

Doação Homóloga versus Autóloga e Substitutos da Hemoglobina

*Luiz Antonio Vane**
*Eliana Marisa Ganem***

Introdução

O sangue é um dos mais complexos e completo componentes do organismo, pois é responsável por varias funções fisiológicas e vitais, destacando-se a oxigenação, proteção imunológica, hemostasia e equilíbrio ácido-base, sendo, ainda, um produto que se renova no organismo, aproximadamente, a cada noventa dias¹.

No trauma ou em grandes cirurgias onde ocorre perda sangüínea aguda, a função de oxigenação do sangue é a mais relevante, sendo o principal indicador do momento decisivo em que a reposição volêmica deve ser realizada com sangue ou seus hemocomponentes no lugar de soluções acelulares, isoladamente. Neste caso, na grande maioria das vezes, esta reposição sangüínea é feita com sangue homólogo cujo doador é estranho ao receptor, e poucas vezes utiliza-se sangue autólogo, quando o doador e o receptor são a mesma pessoa.

A transfusão sangüínea homóloga nada mais é que um transplante de tecido líquido que contém células responsáveis pela rede imunológica. Assim, diferentemente do que se preconiza, infundimos, ou seja, transplantamos, durante a transfusão sangüínea, células de defesa, estranhas, enquanto que durante a realização de qualquer transplante de tecido ou órgão, empenhamo-nos em deprimir essas células. Somando-se o fato da possibilidade de serem transmitidas doenças ao receptor e os problemas envolvidos com a transfusão, esta se constitui em uma das mais críticas decisões durante processo de sangramento, ou seja, qual o momento de ser indicada a transfusão sangüínea.

* Professor Titular do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Diretor Científico da Sociedade Brasileira de Anestesiologia

** Professora Adjunta do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Chefe do Departamento de Anestesiologia

Estamos certos que o benefício ao paciente deve superar, em muito, os riscos envolvidos na transfusão sangüínea, já que estes são geralmente graves. Destacamos, abaixo, as reações e as complicações possíveis com uso de sangue homólogo, bem como as vantagens e desvantagens no uso de sangue autólogo.

Reações ao uso de sangue e hemocomponentes

O uso de sangue e hemocomponentes impõem o conhecimento de reações e complicações inerentes e, entre elas, as reações hemolíticas, as alérgicas, as imunoalérgicas e as chamadas hemolíticas não-imunes. Ainda, devem-se conhecer e saber tratar as diversas complicações, como a intoxicação pelo anticoagulante, as alterações do equilíbrio ácido-base, em especial a hiperpotassemia, a hipotermia, a redução do 2,3 difosfoglicerato (DPG), a formação de microêmbolos e outras reações transfusionais, passíveis de serem encontradas durante a reposição de sangue e de seus hemocomponentes².

Reações Hemolíticas

As reações hemolíticas dividem-se em reações intravasculares, devidas à incompatibilidade do grupo sangüíneo ABO e do fator Rh, e as extravasculares, devidas às reações entre o antígeno eritrocitário e o anticorpo IgG. Estas reações ocorrem, principalmente, devido a erro na tipagem sangüínea, na identificação da bolsa e/ou do paciente, ou por sensibilização anterior. A sensibilização anterior pode ocorrer por contaminação prévia do paciente por células brancas estranhas, durante transfusões anteriores (condição patológica) ou por contaminação durante o parto, com sangue do recém-nascido (condição fisiológica).

Neste tipo de reação, ocorre hemólise, com conseqüente liberação na circulação de potássio e de substâncias vasoativas, com mediação inflamatória, destruição tecidual e formação de massa eritróide, responsáveis pela queda da pressão arterial de oxigênio e da ativação do sistema de coagulação, o que consumirá fatores de coagulação, colaborando para estado de hipocoagulabilidade. Ainda, pela destruição de hemácias, o quadro de anemia pode-se agravar e os pedaços de células vermelhas rotas, na circulação, irão comprometer a microcirculação, principalmente a glomerular renal. Como conseqüência, um quadro exuberante subsidia o diagnóstico, com febre, náusea, vômitos, diarréia, rigidez muscular, entre outros. Durante o procedimento anestésico-cirúrgico, outros sinais devem ser motivo de atenção durante transfusão, como a piora da hemodinâmica, com o agravamento da hipotensão arterial, apesar da reposição de sangue, o aumento do sangramento no campo operatório, que indica consumo aumentado dos fatores de coagulação e, principalmente, a oligúria, com urina escurecida, devido à presença de hemoglobina. A hipotensão decorre da liberação de produtos do complemento, polipeptídeos de alto peso molecular (20.000) que atuam na musculatura lisa dos vasos, e da liberação de substâncias vasoativas (bradicinina e serotonina), produtos da degradação dos mastócitos. Assim, poderá se instalar quadro de insuficiência renal, motivado pela obstrução mecânica dos túbulos e glomérulos pelos pedaços de hemácias destruídas durante o processo.

Também, pela anemia e pela dificuldade imposta à microcirculação, o paciente pode apresentar insuficiência respiratória, com queda da saturação arterial de oxigênio. No hemograma, encontrar-se-ão hemácias fragmentadas (equistócitos), o que comprova o diagnóstico.

Algumas reações do tipo hemolítico podem ocorrer tardiamente. Resultam de resposta imune secundária em pacientes nos quais os níveis de anticorpos são baixos (não detectados nos testes

pré-transfusional), mas que se elevam após transfusão de hemácias que contêm o antígeno. Os sinais mais frequentes são: febre, diminuição dos níveis de hemoglobina, icterícia e hemoglobinemia, que aparecem entre o quinto e o décimo dia após a transfusão³.

Diagnosticado quadro de reação hemolítica, o tratamento se impõe e no mais curto espaço de tempo possível, com interrupção imediata da transfusão e retipagem sangüínea tanto da bolsa como do paciente. A pressão venosa central, bem como o débito urinário, o nível de potássio plasmático e o estado de coagulabilidade do paciente devem ser cuidadosamente monitorados. Um estado de hiper-hidratação é desejável, na dependência das condições físicas do paciente, como também a administração de diuréticos, tanto manitol quanto furosemida, a fim de preservar o rim. O uso de plasma fresco e de cálcio deve ser considerado no intuito de expansão de volume e de reposição de fatores de coagulação, impedindo a instalação de insuficiência renal.

A pressão arterial, a oxigenação e a função renal devem ser motivo de atenção especial, e sua manutenção, obrigatória.

Reações Alérgicas

Outro tipo de reação que pode ocorrer, com mais frequência, mas que felizmente é menos grave, é a reação alérgica, durante a qual serão observadas pápulas pelo corpo do paciente, podendo, em alguns raros casos, chegar a situação mais grave, como o edema de glote. É provável que isto resulte da reação entre alguma proteína estranha contida no plasma do doador e o respectivo antígeno presente no plasma do receptor. Reações anafilactóides graves, caracterizadas por hipotensão arterial, dor retroesternal, dispnéia e sintomas gastrintestinais resultam da presença de anticorpos específicos anti-IgA no plasma do receptor, que reagem com a IgA normal do doador. Normalmente, o uso de anti-histamínicos e a diminuição do fluxo de infusão do sangue já são suficientes para corrigir o problema. O uso de cortisona e de catecolaminas geralmente não está indicado, mas, se necessário, a hidrocortisona endovenosa na dose de 1,5 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo de 6 em 6 horas e, eventualmente a epinefrina, 0,3 a 0,5 ml por via subcutânea, são suficientes.

Reações Imuno-Alérgicas

Os efeitos imunossupressores das transfusões foram avaliados em diversos estudos clínicos e experimentais, mas o mecanismo que fundamenta as diversas alterações ainda não foi totalmente elucidado. As alterações imunológicas relacionadas com as transfusões incluem: 1) aumento na produção de prostaglandina E2; 2) diminuição de liberação de interleucina-2; 3) diminuição da produção de TNF, IFN- γ , GM-CSF; 4) diminuição da relação T4/T8; 5) diminuição da atividade das células “natural killer”; 6) supressão da reação DTH; 7) presença de células supressoras inespecíficas; 8) anticorpos antiidiotípicos; 9) presença de células T-supressoras¹.

Como resposta, o paciente apresenta pruridos, broncoespasmo e aumento da permeabilidade capilar, o que leva à hipovolemia com hipotensão e insuficiências respiratória e cardíaca. O tratamento envolve hidratação, uso de diuréticos e ventilação mecânica, se necessário. O uso de catecolaminas e de corticóides pode ser necessário.

Não se sabe se estas alterações estão relacionadas com a transfusão em si, ou se podem ser atribuídas aos outros fatores que levaram à indicação da transfusão, como, por exemplo, o porte da cirurgia, o grau de sangramento e o grau de acometimento dos tecidos. Em relação à maior recorrência de câncer, as repercussões imunológicas das transfusões alogênicas tomam grande relevância clínica, uma vez que grande número de unidades é transfundido durante cirurgias oncológicas.



No final da década de 1980 e início da década de 1990, alguns estudos retrospectivos indicaram que havia forte associação entre exposição ao sangue alogênico e o risco de recidiva de alguns tipos de câncer, especialmente, câncer de cólon e de reto.^{4,5} Uma análise multivariada e duas meta-análises de trabalhos publicados na época mostraram que a transfusão alogênica foi fator preditivo do prognóstico, em função da maior sobrevida sem recorrência do tumor no grupo que recebeu transfusão autóloga.^{6, 7, 8, 9, 10, 11, 12}

Outros tipos de câncer também foram associados com recidiva precoce após transfusões autólogas, como o câncer de cabeça e pescoço. MOIR e colaboradores¹³, estudaram, retrospectivamente, pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados cirurgicamente, com seguimento superior a dois anos, analisando as variáveis que também contribuíram para a recorrência de câncer - falha no tratamento inicial, presença de metástases nodais e positividade da doença nas margens da biópsia. Mesmo quando estes três fatores foram controlados, o aumento do risco relativo associado com as transfusões alogênicas continuou estatisticamente significativo.

Vários estudos de observação também analisaram a associação entre transfusões alogênicas e a ocorrência de infecção no pós-operatório de cirurgias abdominais e cardíacas ou após trauma. Uma análise multivariada destes estudos mostrou correlação forte e independente entre transfusão alogênica e infecção.¹⁴ A análise das variáveis envolvidas no risco de infecção pós-operatória mostrou que nenhuma outra variável está tão fortemente associada com a ocorrência de infecção pós-operatória do que o uso de transfusões alogênicas.¹⁴

Resumindo, não está bem claro se as transfusões alogênicas podem alterar o tempo de recorrência de tumores ou a ocorrência de infecção no pós-operatório. Admite-se, no entanto, que a imunossupressão causada pela transfusão alogênica perioperatória pode atuar sobre a doença residual, que ainda permanece após a ressecção do tumor. Este efeito cria condições para que as células tumorais possam disseminar-se e gerar metástases a distância.¹⁵

Lesão Pulmonar Aguda Relacionada à Transfusão

Durante o processo de transfusão, ou, mais apropriadamente, logo após o término da transfusão, em período não superior a 6 horas do início da transfusão, outro tipo de reação pode ser experimentado pelos pacientes, a “transfusion related acute lung injury” – TRALI. Este tipo de reação ocorre por reações do tipo antígeno-anticorpo, com o envolvimento de anticorpos granulocíticos ou linfocitotóxicos e antígenos leucocitários, devidos à transferência passiva anterior, por transfusões ou parto.¹⁶

Esta reação ocorre no endotélio dos capilares pulmonares, provocando lesões com aumento da permeabilidade capilar e conseqüente edema pulmonar com falência respiratória aguda, hipóxia, hipertermia e hipotensão arterial, num quadro semelhante ao da síndrome da angústia respiratória aguda – SARA, dela diferindo por apresentar pressão venosa central normal ou baixa.

Hemólise Não-Imune

Finalmente, a hemólise não-imune constitui outro tipo de problema durante transfusão. Esta hemólise acontece quando há necessidade de transfusão maciça e em curto espaço de tempo, devido a grandes perdas sangüíneas e risco iminente de morte. Nesta situação, o uso de bombas de infusão com roletes, que causa tensão mecânica sobre o equipo, comprimindo-o, e o uso de bombas de circulação extracorpórea fazem com que ocorra hemólise. Da mesma maneira, o uso concomitante e no mesmo ponto de infusão de soluções incompatíveis com o sangue, como solu-

ções hipotônicas ou hipertônicas, as variações extremas de temperatura (congelamento-aquecimento), realizando processo de pasteurização do sangue e, ainda, as compressões externas da bolsa podem levar a algum grau de hemólise. Estas situações devem, na medida do possível, ser evitadas, porém, durante grandes sangramentos, em que a gravidade do caso impõe reposição rápida e maciça, o bom senso deve prevalecer e a escolha entre a vida e um certo grau de hemólise, apesar de entendida sua inconveniência, deve pesar em favor da vida.

Complicações com o uso de sangue e hemoderivados

Além das reações, um rol de complicações deve ser levado em conta quando se administra sangue. Assim, são complicações possíveis a intoxicação pelos produtos do anticoagulante, a hipotermia, a hiperpotassemia, as alterações ácido-base, a formação de microêmbolos, a queda da quantidade da enzima 2,3 DPG e a possibilidade de transmissão de doenças.

Intoxicação pelo Anticoagulante

O anticoagulante utilizado mais comumente é o citrato de sódio na forma citrato-fosfato-dextrose (CPD), que, por conter citrato, age impedindo as ações do cálcio no processo de coagulação. Com o uso de várias bolsas e, como consequência, de grandes volumes de CPD, já que cada bolsa contém em média 65 ml do anticoagulante, o que corresponde a 3 gramas de citrato, pode ocorrer queda importante do nível de cálcio circulante com o uso de sangue estocado. Normalmente, isso não acontece de modo crítico que necessite reposição, devendo esta ser realizada somente se houver sinais de hipocalcemia. Isto porque o fígado normalmente metaboliza rapidamente o anticoagulante e os depósitos de cálcio do organismo suprem suficientemente para não se necessitar reposição rotineira. Porém, em grandes transfusões, quando grande quantidade de anticoagulante é administrada e de maneira rápida, na circulação, e ao mesmo tempo o fígado experimenta queda de perfusão devido ao estado de choque, ou de hipovolemia aguda, os níveis de cálcio podem diminuir e ser necessária reposição.

O quadro de intoxicação pelo citrato é composto de hipotensão arterial, estreitamento da pressão de pulso, com aumento das pressões venosa central e diastólica final intraventricular, achatamento da onda T, prolongamento do intervalo QT e alargamento do complexo QRS. Neste caso, o tratamento com cálcio é necessário e a quantidade a ser administrada deverá ser baseada na concentração de cálcio plasmático.

Hipotermia

Instala-se em virtude da administração de grande volume de líquidos não aquecidos, pela perda de calor radiante e calor latente de evaporação de líquidos corpóreos de cavidades abertas e pela ventilação controlada com gases não aquecidos durante cirurgias de longa duração. É agravada pela baixa produção de calor durante o período anestésico e baixa temperatura da sala cirúrgica.

As repercussões indesejáveis atribuídas à hipotermia resultam da redução das taxas de metabolização do citrato e do ácido láctico, da maior facilidade em desenvolver hipocalcemia e acidose metabólica, do aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, da disfunção plaquetária e sangramento e ainda da maior incidência de disritmias cardíacas.

Como medidas profiláticas, recomenda-se a utilização de colchões térmicos e o cuidadoso aquecimento dos líquidos e componentes do sangue a serem transfundidos¹⁷.



Hiperpotassemia

O sangue estocado envelhece e, apesar de ser viável por 42 dias, se conservado à temperatura de 4°C e tiver como anticoagulante o CPD, à medida que o tempo passa, suas condições vão se deteriorando. Um dos principais pontos a ser considerado em função do tempo é o nível de potássio. A quantidade deste íon é dependente do tempo de estocagem, variando de 17 a 35 mEq/L.

Após transfusão, as hemácias readquirem sua capacidade de trocar íons em função da recuperação do funcionamento da bomba de sódio e os íons potássio são levados para o espaço intracelular. Desta maneira, a hiperpotassemia pós-transfusional é transitória e está na dependência direta da velocidade de transfusão.

O diagnóstico de hiperpotassemia é feito laboratorialmente, por dosagens plasmáticas de potássio, e clinicamente, pelo traçado do eletrocardiograma (ECG), que apresentará ondas T altas, QRS alargado e intervalo PR aumentado. O tratamento é feito com diuréticos e solução polarizada, com glicose e insulina.

Alteração do Equilíbrio Ácido-Base

Estocado, o sangue apresenta pH baixo, entre 6,9 e 7,1, devido ao uso do CPD, que é constituído pelo ácido cítrico, e, também, pela respiração anaeróbica da hemácia, com produção de gás carbônico. Juntos, são os principais fatores da queda do pH. Assim, a infusão de sangue estocado pode levar à queda do pH plasmático, determinando estado de acidose metabólica, que deve ser, durante a transfusão, acompanhada pelas gasometrias arterial e venosa. Este fato é altamente preocupante, pois a microcirculação, local onde a pressão parcial de oxigênio arterial já é, normalmente, bastante reduzida, pode sofrer ainda mais com o estado de hipovolemia e hipoperfusão que, somado à hipotermia, diminui a liberação de oxigênio às células, levando à hipóxia celular, com formação de ácido lático. Tendo em vista que o sangue estocado tem a quantidade de 2,3 DPG diminuída, haverá desvio da curva de saturação da hemoglobina para a esquerda com conseqüente dificuldade na liberação de oxigênio pela hemoglobina (queda do efeito Bohr).

Tabela 1 - Efeito da estocagem de sangue

parâmetros	dias de estocagem		
	0	35 dias (sangue total)	35 dias (concentrado)
pH	7.55	6.73	6.71
Potássio – plasma (mEq/l)	4.2	17.2	76
Sódio – plasma (mEq/l)	169	153	122
2,3 DPG (uM/ml)	13.2	≤1	≤1
ATP (%)	100	50	50

Felizmente, esta situação, que parece ser uma grande tragédia, é minimizada, pois o citrato do ácido cítrico administrado como anticoagulante, na circulação, reage com o lactato formado, originando bicarbonato, que atenua a situação, explicando o porquê de não ser sempre necessário o uso de soluções tamponantes com a administração de sangue estocado.

Microêmbolos

Ainda, com relação ao sangue estocado, há, no interior da bolsa, certo grau de hemólise que, além de aumentar a concentração de potássio, produz microagregados, com acúmulo de plaquetas, fibrina e células brancas, dando origem aos microêmbolos, os quais, se infundidos, provocarão obstrução da microcirculação, colaborando com a possibilidade de insuficiência renal e pulmonar.

Este problema é minimizado com o uso de filtros de linha durante a infusão e diluentes com tonicidade compatível com a do plasma, mas sem cálcio, para não permitir que haja ativação da coagulação.

Riscos da Transmissão de Doenças

Os riscos de transmissão de doenças ou de alterações imunológicas, embora baixos, ainda persistem. Previamente a qualquer transfusão, dever-se-ia avaliar o risco/benefício, informá-lo aos pacientes e solicitar a assinatura do Termo de Consentimento Informado¹.

O sangue total e/ou seus componentes não podem ser transfundidos antes da obtenção de resultados finais (não-reagentes) nos testes de detecção para: hepatite B, hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2), doença de Chagas, sífilis, HTLV-I e HTLV-II. É obrigatório que os exames laboratoriais, de alta sensibilidade, sejam feitos em amostra colhida da doação do dia e sejam testados com conjuntos diagnósticos (kits) registrados na ANVISA, em laboratórios específicos para tal fim. É vedada a realização de exames em “pool” de amostras de sangue¹.

Nas regiões endêmicas, com transmissão ativa de malária (alto risco, pelo Índice Parasitológico Anual - IPA), deve ser realizado o exame parasitológico/hematoscópico. Em regiões endêmicas sem transmissão ativa, recomenda-se o exame sorológico. A sorologia para o citomegalovírus (CMV) deve ser efetuada em todas as unidades de sangue ou componentes destinadas aos pacientes: a) submetidos a transplantes de órgãos; b) recém-nascidos de mães CMV-negativas ou com resultado de sorologia inexistente ou desconhecido. No caso em que se transfunda sangue desleucocitado neste grupo de pacientes, esta sorologia não precisa ser realizada¹.

Até o início da década de 1980, o risco transfusional na transmissão de doenças era menos considerado. Com o aparecimento da AIDS, este fato tornou-se importante e constitui, hoje, um dos principais pontos de decisão na indicação de transfusão sanguínea. Mesmo levando em consideração o avanço tecnológico nos testes empregados para a detecção de doenças no sangue doado, há ainda um risco inerente de transmissão de doenças segundo as estatísticas norte-americanas¹⁸, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Risco transfusional na transmissão de doenças.

Doença	Risco	Teste positivo (dias)
Hepatite B	1/63.000	60
Hepatite C	1/103.000	82
HIV	1/493.000	22
HTLV	1/641.000	51
Citomegalovírus	Menos de 1%	rapidamente

O agente infeccioso mais frequentemente transmitido é o citomegalovírus, que não representa problema clínico significativo em pacientes imunologicamente saudáveis. A hepatite pós-transfusional não-A e não-B constitui-se na infecção clinicamente significativa mais frequente, podendo causar doença hepática grave e insuficiência hepática.

A incorporação de novas tecnologias para os testes de amplificação e de detecção de ácidos nucleicos (NAT) para o HIV e para o HCV na triagem laboratorial dos doadores de sangue diminuiu o período de janela imunológica para a identificação das contaminações por HIV e HCV, reduz o risco de transmissão destes vírus por transfusões e, como consequência, aumenta a segurança transfusional¹.

Tabela 3 - Transmissão de doenças antes e após a adoção de testes laboratoriais que diminuem o período de janela imunológica (NAT)

Risco de infecção após transfusão única		
Ano	1996	2002
HIV	1:676.000 ²⁰	1:930.000 ¹⁷ 1:3.300.925 ¹⁹
HVC	1:103.000	1:260.000
HBV	1:63.000	1:138.000

Apesar de os números encorajarem a indicação de transfusão de sangue, fato a considerar é que, somente nos Estados Unidos, mais de 18 milhões de bolsas são administradas por ano, e cerca de 60% delas, por anesthesiologistas.

Outros pontos, entretanto, merecem nossa atenção como a possibilidade de transmissão de prions e de vírus do Nilo Ocidental.

Prions

Através da transfusão de sangue contaminado, entre outras formas possíveis, o homem pode adquirir doença denominada de Creutzfeld-Jakob, também conhecida como mal da vaca louca, que tem como denominador comum a encefalite esponjosa, devido ao fato de que os danos às células cerebrais e conseqüente absorção formam pequenas cavidades no interior do cérebro, tornando-o parecido a uma esponja.

A encefalite esponjosa tem como agente proteínas modificadas, denominadas prions, as quais são resistentes à maioria dos processos de esterilização existentes, inclusive radiações. Estas proteínas não são filtráveis, sendo transmitidas ao homem através de carne contaminada, instrumental cirúrgico esterilizado a menos de 120°C, transplante de tecido contaminado ou transfusão de sangue. Não apresentam imunogenicidade. Agem pela substituição gradativa das proteínas normais, modificando seus amino-ácidos, fazendo com que estas fiquem idênticas às proteínas prions. Portanto, prions é uma pequena parte de molécula de proteína infecciosa, a qual resiste à inativação por procedimentos que modificam os ácidos nucleicos.²¹

A sintomatologia, que tem início com a morte neuronal, compreende declínio cognitivo, demência rapidamente progressiva, deterioração motora com ataxia e espasticidade e movimentos involuntários do tipo mioclonia.

Não existe no Brasil, felizmente, mas, infelizmente, não há tratamento específico disponível. O tratamento existente é paliativo e consiste no uso de anfotericinas, interferon (alfa e beta), imunoglobulinas e aciclovir.

Virus do Nilo Ocidental

Trata-se de uma doença infecciosa transmitida por um RNA virus, da família Flaviviridae do genero flavivirus. Apesar de ter sido descrito na Africa no ano de 1950, recentemente foi diagnosticado em vários outros países, em nova conformação, muito mais virulenta. Assim, no final da década de 1990, vários casos ocorreram na Europa e, no início da década de 2000, apareceram casos nos Estados Unidos.

O paciente pode apresenta-se febril, com alteração do nível de consciência, fraqueza muscular intensa caracterizando uma meningoencefalite. Entretanto, grande parte dos pacientes infectados, permanecem assintomáticos. O período de incubação é de 4 a 14 dias. Casos de transmissão pela transfusão de sangue ou de hemocomponentes, foram documentados a partir de agosto de 2002, sendo que desta época até março de 2003, o Centro de Controle de Doenças nos Estados Unidos, documentou 61 casos suspeitos, sendo confirmados 23 casos, dos quais, 12 apresentaram meningoencefalite cerca de 11 dias após a transfusão.

Em 2002 foram relatados 4 casos de virus do Nilo ocidental (WNV) em pacientes que receberam órgãos do mesmo doador. Todos os receptores dos quatro órgãos estavam em tratamento com drogas imunossupressoras. Destes, três desenvolveram meningoencefalite e um, doença febril 7 a 10 dias após o transplante.

Devido a possibilidade de epidemias nos Estados Unidos e em outras regiões do mundo, os bancos de sangue americanos, implantaram, a partir de junho de 2003, exames de amplificação de ácido nucléico como teste de triagem em todas as doações de sangue.

Nos hemoderivados, o uso de métodos de nanofiltração, solvente-detergente e tratamento pelo calor para eliminação de outros flavivírus parece suficiente para evitar a contaminação pelo WNV, uma vez que é um virus envelopado e de tamanho relativamente grande (50 nm).²²

Não existe até o momento tratamento específico para a encefalite por WNV. Algumas drogas antivirais foram experimentadas, mas sem eficácia comprovada.

Sangue autólogo

Devido a estes fatos, muita ênfase se deu ao uso de sangue autólogo. O sangue autólogo pode ser obtido por doações prévias (DP), por hemodiluição normovolêmica aguda (HNA), ou por reaproveitamento de sangue do campo operatório, também conhecido por “blood saved” (BS).

O sangue autólogo não transmite doenças, entretanto, pode sofrer contaminação durante seu manuseio entre a coleta no hemocentro e sua administração no centro cirúrgico. Não há ocorrência de reações hemolíticas (aloimunização), alérgicas, imunológicas (imunomodulação) e TRALI.

Pré-Doação

Quando obtido por meio de pré-doação, técnica que consiste na doação de sangue no período pré-operatório, durante 4 a 6 semanas para uso próprio, teremos as vantagens acima mencionadas, mas, por outro lado, o paciente poderá apresentar-se anemiado para cirurgia, com maior risco de isquemia miocárdica, reação vaso-vagal com hipotensão arterial, sendo necessárias trans-

fusões mais frequentes e precoces, com possibilidade no final de ter que se lançar mão de sangue autólogo para completar a quantidade de sangue necessária àquele paciente.

Outros pontos a serem considerados são a possibilidade de troca de bolsa, o que, segundo estatísticas, ocorre em 1 a cada 60 a 100.000 transfusões, e o alto custo do descarte das bolsas não utilizadas.

Esta técnica, conhecida há mais de cem anos, teve maior aceitação a partir de 1.980, com o advento da AIDS. Em 1992, 1,1 milhão de bolsas foram obtidas por esta técnica nos Estados Unidos. No ano de 2.000, cerca de 5% do sangue coletado naquele país eram sob a forma de pré-doação. O interesse e principalmente a aceitação pela técnica têm diminuído, basicamente pelo fato de que o sangue fornecido pelos hemocentros é atualmente mais seguro, e porque a possibilidade do uso de sangue do hemocentro (homólogo) é considerável.

A pré-doação de sangue tem sua indicação baseada, principalmente, na história clínica do paciente e no provável uso de sangue. A idade não é fator limitante, podendo ser realizada em qualquer idade acima dos 5 anos. O inconveniente é o trauma que a criança poderá sofrer pela retirada de sangue previamente à cirurgia. Os níveis de hemoglobina (Hb) e de hematócrito (Ht) definirão as quantidades e a frequência das retiradas.

Normalmente, as doações devem ser semanais, podendo ser no máximo a cada três dias, devendo ser respeitado rigorosamente o prazo de setenta e duas horas entre a última doação e a cirurgia. Para auxílio do paciente na rápida reposição do sangue doado, o emprego de fármacos contendo ferro, administrados antes, durante e após as doações, associado ao uso de eritropoetina, tem dado bons resultados.

Fato importante é que pacientes com teste positivo para HIV não devem ser incluídos nesta técnica, tendo em vista a grande possibilidade de reativação viral após reinfusão.

Hemodiluição Normovolêmica Aguda

Outra técnica utilizada para obtenção de sangue autólogo é a hemodiluição normovolêmica aguda. Consiste na retirada de sangue imediatamente antes ou após a indução anestésica, com concomitante reposição com cristalóides e/ou colóides. Se a opção de reposição for pelos cristalóides, esta deve ser de três partes de cristalóides para cada parte de sangue retirado. Se optarmos por colóides, a proporção será de uma parte de sangue para uma ou uma e meia parte de colóide.

O volume de sangue a ser retirado está baseado no valor do hematócrito, segundo a fórmula:

$$V = VSE \cdot \frac{Hto - Htf}{Htm}$$

na qual:

- V = volume de sangue a ser retirado
- VSE = volume de sangue estimado
- Hto = hematócrito inicial
- Htf = hematócrito final
- Htm = hematócrito médio

O volume de sangue estimado para o cálculo na fórmula acima é de 65 ml/kg para a mulher e de 70 ml/kg para o homem. O valor do hematócrito médio é obtido através da média dos valores de hematócrito durante o processo de doação, tendo pelo menos 3 valores de hematócrito.

Fato importante a ser considerado é que a reinfusão do sangue coletado deverá ser feita na ordem inversa à da coleta. Isto porque a primeira bolsa a ser retirada apresenta valor de hematócrito maior, por estar menos diluída, sendo a última a ser repostada, quando a condição de sangramento do paciente já é menor.

Na hemodiluição normovolêmica aguda (HNA), o organismo lança mão de fatores compensatórios, como o aumento do débito cardíaco (DC), a manutenção da pressão arterial sistêmica, o aumento da síntese de óxido nítrico e a queda na resistência periférica total e da viscosidade sanguínea. Ainda, permite redistribuição do fluxo sanguíneo para órgãos com taxas mais altas de extração de oxigênio e, com isso, facilita sua liberação para os tecidos (efeito Bohr).

A técnica está contra-indicada em pacientes anêmicos e naqueles que apresentam hemodiluição patológica, como na esplenomegalia de hiperfluxo. Também não deve ser utilizada nos casos em que ocorrer queda no transporte de oxigênio e na saturação da hemoglobina. É ainda contra-indicada nas hepatopatias, nefropatias, coagulopatias e hemoglobinopatias, exceto nos pacientes falcêmicos, para os quais a hemodiluição é benéfica.

Blood Saved

Finalmente, outra técnica utilizada é a que reaproveita o sangue coletado. Este sangue é aspirado, filtrado e processado e os glóbulos vermelhos, obtidos por centrifugação, são reinfundidos na medida da necessidade.

Em todas as técnicas de obtenção de sangue autólogo, o paciente ainda está sujeito a complicações, como a intoxicação pelo citrato do CPD, alteração do equilíbrio ácido-base, hiperpotassemia, hipotermia, diminuição na concentração de 2,3 DPG e formação de microêmbolos, já descritas.

Uma questão importante é: sangue autólogo é igual ao sangue do paciente?

A resposta, evidentemente, é não. O sangue uma vez fora do leito vascular não retorna mais nas mesmas condições em que saiu no momento da doação. Isto porque as células sanguíneas, uma vez fora da circulação e, portanto, paradas, tendem a se aglomerarem, mesmo na presença de anticoagulante, com formação de microêmbolos, além de apresentarem certo grau de hemólise. Com isto, haverá queda do valor do Ht e aumento da quantidade de Hb livre. As hemácias lesadas consumirão fatores de coagulação e haverá queda da concentração deles no plasma e aumento dos produtos de degradação da fibrina.

As técnicas utilizadas para uso de sangue autólogo não encontram, hoje, grande aceitação. Assim, na Itália, Alemanha e França, apenas 7,5% do sangue coletado são resultantes de pré-doações. A média na Europa é de 4,4% das doações, ou seja, cerca de 670.000 unidades por ano. Outro fator importante é que apenas 70% do sangue autólogo são utilizados, contra 95% do sangue homólogo, o que torna o procedimento muito caro, sendo fator limitante na Suíça e Inglaterra. A técnica não é recomendada na Dinamarca e utilizada apenas em casos excepcionais, como na presença de anticorpos no receptor, na Noruega. Nos Estados Unidos, a técnica representa apenas 5% das doações, ou seja, cerca de um milhão de unidades por ano. Esta pouca popularidade da técnica está baseada nos seguintes pontos:

- 1 - não elimina a possibilidade do uso de sangue homólogo;
- 2 - há possibilidade de ser administrado sangue errado (homólogo ou autólogo de outro paciente);
- 3 - há possibilidade de desenvolvimento de anemia e angina pré-operatórias;
- 4 - as transfusões são mais frequentes;



- 5 - há possibilidade de contaminação bacteriana;
- 6 - os descartes de bolsas são mais freqüentes;
- 7 - o custo é elevado.

Contudo, apresenta algumas vantagens importantes, como:

- 1 - baixa possibilidade de transmissão de doenças;
- 2 - ocorrência rara de reações hemolíticas ou alérgicas;
- 3 - possibilidade de estocagem por longo período (10 anos);
- 4 - sensibilização do paciente não ocorre;
- 5 - indicação especial para pacientes com anticorpos por transfusões anteriores.

Nossa opinião é a de que a técnica do *blood saved* será a mais popular dentro em breve, seguida da hemodiluição normovolêmica aguda, ficando a doação prévia como uma possibilidade para quem desejar estocar seu próprio sangue para eventuais necessidades.

Soluções carreadoras de oxigênio

O termo substituto do sangue tem sido utilizado para descrever soluções que promovem expansão de volume e transportem oxigênio. Porém, o sangue, um dos mais complexos líquidos do organismo, tem muitas outras funções, além das duas funções destinadas aos chamados substitutos do sangue.

Desta forma, os termos substitutos do sangue ou sangue artificial são incorretos e, mais propriamente, deveria ser solução expansora carreadora de oxigênio.

O interesse por essas soluções aumentou devido a dois problemas: a transmissão de doenças, particularmente a AIDS no início da década de 1980, e o uso em situações de emergência, como as que ocorrem fora do ambiente hospitalar, no atendimento ao politraumatizado e no atendimento a soldados em campo de batalha, por não necessitar de provas cruzadas, teste ABO e Rh e ser estéril.

Basicamente, estes produtos são:²³

- 1 - hemoglobinas livre de estroma – contêm algumas modificações na molécula da hemoglobina;
- 2 - hemoglobinas geneticamente modificadas – células vermelhas produzidas por microorganismo como *E. coli*;
- 3 - hemoglobinas lipossoma-encapsuladas – contêm hemoglobina com membrana sintética;
- 4 - perfluorocarbono – soluções orgânicas com alta solubilidade em oxigênio.

Para prevenir complicações, como dano renal, hipertensão pulmonar, formação de metahemoglobina, entre outras, as soluções de hemoglobina têm sido usadas como “cross-linked” (CL), polimerização e conjugação, tendo sido submetidas a procedimentos químicos ou de engenharia genética. O resultado destes esforços é no sentido de oferecer uma substância carreadora de oxigênio sem as complicações já citadas aqui ou apresentadas pelos cristalóides e colóides.²⁴

Vane e col.²⁵ compararam os efeitos da reposição volêmica com *diasparin cross-linked hemoglobin* (DCLHb), glóbulos vermelhos (GV) e solução de Ringer lactato (RL) para tratamento de anemia intra-operatória em ovelhas submetidas a grande cirurgia sob anestesia geral. Verificaram que o DC aumentou tanto com RL como com GV, mas não aumentou com DCLHb, sendo que com RL aconteceu o maior aumento. Com DCLHb, a expansão de volume foi maior, mas também a porcentagem de metahemoglobina, fazendo com que o conteúdo arterial de oxigênio fosse mais baixo, quando comparado com o uso de GV ou RL. Ainda, DCLHb causou hipertensão pulmonar e aumen-

to da pressão venosa central (PVC). Outros autores^{26,22,28} também estudaram soluções livres de hemoglobina em animais sob hemorragia e verificaram aumento da pressão arterial, restabelecimento da concentração de lactato plasmático e aumento da capacidade de carregar oxigênio.

Os concentrados de glóbulos têm hematócrito típico de 60-75%, com correspondente concentração de hemoglobina de 20-25 g/dl, enquanto as soluções de hemoglobina livre têm concentração de hemoglobina de 10-15 g/dl. Estas soluções, em colóides hiperoncóticos, apresentam grande capacidade de expansão, superior até ao volume infundido em cerca de 30%.²⁹

Sloan e col.³⁰ estudaram o índice de sobrevivência de pacientes em choque hemorrágico grave, tratados com DCLHb ou RL. Verificaram que, após 28 dias, 46% dos pacientes que receberam DCLHb morreram, contra 17% dos que receberam RL. Concluíram que a mortalidade foi maior com o uso de DCLHb, mas ponderam que esta solução não é própria para uso como o realizado no experimento, ou seja, como solução para ressuscitação.

Apesar dos intensos estudos, este tipo de solução ainda não mostrou grande eficácia, devendo ser motivo de estudo para os próximos anos, tendo em vista sua premente necessidade. Hoje, a quantidade de sangue necessária não é acompanhada pelo volume obtido com doações e, nas próximas décadas, isto tende a se acentuar.

Soluções de Hemoglobina

A tentativa de se obter uma solução que, além de expandir o volume intravascular, pudesse também transportar oxigênio e liberá-lo para os tecidos remonta à primeira guerra mundial, quando ficou claro que a hipovolemia por hemorragia aguda e intensa levava o paciente ao chamado choque circulatório. Apesar disso, o marco inicial deste estudo é de Amberson e col.³¹, em 1930, com o uso de hemoglobina bovina e de hemoglobina humana em solução salina. Este estudo teve por finalidade o tratamento do sangramento obstétrico com hemoglobina humana em solução salina, o que prontamente restaurava a pressão arterial, mas apresentava efeitos colaterais graves, como disfunção renal e hipertensão arterial.

Estes estudos, apesar de nunca terem sido abandonados, ganharam novo interesse com o advento da AIDS em 1980. A partir daí, os estudos no campo molecular se intensificaram e, hoje, alguns produtos já estão em testes em seres humanos, principalmente a hemoglobina livre de estroma.

Quando a hemoglobina é liberada da hemácia, sua estrutura tetramérica, constituída de duas cadeias alfa e duas beta, dissocia-se em dímeros, constituídos por uma cadeia alfa e uma beta, ou, ainda, em monômeros de Hb, os quais apresentam menor peso molecular, sendo, portanto, filtrado pelos rins, tendo reduzido assim o tempo de retenção intravascular.³²

Ainda, esses dímeros apresentam perda da enzima 2,3 DPG² e, como resultado, há maior dificuldade na liberação do oxigênio aos tecidos, o que modifica a curva de dissociação da hemoglobina com desvio para a esquerda, diminuindo a PO₂ em 12 a 16 mmHg.³³

Devido à filtração pelos rins desses dímeros, quando em meio ácido, o que acontece na parte ascendente da alça de Henle, há precipitação, com dano renal. Ainda, na circulação, têm efeitos tóxicos devido à ativação da cascata de complemento.³⁴

As soluções de hemoglobina livre de estroma podem-se apresentar sob quatro formas e todas elas contêm moléculas de hemoglobina modificadas.

- 1- Hemoglobina *cross-linked*
- 2- Hemoglobina polimerizada
- 3- Hemoglobina conjugada
- 4- Hemoglobina em microbolhas



Estas modificações e seus diversos tipos são tentativas para que haja menor filtração renal e, como conseqüência, menor dano para os rins e maior tempo de retenção intravascular.³² Como resultado, as hemoglobinas *cross-linked*, polimerizadas ou conjugadas apresentam valores de P50 muito próximos do fisiológico. Com as do tipo *cross-linked*, há manutenção da estrutura tetramérica da hemoglobina pela junção das cadeias alfas e betas. Estudos visando a criação de pontes ou sítios de ligação entre as cadeias estão sendo realizados com o advento da engenharia genética e da química fina e também da síntese de hemoglobina a partir de microorganismos³².

As outras configurações nada mais são do que variações da hemoglobina *cross-linked*, visando a ligação entre as cadeias para aumento do tamanho da molécula.

Outro tipo de solução de hemoglobina são as microesferas, obtidas por alta intensidade de ultra-som para que haja formação de microbolhas, as quais sofrem processo de *cross-linked* pelo superóxido formado durante o processo de ultra-som. Como vantagem, apresentam alta capacidade de transporte e liberação de oxigênio aos tecidos e mínimas alterações no processo de estocagem por seis meses a 4°C. Ainda, a tecnologia de DNA recombinante tem sido utilizada para produzir hemoglobina humana modificada por microorganismos como *E. coli* ou *S. cerevisiae*. Esta forma, infelizmente, parece não ter produção suficiente para escala comercial³².

Outra técnica utilizada para produzir grandes quantidades de hemoglobina é a de manipulação genética em animais para que possam produzir células vermelhas que contenham hemoglobina igual à humana. Esta técnica poderá produzir em grande escala e os estudos estão sendo realizados em porcos.

As soluções de hemoglobina lipossoma-encapsulada foram primeiramente propostas por Chang³⁵, em 1957, através de um processo de encapsulamento da hemoglobina com uma pseudomembrana lipídica ou lipossoma. A tentativa foi a de diminuir os efeitos colaterais, prolongando o tempo de retenção vascular e a capacidade de transportar e liberar oxigênio. A estrutura envolve uma forma de eritrócito sintético com lipossoma unilaminar, contendo solução de hemoglobina livre de estroma. Esta membrana é composta de uma dupla camada fosfolipídica, com moléculas de colesterol para aumentar a rigidez e a estabilidade mecânica da molécula. Ainda, adiciona-se 2,3 DPG ou inositol hexafosfatado para ajuste da curva de dissociação da hemoglobina para valores próximos ao normal.²³

Perfluorocarbonos

Perfluorocarbonos (PFC) são compostos sintéticos que atuam como solventes para moléculas de oxigênio, tendo sido demonstrados pela primeira vez em 1966, por Clark e Gollan.

Os PFC podem dissolver até 40-50 volumes% de oxigênio em pressão parcial de oxigênio de 160 mmHg a 37°C. Sua capacidade de transportar oxigênio compara-se à do sangue total.

Dois gerações de PFC foram desenvolvidas: a primeira, constituída pelo Fluosol-DA 20%, que é utilizado para casos de isquemia tecidual, e a segunda geração, o Perfubron, é mais eficiente que a primeira geração no transporte de oxigênio, sendo utilizado na preservação de órgãos.

O Fluosol-DA 20%, apresenta pequeno tempo de retenção intravascular e baixa capacidade de transportar oxigênio, alterando o mecanismo normal de síntese do surfactante, sendo, hoje, pouco empregado, limitando-se à perfusão coronariana pós-angioplastia.³⁶

Embora a segunda geração de PFC apresente maior capacidade de oxigenação, a quantidade de oxigênio dissolvido a uma atmosfera de pressão é, ainda, muito limitada e, os PFC têm ainda o inconveniente de apresentarem baixa viscosidade.

Podem, ainda, causar prejuízo no mecanismo de defesa imunológica e um tipo de reação

anafilática por ativação do complemento. Hoje, seu uso está restrito à preservação de órgãos para transplante e em pacientes de alto risco submetidos à angioplastia³⁷.

Referências Bibliográficas

1. RESOLUÇÃO - RDC Nº 343, DE 13 DE DEZEMBRO DE 2002
2. Elison N. Use of blood and blood products during anesthesia and surgery. ASA Refresher Course Lectures, 161:1-6, 1994.
3. Contreras M & Mollison PL. Immunological complications of transfusion. *BMJ*, 300:173-6, 1990
4. Foster-Jr., R.S.; Constanza, M.C.; Foster, J.C. et al Adverse relationship between blood transfusions and survival after colectomy for colon cancer. *Cancer*, 55:1195-1201, 1985
5. Mc Clinton, S.; Moffat, L.E.; Scott, S. et al Blood transfusion and survival following surgery for prostatic carcinoma. *Br. J. Surg.*, 77:140, 1990.
6. Heiss, M.M.; Mempel, W.; van de Watering, L.M.G et al. Blood transfusion-modulated tumor recurrence: first results of a randomized study of autologous vs. allogenic blood transfusion in colorectal cancer surgery. *J. Clin. Oncol.*, 12: 1859-367, 1994
7. Chung, M.; Steinmetz, O.K.; Gordon, P.H. Perioperative blood transfusion and outcome after resection for colorectal carcinoma. *Br. J. Surg.*, 80: 427, 1993.
8. Vamvakas, E.C.; Moore, S.P Perioperative blood transfusion and colorectal cancer recurrence: a qualitative statistical overview and meta-analysis. *Transfusion*, 33: 754, 1993
9. Busch, O.R.C.; Hop, W.C.J.; Marquet, R.L.; et al Blood transfusion and prognosis in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 328: 1372, 1993
10. Heiss, M.M.; Mempel, W.; Jauch, K.W et al Beneficial effect of autologous blood transfusion on infectious complications after colorectal cancer surgery. *Lancet*, 342: 1328, 1993.
11. Houbiers, J.G.A.; Brand, A.; van de Watering, L.M.G et al Randomized controlled trial comparing transfusion of leukocyte-depleted or buffy-coat-depleted blood in surgery for colorectal cancer. *Lancet*, 344: 573-7, 1994
12. Jensen, L.S.; Kissmeyer-Nielsen, P.; Wolff, B. et al Randomized comparison of leukocyte-depleted versus buffy-coat-poor blood transfusion and complications after colorectal cancer surgery *Lancet*, 348: 841-5, 1996
13. Moir, M.S.; Samy, R.N.; Hanasono, M. Autologous and heterologous blood transfusion in head and neck cancer surgery. *Arch. Otolaringol. Head Neck Surg.*, 125: 864, 1999
14. Heiss, M.M. - Risk of allogenic transfusions. *Br J Anaesth*, 81(suppl 1): 16-9, 1998.
15. Heiss, M.M.; Allgayer, H.; Gruentzner, K.U Prognostic influence of blood transfusion on minimal residual disease in resected gastric cancer patients. *Anticancer Res.*, 17: 2657, 1997
16. Toy P, Gajic O. Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Anesthesia Analgesia* 2004;99:1623-4
17. Donald RY Germs, gels and genomes: a personal recollection of 30 years in blood safety testing In Stramer SL Blood safety in the millennium. Bethesda: American Blood Bank Association p97, 2001
18. Miller RD. Transfusion therapy. In: Miller RD *Anesthesia*. 5th, New York: Curchill Livingstone 2000; p 1613-44.
19. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH et al The risk of transfusion transmitted viral infections *N Engl J Med* 334:1685, 1996
20. Stramer SL Reentry for donors deferred because of HIV or HVC-NAT or serological test results. Presented for BPAC june4, 2001
21. Florell SR, Velasco SE, Fine PG. Perioperative recognition, management, and pathologic diagnosis of transfusion-related acute lung injury. *Anesthesiology* 1994;81:508-10
22. Virus do Nilo Ocidental – Nova ameaça à segurança transfusional? *Rev bras hemoter* 2004;26(2):114-21
23. Miller RD. Update on Blood Transfusion. *Anesth Analg Suppl* 2000;
24. Dietz NM, Jorner MJ, Warner MA. Blood substitutes: fluids, drugs or miracle solutions? *Anesth Analg* 1996; 82:390-405



25. Vane LA, Funston JS, Kirschner R, H6rper D, Deyo D, Traber DL, Traber LL, Kramer GC. Comparison of transfusion with DCLHb or pRBC's for treatment of intraoperative anemia in sheep. *J Appl Physiol* 2002;92:343-353
26. Fischer SR, Burnet M, Traber DL, Prough DS, Kramer GC. Plasma volume expansion with solutions of hemoglobin, albumin and Ringer lactate in sheep. *Am J Physiol* 1999;276:H2194-H2203
27. Cohn SM, Farrel TJ. Diasparin cross-linked hemoglobin resuscitation of hemorrh6ge: comparison of a blood substitute with hypertonic saline and isotonic saline. *J Trauma* 1995;39:210-6
28. Schultz S, H6milton I, Malcolm D. Use of base deficit to compare resuscitation with lactated Ringer's solution, haemaccel, whole blood and diasparin cross-linked hemoglobin following hemorrh6ge in rats. *J Trauma* 1993;35:619-625
29. Vane LA, Funston JS, Deyo D, Kramer GC. Comparison of transfusion using packed red blood cells (pRBC) and hemoglobin based oxygen carriers (HBOC). *Anesthesia Analgesia* 2000; 90:S146 February.
30. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman Jr G. Diasparin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA* 1999;282(19):1857-64
31. Amberson WR, Flexner J, Steggerda FR. On the use of Ringer-locke solutions containing hemoglobin as a substitute for normal blood in mammals. *J Cell Comp Physiol* 1934;5:359-82
32. Hoffman SJ, Looker DL, Roehrich JM. Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8521-5
33. Bunn HF. Subunit Dissociation of certain abnormal human hemoglobin. *J Clin Invest* 1969;48:126-38
34. De Venuto F, Friedman HI, Neville JR, Peck CC. Appraisal of hemoglobin solution as a blood substitute. *Surg Gynecol Obstet* 1979;149:417-36
35. Ch6ng TMS. Semi permeable microcapsules. *Science* 1964;146:524-5
36. Kerius DM. Role of Perfluorocarbon Fluosol-DA in coronary angioplasty. *Am J Med Sci* 1994;307:218-21
37. Zuck TF, Riess JG. Current status of injectable oxygen carriers. *Crit Ver Clin Lab Sci* 1994; 31:295