patients submitted to several surgical procedures. HBOC-201 administration was associated to a dose-dependent increase in methemoglobin plasma concentration reaching 7.1% in patients receiving higher doses of the product. However, although well tolerated, there were no differences in the number of autologous blood units transfused to patients.

Jahr et al.⁴⁶ have shown, in patients submitted to orthopedic surgeries, 59.4% decrease in transfusions in the Hemopure[®] group 42 days after surgery. This ratio has reached 96.3% in the day of the surgery. According to the authors, these results reflect the efficacy of the compound in eliminating the need for transfusion in a large number of patients submitted to orthopedic surgeries.

Biopure has asked FDA's authorization to commercialize Hemopure to treat signs and symptoms of acute anemia in

patients submitted to orthopedic surgeries, in addition to eliminating, delaying or decreasing the need for blood transfusion in this group of patients.

Human Polyhemoglobin

Hemolink[®] is an o-Rafinose bound to human hemoglobin extracted from validity overcome blood. Its half-life is 14 to 20 hours and may be stored at 4 °C for approximately 1 year. In a phase II study⁴⁷, 60 patients submitted to myocardial revascularization have received Hemolink[®] (up to 1000 ml) or colloids associated to perioperative autologous donation. Most frequent side-effect was increased blood pressure, being in general well tolerated. There has been a significant decrease in the number of patients needing blood transfusion in the Hemolink[®] group as compared to the control group until the 5th postoperative day (10% vs. 46.7%; $p < 0.0034$). Phase III studies⁴⁸ were completed in Canada and the United Kingdom where 299 patients submitted to heart surgery received 750 ml of the product. Results suggest a favorable profile in terms of safety and efficacy. Hemolink[®] is emerging as a major alternative for allogenic blood transfusion for helping perioperative autologous donation in heart surgeries⁴⁹. Clinical approval was requested in Canada although there are still two heart surgery studies going on jointly by the USA and the UK (high doses in primary surgeries and regular doses in re-operations).

LIMITATIONS TO THE USE OF OXYGEN-CARRIERS

There are still some limitations to existing solutions, among them:

- a) Fast and irreversible methemoglobin auto-oxidation reaching its peak 2 to 3 days after infusion and reaching up to 30%. In general, this is a transient effect dependent on reticuloendothelial system excretion⁵⁰;
- b) Short intravascular half-life for most solutions, not exceeding 24 hours;
- c) Vasoconstrictor effect - nitric oxide plays an important role in controlling vascular tone promoting vasodilation and consequent blood pressure decrease by vascular smooth muscles relaxation⁵⁰. Some authors attribute this effect to hemoglobin-based oxygen carriers due to their chemical affinity to nitric oxide released by the vascular endothelium⁵¹ (Figure 7). Nitric oxide carrier binding increases endothelin sensitivity changing alpha-adrenergic receptors regulation. Stampler et al.⁵² have shown the role of hemoglobin molecules in nitric oxide (NO) transportation and activity. Lung deoxyhemoglobin would bind to oxygen and to a form of NO, thus potentiating the offering of oxygen to tissues. Hemoglobin inside erythrocytes would transport and spread NO (Figure 8). This new suggested function, provided it is confirmed by other studies, shall foster the development of new studies with blood substitutes;

d) Free radicals - COBH biodistribution and metabolism are still not well known. They are deposited in liver, spleen and other tissue reticulo-endothelial systems. Once stored, hemoglobin undergoes a process producing toxic free radicals⁵³.

The lack of oxygen leads to tissue ischemia increasing hypoxanthine production. Soon after reperfusion, xanthine oxidase converts hypoxanthine into superoxides which, through different mechanisms, result in oxygen free radicals leading to tissue damage. Erythrocyte enzymes help preventing tissue damage by converting those superoxides into hydrogen peroxide⁵⁴ (Figure 9). Substances with antioxidant properties were incorporated to new agents to prevent such problems⁵⁷.

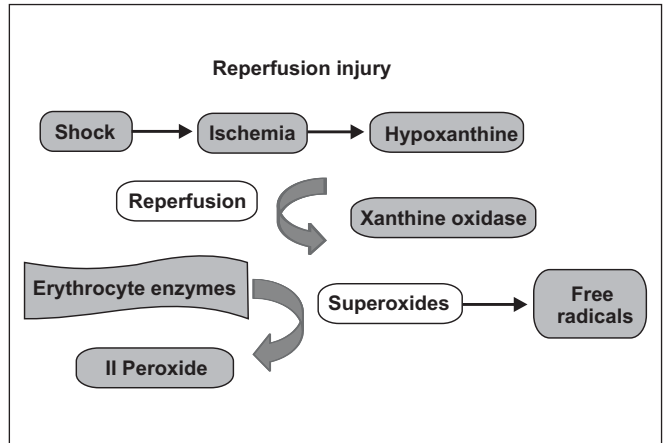


Figure 9 - Reperfusion Injury Schematic Mechanism

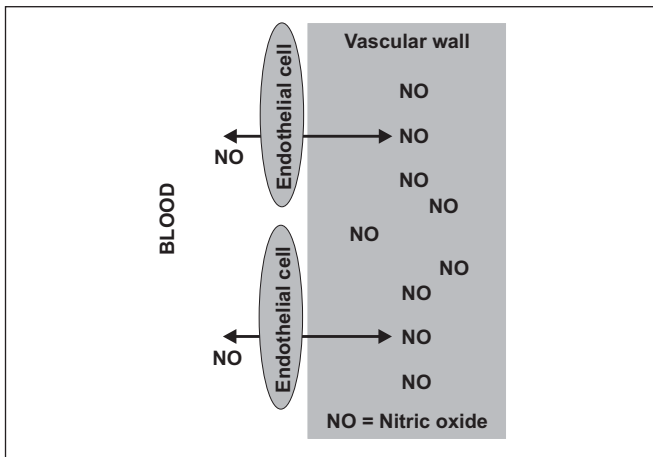


Figure 7 - Vasoconstrictor Effect

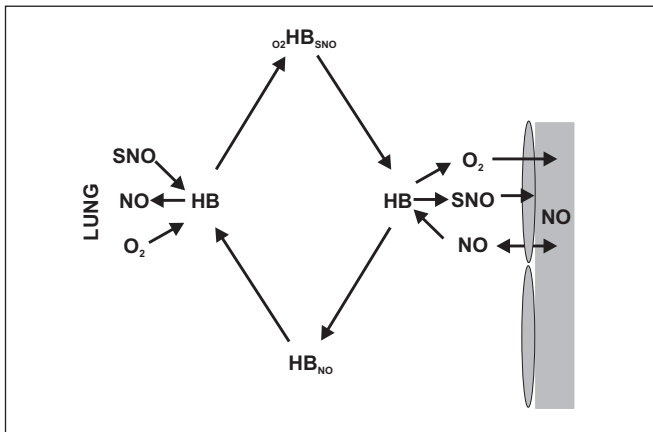


Figure 8 - Hemoglobin Nitric Oxide Transportation

ADVANTAGES OF OXYGEN-CARRIERS

One may highlight the fact that they virtually transmit no disease; there is no need for cross-test because they have no antigens; they have a prolonged storage time; their P50 is close to physiological P50; there is a minor effect in coagula-

tion and their lower viscosity and molecular weight favor oxygen distribution in the microcirculation.

CONCLUSION

Several randomized studies have shown efficacy in decreasing or avoiding blood transfusion. Some problems still remain: hemoglobin-based solutions are able to carry oxygen, but are limited by their short half-life and toxicity. Further studies are needed to explain the role of blood substitutes in clinical situations such as trauma. The blood substitute of the future shall at least mirror safety and efficacy of blood itself.

REFERÊNCIAS - REFERENCES

01. Goodnough LT, Brecher ME, Kanter MH et al - Transfusion Medicine: first of two parts - blood transfusion. N Engl J Med, 1999; 340:438-447.
02. Goodnough LT, Brecher ME, Kanter MH et al - Transfusion Medicine: second of two parts - blood conservation. N Engl J Med, 1999;340:525-533.
03. Schreiber GB, Busch MP, Korelitz JT et al - The risk of transfusion transmitted viral infections. N Engl J Med, 1996;334: 1685-1690.
04. Klein HG - Immunomodulatory aspects of transfusion. Anesthesiol, 1999;91:861-865.
05. Innerhofer P, Walleczek C, Luz G et al - Transfusion of buffy coat-depleted blood component and risk of postoperative infection in orthopedic patients. Transfusion, 1999;39:625-632.
06. Houbiers JG, van de Velde CJ, Hermans J et al - Transfusion of red cells is associated with increased incidence of bacterial infection after colorectal surgery: A prospective study. Transfusion, 1997;37:126-134.
07. Amato AC, Pescatori M - Effect of perioperative blood transfusions on recurrence of colorectal cancer: meta-analysis stratified on risk factors. Dis Colon Rectum, 1998;41:570-585.
08. Vamvakas EC - Transfusion-associated cancer recurrence and postoperative infection: Meta-analysis of randomized, controlled trials. Transfusion, 1996;36:175-186.
09. Vamvakas EC, Taswell HF - Epidemiology of blood transfusion. Transfusion, 1994;34:464-470.
10. Vuylsteke A - Artificial blood substitutes - benefits and risks. SCA Annual Meeting, 2001;144-147.

11. Remy B, Deby-Dupont G, Lamy ML - Red blood cell substitutes: fluorocarbon emulsions and hemoglobin solutions. *Br Med Bull*, 1999;55:277-298.
12. Lamy ML, Daily EK, Larbuisson RP et al - Randomized trial of diaspirin cross-linked hemoglobin solution as an alternative to blood transfusion after cardiac surgery. *Anesthesiol*, 2000;92:646-656.
13. Mazer CD, Cheng DCH, Belo SE et al - Oxygen supply and demand in patients undergoing CABG surgery using intraoperative autologous donation with Hemolink® and Pentaspan. *Anesthesiol*, 2000;93:A195.
14. Levy JR, Goodnough LT, Greilich P et al - A room-temperature stable hemoglobin (HBOC-201) eliminates allogenic red blood cell transfusion in post-operative cardiac surgery patients. *Circulation*, 1998;98:I-132.
15. Vlahakes GJ - Haemoglobin solutions in surgery. *Br J Surg*, 2001;88:1553-1555.
16. Goodnough LT, Scott MG, Monk TG - Oxygen carriers as blood substitutes - past, present and future. *Clin Orth Rel Research*, 1998;398:89-100.
17. Chang TMS - Why do We Need Blood Substitutes? em: Chang TMS - Blood Substitutes - volume I - Principles, Methods, Products and Clinical Trials, Basel, S. Karger AG, 1997;1:3-8.
18. Shoemaker SA, Gerber MJ, Evans GL et al - Initial clinical experience with a rationale designed genetically engineered recombinant human Hb. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1994;22:457-465.
19. Chang TMS - What are Modified Hemoglobin Blood Substitutes? em: Chang TMS - Blood Substitutes, Principles, Methods, Products and Clinical Trials, Basel, S. Karger AG, 1997;1:9-31.
20. Savitsky JP, Doozi J, Black J et al - A clinical safety trial of stroma free hemoglobin. *Clin Pharm Ther*, 1978;23:73.
21. Dietz NM, Joyner MJ, Warner MA - Blood substitutes: fluids, drugs, or miracle solutions? *Anesth Analg*, 1996; 82:390-405.
22. Chapman KW, Snell SM, Jesse RG et al - Pilot scale production of pyrogen-free human hemoglobin for research. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol*, 1992;20:415-421.
23. Lamy ML, Daily EK, Brichant JF et al - Randomized trial of diaspirin cross-linked hemoglobin solution as an alternative to blood transfusion after cardiac surgery. The DCLHb cardiac surgery trial collaborative. *Anesthesiol*, 2000;92:646-656.
24. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D et al - Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. *JAMA*, 1999;282:1857-1864.
25. Dietz NM, Martin CM, Joyner MJ et al - The effects of cross-linked hemoglobin on regional vascular conductance in dogs. *Anesth Analg*, 1997;85:265-273.
26. Figueiredo LFP, Mathru M, Solanki D et al - Pulmonary hypertension and systemic vasoconstriction may offset the benefits of a cellular hemoglobin substitutes. *J Trauma*, 1997;42:847-853.
27. DeAngeles DA, Scott AM, McGrath AM et al - Resuscitation from hemorrhagic shock with diaspirin cross-linked hemoglobin, blood, or hetastarch. *J Trauma*, 1997;42:406-414.
28. Lewis RJ, Berry DA, Fost N et al - Monitoring a clinical trial conducted under Food and Drug Administration regulations allowing a waiver of prospective informed consent: the diaspirin cross-linked hemoglobin traumatic hemorrhagic shock efficacy trial. *Ann Emerg Med*, 2001;38:397-404.
29. Serna DL, Powell LL, Kahwaji C et al - Cardiac function after eight hour storage by using polyethylene glycol hemoglobin versus crystalloid perfusion. *ASAIO J*, 2000;34:547-552.
30. Glasgow SC, Shah AS, Noone RB et al - Comparison of various hemoglobin polyoxyethylene conjugate solutions as resuscitative fluids after hemorrhagic shock. *J Trauma*, 2000; 48:884-893.
31. Noone RB, Mythen MG, Vaslef SN - Effect of alpha-alpha cross-linked hemoglobin and pyridoxalated hemoglobinpolyoxyethylene conjugate solutions on gastrointestinal regional perfusion in hemorrhagic shock. *J Trauma*, 1998;45:457-469.
32. Conover CD, Lejeune L, Shum K et al - Physiological effect of polyethylene glycol conjugation on stroma-free bovine hemoglobin in the conscious dog after partial exchange transfusion. *Artif Organs*, 1997;21:369-378.
33. Yang T, Olsen KW - Thermal stability of Hb cross-linked in the T state by bis (3,5 dibromosalicyl) fumarate. *Biochem Biophys Res Comm*, 1991;174:518-523.
34. Benesch R, Benesch RE, Yung S et al - Hemoglobin covalently bridged across the polyphosphate binding site. *Biochem Biophys Res Comm*, 1975;63:1123.
35. Johnson JL, Moore EE, Offner PJ et al - Resuscitation of the injured patient with polymerized stroma-free hemoglobin does not produce systemic or pulmonary hypertension. *Am J Surg*, 1998; 176:612-617.
36. 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: 113-120.
37. Moore FA, Moore EE, Sauaia A - Blood transfusion: an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Arch Surg*, 1996;132:620-625.
38. Johnson JL, Moore EE, Offner P et al - Resuscitation with a blood substitute abrogates pathologic postinjury neutrophil cytotoxic function. *J Trauma*, 2001;50:449-456.
39. Hughes GS, Antal EJ, Locker P et al - Physiology and pharmacokinetics of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in humans. *Crit Care Med*, 1996;24:756-764.
40. Cohn SM - Is blood obsolete? *J Trauma*, 1997; 42:730-732.
41. LaMuraglia GM, O'Hara PJ, Baker WH et al - The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution. *J Vasc Surg*, 2000;31:299-308.
42. Manning JE, Katz LM, Pearce B et al - Selective aortic arch perfusion with hemoglobin-based oxygen carrier for resuscitation from exsanguinating cardiac arrest in swine. *Crit Care Med*, 2001;29:2067-2074.
43. Cheung ATW, Jahr JS, Driessen B et al - The effects of hemoglobin glutamer-200 (bovine) on the microcirculation in a canine hypovolemia model: a noninvasive computer-assisted intravital microscopy study. *Anesth Analg*, 2001;93:832-838.
44. McNeil JD, Smith DL, Jenkins DH et al - Hypotensive resuscitation using a polymerized bovine hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC 201) leads to reversal of anaerobic metabolism. *J Trauma*, 2001;50:1063-1075.
45. Sprung J, Kindscher J, 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;94:799-808.
46. Jahr JS, Dulchavsky SA, Garino JP et al - Hemodynamic effects of hemoglobin glutamer-250 (Hemopure®, HBOC-201) compared to red blood cells in pivotal safety and efficacy study in orthopedic surgery patients. *Anesth Analg*, 2002;94:S-330.
47. Cheng DCH, Mazer RE, Carmichael FJL et al - The hemodynamic effects of the red cell substitute Hemolink® (o-raffinose cross-linked human hemoglobin) on vital signs in patients undergoing CABG surgery. *Anesthesiol*, 2000;93: A180.
48. Carmichael FJL, Biro GP, Agensky L et al - Use of the blood substitute Hemolink® in CABG surgery. *Anesth Analg*, 2000;90: SCA11.

49. Cheng DCH - Safety and efficacy of o-raffinose cross-linked human hemoglobin (Hemolink[®]) in cardiac surgery. *Can J Anaesth*, 2001;48:S41-S48.
50. Ketcham EM, Cairns CB - Hemoglobin-based oxygen carriers: development and clinical potentials. *Ann Emerg Med*, 1999;33:327-337.
51. Loscalzo J - Nitric oxide binding and the adverse effects of cell-free hemoglobin's: what make us different from earth-worms. *J Lab Clin Med*, 1997;129:580-583.
52. Stamper JS, Jia L, Eu JP et al - Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, 1997;276:2034-2037.
53. Waschke KF, Frietsch T - Modified haemoglobins and perfluorocarbons. *Curr Opin Anaesthesiol*, 1999;12:195-202.
54. Chang TMS. Future Perspectives of Blood Substitutes, em Chang TMS - Blood Substitutes, Principles, Methods, Products and Clinical Trials, Basel, S. Karger AG, 1997;1:88-110.

RESUMEN

Tanaka PP, Tanaka MA - Substancias Cargadoras de Oxígeno a la Base de Hemoglobina: Situación Actual y Perspectivas

JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS: Soluciones alternativas a la transfusión de sangre han sido estudiadas desde la década de 50. El objetivo de este estudio es presentar la situación actual y las perspectivas futuras de las substancias cargadoras de oxígeno a la base de hemoglobina.

CONTENIDO: Son presentadas las áreas potenciales de aplicación, bien como estudios clínicos envolviendo las principales moléculas de hemoglobina desarrolladas, sus ventajas y limitaciones.

CONCLUSIONES: Varios estudios aleatorios demostraron eficacia con el propósito de evitar o reducir la transfusión sanguínea; entretanto, algunas limitaciones existen, siendo que el futuro sustituto sanguíneo deberá, en lo mínimo, retratar la seguridad y la eficacia de la sangre en sí.