



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS,**  
**ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA**  
**CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**SUBSTITUCIÓN DE SANGRE HOMOLOGA**  
**POR COLOIDE-HEMOGLOBINA**  
**EN EL CHOQUE HEMORRÁGICO EN UN**  
**MODELO EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**  
**P R E S E N T A**  
**DOCTOR ADOLFO CHAVEZ NEGRETE**

**COMITÉ TUTORAL**

**DR. RUBÉN ARGÜERO SÁNCHEZ**  
**PROFESOR MARCOS INTAGLIETTA**  
**DR. GUILLERMO RUÍZ ARGÜELLES**  
**DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNÁNDEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

<b>PREFACIO</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>7</b>
<b>2. JUSTIFICACION</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Búsqueda de alternativas de la transfusión</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Transportadores artificiales de oxígeno</b>	<b>12</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>14</b>
<b>4. ABORDAJE DEL PROBLEMA</b>	<b>15</b>
<b>5. HIPOTESIS</b>	<b>17</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>6.1 Primera etapa</b>	<b>17</b>
<b>6.2 Segunda etapa</b>	<b>17</b>
<b>6.3 Tercera etapa</b>	<b>18</b>
<b>7. METODOLOGIA</b>	<b>19</b>
<b>7.1 Primera etapa</b>	<b>19</b>
<b>7.1.1 Origen de la hemoglobina</b>	<b>19</b>
<b>7.1.2 Reacción con el almidón</b>	<b>19</b>
<b>7.1.3 Curva de espectrofotometría</b>	<b>19</b>
<b>7.1.4 Enlace químico entre la Hb-almidón</b>	<b>19</b>
<b>7.2 Segunda etapa</b>	<b>20</b>
<b>7.2.1 Hemodilución isovolémica</b>	<b>20</b>
<b>7.2.2 Procedimiento prequirúrgico</b>	<b>20</b>
<b>7.2.3 Resultados</b>	<b>21</b>
<b>7.3 Tercera etapa</b>	<b>21</b>
<b>7.3.1 Preparación para la microcirculación</b>	<b>21</b>
<b>7.3.2 Evaluación de la eficacia</b>	<b>21</b>
<b>7.3.3 Metodología</b>	<b>23</b>
<b>7.3.4 Parámetros</b>	<b>23</b>
<b>7.3.5 Hemodilución extrema</b>	<b>23</b>
<b>7.3.6 Análisis estadístico</b>	<b>24</b>
<b>7.3.7 Resultados</b>	<b>24</b>
<b>8. DISCUSION</b>	<b>27</b>
<b>8.1 Primera etapa</b>	<b>27</b>
<b>8.2 Segunda etapa</b>	<b>27</b>
<b>8.3 tercera etapa</b>	<b>28</b>
<b>9. CONCLUSION</b>	<b>30</b>
<b>10 REFERENCIAS</b>	<b>31</b>
<b>11 ANEXOS</b>	<b>36</b>
<b>12 GRAFICAS</b>	<b>44</b>
<b>13 FIGURAS</b>	<b>51</b>
<b>14 TABLAS</b>	<b>57</b>
<b>15 CUADROS</b>	<b>60</b>

## **PREFACIO**

A pesar de tener más de un siglo la búsqueda de un sustituto de sangre, no existe comercialmente ninguno autorizado para uso humano.

Hasta los ochentas, la investigación y el desarrollo de esta iniciativa había permanecido con poco avance; sin embargo, la posibilidad de adquirir el SIDA a través de la transfusión, impulsó la investigación en este novedoso campo, por ello las publicaciones se multiplicaron a partir de las dos últimas décadas y en ellas pueden encontrarse con mayor frecuencia los descalabros, mejor que los éxitos.

En 1994 fue particularmente un año fecundo en ésta área, como consecuencia de la Primera Reunión en Sustitutos Sanguíneos celebrada en Bethesda, Maryland, apoyada por el Instituto Nacional de Salud (NIH) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, lo que incrementó el interés científico y particularmente el comercial.

En 1995, 96 y 97 se repitieron las experiencias en San Diego California, encabezadas por un grupo que más adelante constituyeran la *International Society for Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology* (ISABI); a partir de entonces se han programado reuniones bianuales llevadas a cabo en diferentes países, siendo la última en junio del 2005 en Providence Rhode Island, Estados Unidos.

La experiencia adquirida en la elaboración de un sustituto de los glóbulos rojos ha llevado a enfrentar muchas sorpresas y nosotros no hemos sido la excepción, pero al mismo tiempo hemos tenido que desafiar retos que plantean nuevas estrategias no solo en el campo del transporte de oxígeno, sino en el audaz sendero por sustituir otros elementos sanguíneos como las plaquetas.

La gran cantidad de información que cotidianamente se recibe por medios electrónicos y los intercambios personales durante las reuniones internacionales celebradas en este y otros continentes, nos han permitido entrever un escenario difícil, pero no imposible.

Por otro lado, resulta una empresa difícil plasmar el tema en extenso en un documento como el presente, ya que limita la oportunidad de adentrarse en la información histórica, molecular, experimental y clínica lo suficiente como para comprender la complejidad del tema, especialmente cuando en nuestro País no existe iniciativa similar.

El presente proyecto fue desarrollado en tres etapas; en la primera, se elaboró el producto en la Unidad de Investigación del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo los consejos del Maestro Guillermo Carvajal, Jefe del Departamento de Bioquímica del Instituto Politécnico Nacional; la dirección vehemente del Dr. Gilberto Castañeda Hernández y la crítica constructiva del Dr. Rubén Argüero.

Casi en paralelo, se llevó a cabo la segunda etapa, en la que se retó la tolerabilidad del producto en un modelo de choque hemorrágico, experimento que hubo necesidad de desarrollar en roedor especialmente diseñado para este propósito en el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, con la experimentada destreza del Dr. Enrique Foyo.

El transporte de oxígeno es posible analizarlo solo bajo el campo de la microcirculación; esta etapa se realizó en el Laboratorio de Bioingeniería de la Universidad de California, San Diego, sitio donde existe la infraestructura necesaria para tal efecto, bajo la dirección del Profesor Marcos Intaglietta y el apoyo de la Doctora Amy G Tsai.

Para culminar el proyecto y como consecuencia de los inesperados resultados obtenidos en los capilares, se analizó la capacidad de acarreo de óxido nítrico por el sustituto de sangre, en una preparación de anillos aórticos de rata *in vitro*, extraordinariamente montado por el Técnico Teodoro Villanueva y la Doctora Martha Oropeza en la Unidad de Investigación en Farmacología dirigido por la Doctora María G. Campos, de donde se desprendió la publicación inserta en el presente texto.

Muchas otras personas apoyaron el desarrollo de este denodado esfuerzo; he de agradecer particularmente al Dr. Onofre Muñoz Hernández, Coordinador de Investigación del IMSS en ese momento, por su apoyo y confianza, los consejos del Dr. Konrad Meßmer, Armando Isibasi, José Moreno, Miguel Cruz y Dante Amato; reconocer la colaboración incansable de Magdalena Rojas-Uribe, quién montara los ensayos químicos. No terminaría la lista si mencionara a todos aquellos que de alguna forma positiva o disuasiva intervinieron durante el escabroso camino de la búsqueda de mi objetivo. Muchas preguntas quedaron en el camino sin contestar, algunas de ellas siembra para futuras generaciones de nuestros alumnos. Encuentro la frase de Oscar Wild sin igual para culminar este prefacio *“Rara vez la verdad es clara, que nunca simple”*

*Adolfo Chávez Negrete*

## **RESUMEN**

La búsqueda de substitutos de sangre tiene más de cien años, pero las dificultades tecnológicas, la falta de financiamientos e interés comercial, relegaron la investigación formal hasta principios de los ochentas con la aparición del SIDA. En los experimentos iniciales, la hemoglobina libre se pensó idónea para el acarreo de oxígeno, pero los primeros ensayos clínicos arrojaron malos resultados mostrando rápida filtración renal acompañada de nefrotoxicidad lo que obligó a que en los subsiguientes experimentos tuviera que ser planeados con hemoglobinas modificadas ya sea en forma polimérica, englobada en liposomas o conjugada con productos de elevado peso molecular con el objeto de evitar su filtración renal y prolongar su permanencia intravascular.

A pesar de que las infecciones y las reacciones transfusionales han disminuido sustancialmente, el pequeño pero significativo riesgo para adquirir otros virus como el de la hepatitis, el virus del Oeste del Nilo, el citomegalovirus o la enfermedad por priones, impulsaron la búsqueda de alternativas a la transfusión.

En México la demanda más importante de sangre la genera la cirugía y el trauma, tal es el caso de la cirugía cardiotorácica debido a la necesidad de incorporar el uso de la derivación cardiopulmonar que requiere para su cebado de 1 a 2 litros de sangre.

En el Hospital de Cardiología, del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, se realizan diariamente 6 a 8 cirugías, requiriéndose de aproximadamente 80 donadores por semana; esto constituye una demanda que no siempre se puede satisfacer con los recursos internos, advirtiéndose la necesidad de buscar el producto en otros bancos y no en pocas ocasiones tener que diferir las cirugías por falta del producto biológico.

Tomando en cuenta estos antecedentes, el presente proyecto tuvo por objeto la elaboración de un substituto de sangre con disponibilidad inmediata, disminuir la necesidad de transfusiones y sus riesgos, y los diferimientos quirúrgicos.

El trabajo se desarrollo en tres etapas; en la primera, se elaboró el producto que consistió en la extracción de la hemoglobina de los paquetes globulares que el Banco de Sangre del Hospital desecha por vencimiento; esta hemoglobina se eslabonó químicamente con un polisacárido, el almidón con el objeto de incrementar el peso molecular y evitar su filtración renal; casi en paralelo se realizó la segunda etapa, en la que se probó la

tolerabilidad del producto en un modelo experimental de choque hemorrágico, estudio que se efectuó en el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

El transporte de oxígeno se analizó en la microcirculación, por ello la tercera etapa se realizó en el Laboratorio de Bioingeniería de la Universidad de California de San Diego, donde se evaluaron las condiciones microhemodinámicas en los capilares de un modelo experimental en hamster preparado para hemodilución extrema.

Para culminar el proyecto y como consecuencia de los inesperados resultados obtenidos en los capilares, se analizó la capacidad de acarreo de óxido nítrico por el “substituto de sangre”, en anillos aórticos de rata en un modelo *in vitro*, de donde se obtuvieron las conclusiones del presente proyecto: acarreo de óxido nítrico, mejor que de oxígeno.

## 1. INTRODUCCIÓN

Por siglos el hombre ha realizado transfusiones con fines terapéuticos y muchos procedimientos quirúrgicos actuales no podrían llevarse a cabo sin el apoyo de la transfusión. Desde la época de los egipcios los espectadores corrían a beber la sangre de los gladiadores caídos en batalla, pues se decía que en ella radicaba la fortaleza y la bravía de los hombres; incluso en la edad media, beber sangre se proponía como el remedio de varias enfermedades.

Pero no fue sino hasta 1492 que se registró la primera transfusión; el Papa Inocente VIII recibió la sangre de tres jóvenes robustos; el procedimiento no reportó éxito y el Papa murió; sin embargo, no está claro que haya sido ésta una verdadera transfusión ya que la ruta intravenosa no se consiguió hasta el descubrimiento del sistema vascular por William Harvey publicado en 1628 con el título "*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*".

Es aceptado que Andreas Libavius realizó la primera transfusión en 1615, pero uno de los verdaderos pioneros de la medicina transfusional fue el inglés Richard Cogen quien en 1665 realizó la canalización de arteria y vena en perros, rescatándolos del choque hemorrágico.

En 1667, Jean Denys transfundió nueve onzas de sangre de un borrego en la vena de un joven que padecía leucemia; la técnica aparentemente se realizó sin contratiempos, pero el paciente murió al tercer día. Esta fue sin duda la primera reacción transfusional descrita en la literatura. El caso fue discutido acaloradamente por la Academia Francesa, logrando exonerar a Denys, pero el parlamento Británico vetó determinadamente la transfusión. Ciento cincuenta años tuvieron que pasar para que Blundell reiniciara la transfusión en el choque hemorrágico, éxito que le confirió el título de padre de la moderna transfusión.



## 2. JUSTIFICACIÓN

### 2.1. Búsqueda de alternativas de la transfusión

La transfusión no es inocua, tuvieron que ser superadas muchas adversidades como los problemas de coagulación resueltos por Bischoff en 1835, las infecciones bacterianas vencidos por Lister en 1867 y las constantes reacciones a ciertos “productos” hasta esa fecha desconocidos y que gravitaran el concepto de “*horror autotoxicus*” de Paul Erlich en el siglo XIX, encontrando su explicación y solución hasta el descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO y el factor Rh por K. Landsteiner en 1901 y 1940 respectivamente.<sup>1</sup>

La historia de los “substitutos de sangre” podría decirse que se remonta a la infusión de fluidos en el trayecto venoso; en 1875 se inició con solución salina y ocho años después con la solución de Ringer, dando inicio a lo que hoy conocemos como “hemodilución”, procedimiento que rezagara por su éxito y seguridad la búsqueda de otras alternativas a la transfusión.

Las infecciones por transfusión hoy día se han reducido en forma sustancial con las nuevas técnicas de seroidentificación viral, reduciendo la hepatitis C a 1 caso entre 30,000 a 150,000 transfusiones, la hepatitis B de 1 entre 30,000 a 250,000 y el de la inmunodeficiencia humana de 1 a 500 000; además se ha logrado un descenso en las reacciones transfusionales que se estima de 1 en 500 000.<sup>2</sup>

El costo y tiempo de almacenamiento es otro factor que hay que considerar. Bajo las condiciones de conservación de citrato de sodio, el tiempo útil de los concentrados eritrocitarios en México era de 21 días, mientras que con adenina-manitol hoy día se logra hasta por 45 días. A pesar de los sistemas de control interno de los Bancos de Sangre, en México se desechan por caducidad aproximadamente 44 mil unidades al año, de acuerdo al informe del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea,<sup>3</sup> lo que significaría que prolongar los tiempos de almacenamiento no solamente incrementaría los costos, sino permitiría mayor número de unidades caducas. Aunque no está consignado, es un hecho el desconocimiento de los “inventarios” sanguíneos en cada uno de los bancos de sangre del País, lo que impide optimizar la transfusión entre los donadores y solicitantes; tomando en cuenta esta coyuntura, y en forma paralela al proyecto se elaboró y se propuso un software denominado SINADET: **S**istema **N**acional **d**e **E**nlace para la **T**ransfusión, a través del cual

se da a conocer el producto de la donación en los Bancos de Sangre del país y dentro del IMSS, con el objeto de facilitar e identificar la ubicación de los derivados a través de “intranet”; se consiguió el dominio: [contacto@sangreenlinea.com](mailto:contacto@sangreenlinea.com) y se formó a “los amigos de la donación informática altruista” (**Anexo 1**).

A pesar del entusiasmo y apoyos que diversas organizaciones han puesto en la eficiencia de los bancos de sangre (OMS/OPS)<sup>4</sup>, continúa la pesquisa por un sustituto de la transfusión.<sup>5</sup>

Mientras que la demanda de transfusión en la anemia crónica ha sido satisfecha en buena parte con los suplementos de vitamina B, ácido fólico, hierro y eritropoyetina,<sup>6</sup> el reemplazo sanguíneo consecutivo a la hemorragia aguda, ha impuesto un reto a los bancos de sangre para lograr mejor disponibilidad del producto.

Hay que considerar que aún en los países del primer mundo existe disponibilidad sanguínea limitada; en los Estados Unidos la demanda de sangre ha superado el modesto incremento de la donación; por ejemplo, para 1992 fueron recolectadas más de 15 millones de unidades de las cuales más del 60 por ciento fueron utilizadas en procedimientos quirúrgicos, especialmente en ancianos, no obstante se presentó un déficit para abastecer la urgencia en algunos estados de la Unión Americana.<sup>7</sup>

Otro factor de controversia que merece la pena considerar es la transfusión innecesaria; decidir la transfusión va más allá de una normatividad; en este sentido, diversas estrategias se han considerado para identificar el detonante de la transfusión. La posibilidad de adquirir el virus de la inmunodeficiencia humana a través de la transfusión en los años ochentas ayudo a reconsiderar esta postura. Antes de ello, el límite inferior para decidir la transfusión era 34% de hematocrito y/o 10 g/dL de hemoglobina,<sup>8</sup> actitud basada exclusivamente en los niveles de hematocrito y hemoglobina, pero que no significaban de ninguna manera la oxigenación en los tejidos. Para poder establecer el momento decisivo de la transfusión, fue necesario contar con las observaciones de la microcirculación.<sup>9</sup> La hemodilución por ejemplo, es un procedimiento que logra mantener el equilibrio hemodinámico a pesar de la pérdida de sangre; esta ha sido la rutina desde hace más de 5

décadas y persiste hasta la fecha; su eficacia se debe al incremento en el gasto cardíaco y de la velocidad del flujo sanguíneo, los que compensan la falta de eritrocitos sin merma en la entrega de oxígeno tisular;<sup>10</sup> sin embargo, este mecanismo compensador no es infinito y severas pérdidas sanguíneas no se logran recuperar aún con hemodilución extrema (>60% del volumen intravascular).

Cuando la masa globular se pierde durante una hemorragia, merma también la viscosidad sanguínea debido a que los glóbulos rojos constituyen la parte fundamental en la conservación de la viscosidad; al caer la viscosidad sanguínea, disminuye el roce o fricción (shear stress) sobre el endotelio; este mecanismo necesario para la señalización y liberación de óxido nítrico se ve demeritado cuando el hematocrito se pierde por debajo del 50%; la ausencia de óxido nítrico en la microcirculación provoca cierre de los capilares provocando isquemia; este mecanismo ha sido parcialmente revertido en forma experimental incrementando la viscosidad del diluyente;<sup>11</sup> esta aportación fue sustancial para definir el “punto de corte” para decidir una transfusión, y ha sido también fundamental para la elaboración de los futuros transportadores artificiales de oxígeno; de esta forma se definió como límite inferior un hematocrito y hemoglobina de 25 por ciento y 7 g/dL respectivamente.<sup>12</sup>

El almacenamiento de sangre previo a las cirugías electivas<sup>13</sup> también conocido como autotransfusión de predepósito o la hemodilución perioperatoria<sup>14</sup> son algunas de las opciones para disminuir la demanda de sangre de banco,<sup>15</sup> este procedimiento que para los Estados Unidos significa un ahorro de hasta el 20%, desafortunadamente no se lleva a cabo en México.

La hemodilución es un procedimiento que se practica rutinariamente en la cirugía cardiotorácica durante el cebado del circuito extracorporeo con el objeto de poder intervenir las cavidades del corazón; el volumen de relleno o cebado del equipo es de aproximadamente 1,500 mL en un individuo de 70 kilogramos y está conformado por soluciones salinas, ringer, almidón y concentrado de eritrocitos cuya cantidad puede variar de entre dos a tres unidades de 300 mL por procedimiento.<sup>16</sup>

Con el objeto de tener suficiente sangre de banco para la cirugía, cada paciente debe contribuir con al menos 12 donadores familiares o amigos; esta cantidad ha sido establecida en base a la experiencia de los bancos de sangre; se sabe que poco más del 40 por ciento de los donadores potenciales son rechazados debido a diferentes inconvenientes clínicos (bajo peso, antecedentes epidemiológicos dudosos o de riesgo, menstruación) y seropositivos a algún agente infeccioso detectados durante el escrutinio habitual; como resultado de ello se logran 5 a 6 unidades para la cirugía; esta circunstancia y la falta de cultura para la donación, generan una escasa oferta contra una sobredemanda, lo que merma la disponibilidad de sangre o repercute en diferimientos quirúrgicos.

Con el apoyo de la hemodilución es posible estabilizar una hemorragia con pérdida hasta del 50% del hematocrito;<sup>17-18</sup> una reducción mayor conlleva un descenso de la viscosidad sanguínea de alrededor de 2 centipoises, lo que disminuye el shear stress y la consecuente producción de óxido nítrico.<sup>19</sup>

Si el volumen de restitución es con soluciones coloides o viscosas, ayuda a incrementar el gasto cardíaco y la velocidad del flujo sanguíneo.<sup>20-22</sup>

La viscosidad sanguínea favorece la vasodilatación por la liberación endotelial del óxido nítrico<sup>23</sup> por medio del receptor AP-1 localizado en el endotelio vascular provocando un estímulo que induce la producción de sintasa de óxido nítrico dependiente de NF- $\kappa$ B (Factor nuclear  $\kappa$ B), produciendo vasorelajación.<sup>24</sup> En este sentido, la pérdida del hematocrito más allá del 50% condiciona una caída importante en la viscosidad sanguínea que se refleja en la ausencia de estímulo para la producción de óxido nítrico vía shear stress, resultando en vasoconstricción; este concepto, desconocido en los albores de la elaboración de la sangre artificial, resultó en descalabros que hasta la fecha se tienen en los experimentos animales y ensayos clínicos con acarreadores de oxígeno de baja viscosidad.

Una solución de baja viscosidad no alcanza a recuperar la pérdida globular durante la hemorragia, y por lo tanto el “oxigenador” o transportador de oxígeno no llega a nivel capilar.

En resumen, la disminución de la viscosidad sanguínea, reduce el shear stress y la liberación de óxido nítrico, provocando vasoconstricción dejando sin oportunidad a los glóbulos rojos o cualquier otra alternativa acarreadora de oxígeno, de ahí la importancia de

tomar en cuenta estas propiedades reológicas en la elaboración de los substitutos de sangre.

## **2.2. Transportadores artificiales de oxígeno.**

La idea de utilizar la hemoglobina como sustituto de los glóbulos rojos, existe desde hace más de 100 años; el primer reporte que se tiene fue el de Von Stak (1898) quién trató con soluciones de hemoglobina a un paciente con anemia; aunque se realizaron varios intentos, el resultado fue la hemoglobinuria, nefrotoxicidad y elevación de la presión sanguínea.

Posteriormente Rabiner (1967) logró disminuir la nefrotoxicidad mejorando la separación de la hemoglobina del estroma eritrocitario, pero persistió la eliminación renal. Bunn y Jandl (1967) pensaron interligar la hemoglobina entre si con el objeto de incrementar el tamaño y peso molecular, prolongando su permanencia intravascular. A partir de entonces varias iniciativas en este sentido se han llevado a cabo.<sup>25</sup>

La fuente de obtención de la hemoglobina constituyó otro problema por resolver; algunos fabricantes como la casa Biopure, utilizaron la hemoglobina bovina por ser más abundante; sin embargo, la posibilidad de adquirir la enfermedad de las vacas locas (encefalopatía espongiiforme) constituyó una fuerte limitación; otra fuente la constituyeron los concentrados eritrocitarios caducos, pero no todos los países tienen este sobrante; por ejemplo, en Estados Unidos de Norteamérica los concentrados eritrocitarios que llegan a expirar son menores al 1%, por ello la obtención de hemoglobina se realiza en ese país a partir de los glóbulos aún vigentes.<sup>26</sup>

En México, el porcentaje de concentrados eritrocitarios vencidos es del 4%, lo que representa 44,000 paquetes anuales (Centro Nacional de La Transfusión, 2000), lo que pareciera suficiente recurso si se comercializaran los substitutos de sangre.

La hemoglobina recombinante, es otra fuente de obtención, aunque costoso y no esta claro si se logre una producción tan importante como la que se requiere;<sup>27</sup> otro problema existente es la persistencia de los lipopolisacáridos bacterianos resultantes del proceso, ya que han provocado reacciones pirogénicas en los ensayos clínicos Fase I.<sup>28</sup>

Al ser la hemoglobina una proteína de bajo peso molecular (64,600 Daltons) se filtra con rapidez por el riñón, por lo que ha tenido que ser eslabonada, polimerizada o encapsulada con diversas técnicas con el objeto de prolongar su permanencia intravascular.

Por ejemplo, el interligamiento entre las cadenas  $\alpha\alpha$  ha logrado una permanencia de 12 horas (**Fig. 1**), mientras que la casa Northfield ha polimerizado varias moléculas de hemoglobina (**Fig. 2**). La hemoglobina también ha sido micro-encapsulada en membranas de fosfolípidos tratando de homologar los eritrocitos; esta modalidad permite además incorporar elementos como el 2,3-DPG, que facilita la disociación del oxígeno de la hemoglobina; además de perseguir las propiedades reológicas de los glóbulos rojos, alcanzando  $1\mu$  de diámetro; sin embargo, su principal problema es el costo.<sup>29</sup>

La hemoglobina puede también unirse químicamente a polímeros como el dextrán, el almidón o el polietilenglicol, con diferente peso molecular (**Fig. 3**).

#### Perfluorocarbonos

Otro grupo de compuestos que han sido elaborados como transportadores de oxígeno y no derivan de la hemoglobina son los perfluorocarbonos; entre las ventajas de estos transportadores acelulares son las partículas que lo constituyen (1/70 del tamaño del eritrocito) lo que le permite llevar el oxígeno a lugares donde los glóbulos rojos no pasan; sin embargo, tienen otras desventajas, como una vida útil intravascular corta y la necesidad de recibir fracciones inspiradas de oxígeno cercanas al 100%, situación que puede dificultar su administración en los casos de urgencia.<sup>30</sup>

Aunque la indicación más clara para el uso de transportadores artificiales de oxígeno es el sangrado agudo, hay otras condiciones que justifican su utilización, como las cirugías programadas en las que se requieren grandes volúmenes de sangre, como es el caso particular de la cirugía cardiotorácica y traumatológica. No hay que olvidar que los pacientes *Testigos de Jehová* que son sometidos a diversas cirugías con elevado riesgo de sangrado, por lo que productos como estos podrían ser una excelente alternativa de la transfusión.<sup>31</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falta de disponibilidad de sangre en los casos de urgencias hemorrágica es frecuente, lo que ha obligado a las Instituciones de Salud a incrementar las campañas de donación altruista con el objeto de mantener los inventarios necesarios, especialmente con los grupos sanguíneos raros. Algunas cirugías como la cardiotorácica requieren de por lo menos 10 donadores por evento, debido al uso de la circulación extracorporea que necesita de un “excedente circulatorio” de casi dos litros, lo que incrementa además el riesgo de las infecciones por transfusión.

Por tal motivo merece la pena buscar alternativas a la transfusión, especialmente en aquellas cirugías donde el sangrado transoperatorio supera el 50 por ciento del volumen intravascular, más allá del volumen recuperable a través de la hemodilución.

Por otro lado, aunque las infecciones y reacciones por transfusión han descendido en forma importante, siempre estará presente el riesgo de infecciones como las enfermedades emergentes como el virus del Oeste del Nilo, Ebola, la hepatitis TT, Malburg, el virus del Dengue, citomegalovirus o los priones

Si además tomamos en cuenta que los Testigos de Jehová incursionan en estos servicios con relativa frecuencia, es una justificación institucional y social de importancia.

Si bien varios de los productos transportadores de oxígeno han sido elaborados por diversas compañías en otros países (**Tabla I**), la necesidad de investigar alternativas a la transfusión en México donde existe escasa donación, es prioritario.

Encontrar un sustituto, no solamente resolvería la disponibilidad inmediata de sangre, sino permitiría al País enfrentar las necesidades futuras, hoy vigente en países desarrollados. Las 8 cirugías que diariamente se llevan a cabo en el Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, requieren de 12 donadores familiares por cada cirugía, lo que significa la búsqueda de 90 donadores diarios y más de 2000 anuales; se entiende que más de una cirugía tiene que diferirse por falta de sangre.

El proyecto puede plantearse las siguientes preguntas:

¿Es posible elaborar un sustituto de sangre?,

Demostrar su seguridad, tolerabilidad y eficacia, en un modelo experimental

#### 4. ABORDAJE DEL PROBLEMA

*¿Es posible la elaboración de un sustituto de sangre tomando en cuenta la situación económica y tecnológica del País, para considerar factible el proyecto?*

Los productos farmacéuticos que se comercializan en el País, han sido elaborados e investigados en su etapa experimental y clínica en otros país donde la infraestructura permite sintetizar y evaluar resultados experimentales; por lo general los ensayos clínicos que se realizan en México son Fase III o IV de postcomercialización, y participa con escasos sujetos que faciliten mejor la confianza del usuario para luego incursionar en el cuadro básico de medicamentos del sector salud.

La sangre artificial no es una línea de investigación de ningún laboratorio comercial del mundo; algunos como Baxter han aportado un capital importante para el desarrollo de la tecnología y ese capital de riesgo se perdió con los primeros fracasos en los noventas.<sup>32</sup>

Otros laboratorios (Sangart INC) han incursionado tomando en cuenta la necesidad de sustitutos de sangre, pero las aportaciones han sido más bien modestas y condicionadas.

En México en cambio, hay un “déficit” de sangre por desconocimiento de los inventarios o excedentes de los bancos de sangre debido a que estos no son difundidos o publicados; este “excedente” que por desgracia vence es una fuente importante para la elaboración de la materia prima de los sustitutos con base en la hemoglobina.

Utilizar las técnicas de entre cruzamiento por medio de puentes como la diaspirina para elaborar las hemoglobinas interligadas  $\alpha\alpha$ , resulta a la luz de las publicaciones inadecuado, debido a que diversos estudios han demostraron que éste producto fue suspendido en los ensayos clínicos fase II a finales de los noventas.<sup>32</sup>

La hemoglobina polimerizada no es menos costosa que la interligada. Los fosfolípidos encapsulantes elaborados en la Universidad de Waseda Japón, resultan extraordinariamente costosos.

El almidón en cambio, es un coloide que ha demostrado eficacia y seguridad como expansor de plasma en diversos estudios clínicos internacionales;<sup>33-34</sup> la amilopectina, el principal constituyente del almidón es un polímero de glucosas que puede ser adquirido desde 200 hasta 400 kilodaltones, y es relativamente barato y con elevada viscosidad.

*¿Cómo elaborar y probar un transportador artificial de oxígeno?*



La Food and Drug Administration (FDA) en 1990 a través del *Center for Biologics Evaluation and Research* publicó las normas y recomendaciones que deben observarse para la elaboración de transportadores artificiales de oxígeno.<sup>35</sup>

Estas características han sido divididas inicialmente en pruebas físico-químicas e *in vivo* (**Tabla II**); sin embargo, en la década de los 90s, los estudios de microcirculación tomaron relevancia,<sup>36</sup> y con el tiempo han demostrado ser indispensables para el análisis de la eficacia de cualquier transportador de oxígeno.

No es el objetivo del presente proyecto desarrollar toda la tecnología indispensable para proponer un producto final, pero si establecer un principio metodológico necesario que de inicio al conocimiento para continuar con la pesquisa encaminada a los ensayos clínicos, donde se exploran otras variables como los efectos toxicológicos.

Derivado de lo anterior podrían elaborarse las siguientes preguntas:

- ¿Es posible la unión química entre la hemoglobina humana y un polisacárido (almidón), con estabilidad físico química de acuerdo a las observaciones de la FDA?
- ¿La elaboración de esta molécula (hemoglobina-almidón) tendrá tolerabilidad y seguridad en un modelo experimental de hemorragia?
- ¿La molécula de hemoglobina-almidón será capaz de transportar oxígeno bajo la observación de la microcirculación (eficacia)?

## 5. HIPOTESIS

5.1 La hemoglobina es capaz de reaccionar químicamente con el almidón para establecer una unión estable; esta unión se analizará a través de:

- *Espectrofotometría*
- *Gel de poliacrilamida.*
  - *La hemoglobina-almidón demostrará adecuada oximetría, al compararla con la hemoglobina humana.*

5.2. La molécula de hemoglobina-almidón podrá demostrar tolerabilidad y **seguridad** en un modelo experimental de hemorragia, mediante:

- *Estabilidad hemodinámica y gasométrica ( hemodilución isovolémica).*
- *Lograra la sobrevida del modelo experimental.*

5.3. La hemoglobina-almidón demostrará **eficacia** en el transporte de oxígeno bajo la observación de la microcirculación a través de:

- *Evaluación de oxígeno capilar y tisular*
- *Evaluación de la funcionalidad capilar.*

## 6. OBJETIVOS

El presente proyecto buscará en tres etapas los siguientes objetivos:

### **6.1. Primera Etapa (Etapa bioquímica)**

El desarrollo de la metodología química necesaria para la unión de la hemoglobina humana con el almidón, encontrando su estabilidad y equilibrio físico-químico demostrado a través de:

- Curva espectrofotométrica
- Gel de poliacrilamida
- Establecer sus características gasométricas.

### **6.2. Segunda Etapa (Etapa experimental)**

- Desarrollar un modelo murino de hemodilución isovolémica para demostrar la **seguridad** del producto evaluada mediante
  - a) Estabilidad hemodinámica y gasométrica
  - b) Sobrevida al menos del 50% de los especímenes.

### ***6.3. Tercera Etapa (Etapa de estudio sobre la microcirculación)***

Demostrar mediante la observación de la microcirculación, que bajo condiciones de hemodilución extrema el compuesto hemoglobina-almidón es capaz (***eficacia***) de:

- Transportar el oxígeno a nivel capilar y tisular
- Mantener la funcionalidad capilar.

## 7. METODOLOGIA

### 7.1. Primera Etapa. (procedimiento bioquímico)

#### 7.1.1. Origen de la hemoglobina.

Para iniciar la primera etapa del proyecto se extrajo la hemoglobina de los glóbulos rojos de los paquetes globulares vencidos que el Banco de Sangre del Hospital de Cardiología del CMN SXXI, suele dar de baja al término de su vigencia; la hemólisis se realizó por medio de cristalización descrito previamente por De Venuto F.<sup>37</sup>

#### 7.1.2. Reacción con el almidón.

Los cristales obtenidos se disolvieron en agua inyectable y se le determinó la concentración de hemoglobina, posteriormente se dializaron en agua destilada (1:4 v/v) para eliminar el exceso de potasio y fosfatos. Finalmente se dializaron en solución de diálisis "peritoneal" para uso humano (contenido: 5.7 g NaCl, 3 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0.28 g de CaCl<sub>2</sub>, 0.30 g de KCL y 0.15 g de MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, / 1L) para obtener un balance de los electrolitos y del pH.

La esterilización se logró mediante la elusión a través de un filtro millipore de .22μ. Al final la hemoglobina obtenida se analizó para determinar nuevamente su concentración por el método de cianometahemoglobina.

#### 7.1.3. Identificación de la hemoglobina mediante curva de espectrofotometría

La identificación de la hemoglobina se logró mediante la lectura que emite la curva de absorbancia en el espectrofotómetro (Beckman DU) la cual debe oscilar entre 420, 540 y 590 nm (**Fig. 4a**) estimándose la concentración de hemoglobina en  $20 \pm 3$  g/dL.

Un corrimiento en gel de poliacrilamida, por el método de BIO-RAD (Laemmli, UK, Nature 1970) estableció los pesos moleculares y la pureza del producto (**Fig. 4b**).

A continuación se verificó la pureza de la hemoglobina por medio de columna de sephadex 100. La esterilidad de la hemoglobina se certificó por cultivo en placa.

#### 7.1.4. Enlace químico entre la hemoglobina y el almidón (Hb-almidón)

La conjugación entre la Hb y el almidón (250,000 Daltons), tiene por objetivo prolongar la permanencia intravascular del conjugado al incrementar el tamaño molecular, evitando así su filtración renal y la nefrotoxicidad conocida de la hemoglobina libre.<sup>38</sup>

La amilopectina es el principal compuesto del almidón y esta estructurada por 45 grupos hidroxietílicos por cada 100 unidades de glucosa a través de una ligadura de éter en el C-2; para poderla eslabonar a la hemoglobina, es menester utilizar un puente donador de cloros, para lo cual se utilizo el cloruro cianúrico; de esta forma se eliminan dos átomos de cloro y se substituyen por grupos amino, iminos e hidroxilo formando ligandos estables mediante una reacción covalente.<sup>39</sup> (**Fig. 4c**)

La esterilización del aducto final se llevo a cabo mediante la filtración a 0.22 $\mu$  demostrando su pureza por medio del lisado de amebocitos *Limulus*.<sup>40</sup>

La viscosidad final del producto se analizo mediante un viscosímetro rotatorio (Wells-Brookfield RVT-II+, Massachusetts).<sup>41</sup>

## **7.2. Segunda Etapa (modelo experimental)**

### **7.2.1. Hemodilución isovolémica.**

Para la evaluación de la *tolerabilidad* y *seguridad* del aducto (Hb-almidón) se desarrolló un modelo de hemodilución isovolémica en rata,<sup>42</sup> que consiste en provocar una exanguinación aproximada del 50 al 60% del volumen intravascular circulante, estimándose a partir del 7% del peso corporal del animal con reposición isovolumétrica del producto a evaluar.

### **7.2.2. Procedimiento pre-quirúrgico.**

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley para el procedimiento descrito en el **Anexo 2** y se dividieron en dos grupos:

**Grupo I:** Estuvo constituido de 8 animales a los que se les infundió en forma simultánea a la exanguinación **Penta-almidón** (amilopectina de 250,000 mw, 0.9 g de Na Cl, 0.5 g de hidróxido de sodio y amilopectina de 250,000 de peso molecular en 100 mL, Ron-Puolec-Rorer).

**Grupo II:** Este fue el grupo problema y estuvo constituido por 8 especímenes; este grupo recibió la mezcla de **Hb-almidón** y se desarrollo en forma similar al grupo testigo. Los resultados de la presión arterial media (PAM), gasometrías arteriales y venosas, hemoglobina/hematocrito, y tiempo de sobrevida versus hematocrito, fueron analizados en los tiempos basal, a los 5, 10 y 15 mL de sangrado considerando un nivel mínimo de

significancia de  $p < 0.05$  para todos los parámetros mismos que se analizaron a través de t de student.

### **7.2.3. Resultados (segunda etapa)**

El volumen de exanguinación para lograr el descenso del hematocrito fue similar en ambos grupos ( $4.3 \pm .7$  y  $4.1 \pm .5$  mL/Kg del peso corporal, p NS).

Los niveles de hemoglobina / hematocrito en forma basal no tuvieron diferencia entre los grupos; sin embargo, a los 5, 10 y 15 mL después del sangrado, la hemoglobina y hematocrito tuvieron un descenso más acentuado en el grupo del almidón vs. Hb-almidón (**Gráfica 1**).

La hipovolemia consecutiva al sangrado condicionó, a pesar de la restitución isovolémica, caída en la PAM en ambos grupos (**Gráfica 2**).

El sangrado provocó acidosis metabólica con hiperventilación compensatoria solamente en el grupo de almidón; ello se evidenció por el descenso del pH (de 7.38 a 7.3), el exceso de base (de -2.91 a -8.68 mosml/L) y el bicarbonato (de 20.05 a 14.51mosml/L) con diferencia estadística en relación a las cifras basales ( $p < 0.05$ ), no así en el grupo de Hb-almidón que presentó un comportamiento más estable durante todo el procedimiento (**Gráfica 3**); la  $SO_2$  resultó más elevada en el grupo de Hb-almidón pero sin diferencia estadística respecto al grupo testigo. (**Gráfica 4**)

Aunque la administración de almidón y Hb-almidón no se asociaron a ningún efecto secundario aparente, hubo 2 ratas que fallecieron en el grupo de almidón y una en el grupo de Hb-almidón durante las 24 horas de observación, probablemente relacionadas a causas externas como hipotermia post-quirúrgica o eventualmente secuelas del choque, como ha sido reportado por otros autores.<sup>43</sup>

### **7.3. Tercera Etapa (análisis de la microcirculación)**

#### *Evaluación de la oximetría capilar-tisular y funcionalidad capilar*

La tercera etapa del proyecto, se llevó a cabo en el Laboratorio de Microcirculación del Departamento de Bioingeniería de la Universidad de California de San Diego con el objeto

de demostrar si el producto Hb-almidón previamente elaborado en la Unidad de Investigación del Hospital de Cardiología, era capaz de:

1. Mantener las constantes hemodinámicas estables bajo un modelo experimental de *hemodilución extrema*.
2. Mantener la gasometría estable con la hemodilución extrema.
3. Mantener el oxígeno a nivel capilar y tisular
4. Mantener la funcionalidad capilar.

### **7.3.1. Preparación para el análisis de la microcirculación**

El almidón fue seleccionado como substrato para la conjugación con la hemoglobina debido a su elevado peso molecular (250,000 mw) y viscosidad (2.2 cP), su biocompatibilidad, modesto precio y desde luego su disponibilidad en México (Alpha-Fessenius, Guadalajara); las características se encuentran descritas en la **Tabla III**.

### **7.3.2. Evaluación de la eficacia**

Se analizaron las constantes hemodinámicas, gasométricas, oximétricas y de funcionalidad capilar (*FC*) bajo la observación de la microcirculación, en un modelo experimental sometido a hemodilución extrema, que consistió en una exanguinación suficiente para lograr un descenso del hematocrito igual o mayor al 80% del basal;<sup>44</sup> con este grado de hemodilución, el gasto cardíaco disminuye y consecuentemente el flujo sanguíneo a pesar de la restitución isovolémica, lo que provoca reducción del flujo capilar y del *shear stress*, si antes no se incrementa la viscosidad del hemodiluyente o se infunde un *adecuado* “transportador de oxígeno”; si la Hb-almidón es capaz de mantener, no solamente la viscosidad sanguínea (*shear stress*) sino además, transportar el oxígeno, será congruente con la hipótesis de que aún bajo hemodilución extrema, las constantes reológicas y oximétricas bajo el campo de la microcirculación no presentaran grandes cambios; de no ser así, se encontrara una disminución del oxígeno en los capilares y el tejido y por lo tanto, habrá una evidente alteración en la *FC*.

### 7.3.3. Metodología.

El modelo experimental fue planeado en hamsters *Syriam golden* (Simonsen, Gilroy, CA) bajo las guías y normas que rige el uso de Animales de Laboratorio en la Universidad de California de San Diego (National Research Council. 1996), donde el proyecto fue aceptado previamente para su desarrollo (**Anexo 3**).

Para el análisis de la microcirculación, se colocó un dispositivo denominado “cámara o ventana de observación” en el músculo dorsal de los hamsters, para la evaluación del diámetro arteriolar, la velocidad del flujo sanguíneo y la funcionalidad capilar.<sup>45</sup>

El procedimiento microquirúrgico se describe en el **Anexo 2**.

### 7.3.4. Parámetros

Los parámetros de la microcirculación,<sup>45</sup> son descritos en el **Anexo 4**.

### 7.3.5 hemodilución extrema.

La hemodilución fue realizada en tiempos (isocrónica) y volúmenes (isovolémica) iguales con el objeto de mantener siempre una isovolemia en equilibrio y así poder lograr el descenso del hematocrito sistémico sin condicionar choque hipovolémico; para lograr este objetivo la hemodilución se realizó en tres etapas sucesivas. (**Figura A**).

El volumen de exanguinación se estimó en relación al volumen intravascular calculado de acuerdo al 7% del peso corporal; la primera etapa de la exanguinación se realizó para descender un 40% del volumen intravascular, haciendo una regla de tres:

Peso total = 100%

x = 40%

El almidón o la Hb-almidón se infundieron en forma similar utilizando en todos los casos una bomba de infusión eléctrica para uso experimental (CMA/100 Microinjection Pump, Carnegie Medicine AB, Sweden) a una velocidad de infusión de 100  $\mu$ L/min.

La Hb-almidón o el almidón se infundieron en sus diversas etapas a través de una jeringa de 3 mL con un filtro de .20  $\mu$  por el catéter venoso; la exanguinación fue al mismo tiempo a través de un catéter colocado en la arteria carótida en forma manual recolectándose en una jeringa de 1 mL y que correspondió al mismo volumen de la infusión calculada; el animal se dejó recuperar 20 minutos antes de proceder a las siguientes etapas de exanguinación.



El animal despierto fue colocado en un tubo de acrílico fabricado *ad hoc* con una ranura superior para el deslizamiento de la ventana e inmovilización y permitir la observación a través del microscopio invertido de transiluminación intravital.

El experimento se realizó en las siguientes etapas:

- 1) Evaluación basal.
- 2) Etapa 1: Hemodilución isovolémica con el descenso del 40% del hematocrito, substituyendo el volumen con almidón.
- 3) Etapa 2: Hemodilución isovolemica para descender al 60% el hematocrito del basal substituyendo con almidón.
- 4) Etapa 3 (**grupo almidón**) descenso al 80% del hematocrito basal restituyendo el volumen por medio del almidón.
- 5) Etapa 3 (**grupo Hb-almidón**) consistió en un descenso del 80% del hematocrito restituyendo con Hb-almidón.

Al final de la tercera etapa los animales recibieron una infusión en bolo de paladio-porfirina a razón de 30 mg/kg, para evaluar la hemodinámica vascular y la distribución de oxígeno intracapilar y tisular; fueron analizados los parámetros hemodinámicos, gasométricos y vasculares en la etapa basal e inmediatamente después de cada hemodilución; las muestras sanguíneas fueron tomadas después de cada recambio para evaluar el hematocrito y hemoglobina, no así la gasometría la cual se analizó en forma basal y al final de la tercera etapa.

**7.3.6. Análisis estadístico.** Los resultados se presentan como media  $\pm$  DS en relación a la basal; para todos los valores se aplicó análisis de varianza y para la comparación entre los grupos, *t* de Student y *U* de Mann-Whitney. Los cambios son considerados con diferencias estadísticas si la  $p < 0.05$ .

### **7.3.7. Resultados**

Fueron evaluados en este estudio 3 especímenes para la identificación de las variables en la microcirculación del producto Hb-almidón y 3 testigos, realizados con el almidón.

Todos los animales toleraron adecuadamente el procedimiento sin signos de daño aparente.

*a) Parámetros hemodinámicos y gasométricos.*

El volumen y por ciento de exanguinación en las 3 diferentes etapas para ambos grupos fue de: 1.778 mL (40%), 1.506 mL (35%) y de 1.106 mL (35%), respectivamente.

El descenso del hematocrito y la hemoglobina fue similar para los dos grupos hasta la segunda exanguinación (p NS); sin embargo, en la tercera exanguinación el grupo del almidón mostró un gramo menos de hemoglobina y 2.7% menos de hematocrito que el de Hb-almidón (p<0.05) **Cuadro I.**

La PAM basal fue similar para los grupos ( $104 \pm 3$  vs.  $98 \pm 4$  mmHg); sin embargo, después del tercer recambio la PAM descendió en ambos grupos siendo más severo en el grupo de almidón (85 vs. 62 mmHg, respectivamente p<0.05). La frecuencia cardíaca permaneció sin grandes cambios y similar en los dos grupos durante las 3 etapas, (p NS)

#### **Cuadro I.**

En relación a las gasometrías sistémicas, al final del tercer recambio se observó en los dos grupos un incremento en la PaO<sub>2</sub> que al compararlos con la basal denotó diferencia estadística (p< 0.05) y descenso significativo de ambos grupos en la PCO<sub>2</sub> (p< 0.05); el pH se mantuvo entre 7.31 y 7.35 en los dos grupos durante todo el experimento (p = NS); el exceso de base mostró descenso similar para los dos grupos, con diferencia estadística en relación a la basal (p<0.05) pero no entre los grupos, (p NS) **Cuadro II.**

#### *b) Parámetros microcirculatorios*

##### **Tono vascular**

Los cambios en el diámetro en las arterias nutricias, las arcadas (23 – 95 μ) y las vénulas largas y colectoras (24 – 230 μ) fueron evaluadas en forma basal y después de la primera y tercera etapa; en el **Cuadro III** se presentan los cambios en el diámetro de las arteriolas en relación al hematocrito alcanzado después de la 3a exanguinación.

Mientras que se produjo discreta dilatación capilar en ambos grupos después del 3° recambio (p NS), a nivel venular no se observaron diferencias sustanciales.

### **Velocidad del flujo sanguíneo**

En la **Cuadro III** se puede observar los cambios en las velocidades de flujo sanguíneo en las arteriolas y las vénulas en la 3 etapa de la hemodilución extrema; hubo un incremento en la velocidad del flujo en el árbol capilar para el grupo de Hb-almidón con diferencia significativa en relación a la basal (de 2.2 a 2.65 mm/seg,  $p < 0.05$ ), no observándose lo mismo para el grupo del almidón, donde la velocidad de flujo sanguíneo incluso disminuyó de 3.3 a 2.85 ( $p$  NS).

En el área venular la velocidad se incrementó discretamente en ambos grupos pero sin diferencia estadística ( $p =$  NS).

### **Funcionalidad capilar (FC)**

En la **Cuadro IV** se muestran los resultados de la funcionalidad capilar en el período basal y posterior al tercer recambio; el descenso porcentual de la *FC* después del tercer recambio fue del 65% al compararla con la basal siendo más significativa en el grupo del almidón, e incluso marcó una diferencia en el resultado final entre el grupo de Hb-almidón vs. almidón (11 vs. 6,  $p < 0.05$ ).

### **Distribución del oxígeno capilar**

El oxígeno capilar fue evaluado en 7 diferentes arterias en forma basal y posterior al tercer recambio, donde se apreció en promedio una pérdida de aproximadamente el 50% del oxígeno intra como extracapilar, siendo más severa en el grupo del almidón, donde se encontró una diferencia estadística, tanto al compararlo con el oxígeno basal como entre los grupos al final de la tercera etapa. ( $p < 0.05$ ). **Cuadro IV**

El oxígeno tisular, que normalmente forma parte de las mediciones en los experimentos de hemodilución extrema, se consideró innecesario en estos experimentos dado los parámetros oximétricos tan bajos obtenidos en el espacio intra y extracapilar.

## 8. DISCUSION

### 8.1. *Primera etapa.*- Elaboración del compuesto Hb-almidón

Aunque la reacción química entre la hemoglobina y el almidón se logró, se pudo observar una pequeña banda en el gel de poliacrilamida correspondiente a la hemoglobina no ligada (**Fig. 4b**); este resultado obligó a la búsqueda de la eficiencia de la reacción mediante la glicosilación de la hemoglobina, con la cual se puede identificar el por ciento de reacción. En la **Figura 5**, se puede observar el gel y la metodología, donde se demuestra la pobre eficiencia de la reacción.

La hemoglobina libre es potencialmente nefrotóxica, por lo que hubo necesidad de separar el aducto de la hemoglobina libre a través de columna de sefadex 100, de la cual se obtuvo un compuesto más puro, mismo que se retó en el experimento de la microcirculación .

Aunque fue agregado glutatión 1M a la reacción química de la Hb-almidón tratando de evitar la autooxidación de la hemoglobina, la metahemoglobina analizada por medio del Co-oxímetro fue alrededor del 50% después de un período de almacenamiento de una semana a 4°C (**Tabla III**).

En este sentido se intentó disminuir el proceso de autooxidación añadiendo N-acetilcisteina durante la separación de la hemoglobina, pero no fue suficiente para evitarlo.

Otro método que ha demostrado ventaja para reducir la metahemoglobina ha sido el uso de una cámara cerrada de nitrógeno, para lo cual se mandó hacer un matraz bola de tres bocas, sometiéndose a una presión constante de 1000 psi;<sup>46</sup> con este procedimiento se logró reducir la oxidación en forma más temprana (**Tabla III**).

### 8.2. *Segunda Etapa.*- Modelo experimental de hemodilución isovolémica.

El modelo experimental de hemodilución isovolémica alcanzó los objetivos deseados lográndose mantener con sobrieda los animales durante todo el experimento; sin embargo, este modelo solo pudo analizar la capacidad que tiene la solución como “expansor de plasma” mejor que como transportador de oxígeno, ya que se ha demostrado que la hemodilución isovolémica con coloides pueden mantener las condiciones hemodinámicas y eventualmente gasométricas estables en un individuo con pérdidas cercanas al 50% del volumen intravascular.<sup>43</sup> Para analizar la eficiencia de un transportador de oxígeno se

requiere de una hemodilución extrema (> 60 por ciento del volumen). No obstante, vale la pena destacar que el producto Hb-almidón mantuvo niveles elevados de hemoglobina (**Gráfica 1**), aunque el hematocrito también se elevó (19 vs. 11%,  $p < 0.05$ ), lo que seguramente se debió a estroma eritrocitario residual producto de una incompleta separación, como fue señalado en el espectro y en el gel de poliacrilamida (**Figs. 4a y 4b**).

La presión arterial media descendió en forma importante durante el primer recambio a pesar de la restitución isovolumétrica en los dos grupos sin diferencias entre ellos; sin embargo, cabe señalar que los experimentos con derivados de hemoglobina, han reportado hipertensión arterial consecutiva, fenómeno que no observamos en nuestro estudio;<sup>47</sup> esto posiblemente encuentra su explicación en la baja sensibilidad de los polígrafos, ya que los pequeños cambios de alrededor de 8 a 15 mmHg no son claramente visibles en el papel.

Al analizar las gasometrías pudo observarse la presencia de acidosis metabólica en el grupo de animales tratados con almidón (**Gráfica 3**); estos resultados indican que a pesar de la exanguinación, el aducto Hb-almidón fue capaz de estabilizar modestamente algunas de las constantes gasométricas no observadas con el grupo testigo.

### 8.3.- *Tercera etapa*. - Capilarometría

Durante la hemodilución extrema se monitorizó la PAM, la hemoglobina y el hematocrito después de cada recambio, no así las gasometrías que se realizaron en forma basal y después del 2° y 3er recambio, con el objeto de evitar mayor sangrado que repercutiera en el hematocrito final.

La hemoglobina y el hematocrito descendieron en forma similar en ambos grupos hasta el 2° recambio sin diferencia estadística, no así en el tercer recambio donde se pudo observar el mismo fenómeno que en los experimentos con las ratas, es decir, la hemoglobina fue superior en el grupo Hb-almidón, (4.3 vs. 3.4 g/dL); el hematocrito se comportó en forma similar, siendo discretamente más elevado para el grupo de Hb-almidón (12.9 vs. 10.2,  $p < 0.05$ ) (**Cuadro I**).

Las gasometrías mostraron un comportamiento similar al de las ratas durante la hemodilución isovolémica; la acidosis metabólica también fue un fenómeno observado en ambos grupos evidente por el descenso en el pH y exceso de base (**Cuadro II**).

Tanto el diámetro como la velocidad de flujo se vieron incrementadas en el grupo de Hb-almidón, contrastando con el grupo del almidón cuyo diámetro prácticamente no se modificó (**Cuadro III**); este hallazgo es congruente con el hecho de que el aducto puede condicionar vía shear stress dilatación arteriolar;<sup>48</sup> mas aún, como se pudo observar en Cuadro I, la PAM disminuyó paulatinamente durante los recambios; la infusión del aducto no produjo la esperada hipertensión por barrido del óxido nítrico.<sup>49</sup>

Durante el experimento se analizó en forma basal la funcionalidad capilar en 10 diferentes campos de observación, con una duración de grabación de 30 segundos para cada uno de ellos.

En forma basal no se encontraron diferencias en el oxígeno entre el aducto y el almidón (27 vs. 28), sin embargo cuando se evaluó el resultado final después del 3er recambio, se encontró un descenso más pronunciado en el grupo del almidón (11 vs. 6). Estos resultados indican que el producto no fue capaz de mantener el flujo microvascular suficiente para transportar el oxígeno a los tejidos (**Cuadro IV**); este defecto es una consecuencia directamente relacionada a la vasoconstricción y disminución del flujo microvascular más severamente observado en el grupo del Almidón.

Una observación favorable consecutiva a los experimentos fue la estabilidad en la presión arterial. La hipertensión arterial observada en la mayoría de los transportadores de oxígeno es consecuencia del arrastre del óxido nítrico; este fenómeno no se encontró con el aducto, probablemente por la viscosidad elevada, ya que la elevación de la viscosidad condicione incremento en el shear stress repercutiendo en la dilatación arteriolar vía óxido nítrico.<sup>49</sup>

Otra explicación ha sido postulada por Nakai K y col.,<sup>50</sup> quienes han sugerido que las moléculas de hemoglobina que no atraviesan los espacios endoteliales tienen mayor dificultad en acarrear el óxido nítrico y por lo tanto no condicionan vasoconstricción; esto querría decir que la hemoglobina conjugada con el almidón, al tener un tamaño molecular grande, no debería mostrar respuesta hipertensora.

Para analizar este postulado se llevó a cabo el último de los experimentos de éste proyecto, que fue retar la Hb-almidón ante un modelo validado de vasoconstricción en anillos

aórticos de rata, bañados con el producto, con el objeto de demostrar su vasomoción consecutiva a la producción de ON, y la ausencia de respuesta con inhibidores de la sintasa de óxido nítrico (**artículo inserto**).

En el experimento se demostró que a pesar del peso molecular elevado de la Hb-almidón (>300 kDs) el fenómeno de vasoconstricción fue similar a la hemoglobina. Esto encuentra su explicación, en la existencia de otros mecanismos de vasoactividad que no solamente la hipótesis de incrementar el tamaño molecular.

## 9.- CONCLUSION

El presente estudio demostró que es posible unir químicamente la molécula de hemoglobina a un polisacárido y mantenerlo en forma estable por al menos un mes; sin embargo, la eficiencia de la reacción es pobre, por lo que requiere de un análisis bioquímico cuidadoso para mejorarla. Si bien, la molécula de hemoglobina-almidón fue tolerada y capaz de mantener las condiciones hemodinámicas y gasométricas en el modelo de choque hemorrágico ( $\leq 50\%$  del volumen intravascular), esto se debió probablemente al efecto del almidón como expansor, ya que al retar el mismo producto en la microcirculación, su capacidad de transporte de oxígeno fue muy pobre.

En cambio, cuando la molécula fue analizada en el contexto del acarreo del óxido nítrico a través del experimento de vasoconstricción, se demostró que la hemoglobina-almidón es capaz de sustraer el óxido nítrico de la preparación, a pesar de su “elevado” peso molecular. A la luz de los conocimientos actuales y como resultados del presente estudio, no parece sencillo obviar una de las funciones más importantes de la hemoglobina, que es la del acarreo del óxido nítrico, independientemente del tamaño molecular del producto al cual se adhiera. Esta constante de afinidad del óxido nítrico parece ser superior a la del oxígeno, o por la elevada concentración endovascular, o por su estereo-electroquímica, que le facilitan el encriptamiento dentro de la hemoglobina.

aórticos de rata, bañados con el producto, con el objeto de demostrar su vasomoción consecutiva a la producción de ON, y la ausencia de respuesta con inhibidores de la sintasa de óxido nítrico (**artículo inserto**).

En el experimento se demostró que a pesar del peso molecular elevado de la Hb-almidón (>300 kDs) el fenómeno de vasoconstricción fue similar a la hemoglobina. Esto encuentra su explicación, en la existencia de otros mecanismos de vasoactividad que no solamente la hipótesis de incrementar el tamaño molecular.

## **9.- CONCLUSION**

El presente estudio demostró que es posible unir químicamente la molécula de hemoglobina a un polisacárido y mantenerlo en forma estable por al menos un mes; sin embargo, la eficiencia de la reacción es pobre, por lo que requiere de un análisis bioquímico cuidadoso para mejorarla. Si bien, la molécula de hemoglobina-almidón fue tolerada y capaz de mantener las condiciones hemodinámicas y gasométricas en el modelo de choque hemorrágico ( $\leq 50\%$  del volumen intravascular), esto se debió probablemente al efecto del almidón como expansor, ya que al retar el mismo producto en la microcirculación, su capacidad de transporte de oxígeno fue muy pobre.

En cambio, cuando la molécula fue analizada en el contexto del acarreo del óxido nítrico a través del experimento de vasoconstricción, se demostró que la hemoglobina-almidón es capaz de sustraer el óxido nítrico de la preparación, a pesar de su “elevado” peso molecular. A la luz de los conocimientos actuales y como resultados del presente estudio, no parece sencillo obviar una de las funciones más importantes de la hemoglobina, que es la del acarreo del óxido nítrico, independientemente del tamaño molecular del producto al cual se adhiera. Esta constante de afinidad del óxido nítrico parece ser superior a la del oxígeno, o por la elevada concentración endovascular, o por su estereo-electroquímica, que le facilitan el encriptamiento dentro de la hemoglobina.



## 10. REFERENCIAS

1. McGrew RE. Encyclopedia of Medical History. New York McGraw-Hill 1985:23-4
2. Goodnough LT, Brecher ME, Kanter MH, AuBuchon JP. Blood Transfusion. *New Engl J Med* 1999;340:438-47.
3. Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, Informe Anual, 2001.
4. Sánchez GS. El Banco de Sangre como servicio de interconsulta. *Rev Invest Clin* 1995;47:405-408.
5. Scout MG, Kusik DF, Goodnough LT, Monk TG. Blood substitutes: evolution and future applications. *Clin Chem* 1997;43:1724-31.
6. Goodnough LT, Monk TG, Andriole GL. Erythropoietin therapy. *N Engl J Med* 1997;336: 933-38.
7. Fakhry SM, Sheldon GF. Blood administration, risk and substitutes. *Adv Surgery* 1995;28:71-72.
8. Finch CA, Lenfant C. Oxygen transport in man. *N Engl J Med* 1972;286:407-15.
9. Hutter J, Habler O, Kleen M, Tiede M, et al. Effect of acute normovolemic hemodilution on distribution on blood flow and tissue oxygenation in dog skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1999;86:860-66.
10. Messmer K, Kreimeier U, Intaglietta M. Present state of intentional hemodilution. *Eur Surg Res* 1986;18:254-63.
11. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H, Intaglietta M. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skin fold model. *Am J Physiol.* 1998; 275:H2170-H2180.
12. Valeri CR, Crowley JP, and Loscalzo J. The red cell transfusion trigger: has a sin of commission now become a sin of omission? *Transfusion* 1998;38:602-610.

13. Goodnough LT, Monk TG, Brecher MF. Autologous blood procurement: lessons to be learned en the past 10 years. *Vox Sang* 1976;71: 133-41.
14. Monk TG, Goodnough LT, Birkmayer JD, Brecher ME, Catalona WJ. Acute normovolemic hemodilution is a cost effective alternative to pre-operative autologous blood donation by patients undergoing radical retropubic prostatectomy; transfusion, 1995;35: 559-65.
15. Winslow RM. Blood substitutes, a moving target. *Nature Med* 1995;1: 1212-5.
16. Luna OP. Circulación extracorporeal en cirugía cardiaca. En: *Anestesia en cardiología. Interamericana, McGrawGill, 1989 pp.327.*
17. Gunnar WP, Merlotti GJ, Jonasson O, Barret J. Resuscitation from hemorrhagic shock. *Ann Surg* 1986; 204: 686-691.
18. Tsai AG, Friesenecker B, Kerger H, Sakai H and M Intaglietta. The mechanism of tissue oxigenation and the design of oxygen carrying plasma expanders. In: *Advances in blood Substitutes. Industrial Opportunities and medical Challenges* (RM Winslow, KD vandergriff, M Intaglietta, eds) 1997.Birkhauser, Boston pp 189-206,
19. Lipowsky HH, Usami S, Chien S. *In vivo* measurement of hematocrit and apparent viscosity in the microvasculature of cat mesentery. *Microvasc Res* 1980;19:297-319.
20. Messmer K, Kreimeier U and M. Intaglietta. Present states of Intentional Hemodilution. *Eur Surg Res* 1986;18:254-263.
21. Mirhashemi S, Messmer K, Arfors K-E and M Intaglietta. Microcirculatory effects of normovolemic hemodilution in skeletal muscle. *Int J Microcirc: Clin Exp.* 1987;6:359-370.

22. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H and M Intaglietta. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skin fold model. *Am J Physiol* 1998;275:H2170-H2180.
23. Silacci P, Formentin K, Bouzourene K et al. Unidirectional and oscillatory shear stress differentially modulate NOS III gene expression. *Nitric Oxide* 2000;4:47-56.
24. Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG, Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase promoter activity through nuclear factor Kappa-B binding. *J Biol Chem* 2003.
25. Tsuchida ET, Introduction: Overview and perspectives. In: *Artificial Cells*. John Wiley & Sons Ltd. 1995, E. Tsuchida, pp:-20
26. Scott MG, Kucik DF, Goodnough LT et al. Blood substitutes: evolution and future applications. *Clinic Chem* 1997;43:1724-1731.
27. Kumar R., Recombinant hemoglobin as blood substitute: a biotechnology perspective. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:150-8.
28. Shoemaker S, Gerber M, Evans G, Paik L, Scoggin C. Initial clinical experience with a rationally designed genetically engineered recombinant human hemoglobin. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology*, 1994;22:457-465.
29. Rudolph AS. Encapsulation of hemoglobin in liposomes. In: *Blood Substitutes: Physiological Basis of Efficacy*, Winslow RM, Vandegriff KD, and Intaglietta eds. Birkhauser, Boston, 1995; pp. 90-104.
30. Zuck TF, Riess JG, Current status of injects oxygen carries. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994;31:295-324.
31. Chang TMS, *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, Vol I, Ed. Karger-Landes, 1997, Vol I, pp.4-8.

32. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D et al. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. A randomized Controlled Efficacy Trial. *JAMA* 1999; 282:1857-64.
33. Munsch CM, MacIntyre E, Machin SJ, et al. Hydroxyethylstarch: An alternative to plasma for postoperative volume expansion after cardiac surgery. *Br J Surg* 1988;75:675-678.
34. Beards SC, Watt T, Edwards D, et al. Comparison of the hemodynamic and oxygen transport responses to modified fluid gelatin and hetastarch in critically ill patients: A prospective, randomized trial. *Crit Care Med* 1994; 22:600-5.
35. Center for Biologics Evaluation and Research, Points to consider in the safety evaluation of hemoglobin-base oxygen carriers. *Transfusion* 1991;31:369-71.
36. Intaglietta M, Microcirculatory basis for design of artificial blood. *Microcirculation* 1999;6:247-258.
37. De Venuto F, Zuck TF, Zegna AI, and Maj M. Characteristics of stroma-free hemoglobin prepared by crystallization. *J Lab Clin Med* 1977;89:509-516.
38. Tam SCH, Wong TF. Impairment of renal function by stroma-free hemoglobin in rats. *J Lab Clin Med* 1988;111:189-93.
39. Cerny LC, Stasiw and Cerny EL. A Hydroxyethyl Starch-hemoglobin polymer as a blood substitute. *Clinic Hemorheol* 1982;2:355-365.
40. Friberger PM, Knos M and Mellstam L. Endotoxin and their detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test. Alan R. Liss, New York 1982. pp. 195-206
41. Lowe GDO. Blood rheology in arterial disease. *Clin Science* 1986;71:138-146.
42. Messmer K. Hemodilution. *Surg Clin N Am* 1975;55:659-78.

43. Wang P, Ba ZF, Burckhardt and Chaudry IH. Trauma-hemorrhage and resuscitation in the mouse: Effects on cardiac output and organ blood flow. *Am J Physiol* 1993;264:H116-H1173.
44. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H and M Intaglietta. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skin fold model. *Am J Physiol* 1998;275:H2170-H2180.
45. Colantuoni A, Bertuglia S, and Intaglietta M. Quotation of rhythmic diameter changes in arterial microcirculation. *Am J Physiol* 1984;246:H508-H517.
46. Sehgal LR, Rosen AL, Noud G, et al. Large-volume preparation of pyridoxylated hemoglobin with High P<sub>50</sub>. *J Surg Res* 1981;30:14-20.
47. Ulatowski JA, Koehler RC, Nishikawa T, et al. Role of nitric oxide scavenging in peripheral vasoconstrictor response to beta-beta crosslinked hemoglobin. *Artif Cell Blood Substitutes, Immobil Biotech* 1995;23:326-69.
48. Buttler PJ, Weinbaum S, Chien S and Lemons DE. Endothelium-dependent, shear-induced vasodilation is rate-sensitive. *Microcirculation* 2000;7:53-65.
49. Koller A, Sun D and Kaley G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res* 1993;72:1276-84.
50. Nakai k, Sakuma I, Kitabatake A. Vascular activities of hemoglobin-based oxygen carriers. In Tsuchida E. *Blood Substitutes, Present and Future perspectives*. Elseviere Science SA, 1998. pp:251-58.

# ANEXO 1

## “SISTEMA NACIONAL DE ENLACE PARA LA TRANSFUSION”

[contacto@sangreenlinea.com](mailto:contacto@sangreenlinea.com)

http://localhost/Intranet/\_programas/banosad.asp?qopcion=13 - Terra

Archivo Edición Ver Favoritos Herramientas Ayuda

Atrás Adelante Detener Actualizar Inicio Búsqueda Favoritos Historial Vínculos

Dirección http://localhost/Intranet/\_programas/banosad.asp?qopcion=13

**Menu Principal**

- Registro de Donante
- Registro de Egresos
- Consulta para Bancos
- Investigación
- Registro de Receptores
- Consulta de Receptores
- Reac. Transfusionales
- Consulta Reac. Trans.
- Centro de Acopio
- Comunicaciones
- Foro
- Video en línea
- Inicio

**Avisos** Bienvenido Dr. Adolfo Chávez Negrete  
Centro Medico Siglo XXI

**Publicidad**

Producto Sanguíneo Proximo a Vencer						
No. Donacion	Fecha Vencimiento	Grupo Sanguíneo	Modo de Empleo	Volumen	Banco de Sangre	Telefono
44	17/04/2002	O(+)	sangre no fresca o total	400ml	Banco de Sangre del Centro Medico Siglo XXI	5627-6900
46	18/04/2002	O(+)	sangre fresca	450ml	Banco de Sangre del Centro Medico Siglo XXI	5627-6900

Avisos Generales		
Fecha	Aviso	Publicado por:
17/04/2002	<a href="#">1er. CONGRESO MEXICANO e-SALUD</a>	SSA
17/04/2002	<a href="#">SEMINARIO DONACION SEGURA</a>	IMSS

Listo Intranet local

Inicio Administr... http://l... NoteTab ... Microsoft ... 08:54 p.m.

## ANEXO 2

### PROCEDIMIENTO QUIRURGICO

#### a) Pre-quirúrgico.

Se utilizaron ratas macho, Sprague-Dawley de aproximadamente  $300 \pm 55$ g de peso, que correspondieron a una edad de entre tres a cuatro meses, liberadas por el Laboratorio de Certificación del Bioterio del Centro Medico Nacional Siglo XXI.

Los especímenes se mantuvieron durante treinta días previos a cualquier procedimiento, aislados en jaulas de policarbonato en grupos de cinco y bajo un régimen de alimentación formulada para condiciones pre-quirúrgicas; los líquidos se administraron pre-filtrados, a consumo libre y en bebederos de uso grupal.

Doce horas previas al procedimiento quirúrgico, el espécimen se mudó a una jaula de aislamiento sin alimentos, permitiendo únicamente agua. Al cumplirse el plazo establecido se procedió a su preparación sujetándolo por el extremo distal de la cola y de esta manera introducirlo en una bolsa reticular que sirvió como asistencia para su inmovilización y para facilitar las maniobras subsecuentes que fueron el pesado y la aplicación de los anestésicos. El procedimiento anestésico consistió en la aplicación de una inyección intramuscular profunda en la región glútea de Ketamina (0.5 mL) y Dehidrobenzoperidol (0.5 mL) a dosis de efecto disociativo. Una vez alcanzado el plano anestésico, se extrajo el espécimen de la bolsa y se inició el procedimiento de preparación prequirúrgica en decúbito dorsal sobre la tabla de cirugía y la sujeción con brazaletes de tela adhesiva por la parte distal de las cuatro extremidades, se procedió al rasurado del pelo en el abdomen bajo e ingles, así como la aplicación de Heparina 1,000 U por la vía transcutánea a la cavidad peritoneal .

#### b) Procedimiento quirúrgico

Se cateterizó la arteria y vena femoral superficiales izquierdas para permitir la extracción de sangre e introducción del producto respectivamente, en forma controlada mediante una llave ad hoc en la arteria y una bomba de infusión experimental (SP210iw syringe pump, WPI®) a través de la vena para lograr la hemodilución isovolémica (extracción de 1 mL por 1 mL de entrada) a una velocidad de 1/2 mL/min y mantener una oxigenación tisular

adecuada, a pesar del descenso constante del hematocrito; se cateterizó la arteria femoral superficial derecha para la monitorización continua de la presión arterial y de la frecuencia cardiaca a través de la interconexión de un sensor de presión o termistor con el electrofisiógrafo (Grass Instrument®, Mod 89).

Manteniendo una técnica quirúrgica estéril, se inició la apertura de la pared abdominal incidiendo la piel en la línea media utilizando para este fin una hoja de bisturí del número 20, el corte se inició a un centímetro por abajo de la cicatriz umbilical y se prolongó en dirección al pubis por un espacio de tres centímetros, en este punto se desvió la línea de corte a la parte media de la región inguinal izquierda avanzando hasta el hueco poplíteo de la extremidad pélvica izquierda, a continuación y para dar por terminado el corte de la piel fue necesario ubicar la punta del bisturí en el vértice del ángulo formado por el corte previo y prolongar la incisión a través de la parte media inguinal derecha hasta alcanzar el hueco poplíteo de la extremidad pélvica derecha.

Una vez realizados los cortes en la piel, fue posible ver el tejido graso subcutáneo que cubre el ligamento inguinal extendiéndose hasta la proximidad del hueco poplíteo en ambas extremidades pélvicas y proteger a los elementos vasculares y nerviosos femorales superficiales.

Para visualizar el paquete vascular y nervioso femoral superficial izquierdo, fue necesario separar el tejido graso subcutáneo de la aponeurosis anterior del músculo pectíneo, lo que se logró al realizar un túnel de trayectoria recta entre el hueco poplíteo y la parte media del ligamento inguinal. Para realizar el túnel fue necesario apoyar la punta de una tijera curva de Metzenbaum cerrada sobre la fascia anterior del músculo pectíneo en la proximidad del hueco poplíteo y por disección roma desplazar el tejido laxo en dirección a la parte media del ligamento inguinal hasta alcanzarlo, en este punto se perforó el tejido subcutáneo ejerciendo presión hacia arriba con la punta de la tijera, a continuación se introdujo en el túnel la rama izquierda de la tijera hasta que la punta apareció a través de la perforación aislando la cara posterior del tejido subcutáneo y ejerciendo presión hacia arriba para efectuar el corte en la mitad del ligamento inguinal.

El corte con tijera, se amplió en dirección cefálica formando un ángulo recto con el borde

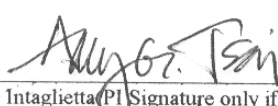



de la sección previa, el corte se efectuó en sentido paralelo al ligamento inguinal, con esto se terminó la preparación de un colgajo pediculado por los elementos vasculares y nerviosos hipogástricos, que posteriormente se revertió con la ayuda de una pinza de Kelly curva colocándolo a un costado de la pared abdominal para permitir la visualización de los vasos femorales superficiales

### ANEXO 3

Personal Qualifications Statement 2001	
Name: <b>Chavez-Negrete, Adolfo</b> Species <b>rat</b>	Title: <b>Visiting Scholar-Volunteer</b> Email: <b>adolfo@spin.com.mx</b> Dept: <b>Biengineering</b> Emerg: <b>619-459-8608</b> Fax: <b>534-5722</b>
Work: <b>x42315</b> Mail: <b>0412</b> Submitted: <b>03/02/01</b> Printed: <b>03-02-2001</b>	x Fully Qualified Provisional approval Not approved
<i>When checked, training required within 6 months:</i> ASP Orientation to Research (contact 4-6069) Recordkeeping (contact 4-7506) Intro to Mice, Rats, Rabbits (contact 4-7506) Breeding Colony (contact 4-7506) Must enroll in OHS program (contact 294-6001) Other:	SG 3/5/2001 - Compliance Review Completed DW 3/5/2001 - Administrative Review Completed Comments: <i>Additional information required for approval:</i> Please document qualifications more completely Please complete OHS section Trainer not identified or not fully qualified Other:

Education and training				Occupational Health & Safety
Degree:	Year:	Institution:	UCSD training:	Must be enrolled, intend to enroll, or decline: <b>Declines to enroll</b>
<b>MD InternalMed</b>	<b>1975</b>	<b>LaSalle Univ Mexico City</b>	<b>Orientation to Animal Rese unk</b>	
Other training: Trained at UCSD, Dept Bioengineering 1987-1988. Research topics include Hemodilution and ischemia/reperfusion.				

I am qualified in the rat for:		I will be taught:	
Surgery	Procedures	Surgery	Procedures
Major	Anesthesia	Trainer: _____ Signature	
Minor	Euthanasia		
Terminal	Ex vivo blood/tissue		
Assist	In vivo blood/tissue		
	Handling		
	Observation		
Experience: Research animals include rat models (and hamsters), 1987-1999. Participate and perform animal experiments per protocol, anesthetize and euthanize animals. One year experience with this experimental Protocol 1-220-09.			
Please add <b>Adolfo Chavez-Negrete</b> to my protocols: 1-220-09		To the best of my knowledge the statements made on this form are true. I agree to abide by UCSD, state and federal policies and regulations governing the use of animals in research and teaching.	
 M. Intaglietta (PI Signature only if being added to protocol)		 Adolfo Chavez-Negrete (Personnel Signature- Required)	
Date: <b>05/03/01</b>		Date: <b>05/03/01</b>	

## ANEXO 4

### a) **Parámetros hemodinámicos.**

La PAM y la frecuencia cardiaca fueron monitorizados permanentemente mediante la interconexión del catéter arterial a un transductor-monitor (Beckman Recorder; Spectramet Pressure Transducer).

### b) **Parámetros microcirculatorios**

Antes de iniciar el procedimiento fueron tomadas fotografías de la ventana dorsal e impresa en papel para poder seguir la vasculatura en forma macroscópica y de esa forma “mapear” con mayor facilidad y definir los vasos a estudiar. La observación de la microcirculación se llevo a cabo por medio de un microscopio invertido (IMT-2, Olympus, New Hyde Park, NY) utilizando un objetivo de inmersión en agua 40x (Olympus Wplan, NA=0.7) por medio de técnica de transiluminación; las imágenes fueron grabadas en una videocamara (Cohu 4815-2000) y transferidas a una televisión-grabadora (Sony Trinitron PVM-1271Q y grabadora Panasonic AG-7355, respectivamente). Las arteriolas fueron agrupadas de acuerdo a sus trayectos como ramas principales A1, pequeñas arcadas A2, arteriolas transversas A3 y arteriolas terminales o precapilares A4; las vénulas fueron clasificadas como pequeñas colectoras Vc y grandes vénulas V1.

La funcionalidad capilar (*FC*) fue definida como los segmentos capilares que tienen un tránsito de glóbulos rojos (al menos uno) en un período de 30 segundos de observación y analizada en 10 sucesivos campos microscópicos, para totalizar una región de .46 mm<sup>2</sup>. La observación de los campos fue hecha sistemáticamente por desplazamiento de la platina hacia la derecha o hacia la izquierda de cada campo, mismo que fue impreso en una videograbadora cuadro por cuadro durante 30 segundos de observación-grabación, definiendo el primer campo como el principal (bifurcación de grandes arteriolas).

La velocidad del flujo vascular en las arteriolas y vénulas fue medida usando un sistema de fotodiodo diseñado por Intaglietta y col (Fiber Optics Photo Diode Pickup and Velocity Traker 102B; Vista Electronics, San Diego, CA) y analizada a través de un microsensors que se ubica a lo largo del vaso para obtener un promedio de velocidad del paso de glóbulos rojos. El diámetro arteriolar y venular fue medido a través de una video imagen por la

técnica de deslizamiento (Digital Video Imagen Shearing Monitor model 908: Vista Electronics) durante el mismo tiempo en el que se evaluó la velocidad del flujo microvascular.

La velocidad del flujo sanguíneo ( $Q_B$ ) fue calculada de acuerdo a la fórmula:

$$Q_B = \alpha \cdot V_{RBC} \cdot \pi \cdot d^2/4$$

**Donde  $\alpha$  es un parámetro que varía de 2.0 para A1 y V1 a 1.0 en capilares,  $V_{RBC}$**

Se refiere a la velocidad de flujo sanguíneo y  $d$  al diámetro.

### **c) Análisis del oxígeno capilar y tisular.**

Las medidas de oxígeno fueron hechas utilizando el método de “desaparición de la fosforescencia” del Paladio-Porfirina descrita previamente,<sup>52</sup> el cual está basado en la relación que existe entre la velocidad de la desaparición de la fosforescencia dependiente de oxígeno emitido por la albúmina unida al complejo mesotetra-paladio-porfirina excitado por la emisión de pulsos de luz.

La relación entre el tiempo de vida de la fosforescencia ( $\tau$ ) y la presión del oxígeno está dada por la ecuación de Stern-Volmer :

$$\tau_0 / \tau = 1 + kq \cdot \tau_0 \cdot pO_2$$

Donde  $\tau_0$  y  $\tau$  son la vida media de la fosforescencia en ausencia de oxígeno molecular y a una  $pO_2$  establecida respectivamente, y  $kq$  es la constante de emisión, ambos factores dependientes del pH y la temperatura. (Torres Filho IP, and Intaglietta M. Microvessel  $PO_2$  measurements by phosphorescence decay method. Am J Physiol 1993;265:H1434-H1438)

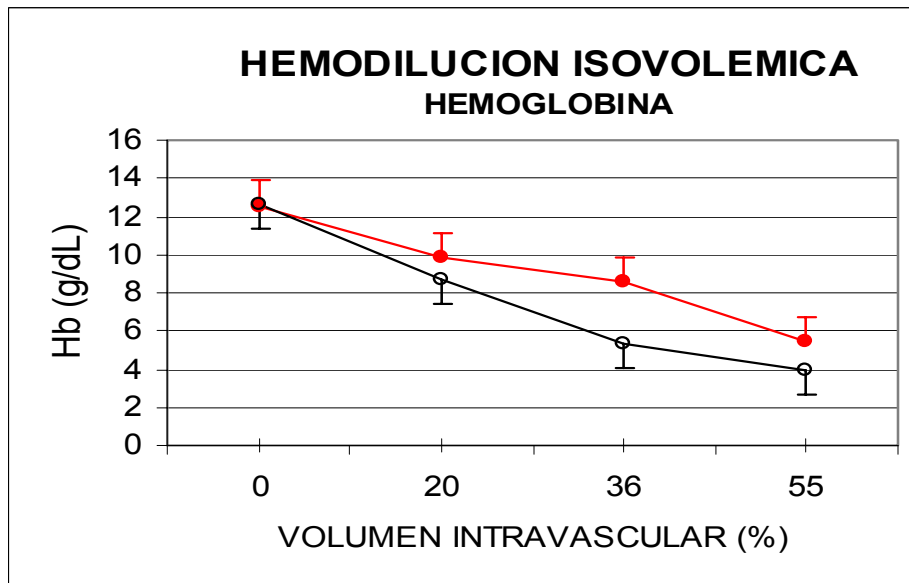
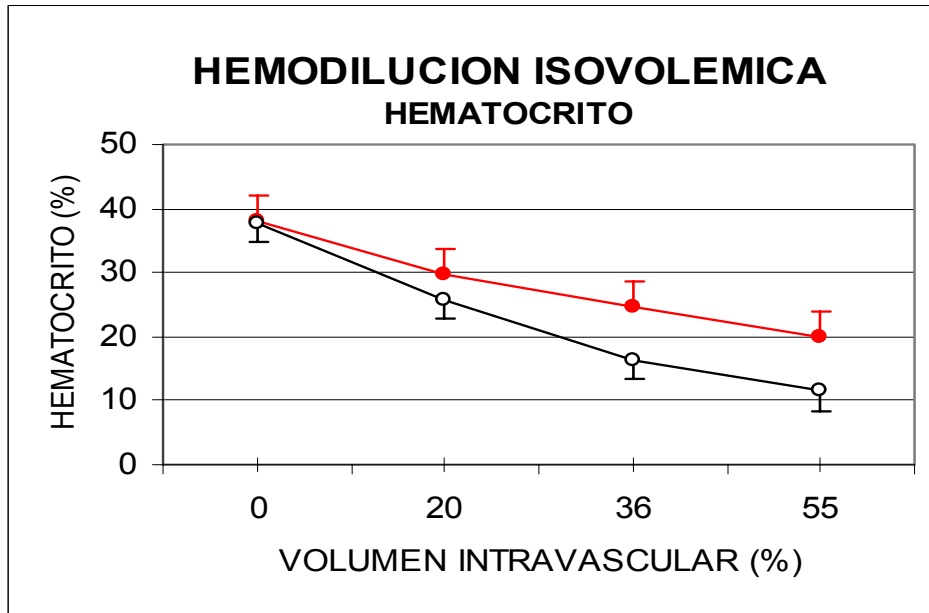
Los animales recibieron 30 mg/kg de peso de meso-tetra (4-carboxifenil) porfirina (Porphyrin Products, Inc., Logan, UT) unida a albúmina y diluida en solución salina al 0.9, para lograr una concentración final de 15 mg/mL como fosforescencia seca ( $\tau_0 = 600$  Oseg,  $kq = 325 \text{ Torr}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ , pH 7.4 y 37C).

La fosforescencia fue excitada por pulsos de luz de 30 Hz generada por un arco de xenón de 45 W (EG&G Electro Optics, Salem, MA). Fueron utilizados filtros de 420 y 630 nm para la observación de la fosforescencia de la porfirina.

La señal de la fosforescencia fue capturada por un fotomultiplicador (EMI, 9855B, Knott Elektronik, Munich, Germany) con un promedio de decadencia de 128 curvas y visualizado en un osciloscopio digital (Hitachi Oscilloscope V-1065, 100 MHz, Hitachi Denshi, Ltd, Japan). La constante de decadencia de la fosforescencia fue determinada por una computadora utilizando los promedios de las curvas en forma exponencial mediante la ecuación de Stern-Volmer.

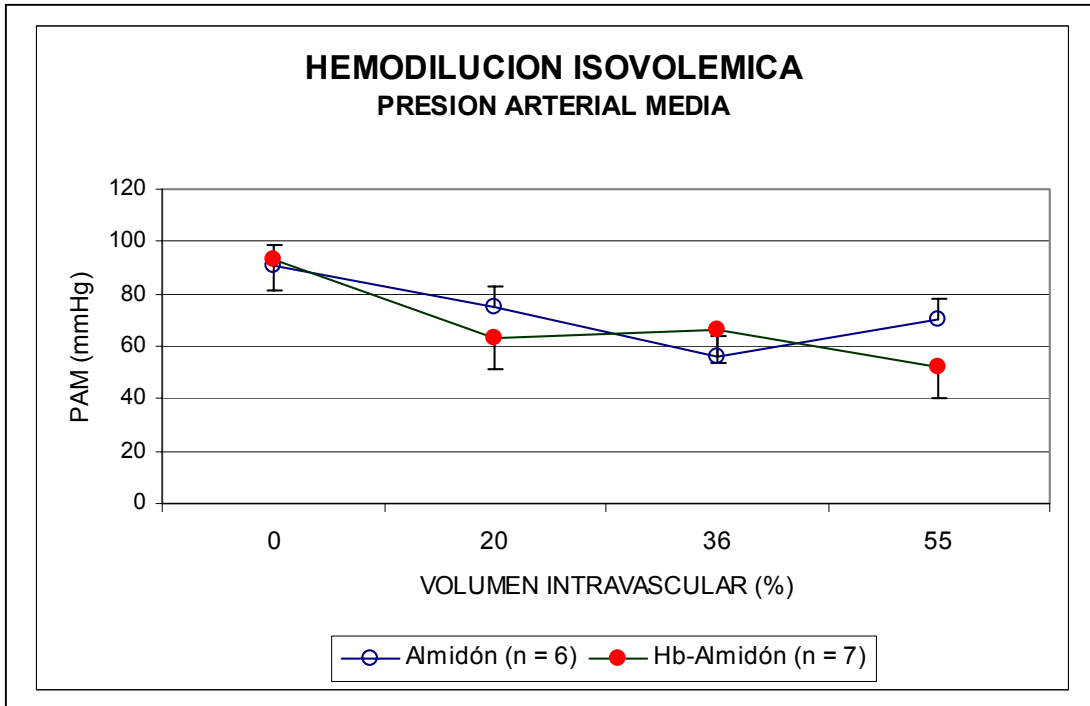
Fueron evaluados diferentes vasos (7 arterias y 7 venas) a lo largo de los segmentos estudiados midiendo la concentración de oxígeno dentro y fuera del vaso mediante la colocación de microelectrodos a voluntad. Las evaluaciones vasculares fueron hechas en las arteriolas largas y arcadas pequeñas, en las vénulas largas y vénulas colectoras pequeñas, mientras que el oxígeno tisular/endotelial fue analizado en 10 diferentes campos.

GRAFICA 1

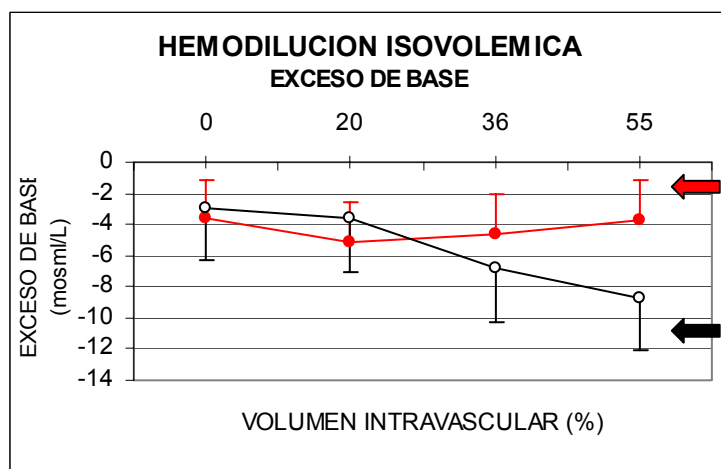
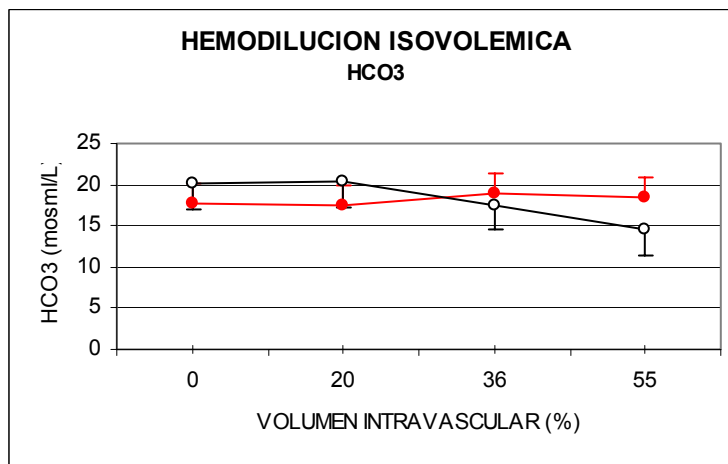
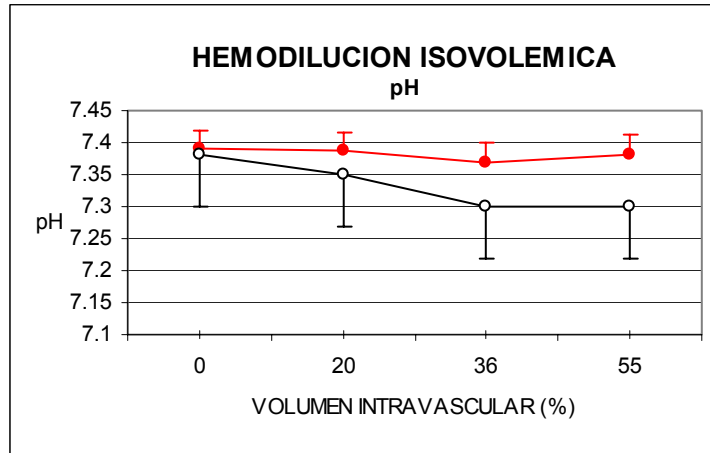


Hb-almidón (n= 7) ●  
Almidón (n= 6) ○

GRAFICA 2



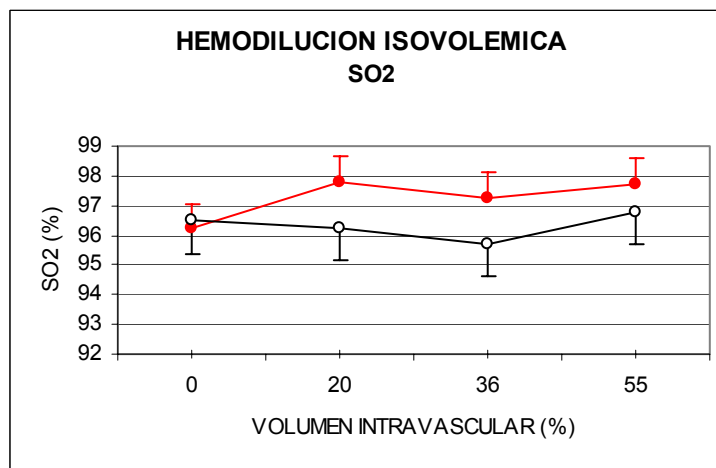
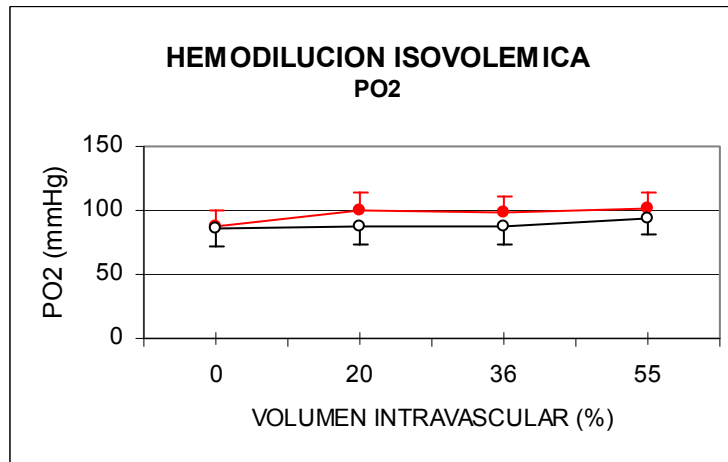
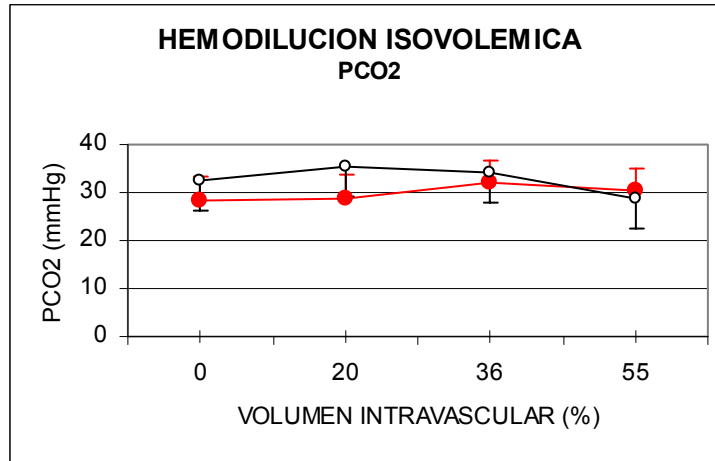
GRAFICA 3



Hb-almidón (n= 7)	●		
Almidón (n= 6)	○	← VS. ←	P < 0.05



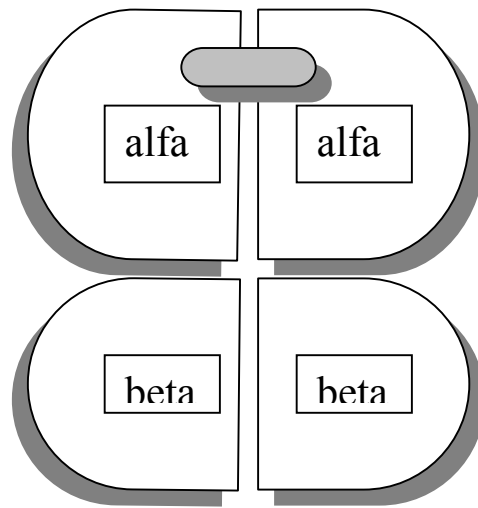
GRAFICA 4



Hb-almidón (n= 7) ●  
Almidón (n= 6) ○

# FIGURA 1

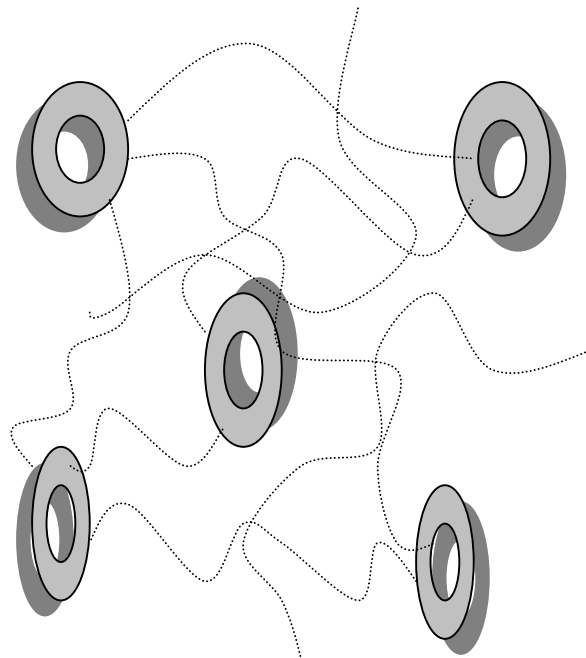
UNION INTRAMOLECULAR  $\alpha$ - $\alpha$



Bis (N-maleimidometil) eter

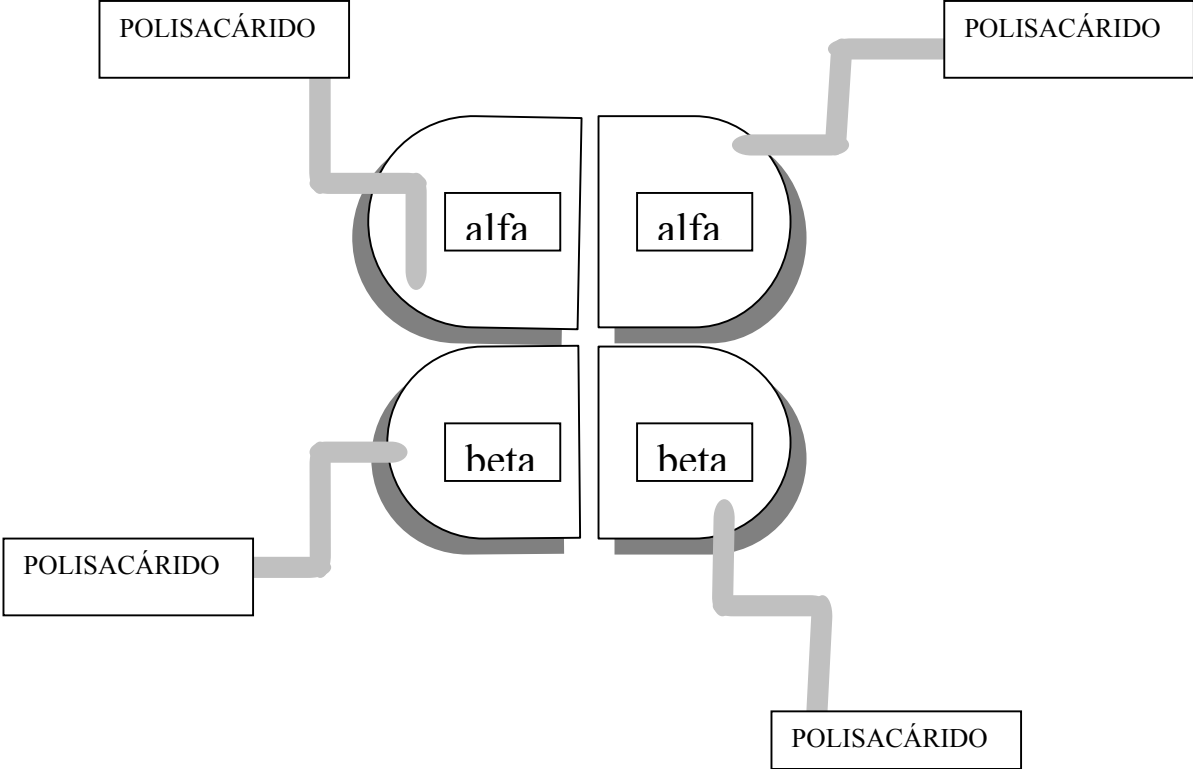
**FIGURA 2**

**UNION POLIMOLECULAR ENTRE LAS HEMOGLOBINAS**

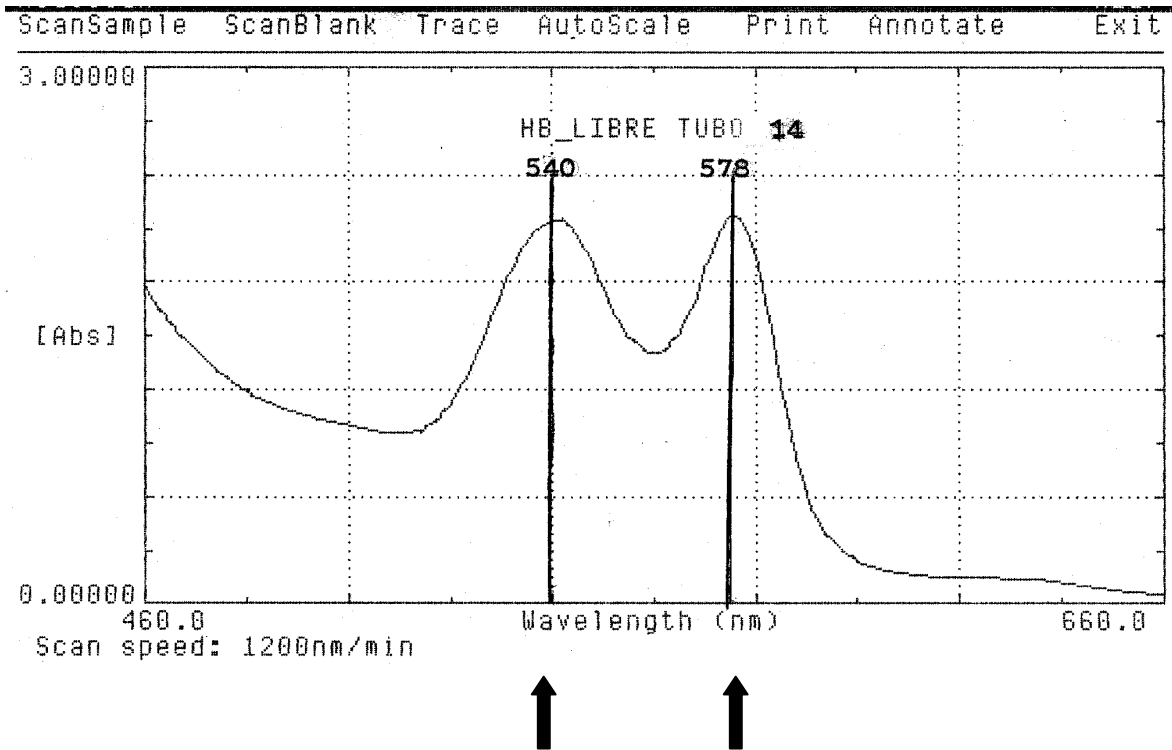


**FIGURA 3**

**HEMOGLOBINA CONJUGADA**

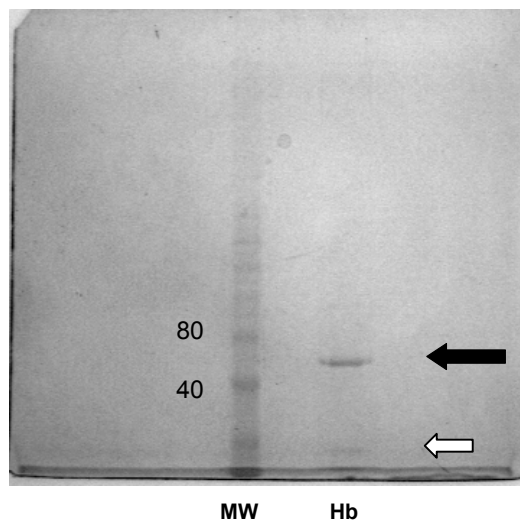


**FIGURA 4a**



La curva de hemoglobina se presenta entre los 540 y 580 nm

**FIGURA 4b**



Gel de poliacrilamida.



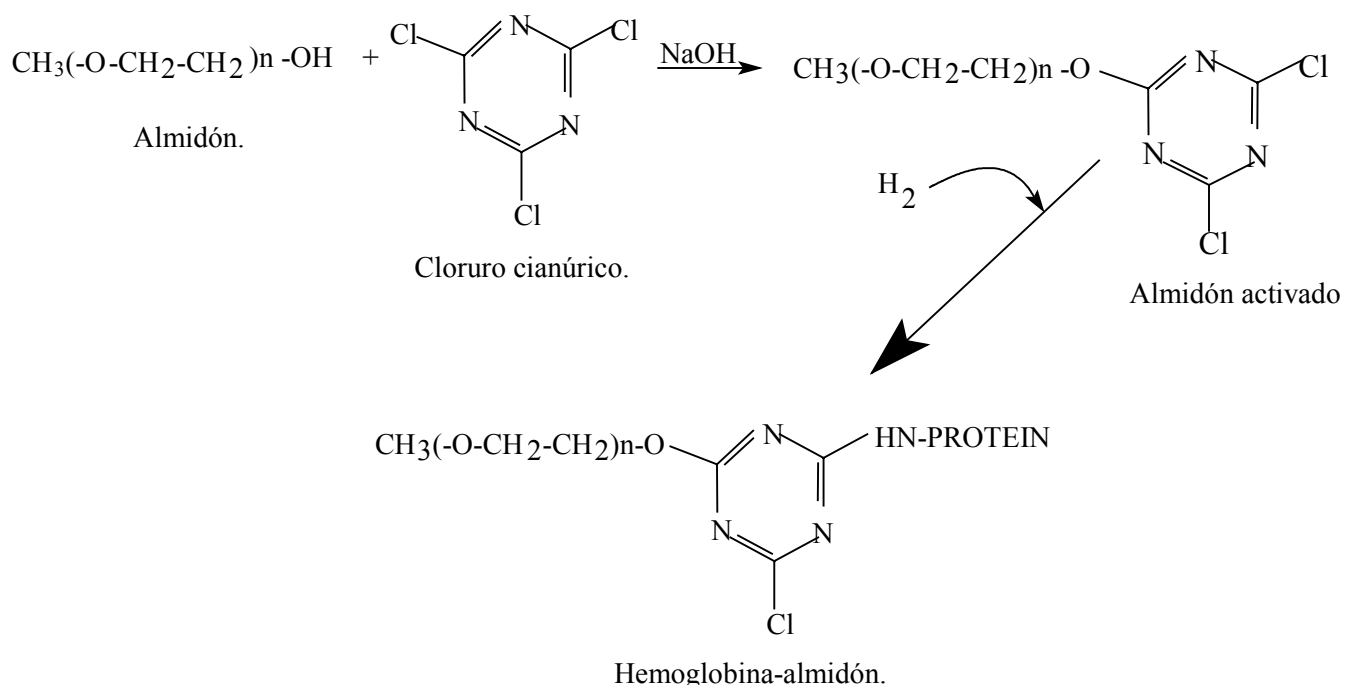
Se puede observar una banda (  ) que corre entre 40 y 80 mil daltons, en correspondencia al carril de pesos moleculares; también se puede observar una pequeña banda inferior (  ) que puede deberse a impurezas de la elusión.

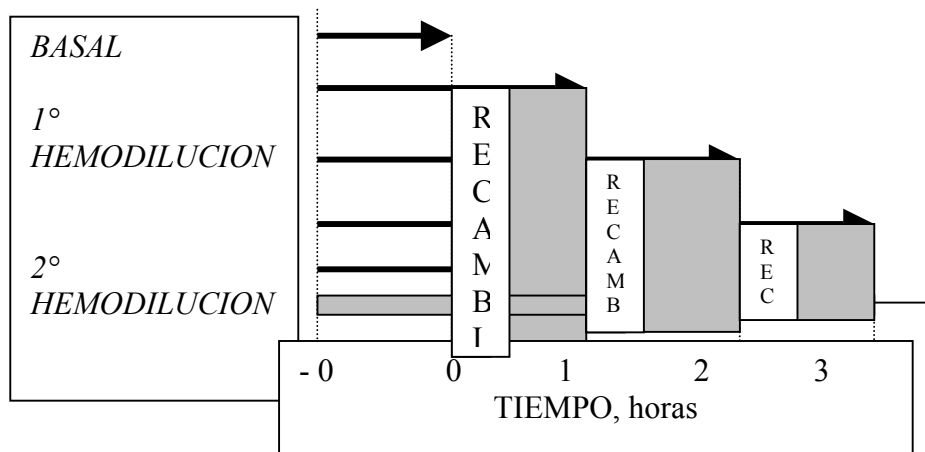
FIGURA 4c

La reacción se puede describir en la siguiente fórmula química:



## FIGURA A

### Tiempo y etapas del experimento



En la presente figura se presenta las tres etapas de hemodilución realizadas en el grupo de almidón y Hb-almidón; en el tiempo -0 al 0 (basal) se incluyen a los animales que tienen un hematocrito  $\geq$  a 45; la primera, segunda y tercera hemodilución isovolémica se realizan en los tiempos indicados con el objeto de descender el hematocrito a 40, 70 y 80 por ciento del basal respectivamente, permitiendo media hora de estabilización entre cada recambio.



## FIGURA 5

### Metodología

Cuando se hace pasar una corriente eléctrica continua a través de una solución que posee diferentes componentes cargados eléctricamente, éstos pueden ser separados. La velocidad con que se separan los componentes de la solución está en relación a la intensidad de la carga eléctrica que poseen. La hemoglobina, por ser una molécula de naturaleza proteica, está constituida por aminoácidos que se unen entre si mediante enlaces peptídico formando cadenas secuenciales (globinas) que poseen radicales ácidos básicos  $\text{NH}_3^+$ . Las diferentes hemoglobinas normales, al igual que las proteínas del plasma, cuando se colocan en un medio a un determinado pH, presentan diferente carga eléctrica, por lo que pueden ser separadas debido a su distinta movilidad al aplicar un campo eléctrico.

### Material

- Membrana de acetato de celulosa IL-Inc. Cat 49206-02.
- Buffer para hemoglobina Helena Laboratorios. Cat 5805.
- Aplicador automático Gelman Sciences de 8 canales.
- Cámara de electroforesis Sepratex. Gelman Sciences.
- Fuente de poder BRL Life Technologies, Inc Model 500.
- Densitometro junior.

### Procedimiento

Se coloco el soporte de acetato de celulosa en el Buffer para hemoglobina y con un aplicador automático se adicio la hemoglobina libre y la solución de hemoglobina-almidón y la electroforesis se llevo a cabo durante 1 hora a 200V. Después de la electroforesis el soporte se coloreo colocándolo durante un minuto en solución colorante rojo de Ponceau por 10 minutos y a continuación en solución decolorante por 5 minutos. Finalmente la placa se coloco en un vidrio desengrasado y se desprendió hasta estar completamente seco. El porcentaje de las bandas se cuantifico en un densitómetro *Júnior*.

## Resultados



carril 5 hemoglobina almidón	carril 6 hemoglobina libre dilución 1:2
[ ] 5g/dL	[ ] 5g/dL
	4.6% de hemoglobina glicosilada
8% de hemoglobina “almidonada”	

Hemoglobina Libre	Hemoglobina almidón
4.6%	2.6%
95.4 %	10.0%
	87.5 %

**TABLA I**

<b><u>Origen de la hemoglobina</u></b>	<b><u>Modificación</u></b>	<b><u>Compañía</u></b>
Bovina	Polimerización con glutaraldehido	Biopiure
Bovina	Polimerización con polietilenglicol	Enzon
Bovina	Interligada con <i>0</i> -Rafinosa	Hemosol
Humana (caducada)	Interligada $\alpha$ - $\alpha$	Baxter
Humana (caducada)	Polimerización con polietilenglicol	Sangart
Humana (caducada)	Polimerizada con glutaraldehido	Northfield
<u>Recombinante</u>	<u>Dímeros <math>\alpha</math></u>	<u>Somatogen</u>

Scott MG. 1997.

## TABLA II

### RECOMENDACIONES DE FDA PARA LA ELABORACION DE TRANSPORTADORES DE OXIGENO

#### 1.- CARACTERIZACION FISICO QUIMICA

- ❑ Capacidad oximétrica (p50, Coeficiente de Hill y Bohr).
- ❑ Espectro óptico
- ❑ Gel de poliacrilamida, con punto isoeléctrico
- ❑ Contenido de lipidos y lipidofosfatos
- ❑ Nivel de endotoxinas (Limulus)
- ❑ Contenido de hierro
- ❑ Presión coloidosmotica y viscosidad
- ❑ Contenido de metahemoglobina
- ❑ PH
- ❑ Cuantificación de electrolitos y iones.

#### 2.- PRUEBAS *IN VIVO*

- ❑ Estudio de sobrevida
- ❑ Efectos tóxicos observables en el animal
- ❑ Estudios de hemodilución en hemorragia
- ❑ Generación de radicales libres
- ❑ Estudios de coagulación y activación de macrofagos/neutrofilos y plaquetas (tromboxanos, histamina, leucotrienos)
- ❑ Respuesta inmune (IgG, IgE) y retardada.
- ❑ Estudios toxicológicos a largo plazo
- ❑ Cito hematología completa, y de función hepática.
- ❑ Creatinina sérica, BUN, Urea
- ❑ Análisis de la función glomerular y tubular (NAG, histología o inulina)

#### 3.- PRUEBAS EN LA MICROCIRCULACION

- ❑ Análisis de la oximetría capilar y tisular
- ❑ Análisis de la funcionalidad capilar

**TABLA III**

PARAMETROS	REFERENCIA	Hb Cristales		REFERENCIA	Hb- almidón	
	Hb cristales	iniciales	modificación	Hb-almidón	iniciales	modificación
Hb gm/dL	> 10	14.3	9.6	> 7	2.6	3.2
OHb gm/dL	> 75 %	89.6	96.3	90 - 99	47	83
MHb gm /dL	-15%	10.4	0.9	0.17 - 0.28	55.8	9.7
COHb gm/dL	-5%	-6	-0.2	1 a 7	3.1	1.4
RHb gm/dL	-5%	6	3	3.8 - 6.4	-5.9	5.9
CO2 V%	17 - 21 %	5.8	12.9	22 - 28	1.8	3.6
O2 cap V%	80 - 100 %	19	13.3	80 - 100 %	1.6	
sO2 V%	60 - 85 %	93.7	97	60 - 90 %	114.4	93.4
pH	6.3 - 7.3	6.5	6.2	7.29 - 7.41	6.038	6.49
Na mEq/L	145	129.8		128.6	132.3	
K mEq/L	4.9	3.73		3.6	4.1	
Cl mEq/L	113	109.4		95 - 105	111.5	
Calcio				5.45 - 5.9		
viscosidad (cP)	3.83	5.4		5.0 - 6.0	3.8	4.75
PM daltons	> 80 000	64 000	64 000	64 000	> 80 000	
P <sub>50</sub>				31 +/- 6		
Presión oncótica				20 - 25		
osmolaridad				290 - 310		156
LIMULUS	Negativo				Negativo	

Chiron/diagnostics Rapid Lab 240 pH/blood gas analyzer.

## Starch-hemoglobin Induces Contraction on Isolated Rat Aortic Rings

A. Chávez-Negrete,<sup>1,\*</sup> M. V. Oropeza,<sup>2</sup> M. M. Rojas,<sup>1</sup>  
F. Villanueva,<sup>2</sup> and M. G. Campos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Unit, Cardiology Hospital and  
<sup>2</sup>Pharmacology Research Unit, Specialties Hospital,  
National Medical Center, Mexico City, Mexico

### ABSTRACT

*Background.* Blood substitutes are being developed using molecular solutions of modified free hemoglobin; however, anaphylactic reactions, severe renal toxicity, and hypertension have been reported in experimental models and human beings. Hypertension remains as an obstacle to the clinical use of most blood substitutes. Several investigators suggest that this effect is due to the interaction between nitric oxide and hemoglobin into the endothelial cells; hence, prevention of hemoglobin extravasation would avoid vasoconstriction. The forms of hemoglobin likely to prevent extravasation include polymerized and encapsulated Hb. Another alternative and

\*Correspondence: A. Chávez-Negrete, Paseos de la Herradura 107, Col. Parques de la Herradura, Huixquilucan Edo. De México, 52786, Mexico; Fax: + 52 (55) 5761 4867; E-mail: adolfchavez@terra.com.mx.

significantly less expensive approach is the hydroxyethyl starch Hb-polymer. The aim of the present study was to compare the effect of hydroxyethyl-starch-hemoglobin with that of stroma-free hemoglobin on the *in vitro* contractile activity of aortic rings isolated from adult male rats. *Methods.* The hemoglobin-based oxygen carrier was made using stroma free hemoglobin prepared from oxidated human red cells and conjugated with 10% hydroxyethyl starch 200-260 MW. The experiments were made in thoracic segments of the aortic rings incubated with hemoglobin, starch-hemoglobin or Ringer Krebs-Bicarbonate solution (RKB) during 30 min. Smooth muscle contraction with phenylephrine and subsequent inhibition of contraction with carbachol were performed before and after incubation with hemoglobin, starch-hemoglobin, or vehicle. *Results.* Incubation with hemoglobin and starch-hemoglobin significantly increased the contractile response to phenylephrine of aortic rings compared with RKB solution. The maximal response to carbachol was significantly decreased in the aortic rings incubated with either hemoglobin or starch-hemoglobin in comparison with the RKB-incubated tissues. There were no differences between the aortic rings incubated with either hemoglobin, or starch-hemoglobin. *Conclusions.* These results show that there are no differences between the effects of stroma-free hemoglobin and starch-hemoglobin on the *in vitro* contractile activity of aortic rings isolated from adult male rats. Our findings do not support the hypothesis that an increase in the size of the hemoglobin molecule prevents hemoglobin extravasation, and the consequent vasoconstriction due to the scavenging of nitric oxide by stroma free hemoglobin in the cellular space between endothelium and smooth muscle.

*Key Words:* Blood substitute; Vasoactivity; Nitric oxide; Hydroxyethylstarch.

## INTRODUCTION

Substitution of red blood cells with soluble hemoglobin (Hb)-based oxygen is a challenge of modern medicine. Interest in the use of hemoglobin as an oxygen carrier was first reported in the literature in 1934 when totally exsanguinated sheep were transfused with a solution of bovine Hb (Amberson et al., 1934).

In the late (1940s), Amberson et al. carried out unsuccessful attempts at human transfusion with Hb solution (Amberson et al., 1949). Anaphylactic reactions (Amberson et al., 1949), severe renal toxicity (Brandt et al., 1951), and hypertension (Hess and Reiss, 1996) have been

reported as side-effects of the use of Hb solution. Anaphylactic reactions and renal damage due to stroma-free hemoglobin (SFH) have been solved, but hypertension remains as an obstacle to the clinical use of most blood substitutes.

In animal studies, Schultz et al. have observed that the administration of SFH increases both diastolic and systolic pressures, peaking 15–30 min after administration and returning to baseline levels after two hours (Shultz et al., 1993).

The mechanism involved in the hypertensive effect of SFH is not completely understood and several explanations have been proposed. Most investigators suggest that this effect is due to the interaction between nitric oxide (NO) and hemoglobin; unlike Hb in the red blood cells, soluble Hb may be taken up by endothelial cells or enters the space between these and smooth muscle and reacts with NO to form met-Hb and NO-Hb (Sanders et al., 1996).

Nitric oxide, also referred to as endothelial-derived relaxing factor, is a potent endothelial vasorelaxant that inhibits conversion of pro-endothelin into the vasoconstrictor endothelin (Palmer et al., 1987). On these grounds, prevention of Hb extravasation would avoid vasoconstriction.

The forms of hemoglobin likely to prevent extravasation include polymerized and encapsulated Hb. This type of modification should hinder extravasation, allowing nitric oxide to exert its physiological vasorelaxant role.

In vitro studies on Hb-induced vasoactivity have shown that changes of the Hb molecule cause hypertension that seems qualitatively and quantitatively dependent on the type of modification performed (Rohlf s et al., 1998). Conversely, red cell and cellular liposome-encapsulated Hb do not cause either vasoconstriction or hypertension (Rudolph et al., 1997; Sakai et al., 1999).

The analysis of the literature on the different Hb molecules modified and commercially developed suggests an inverse relationship between Hb molecular size and the extent of the pressor response, an effect that could be related to the dynamics of NO/Hb interactions (Bassange et al., 1987).

Conjugation of Hb to an inert material has been proposed as a means to increase molecular size, an effect that has been achieved using polyethylene glycol yielding a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC) with reduced vasoactivity (Conover et al., 1996; Nakai et al., 1998). An alternative to this approach is the hydroxyethyl starch Hb-polymer, which may be significantly less expensive to produce; however, its potential role in promoting vasoactivity has not been explored.



The aim of the present study was to compare the effect of hydroxyethyl-starch-hemoglobin with that of stroma-free hemoglobin on the *in vitro* contractile activity of aortic rings isolated from adult male rats.

## METHODS

### Hemoglobin Production and Purification

Stroma-free hemoglobin (SFH) was prepared from outdated human red cells obtained from the blood bank of the Cardiology Hospital, National Medical Center, Mexican Social Security Institute.

Red blood cells (RBCs) were separated from whole blood by the DeVenuto modified method (De Venuto et al., 1977). RBCs were washed three times with saline solution (0.9%) and hemolyzed by stirring in 1.5 vol of distilled water during 30 min at 4°C. The hemolyzed cells were then centrifuged at 4000 × g/30 min at 4°C to yield a hemoglobin solution free of visible particulate matter. This solution was filtered through surgical gauze, and mixed with 100 g of DEAE-52 cellulose (Cheung et al., 1984) in PBS, pH 7.5 for one hour. The SFH obtained was filtered through a sterile 0.22 μm Millipore filter.

The purity of the product was verified by passing a mixture of SFH and *N*-acetylcysteine (1:1 molar equivalents) through a Sephadex column C-300, and by analyzing the absorbance curves between 540–573 nm (spectrophotometer Beckman DU) from the fourteen fraction of the Sephadex column.

Total Hb content and percentage of HbO<sub>2</sub>, met-Hb, and other parameters were evaluated with a IL282 Co-Oximeter (Instrument Laboratories, Lexington, Mass.) and are shown on Table 1. The Hb was filtered in 40 μm filter, and was stored in sealed containers in a nitrogen atmosphere.

### Starch-hemoglobin Preparation

The hemoglobin-based oxygen carrier was made using 10% hydroxyethyl starch 200,000–260,000 MW (308 mOsm/L) from Fresenius, Bad Homburg, Germany (Sommermeier et al., 1987).

The covalent reaction was initiated by adding 0.3 g of cyanogen chloride to 5.0 g of hydroxyethyl starch at 10°C under a nitrogen atmosphere for about 90 min, during which time the pH was maintained

Table 1. Characteristics of the stroma-free and starch hemoglobin preparations used in the study.

Parameters	Stroma-free hemoglobin	Starch hemoglobin
Hb (g/dL)	5.5 ± 1.5	1.6 ± 0.4
O <sub>2</sub> (%)	96.9 ± 2.8	86.8 ± 13.0
COHb (%)	0.6 ± 0.0	0.9 ± 0.9
Methemoglobin (%)	1.4 ± 2.1	4.5 ± 1.4
O <sub>2</sub> ct	6.5 ± 3.3	1.5 ± 1.1
SO <sub>2</sub> (%)	98.4 ± 0.9	100.54 ± 1.6
O <sub>2</sub> cap	6.7 ± 3.4	1.5 ± 1.2
RHb (%)	1.3 ± 0.9	0.8 ± 0.4

Data are mean ± S.D. of four samples.

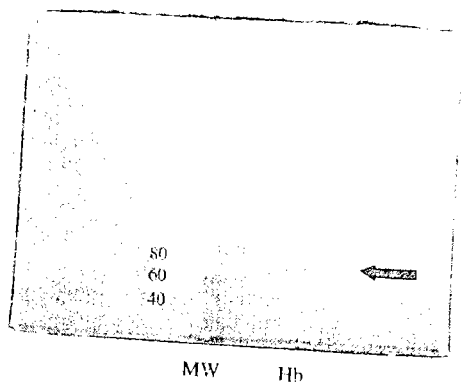


Figure 1. Hb lane, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of stroma-free hemoglobin isolated by the selective DEAE-cellulose absorption method. MW lane, molecular weight markers.

in 5.0 with 0.1 M NaOH (Cerny et al., 1982). This solution produced the "activated starch" and was allowed to stand overnight at 4°C. Twenty-five grams of the SFH solution were transferred to 100 mL of "activated starch" in nitrogen atmosphere for 90 min at room temperature. To regulate the osmolarity the solution was filtered in 40 µm dialysis membrane with human dialysis solution (5.7 g NaCl, 3 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0.28 g de CaCl<sub>2</sub>, 0.30 g de KCl y 0.15 g de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O./lL) at 4°C overnight. The purity of the starch-hemoglobin solution was verified as mentioned (Fig. 1).

### Contractile Activity Assays

Male Sprague-Dawley rats (250–350 g body weight) were killed by cervical dislocation. The thorax was opened by a midline incision, the heart and lungs were put aside, and the aorta was carefully excised. Thoracic segments of the aorta were placed in Ringer Krebs-Bicarbonate solution (RKB) composition (mM): NaCl, 118; KCl, 4.8; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 24; glucose, 11. The thoracic aorta was cleaned of connective tissue and blood, and transversal rings 4–5 mm long were obtained.

Each aortic ring was placed in a 5.0 mL bath with RKB solution, pH 7.4, at 37°C and continuously gassed with 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub>. The rings were fixed by stainless steel hooks to the bottom of the tissue bath and to a tension transducer (Grass, FT03) connected to a polygraph (Grass, model 7B). Tissues were stabilized under a 2 g tension during a 60 min period. The RKB solution was washed out every 10 min. After the stabilization period the aortic rings were stimulated with KCl 60 mM prepared from RKB by equimolar substitution of KCl by NaCl. All tissues showing two consecutive similar responses to high KCl were included in the study.

Tissues were contracted with phenylephrine (10<sup>-6</sup> M), and when a plateau was reached tissues were relaxed with cumulative doses of carbachol (10<sup>-8</sup> to 10<sup>-5</sup> M), in such a fashion that every 10 min the consecutive dose was added to the bath, without washing out the previous one. At the end of the carbachol curve, the solution in the bath was washed out and replaced with fresh RKB, and the aortic rings were incubated with hemoglobin (1.8 μM), starch-hemoglobin (1.8 μM) or RKB solution during 30 min. The schedule of phenylephrine and carbachol administration was repeated after the incubation time.

Tissue viability was verified by high KCl stimulation at the end of the experiments.

The dose of 1.8 μM was selected to perform experiments on the basis of previous concentration-response curves post incubation with hemoglobin (0.3, 1.0, 1.8, 3.2, and 10 μM). Four solutions of hemoglobin and four of starch-hemoglobin were prepared.

An acceptable level of methemoglobin content (or oxidation state, <5%) of the solutions was verified. Three experiments were performed with each solution.

### Data Analysis

The amplitude of responses was recorded. Relaxation was expressed as percentage of the inhibition of the maximal contractile response

(phenylephrine  $10^{-6}$  M). All results are expressed as mean of 10–12 experiments  $\pm$  S.E.M. Each  $n$  was obtained from a different animal. The maximal response ( $R_{max}$ ) and the effective concentration 50 ( $EC_{50}$ ) were calculated with the Sigma Plot 4.01 software. One-way analysis of variance and Bonferroni multiple comparison tests were used to evaluate statistical differences.  $P < 0.05$  was considered significant.

### RESULTS

The contraction to phenylephrine (Fig. 2) and the carbachol-induced relaxation (data not shown), performed prior to incubation did not show any significant difference between groups. Incubation with hemoglobin and starch-hemoglobin increased the contractile response to phenylephrine of aortic rings, as compared with preincubation response ( $P < 0.01$ ). Whereas aortic rings incubated with RKB solution seemed to display a minor contractile response to phenylephrine after incubation, however, this difference was not significant (Fig. 2).

The maximal response to carbachol was minor in the aortic rings incubated with either hemoglobin or starch-hemoglobin in comparison with the RKB-incubated tissues ( $P < 0.01$ ; Table 2). There were no

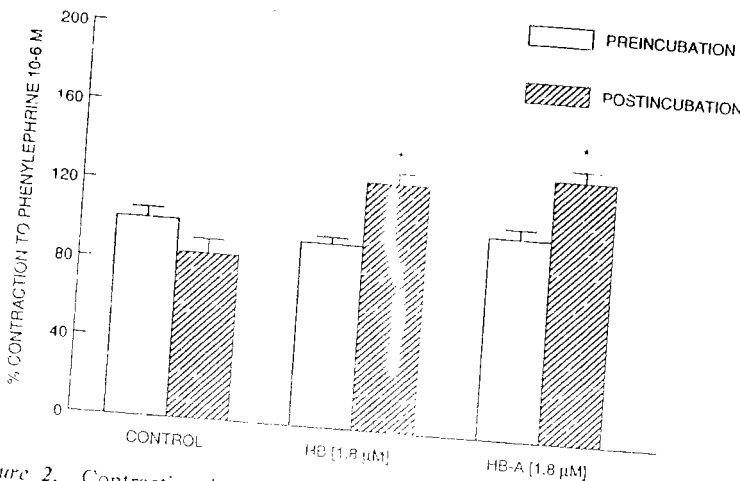


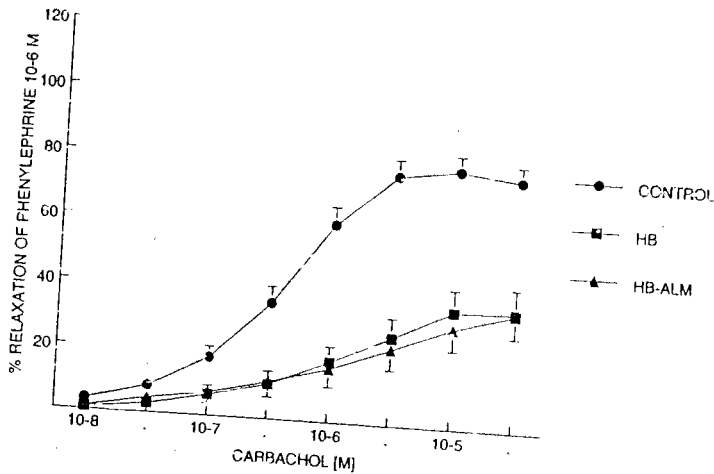
Figure 2. Contraction induced by phenylephrine ( $10^{-6}$  M) in rings of aorta, isolated from adult male rats. Bars represent the mean ( $n = 10-12$ ) and "T" lines represent S.E.M. \* $P < 0.01$  as compared with preincubation value.

**Table 2.** Relaxation response to carbachol of aortic rings after precontraction with phenylephrine  $10^{-6}$  M.

Previous incubation	Maximal response	EC <sub>50</sub> ( $10^{-7}$ M)
Stroma-free Hemoglobin	40.43 ± 2.7 <sup>a</sup>	10.23 ± 2.81
Starch-hemoglobin	52.64 ± 7.56 <sup>a</sup>	42.31 ± 24.71
Control (RKB)	79.68 ± 1.84	3.98 ± 0.43

Data are mean ± S.E.M.

<sup>a</sup> $P < 0.01$  as compared with control incubation.



**Figure 3.** Concentration response curves to carbachol of rings of aorta isolated from adult male rats. Lines represent mean ( $n = 10-12$ ) and "T" lines represent S.E.M.

differences between the aortic rings incubated with either hemoglobin or starch-hemoglobin (Fig. 3). The EC<sub>50</sub> of the relaxing response to carbachol was similar in all groups (Table 2).

## DISCUSSION

The results of the present study show that there are no differences between the effects of stroma-free hemoglobin and starch-hemoglobin on the in vitro contractile activity of aortic rings isolated from adult

male rats. Therefore, our findings do not support the hypothesis that an increase in the size of the hemoglobin molecule prevents hemoglobin extravasation and thus the vasoconstriction due to the scavenging of nitric oxide by stroma-free hemoglobin in the cellular space between the endothelium and smooth muscle.

In support of this theory, and in contrast with the present findings, studies in a Langendorff perfusion model of rat hearts have shown that polyethylene-glycol-hemoglobin had smaller vasoconstrictive effects than unmodified hemoglobin (Nakai et al., 1998). The molecular weight of the polyethylene-glycol preparation is about 90,000 Da, whereas that of the starch-hemoglobin used in the present study was 200,000–260,000 Da.

On the basis of the molecular size hypothesis, it would be expected that starch-hemoglobin had a smaller vasoconstrictive effect than both polyethylene-glycol-hemoglobin or stroma-free hemoglobin. Studies with reactive groups of nonheme Hb sites that may also interact with NO have shown that the contribution of these nonheme sites to overall Hb-induced vasoactivity appears to be negligible when the high-affinity heme sites are available for NO interaction (Jia et al., 1996; Stamler et al., 1997). These findings suggest that in the starch-hemoglobin molecule assayed in the present study, these high affinity heme sites may still be available for interaction with nitric oxide, which would explain the similarity in vasoactivity between starch-hemoglobin and stroma-free hemoglobin.

Abassi et al. showed that polymeric cross-linked hemoglobin, with molecular size >360 KDa, increased blood pressure in a lesser extent than native hemoglobin in a euolemic rat model (Abassi et al., 1997). To explain their findings the authors proposed that:

- (1) Polymerization of hemoglobin may not entirely eliminate its propensity to reduce the steady-state flux of nitric oxide toward smooth muscle cells.
- (2) Nitric oxide binding to hemoglobin in the lumen will create a diffusion gradient that can theoretically divert more endothelial nitric oxide toward the lumen, where it plays only a partial role in the regulation of vascular tone.
- (3) The reduction of local nitric oxide produced by its binding to cell-free hemoglobin can also increase endothelial permeability, reducing the selectivity for differently sized hemoglobins, blunting the effect of size of the molecular species.

This analysis shows the complexity of the processes involved in the vascular tone regulation, since stroma-free and starch-hemoglobin

displayed similar effects on the carbachol-induced relaxation in aortic rings.

Nitric oxide binding to ferrous deoxyhemoglobin has been proposed to be the main mechanism for NO depletion. Deoxyhemoglobin has an extremely high affinity for nitric oxide and although its concentration relative to HbO<sub>2</sub> may be low, the absolute amount may be still sufficient to bind the nitric oxide produced by endothelial cells (Vandergriff and Winslow, 1995). Kosaka et al. have shown that stimulation of NO production in endothelial cell by cytokines produces significant amounts of Hb-nitric oxide in vivo (Kosaka et al., 1994).

Binding to methemoglobin (Hb<sup>+</sup>) and oxidation/reduction cycles have also been proposed as causes of nitric oxide consumption, although the affinity of nitric oxide for Hb<sup>+</sup> is too low to be significant at physiological concentrations (Alayash et al., 1994).

In the present study, the mean concentration of methemoglobin (1.4 and 4.5 for stroma-free and starch-hemoglobin, respectively) might participate in the nitric oxide scavenging. On the other hand, Rohlf's et al. showed an inverse relationship between the affinity of nitric oxide for hemoglobin and the hypertensive response of conscious rats after 50% hemodilution of intravascular volume, with several modified hemoglobin molecules (Rohlf's et al., 1998). These findings suggest that the mechanisms participating in the hypertensive response of stroma-free or modified hemoglobin are not completely understood.

Another factor that should be considered is the viscosity of the hemoglobin solution. Tsai et al. have shown that normal levels of tissue perfusion could be obtained during extreme hemodilution when plasma viscosity is increased by the addition of high molecular weight dextran to the blood volume replacement fluid, an effect that could not be obtained with a lower viscosity solution (Tsai et al., 1998).

Shear stress is a direct function of viscosity. Studies of large conduit arteries have shown a direct relation between the viscosity of the perfusion solution or blood and vessel diameter in various experimental conditions, suggesting that an increase in shear stress, at the lumen surface of the vessel, is the stimulus needed for the enhanced production of the factor(s) eliciting vasodilation (Melkumyants et al., 1989; Tesfamariam and Halpern, 1987).

Analysis of the relationships between flow, viscosity, and shear stress in cremaster muscle arterioles from rats has shown that increases in shear stress due to the increases in viscosity of the perfusion fluid resulted in arteriolar dilation similar to that caused by increases in flow velocity, that this dilation was endothelium-dependant, and that it may be mediated by prostaglandins or nitric oxide (Frangos et al., 1996; Koller et al., 1993).

Thus viscosity, flow, shear stress, and the production of vasodilators are closely related and should be considered in the design of hemoglobin-based oxygen carriers (Intaglietta, 1999).

In the present study, flow and the consequent shear stress are absent, therefore the stimulus required to induce endothelial production of nitric oxide is not present, which would result in a poor relaxation of the aortic rings. The present study is basically an experimental investigation, therefore it is difficult to draw clinically relevant conclusions, and more studies are needed to clarify the phenomena leading to the hypertensive effect of hemoglobin-based oxygen carriers.

Several questions remain unsolved. May the scavenging of nitric oxide by starch-hemoglobin be compensated by an increase of viscosity of the oxygen carrier? Do hemoglobin-based oxygen carrying blood substitutes have adequate viscosity to maintain endothelial shear stress necessary to stimulate the production of nitric oxide? In this context, new formulations of hemoglobin-based oxygen carriers that enhance viscosity by increasing either the molecular weight or molecule size may be devised by substituting valine and leucine residues by tryptophan in the heme groups of hemoglobin to avoid nitric oxide scavenging without modifying oxygen affinity (De Witt et al., 1997).

## REFERENCES

- Abassi, Z., Kotob, S., Pieruzzi, F., Abouassali, M., Keiser, H. R., Frantantoni, J. C. (1997). Effects of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 129:603-610.
- Alayash, A. I., Brokner Ryan, R. E., Frantantoni, J. C., Cason, R. E. (1994). Redox reactivity of modified hemoglobins with hydrogen peroxide and nitric oxide: toxicological implications. *Artif. Cell Blood Substit. Biotechnol.* 22:373-386.
- Amberson, W. R., Flexner, J., Steggerda, F. R., Mulder, A. G., et al. (1934). On the use of Ringer-Locke solution containing Hb as a substitute for normal blood in mammals. *J. Cell Comp. Physiol.* 5:359-382.
- Amberson, W. R., Jennings, J. J., Rhode, C. M. (1949). Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *J. Appl. Physiol.* 1:469-489.
- Bassange, F., Busse, R., Pohl, U. (1987). Albumin release and asymmetrical response of the rabbit arterial wall to endothelium-derived relaxing factor. *Circ. Res.* 61:1168-1173.



- Brandt, J. I., Frank, N. R., Lichtman, H. (1951). The effects of Hb solutions on renal function in man. *Blood* 6:1152-1158.
- Cerny, L. C., Stasiw, D. M., Cerny, E. L. (1982). A hydroxyethyl starch-hemoglobin polymer as a blood substitute. *Clin. Hemorheol.* 2:355-365.
- Cheung, L. C., Storm, C. B., Gabriel, B. W., Anderson, W. A. (1984). The preparation of stroma-free hemoglobin by selective DEAE-cellulose absorption. *Anal. Biochem.* 137:481-484.
- Conover, C. D., Lejeune, L., Shum, K., Shorr, R. G. L. (1996). The influence of polyethylene glycol conjugation on bovine hemoglobin's intrinsic effect on the gastrointestinal system of the rat. *Life Sci.* 59:1861-1869.
- De Venuto, F., Zuck, T. F., Zegna, A. I., Maj, M. (1977). Characteristics of stroma-free hemoglobin prepared by crystallization. *J. Lab. Clin. Med.* 89:509-516.
- De Witt, C., Schäfer, C., von Bismark, P., Pohl, U. (1997). Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilatation in the hamster microcirculation in vivo. *Pflügers Arch.* 434:354-361.
- Frangos, J. A., Huang, T. Y., Clark, C. B. (1996). Steady shear and step changes in shear stimulate endothelium via independent mechanism-superposition of transient and sustained nitric oxide production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:660-665.
- Hess, J. R., Reiss, R. F. (1996). Resuscitation and the limited utility of the present generation of blood substitutes. *Transfus. Med. Rev.* 10:276-285.
- Intaglietta, M. (1999). Microcirculatory basis for the design of artificial blood. *Microcirculation* 6:247-258.
- Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Stamler, J. S. (1996). S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380:221-226.
- Koller, A., Sun, D., Kaley, G. (1993). Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow-and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Cir. Res.* 72:1276-1284.
- Kosaka, H., Sawai, Y., Sakaguchi, H., Kumura, E., Harada, N., Watanabe, M., Shiga, T. (1994). ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of cytokine-treated rats. *Am. J. Physiol.* 266:C1400 C1405.
- Melkumyants, A. M., Balashov, S. A., Khasyutin, V. M. (1989). Endothelium dependent control of arterial diameter by blood viscosity. *Cardiovasc. Res.* 23:741-747.
- Nakai, K., Sakuma, I., Kitabatake, A. (1998). Vascular activities of hemoglobin-based oxygen carriers. In: Tushida, E., ed. *Blood Substitutes Present and Future Perspectives*. Elsevier Science, pp. 251-264.

- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Rohlf's, R. J., Bruner, E., Chiu, A. et al. (1998). Arterial blood pressure response to cell-free hemoglobin solution and the reaction with nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 273:12128-12134.
- Rudolph, A. S., Sulpizio, A., Hieble, P. et al. (1997). Liposome encapsulation attenuates hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segment. *J. Appl. Physiol.* 82:1826-1835.
- Sakai, H., Tsai, A. G., Rohlf's, R. J., Hara, H. et al. (1999). Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes: influence of O<sub>2</sub> affinity. *Am. J. Physiol.* 276:H553-H562.
- Sanders, K. E., Ackers, G., Sligor, S. (1996). Engineering and design of blood substitutes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:534-540.
- Shultz, S. C., Grady, B., Cole, F. et al. (1993). A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to dapsirin cross-linked hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 122:301-308.
- Sommermeier, K., Schmidt, F., Weidler, B. (1987). Klinisch verwendete hydroxyethylstärke-mische charakterisierung. *Krankenhauspharmazie*, 271.
- Stamler, J. S., Jia, L., Eu, J. P., et al. (1997). Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276:2034-2037.
- Tesfamariam, B., Halpern, W. (1987). Modulation of adrenergic responses in pressurized resistance arteries by flow. *Am. J. Physiol.* 253 (Heart Circ. Physiol. 22): H1112-H1119.
- Tsai, A. G., Friesenecker, B., McCarthy, M., Sakai, H., Intaglietta, M. (1998). Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skin fold model. *Am. J. Physiol.* 275:H2170-H2180.
- Vandergriff, K. D., Winslow, R. M. (1995). A theoretical analysis of oxygen transport: a new strategy for the design of hemoglobin-based red cell substitutes. In: Winslow, R. M., Vandergriff, K. D., Intaglietta, M., eds. *Blood Substitutes. Physiological Basis of Efficacy*. Boston: Birkhauser, pp. 143-154.