

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de la Salud**

**Técnicas y materiales para el desarrollo de transportadores de oxígeno a base de Hb como alternativa a las transfusiones sanguíneas en medicina veterinaria.  
Revisión sistemática.**

**Pamela Alexandra Arizo Lucero**

**Medicina Veterinaria**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario

Quito, 20 de mayo de año 2023

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de la Salud**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Técnicas y materiales para el desarrollo de transportadores de oxígeno a base de Hb como alternativa a las transfusiones sanguíneas en medicina veterinaria.  
Revisión sistemática.**

**Pamela Alexandra Arizo Lucero**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Rommel Lenin Vinueza DMVZ, M.Sc.**

Quito, 20 de mayo de 2023

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Pamela Alexandra Arizo Lucero

Código: 00206454

Cédula de identidad: 1723508642

Lugar y fecha: Quito, 20 de mayo de 2023

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

La disponibilidad y seguridad de las transfusiones sanguíneas en medicina presentan desafíos que han llevado a la búsqueda y desarrollo de terapias alternativas. Los transportadores de oxígeno basados en hemoglobina (HBOCs) han surgido como una solución prometedora a estas limitaciones. Los HBOCs son biopartículas diseñadas para aprovechar las propiedades únicas de la hemoglobina, asegurando la entrega eficiente de oxígeno a los tejidos y previniendo situaciones de hipoxia. Se pueden clasificar en HBOCs acelulares y celulares, cada uno con ventajas y composiciones distintas. Los HBOCs acelulares implican modificaciones químicas de la hemoglobina, mientras que los HBOCs celulares encapsulan la hemoglobina en estructuras que imitan a los eritrocitos. La revisión tuvo como objetivo sistematizar la información sobre las técnicas y materiales utilizados para desarrollar HBOCs en medicina veterinaria, proporcionando una visión completa de su potencial como opciones de tratamiento seguras y accesibles. En los resultados se detallan las técnicas, materiales, simplicidad y eficacia de cada uno de los pasos involucrados en el desarrollo de los HBOCs y se discute sobre su utilidad para medicina veterinaria.

**Palabras clave:** HBOCs, transportadores de oxígeno, transfusiones, hemoglobina, biofármaco, medicina veterinaria

## ABSTRACT

The availability and safety of blood transfusions in medicine present challenges, leading to the exploration and development of alternative therapies. Hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) have emerged as a promising solution to these limitations. HBOCs are bioparticles designed to harness the unique properties of hemoglobin, ensuring efficient oxygen delivery to tissues, and preventing hypoxic conditions. They can be classified into acellular HBOCs and cellular HBOCs, each with distinct advantages and compositions. Acellular HBOCs involve chemical modifications of hemoglobin, while cellular HBOCs encapsulate hemoglobin within structures that mimic erythrocytes. The review aimed to systematize information about the techniques and materials used to develop HBOCs in veterinary medicine, providing a comprehensive understanding of their potential as safe and accessible treatment options. The results detail the techniques, materials, simplicity, and efficacy of each of the steps involved in the development of HBOCs and discuss their usefulness for veterinary medicine.

**Keywords:** HBOCs, oxygen carriers, transfusions, hemoglobin, biodrug, veterinary medicine.

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>Introducción .....</b>	<b>10</b>
<b>Transportadores de oxígeno a base de hemoglobina.....</b>	<b>11</b>
<b>Metodología .....</b>	<b>15</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>17</b>
<b>Aislamiento y purificación de Hb .....</b>	<b>17</b>
<b>Ensamblaje de los transportadores .....</b>	<b>22</b>
Modificaciones químicas de la Hb libre.....	22
Encapsulación de hemoglobina.....	26
<b>Vehículos de administración farmacológica por vía parenteral .....</b>	<b>30</b>
<b>Resumen gráfico.....</b>	<b>31</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>32</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>39</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>40</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos y materiales para el aislamiento y purificación de Hb.....	18
Tabla 2 Métodos y materiales para el ensamblaje de transportadores: Modificaciones químicas de Hb libre.....	23
Tabla 3. Métodos y materiales para el ensamblaje de transportadores: Encapsulación de hemoglobina.....	27
Tabla 4. Vehículos para administración de fármacos parenterales.....	30

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Resumen gráfico sobre el proceso de elaboración de HBOCs para su aplicación clínica veterinaria..... 31

## INTRODUCCIÓN

Las transfusiones sanguíneas buscan compensar la pérdida de sangre y restaurar el volumen sanguíneo normal del organismo, evitando así la aparición de isquemia, necrosis o shocks hipovolémicos (Kisielewicz & Self, 2014). Esta práctica es especialmente valiosa en situaciones de emergencia, como hemorragias activas, diferentes tipos de anemia, enfermedad renal, neoplasias, y otras condiciones médicas críticas (Le Gal et al., 2020).

En el ámbito de la medicina veterinaria, es fundamental considerar los potenciales donadores y los diferentes tipos sanguíneos propios de cada especie. Estos tipos sanguíneos pueden presentar variaciones significativas en su composición y características moleculares entre especies e individuos (Blais et al., 2007; Lanevski & Wardrop, 2001). Estas variaciones incluyen diferencias en las proteínas de superficie de los glóbulos rojos, que son responsables de la tipificación sanguínea en humanos y animales (Jamieson et al., 2022). Es necesario realizar un tamizaje preliminar antes de llevar a cabo las transfusiones para asegurarse de la compatibilidad entre el donador y el receptor. La incompatibilidad sanguínea puede desencadenar una reacción adversa del sistema inmunitario del receptor contra proteínas de superficie que no correspondan a las propias y las ataca, lo que puede resultar en reacciones graves e incluso potencialmente mortales (Zaremba et al., 2019). Algunas especies, como los felinos, pueden desarrollar naturalmente anticuerpos incluso sin una exposición previa (Pennisi et al., 2015), mientras que en otras especies, como los caninos y los equinos, se requiere una exposición previa al antígeno para desarrollar los anticuerpos correspondientes (Kuo & McMichael, 2020).

Además del complejo proceso de selección de donadores, la obtención de sangre para transfusiones implica procesos complejos y elevados costos. Aunque las transfusiones son necesarias, no siempre están disponibles o son accesibles para un uso rutinario (Beeston et al., 2020). Las transfusiones sanguíneas tienen el potencial riesgo de estar asociadas con la transmisión

cruzada de enfermedades, sepsis, toxicidad, hemólisis, y reacciones inmunológicas severas, lo cual representa un riesgo adicional para los pacientes en estado crítico (Holowaychuk et al., 2014; Kuo & McMichael, 2020; Miglio et al., 2016).

Como se mencionó, las transfusiones sanguíneas son una práctica de gran importancia clínica. Sin embargo, su acceso rutinario puede ser complicado y no están exentas de riesgos. Por tanto, la búsqueda de alternativas seguras y eficaces se ha vuelto crucial para mejorar la atención médica veterinaria. Estas alternativas incluyen productos como la albúmina sérica, productos sanguíneos liofilizados, factores de crecimiento hematopoyético, y fármacos protrombóticos, que ayudan a regular y estabilizar el sistema circulatorio (Moore et al., 2009; Weiskopf et al., 2017). Actualmente se han desarrollado biomateriales sintéticos como transportadores de oxígeno a base de perfluorocarbono y transportadores de oxígeno a base de hemoglobina (Charbe et al., 2022). Si bien estas alternativas han sido ampliamente exploradas en medicina humana, su aplicación en medicina veterinaria se encuentran en una escala más limitada (Beeston et al., 2020; Scharman et al., 2017).

### *Transportadores de oxígeno a base de hemoglobina*

Los transportadores de oxígeno a base de hemoglobina (HBOCs) son biopartículas diseñadas para aprovechar las propiedades únicas de la hemoglobina (Hb) y asegurar la entrega eficiente de oxígeno a los tejidos, previniendo así la hipoxia causada por la falta de irrigación sanguínea (Charbe et al., 2022). Estos transportadores se componen de moléculas de Hb que han sido modificadas y/o encapsuladas para mejorar su estabilidad y función (Jia et al., 2016).

Una de las principales ventajas de los HBOCs es su compatibilidad universal. Al no presentar proteínas de superficie, se evitan las reacciones cruzadas que pueden ocurrir con las transfusiones convencionales, haciéndolos una opción ideal para pacientes que necesitan

transfusiones de manera repetitiva o aquellos animales con un amplio espectro de grupos sanguíneos (Alayash, 2014; Sen Gupta, 2019).

Otra característica destacada es su capacidad para reducir el riesgo de infecciones transmitidas por la sangre. Los HBOCs pasan por un riguroso proceso de purificación que elimina la presencia de patógenos bacterianos, virales o parasitarios, lo que resulta en un riesgo considerablemente menor de infecciones asociadas a su aplicación (Sun & Palmer, 2008). Estos transportadores tienen una vida útil prolongada y pueden ser almacenados por períodos más largos en comparación con la sangre completa, lo que los hace especialmente útiles en situaciones de emergencia o en entornos con recursos limitados (Sen Gupta, 2019).

Los HBOCs han evolucionado a lo largo de los años, y como resultado, se han desarrollado diversas técnicas y materiales para su elaboración. Varios estudios de investigación han propuesto una clasificación de estos transportadores basada en su estructura y composición. De acuerdo con investigaciones como la de (Jia et al., 2016) y otros investigadores como (Charbe et al., 2022), los HBOCs se pueden clasificar en dos grandes categorías principales: acelulares (libres) y celulares (encapsulados).

En la categoría de HBOCs acelulares, se usan modificaciones químicas de la Hb para estabilizar al transportador y permitir su circulación en el torrente sanguíneo. Estas modificaciones buscan mantener la forma tetramérica de la Hb, similar a la que se encuentra en los eritrocitos, o adoptar una forma polimérica para incrementar la retención intravascular (Alayash, 2014). Estos HBOCs son libres de estroma, es decir, están libres de las proteínas y enzimas asociadas a la estructura y función de la membrana eritrocitaria. En su formulación, se busca usar la forma más pura de Hb, la cual puede combinarse con diferentes moléculas como polímeros estabilizadores o enzimas como superóxido dismutasas o catalasas, permitiendo que los HBOCs viajen libremente en sangre para alcanzar los tejidos deseados (Jia et al., 2016). Algunos ejemplos de productos basados en modificaciones químicas incluyen HemAssist, Hemopure, Hemospan, entre otros (Chen

et al., 2023). Sin embargo, debido a su bajo peso molecular, estos transportadores son inestables y se asocian a problemas como extravasación e hipertensión debido a la liberación de óxido nítrico (Cabralés et al., 2009).

En la categoría de HBOCs celulares, se encapsula la Hb de tal forma que se asemeje a los eritrocitos de mamíferos. Estos transportadores encapsulados presentan una mayor estabilidad y evitan el contacto directo entre la Hb y la sangre, lo que reduce los efectos adversos. Las propiedades de estos HBOCs en términos de liberación de oxígeno, capacidad para alcanzar áreas de difícil acceso y tiempo de vida útil, dependen del tipo de encapsulación utilizado siendo los principales lípidos y polímeros (Charbe et al., 2022). La encapsulación con lípidos, como fosfolípidos, ha sido usada en ciertos HBOCs debido a ciertas ventajas específicas como mejorar la estabilidad de la Hb, la amplia capacidad de carga de Hb, la estabilidad coloidal, y la facilidad en su preparación. Sin embargo, la formación de metahemoglobina y peroxidación durante la reperfusión de un proceso isquémico son factores que pueden afectar negativamente la función, viabilidad y eficacia de estos transportadores (Taihang Li et al., 2011).

Por otro lado, la encapsulación con polímeros ha demostrado ser una alternativa prometedora y ha superado algunas limitaciones presentadas por la anteriores generaciones de HBOCs. Esta técnica ofrece una serie de ventajas significativas, como su fácil accesibilidad, bajo costo, amplia variedad de opciones de polímeros disponibles y alta biocompatibilidad entre materiales usados (Jia et al., 2016). Los transportadores encapsulados con polímeros pueden obtenerse mediante distintas técnicas, cada una de ellas con sus propias ventajas. Algunos ejemplos, que se tratarán más adelante, incluyen la técnica de capa-por-capas, que permite un control preciso del recubrimiento de la cápsula; el autoensamblaje, que facilita la formación de estructuras estables; las técnicas de doble emulsión y difusión del solvente, que permiten la formación de microesferas

poliméricas; la impresión de partículas de hidrogel, que ofrece una plantilla adaptable para el encapsulamiento, entre varias técnicas (Chen et al., 2023; Jia et al., 2012).

Finalmente, los transportadores de oxígeno a base de hemoglobina se presentan como una alternativa prometedora a las transfusiones sanguíneas convencionales, superando las limitaciones y riesgos asociados con ellas. La implementación de estos transportadores ofrece soluciones innovadoras que podrían mejorar la disponibilidad de tratamientos seguros y accesibles para pacientes veterinarios (Alayash, 2014). El objetivo principal de la presente revisión fue sistematizar la información sobre técnicas y materiales para desarrollar transportadores de oxígeno a base de hemoglobina en el ámbito de la medicina veterinaria. Para lograrlo, se plantearon objetivos secundarios que incluyeron recopilar información sobre las transfusiones sanguíneas, los transportadores de oxígeno, el aislamiento de la Hb, los procesos de ensamblaje de transportadores, y los sistemas de administración parenteral de biofármacos. También, analizar y clasificar la metodología y los resultados de los estudios recopilados en forma de tablas. Finalmente, desarrollar un resumen gráfico que representara de manera visual el proceso general de construcción de HBOCs.

## METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda exhaustiva de información sobre el estado de las transfusiones sanguíneas en medicina veterinaria y la importancia de buscar alternativas debido a sus limitaciones. Además, se recopiló información relevante sobre los HBOCs, abordando aspectos generales, usos, métodos, y materiales para su elaboración. Para ello, se utilizaron los motores de búsqueda: ScienceDirect, PubMed, Wiley Library, y Google Scholar.

La información recopilada se clasificó en cuatro tablas, correspondientes a cada etapa del desarrollo de los transportadores: aislamiento de Hb, ensamblaje de los transportadores (modificación química y encapsulación de la Hb) y selección de vehículos para la administración parenteral.

En las tablas 1, 2 y 3 se incluyeron estudios experimentales originales publicados en los últimos 20 años (2003-2023) que detallasen y explicaran claramente su metodología y resultados. La búsqueda se realizó en los motores mencionados anteriormente, usando las palabras clave: “*hemoglobin isolation, hemoglobin filtration, hemoglobin purification*” para la Tabla 1: Métodos y materiales para el aislamiento y purificación de Hb; “*hemoglobin polymerization, cross-linked hemoglobin, hemoglobin conjugation, extracellular hemoglobin*” para la Tabla 2: Métodos y materiales para el ensamblaje de transportadores: Modificaciones químicas de Hb libre; y “*microparticles, oxygen carriers, liposome hemoglobin, double emulsion, self-assemble, layer-by-layer method*” para la Tabla 3: Métodos y materiales para el ensamblaje de transportadores: Encapsulación de hemoglobina.

Por otro lado, los criterios de inclusión para la Tabla 4: Vehículos para administración de fármacos parenterales, fueron las revisiones bibliográficas en los últimos 20 años (2003-2023), debido a la limitada información de estudios experimentales. Para la búsqueda se usaron las palabras

clave “*parenteral products, implantable systems, sustained drug delivery, water for injection, crystalloids, colloids, y fluid therapy*”.

Además, se realizó un resumen gráfico en BioRender.com para visualizar el proceso general de construcción de los HBOCs. Por último, se discutió los resultados obtenidos.

## RESULTADOS

### *Aislamiento y purificación de Hb*

En la Tabla 1 se presentaron 19 estudios experimentales sobre diferentes métodos y materiales requeridos para aislar y purificar Hb a partir de lisados de eritrocitos. Las fuentes de estas células pueden ser animales o humanas, sin embargo, 16 de los 19 estudios (el 84%) corresponden a Hb bovina. La tabla clasificó la información en función de la técnica utilizada, las características generales de cada técnica, el tipo de Hb purificada, la eficacia del estudio acorde los resultados y conclusiones de los autores, la simplicidad de la técnica, y las particularidades destacadas en cada estudio.

**Tabla 1. Métodos y materiales para el aislamiento y purificación de Hb**

N	Técnica	Característica	Hb Purificada	Eficacia	Simplicidad	Particularidades	Referencia
1	Filtración de flujo tangencial	Se hacen varias filtraciones (3-4 etapas) del lisado de glóbulos rojos por columnas TFF de 50nm y 500kDa. Luego se concentra lo obtenido en filtros TFF de 50-100kDa. Elimina impurezas intra y extracelulares, patógenos y aísla la Hb	Bov/Hum/Av	+++	+++	No	(Elmer et al., 2011)
2	Filtración de flujo tangencial		Bov/Hum	+++	+++	No	(Palmer et al., 2009)
3	Filtración de flujo tangencial con diafiltración		Bov	+	+++	Paso extra de diafiltración de 10L para eliminar impurezas de muy bajo peso molecular. <b>No presenta beneficios</b>	(Elmer et al., 2009)
4	Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados + Filtración de flujo tangencial		Bov/Hum/Av	+++	++	Parte de un primer filtrado en TFF. Hb altamente purificada.	(Elmer et al., 2011)
5	Cromatografía de intercambio iónico en modo de flujo continuo con PEG	Se basa en la separación física de los componentes de una solución. Se coloca el concentrado de eritrocitos (fase móvil) en una columna de filtración que contiene resina (fase fija) cargada con diferentes iones de alta afinidad por la Hb. Se lava el exceso y se tiene un concentrado ultrapuro de Hb	Bov	++++	+	Resina comercial QMA Spherosil LS, Q Sepharose Big Beads y Mustang Q + PEG (mejoró pureza y recuperación)	(Lu et al., 2004)
6	Cromatografía de intercambio aniónico		Bov/ Hum	+++	++	Resina comercial AG MP-1 y Q-SFF	(Sun & Palmer, 2008)
7	Cromatografía de intercambio aniónico		Hum	+++	++	Resina comercial Q Sepharose XL	(Andrade et al., 2004)
8	Cromatografía líquida de rápida resolución		Bov	+++	++		(Dimino & Palmer, 2007)
9	Adsorción en fase sólida		Bov (Conjugado Alb-Hb)	++	++	Resina comercial Q Sepharose Fast Flow + conjugación de albumina-Hb con glutaraldehído	(Hu & Su, 2003)

Continuación Tabla 1.

N	Técnica	Característica	Hb Purificada	Eficacia	Simplicidad	Particularidades	Referencia
10	Nanopartículas magnéticas de impresión molecular (MMIP)		Bov	+++	+++	Se usó nanopartículas de silicato a base de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	(Su et al., 2018)
11	Polímeros con impresión molecular con sitios de biorreconocimiento para Hb bovina		Bov	+++	+++	Se usó nanopartículas de sílice	(Zhang & Li, 2018)
12	Microesferas magnéticas mesoporosas de silicato de tierras raras	Se generan nanopartículas de diferentes componentes que contengan sitios de biorreconocimiento para las moléculas de Hb y se puedan aislar de otros componentes contaminantes. La Hb se acumula en los alrededores de estas nanopartículas formando a su vez microcápsulas.	Bov	+++	+++	Se usó microesferas de silicato a base de tierras raras (Er, Tm, Yb)	(Wang, Tan, et al., 2019)
13	Microesferas magnéticas potenciadas por óxidos lantánidos		Bov	+++	+++	Se usó microesferas de silicato a base de óxidos lantánidos	(Wang et al., 2018)
14	Nanocompuestos magnéticos cubiertos de ácido fítico hidrófilo inmovilizados Yb <sup>3+</sup>		Bov	++	+++	Se usó microesferas de silicato a base de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> y se adiciona Yb <sup>3+</sup> como un quelante extra de Hb	(Wang, Guan, et al., 2019)
15	Aislamiento de Hb con líquido iónico 1-butil-3-trimetilsilimidazolio hexafluorofosfato (BtmsimPF <sub>6</sub> )	Se coloca la Hb en fase acuosa con el líquido iónico y se centrifuga. El BtmsimPF <sub>6</sub> aprovecha su afinidad covalente con el átomo ferroso del grupo hemo.	Bov	++	++	No	(Cheng et al., 2008)

Continuación: **Tabla 1**

N	Técnica	Característica	Hb Purificada	Eficacia	Simplicidad	Particularidades	Referencia
16	Precipitación de afinidad con micro-ligando sensible a estímulos basados en haptoglobina (Hp)	A partir del lisado de eritrocitos se precipita con sulfato de amonio en dos pasos. Primero se remueve proteínas de alto peso molecular. Segundo proteínas de peso molecular medio. Se recupera por centrifugación y se pasa por una columna de filtración en gel. Finalmente se agrega Hp como ligando de alta afinidad a la Hb	Hum	++	+	No	(Stocker-Majd et al., 2008)
17	Adsorción selectiva de Hb a través de hidrogel de fibroína de seda/gelatina	Se aprovecha la capacidad de los hidrogeles de separar moléculas acorde el tamaño molecular de la Hb.	Bov	++	+	No	(Fan et al., 2023)
18	Hemólisis controlada con filtración en biorreactor de membrana	Se realiza hemólisis gradual en medios hipotónicos y estas se filtran en las membranas del biorreactor. Variación del TFF	Bov	+++	++	No	(Stojanović et al., 2012)
19	Purificación de Hb recombinante en <i>E. coli</i>	A diferencia del resto. La Hb se obtiene de una fuente de bacterias <i>E. coli</i> transgénicas. Este sistema integra plásmidos que codifican al gen de Hb para ser expresados en la bacteria. El aislamiento usó cromatografía de intercambio aniónico	Mur	++	+	Varias limitaciones respecto a la estructura de la Hb.	(Natarajan et al., 2011)

Hum: Humana. Bov: Bovina. Av: Aviar. Mur: Murina. TFF: Tangential flow filtration. Hb: Hemoglobina. kDa: Kilo dáltones. nm: nanómetros. PEG: polietilenglicol  
 Eficacia: + : Baja / ++: Media / +++: Media alta / ++++: Alta. Simplicidad: +: poco simple/ ++: simplicidad media/ +++: muy simple

La purificación y aislamiento de Hb de otros componentes celulares es un proceso necesario para su posterior aplicación como transportador de oxígeno. La obtención de Hb se logra a partir de una lisis previa de los eritrocitos con soluciones hipotónicas (Buehler & Alayash, 2008). El objetivo es retirar todo el material extracelular e intracelular que no sea de interés y sea un potencial contaminante, esto incluye: proteínas, membranas, otro tipo de células, restos celulares y patógenos bacterianos, parasitarios o virales (Palmer et al., 2009). En la Tabla 1 se detallan seis técnicas significativas para lograr esta purificación.

En primer lugar, se encuentra la filtración de flujo tangencial (TFF) o filtración de flujo cruzado (CFF). Como describen (Elmer et al., 2009, 2011; Palmer et al., 2009) en los tres primeros estudios, esta técnica consiste en la separación física de los componentes de la solución por medio de filtros. En ella la solución se inserta a presión en columnas con filtros de diferentes diámetros. En el caso de la Hb se hacen las filtraciones en 3 a 4 etapas por medio de filtros de 50nm y 500kDa que eliminan los virus y restos celulares. Posteriormente se reúne lo obtenido en una columna de concentración con filtros de 50 a 100kDa que eliminan rezagos de impurezas mucho más pequeñas. Excepto por el segundo experimento de Palmer et al., (2009), esta técnica es altamente eficaz y muy simple de realizar.

A continuación, se tiene la cromatografía de intercambio iónico. Los estudios N4 al N9 correspondientes a (Andrade et al., 2004; Dimino & Palmer, 2007; Elmer et al., 2011; Hu & Su, 2003; Lu et al., 2004; Sun & Palmer, 2008) detallan que esta técnica se compone de una fase móvil (la solución), y una fase fija (resina). Esta resina se encuentra en una columna de filtración y está cargada con iones de alta afinidad. La solución de eritrocitos pasa por la columna y estos iones altamente afines a la Hb, la atraen hacia la fase fija mientras se lava los excedentes e impurezas. De forma general, esta técnica presenta una elevada eficacia pero una simplicidad media.

Los estudios N10 al N14 correspondientes a (Su et al., 2018; Wang et al., 2018; Wang, Guan, et al., 2019; Wang, Tan, et al., 2019; Z. Zhang & Li, 2018) basan sus investigaciones en el

aislamiento de Hb por medio de magnetismo con el uso de partículas afines. Estas moléculas atraen la Hb hacia sí mismas por magnetismo y acumulan Hb en los alrededores de las nanopartículas. Cabe destacar que estos estudios presentaron una eficacia media y alta y una técnica muy simple de realizar.

Por otro lado, los estudios N15 al N18 correspondientes a presentan diferentes variaciones de las técnicas de TFF y cromatografía de afinidad (Cheng et al., 2008; Fan et al., 2023; Stocker-Majd et al., 2008; Stojanović et al., 2012). Así mismo, el estudio N19 detalla la producción y purificación de Hb recombinante por medio de vectores plasmídicos colocados en bacterias de *E. coli* que producen Hb de forma in vitro (Natarajan et al., 2011). Sin embargo, la eficacia de estos experimentos fue baja, y las técnicas poco simples para su replicación.

### *Ensamblaje de los transportadores*

Los HBOCs pueden usar la Hb libre en suspensiones sin células pero con modificaciones químicas que potencien su función y estabilicen su estructura, o pueden usar la Hb de forma encapsulada dentro de micro o nanopartículas (Chang, 2006). A continuación, las Tablas 2 y 3 corresponden a 35 estudios experimentales sobre diferentes métodos y materiales requeridos para el ensamblaje de los transportadores. Esta información fue clasificada en dos tablas de acuerdo con el tipo de transportador: Hb libre o Hb encapsulada.

### *Modificaciones químicas de la Hb libre.*

Se encontraron 15 estudios que describen la técnica usada por cada uno, las características generales de cada técnica, la generación de HBOCs a la que pertenecen, la simplicidad de la técnica y la disponibilidad de un producto comercial basado en esa técnica (Tabla 2). Se clasifica todas las modificaciones químicas que se pueden realizar a la Hb para que pueda funcionar como un transportador libre en el torrente sanguíneo.

**Tabla 2 Métodos y materiales para el ensamblaje de transportadores: Modificaciones químicas de Hb libre.**

N	Estudio	Técnica	Característica	Generación	Simplicidad	Producto comercial	Referencia
1	Hb humana polimerizada	Polimerización	Formación polímeros a partir de Hb con el objetivo de aumentar su tamaño por separado. La unión se da principalmente con glutaraldehído	Primera	++++	Polyheme	(Jonathon S Jahr & Varma, 2004)
2	Polimerización de Hb con Glutaraldehído.	Polimerización		Primera	++++	HemAssist	(Chen et al., 2023)
3	Hb bovina reticulada y polimerizada con glutaraldehído	Polimerización + reticulación		Primera	+++	Oxyvita, Hemopure Oxyglobin	(Harrington & Wollocko, 2010)
4	Hb reticulada YQ23	Reticulación	Reticulación, entrecruzamiento o <i>cross-linking</i> . Busca fortalecer los enlaces inter y/o intramoleculares de la Hb, entre sus propias subunidades o con otras moléculas respectivamente. Estabiliza a la Hb como transportador. Generalmente se mezcla con otras modificaciones químicas	Primera	++++	YQ23	(Tao Li et al., 2017)
5	Hb reticulada intramolecularmente con DSS	Reticulación		Primera	++++	N/I	(Lu et al., 2005)
6	Polimerización de DCLHb con 1,6-hexano-bismaleimico	Reticulación + Polimerización		Primera	+++	DCLHB (estudios preclínicos)	(Qi et al., 2016)
7	Polimerización de DCLHb con PEG	Reticulación + Polimerización		Primera	+++	DCLHB (estudios preclínicos)	(Buehler et al., 2006)
8	Hb bovina reticulada con ATP-adenosina-glutatió (GSH)	Reticulación + Conjugación		Segunda	+++	HemoTech	(Simoni et al., 2012)
9	Hb conjugada con dextrano 20kDa	Conjugación		Segunda	+++	N/I	(J. Zhang et al., 2018)
10	Hb conjugada con microesferas de gelatina	Conjugación		Segunda	++	G-HbOD (ensayos)	(Paciello et al., 2016)
11	Hb bovina conjugada a albumina sérica humana con PEG	Conjugación		Segunda	+++	HB-HSA (ensayos)	(Zheng et al., 2007)
12	Conjugación de <b>Mal-PEG</b> con Hb bovina Beta reticulada	Conjugación + reticulación	Segunda	++	N/I	(Webster et al., 2017)	
13	Poli-Hb-superóxido dismutasa-catalasa-anhidrasa carbónica	Conjugación + reticulación	Segunda	++	PolyHb-SOD-CAT-CA (ensayos)	(Bian & Chang, 2015)	

Continuación: **Tabla 2.**

N	Estudio	Técnica	Característica	Generación	Simplicidad	Producto comercial	Referencia
14	Hb acelular natural de <i>Arenicola marina</i>	Sin modificaciones	Hb de organismos que naturalmente circula sin eritrocitos y es de difícil degradación. No necesita modificaciones para trabajar como transportador.	N/I	++++	HemO2Life	(Zal et al., 2022)
15	MegaHb acelular natural de <i>Lumbricus terrestris</i>	Sin modificaciones	Hb de organismos que naturalmente circula sin eritrocitos y es de difícil degradación. No necesita modificaciones para trabajar como transportador.	N/I	++++	N/I	(Savla et al., 2020)

N/I: No información. DSS: disuccinimidil-suberato. DCLHb: Hb reticulada con di-aspirina. PEG: polietilenglicol. SOD: superóxido dismutasa. CAT: catalasa. CA: anhidrasa carbónica. Simplicidad: +: poco simple/ ++: simplicidad media/ +++: simple/ ++++ muy simple

La primera modificación presentada es la polimerización, los estudios N1 al N3 detallan esta técnica (Chen et al., 2023; Harrington & Wollocko, 2010; Jonathon S Jahr & Varma, 2004). La técnica se basa en la formación de polímeros de Hb a partir de moléculas individuales agregadas glutaraldehído como conector. Esto con la intención de aumentar el tamaño molecular del transportador. La polimerización presenta una simplicidad muy alta y tiene disponibilidad de productos comerciales basados en esta.

A continuación, los estudios N4 al N8 se basan en el proceso de reticulación (Buehler et al., 2006; Tao Li et al., 2017; Lu et al., 2005; Qi et al., 2016; Simoni et al., 2012). Esta técnica implica el reforzamiento de los enlaces intra y/o intermoleculares de la Hb, entre sus mismas subunidades o con otras moléculas conjugadas. Los resultados de estos experimentos reflejaron una simplicidad alta y muy alta; sin embargo, no todos los experimentos contaban con un producto comercial disponible.

La siguiente técnica es la conjugación, representada por los estudios N9 al N13. Esta técnica busca unir a la Hb con diferentes moléculas para añadir propiedades protectoras o estabilizadoras. Si bien algunos estudios, como el número 9 y 11, presentan una simplicidad alta, el resto presentan una simplicidad media. Esto se relaciona al tipo de molécula que se conjugue a la Hb. Ninguno de los ensayos presentó un producto comercial disponible.

Finalmente, los estudios N14 y N15 se basan en el uso de Hb natural sin modificaciones. Esta Hb tiene un peso molecular mucho mayor al convencional y se encuentra de forma libre en el torrente sanguíneo de *Arenicola marina* o *Lumbricus terrestris* (Savla et al., 2020). Cabe destacar que el uso de esta Hb es muy simple, y la Hb de *A. marina* si cuenta con un producto comercial disponible para la conservación de órganos.

### ***Encapsulación de hemoglobina***

La tabla 3 indica las técnicas para encapsular a la Hb dentro de diferentes materiales. En esta se enlistan 10 estudios, la técnica usada en cada uno, las características principales de cada técnica, los principales materiales usados, la generación de HBOCs a la que pertenecen, y la simplicidad de la técnica.

**Tabla 3. Métodos y materiales para el ensamblaje de transportadores: Encapsulación de hemoglobina.**

N	Estudio	Técnica	Característica	Materiales	Generación	Simplicidad	Referencia	
1	Nanopartícula de Hb/sílice encapsulada en liposomas	Evaporación de disolvente de doble emulsión	Emulsión: sistema de dos fases líquidas inmiscibles. La Hb es encapsulada en dos fases: agua en aceite en agua. En la primera reacción, se hace una emulsión en fase acuosa con el producto de interés (Hb), el polímero (ej PLGA), y alguna molécula de interés (como TRE que estabiliza proteínas) en un solvente orgánico. En la segunda reacción se añade otro polímero emulsionante (PVA). Finalmente se evapora el disolvente orgánico y se tienen las nanopartículas.	Lípidos: Lecitina y CTAB. Cloroformo solvente orgánico. Núcleo rígido: sílice	Tercera	+++	(Liu et al., 2012)	
2	Encapsulación de Hb dentro de un núcleo de PLGA	Evaporación de disolvente de doble emulsión	Emulsión: sistema de dos fases líquidas inmiscibles. La Hb es encapsulada en dos fases: agua en aceite en agua. En la primera reacción, se hace una emulsión en fase acuosa con el producto de interés (Hb), el polímero (ej PLGA), y alguna molécula de interés (como TRE que estabiliza proteínas) en un solvente orgánico. En la segunda reacción se añade otro polímero emulsionante (PVA). Finalmente se evapora el disolvente orgánico y se tienen las nanopartículas.	Polímero: PLGA	Tercera	+++	(Sheng et al., 2008)	
3	Encapsulación de Hb dentro de un núcleo de PEG	Evaporación de disolvente de doble emulsión		Polímero: PEG	Tercera	+++		
4	Nanopartículas de estructura porosa cargadas de Hb portadoras de oxígeno	Evaporación de disolvente de doble emulsión		Polímero: PCL y PCL-PEG. Solvente: DCM)/acetato de etilo (EA)	Tercera	+++		(Zhao et al., 2007)
5	Nanopartículas a base de Hb	Evaporación de disolvente de doble emulsión		Polímero: PELA. Solvente: Acetato de etilo	Tercera	+++		(Qiu et al., 2003)
6	Hb encapsulada en polimerosomas reticulados con deformabilidad reversible	Autoensamblaje		Los cápsulas de polímeros o polimerosomas se ensamblan por su cuenta formando una cápsula alrededor de la Hb. El autoensamblado de bloques de copolímeros aprovechan las interacción hidrofóbicas e hidrofílicas de las soluciones.	Polímero: PEG--b-poli(dimetil-r-metilvinil)silano y PDMS	Tercera		++
7	Hb encapsulada en polimerosomas biodegradables y biocompatibles	Autoensamblaje		Polímeros: PEO, PCL, PLA	Tercera	++	(Rameez et al., 2008)	

Continuación: **Tabla 3.**

N	Estudio	Técnica	Característica	Materiales	Generación	Simplicidad	Referencia
8	Cápsulas a base de Hb bovina con ensamblaje de capa por capa y reticulado con DHP	Ensamblado de capa por capa	Las cápsulas se polimerizan de forma hueca. La Hb se polimeriza sobre un molde (disoluble) y se reticulan sus enlaces, también se añaden moléculas estabilizadoras y encapsuladoras para cada capa	Molde: Partículas esféricas de MnCO <sub>3</sub> . Polímero: DHP	Tercera	+++	(Jia et al., 2012)
9	Cápsulas huecas a base Hb reticulada con GA (glutaraldehído)	Ensamblado de capa por capa + reticulación	(ej DHP). Finalmente se disuelve el molde.	Polímero: GA	Tercera	+++	(Duan et al., 2007)
10	Partículas de fibroína de seda como HBOC	Encapsulación en método todo acuoso.	En primer lugar se debe aislar las partículas de seda de su fuente natural. Luego se forman esferas a base de seda por continuas precipitaciones con Hb+PVA	Material: Fibroína de Seda. PVA	N/I	+	(Pacheco et al., 2023)

PLGA: poli-lactida-co-glicolida. TRE: trehalosa. PVA: poli(alcohol vinílico). PEG: polietilenglicol. PCL: poli(épsilon-caprolactona). PCL-PEG: poli(épsilon-caprolactona-etilenglicol). PELA: metoxipoli (etilenglicol)-poli-DL-lactida. PDMS: polidimetilsiloxona. PEO: poli(óxido de etileno). PCL: poli(caprolactama) (PCL). PLA: poli(lactida). DHP: heparina dialdehido. GA: glutaraldehído. Simplicidad: +: poco simple/ ++: simplicidad media/ +++: muy simple

La tabla 3 agrupa las formas de encapsular la Hb. La primera técnica presentada es la evaporación de disolvente de doble emulsión, en la que se basan los estudios N1 al N5 correspondientes a (Coll-Satue et al., 2021; Liu et al., 2012; Qiu et al., 2003; Sheng et al., 2008; Zhao et al., 2007). Estos autores describen que a técnica consiste en la generación de emulsiones. En la primera emulsión se coloca la Hb que está inmersa en solución líquida, luego se añade otra solución con un determinado polímero como polietilenglicol (PEG) en un solvente orgánico, en este paso también se pueden añadir moléculas de interés que potencien la función de los transportadores. Posteriormente se hace una segunda emulsión añadiendo otro polímero de interés, y finalmente se evapora el disolvente orgánico para obtener las nanopartículas. Esta técnica pertenece a la tercera generación de transportadores y es simple de realizar. Adicionalmente, el estudio N10 (Pacheco et al., 2023) se basa en una modificación de esta técnica usando fibroína de seda y PVA, sin embargo, este experimento no es simple de replicar.

Luego se menciona la técnica de autoensamblaje, usada en los estudios N6 y N7 (Kim et al., 2019; Rameez et al., 2008). Los autores describen que esta técnica aprovecha las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de la Hb con determinados polímeros para que de manera autónoma se generen las cápsulas. La simplicidad de esta técnica es media ya que no existe un detalle minucioso de la metodología.

Finalmente los estudios N8 y N9 (Duan et al., 2007; Jia et al., 2012) detallan la técnica de ensamblado de capa por capa. En esta metodología se tiene previamente una plantilla esférica de diferentes materiales (como  $MnCO_3$ ) y que sea soluble en solventes orgánicos. A esta se le añade la Hb y por afinidad de cargas entre las moléculas se comienzan a polimerizar alrededor de la esfera, adicionalmente se añaden polímeros para estabilizar y fortalecer los enlaces de la Hb, una vez que se obtienen el número deseado de capas (Hb + polímeros), se disuelve el molde y se obtienen las cápsulas huecas. Esta técnica presenta una simplicidad alta.

### *Vehículos de administración farmacológica por vía parenteral*

La tabla 4 expone los principales vehículos usados para la administración de fármacos por vía parenteral intravenosa. En esta se incluyeron 4 revisiones relacionadas con los diferentes materiales disponibles en el mercado para ser usados como vehículos. La información se clasificó en el material per se, la categoría correspondiente al fluido, las características, y la compatibilidad del material con el torrente sanguíneo.

**Tabla 4. Vehículos para administración de fármacos parenterales**

<b>Material</b>	<b>Categoría</b>	<b>Característica</b>	<b>Compatibilidad sanguínea</b>	<b>Referencia</b>
<b>Lactato de Ringer</b>	Cristaloide isotónico		+++	(Jonathan S Jahr et al., 2008; Manchanda et al., 2020)
<b>Plasmalyte</b>	Cristaloide isotónico	Vehículos acuosos	+++	(Manchanda et al., 2020)
<b>Solución salina</b>	Cristaloide hipertónico		+++	(MacDonald & Pearse, 2017; Manchanda et al., 2020)
<b>Almidón hidroxietil</b>	Coloide	Vehículos no acuosos	+++	(MacDonald & Pearse, 2017; Manchanda et al., 2020)
<b>Gelatina</b>	Coloide		++	(MacDonald & Pearse, 2017)
<b>Suero fetal bovino</b>	Coloide	Derivado sanguíneo. Contiene factores de crecimiento, nutrientes. No se ha probado como vehículo	N/I	(van der Valk et al., 2018)

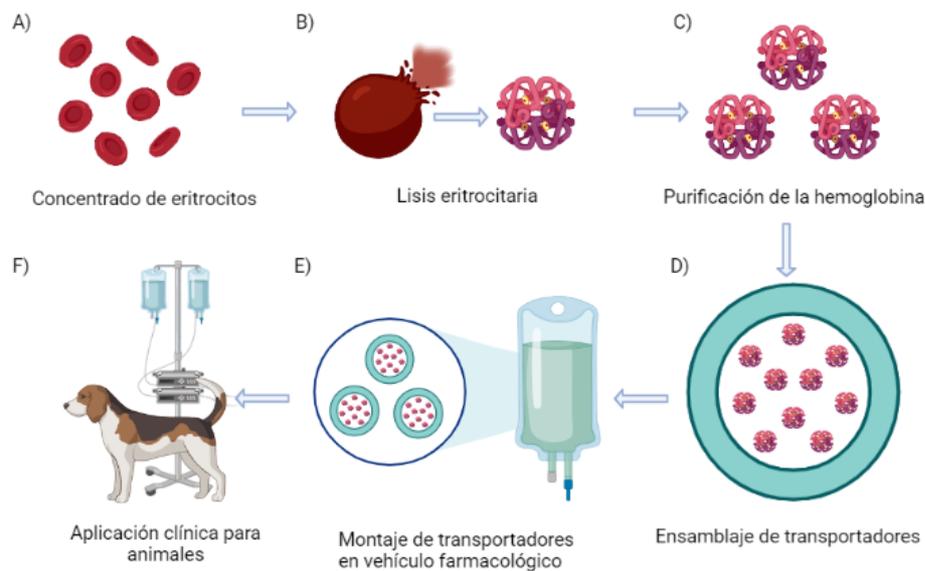
N/I : No hay información. . Compatibilidad: +++ alta, +++ media, ++baja.

El primer grupo de cristaloides incluyó al lactato de Ringer, el Plasmalyte y la solución salina, los cuales se clasifican como vehículos acuosos altamente compatibles con el torrente sanguíneo (Manchanda et al., 2020). Luego, se encuentran el almidón hidroxietil y la gelatina, coloides que funcionan como vehículos no acuosos y cuya compatibilidad con la sangre en el caso de la gelatina, es menor (MacDonald & Pearse, 2017; Manchanda et al., 2020). Finalmente, se

presentó al suero fetal bovino como un coloide derivado sanguíneo de los bovinos (van der Valk et al., 2018). Sin embargo, no existe información previa de este como un vehículo de administración o su compatibilidad con el torrente sanguíneo.

### Resumen gráfico

Finalmente, en la figura 1 se observa el proceso de elaboración de los HBOCs



Created in BioRender.com bio

**Figura 1. Resumen gráfico sobre el proceso de elaboración de HBOCs para su aplicación clínica veterinaria.** A) Se debe seleccionar la fuente de los eritrocitos y obtener una muestra de ellos. B) Las células eritrocitarias deben pasar por un proceso de hemólisis con soluciones hipotónicas. C) La Hb es extraída y purificada a partir de los eritrocitos lisados. D) Las moléculas de Hb son modificadas y/o encapsuladas para el ensamblaje de los transportadores. D) Se selecciona el vehículo de administración farmacológica parenteral más adecuado para montar los transportadores en este. E) Los HBOCs pueden ser aplicados a animales anémicos. Creado con **BioRender.com**

La figura 1 resume los pasos que involucran la elaboración de un transportador de oxígeno a base de Hb para aplicarlo en la clínica veterinaria. Estos pasos implican la obtención de sangre fresca, la lisis de los glóbulos rojos, la purificación de la Hb (con cualquiera de las técnicas descritas anteriormente en la Tabla 1), el ensamblaje de los transportadores (detallados en las Tablas 2 y 3), la selección y montaje de los transportadores del vehículo de administración parenteral más

adecuado (como los mostrados en la Tabla 4), y finalmente su aplicación clínica en animales que requieran de estos HBOCs.

## DISCUSIÓN

Los transportadores de oxígeno basados en hemoglobina (HBOCs) se consideran biofármacos y, como tal, deben pasar por diferentes etapas para su construcción. En general, estas etapas incluyen la obtención y purificación de la materia prima o principio bioactivo con el que se trabajará (Palmer et al., 2009). Una vez que los materiales están listos, se seleccionan las técnicas más apropiadas para su ensamblaje (Jia et al., 2016; Topuz & Uyar, 2022). Finalmente, se selecciona un vehículo farmacológico acorde a las propiedades físico-químicas del principio activo y a la vía de administración elegida para el biofármaco (Manchanda et al., 2020) Este proceso se encuentra representado en la Figura 1.

En la Tabla 1 se muestra la recopilación de información sobre las diferentes técnicas para aislar y purificar hemoglobina (Hb), además se expone las diversas fuentes de las que pueden provenir los eritrocitos, siendo la Hb bovina la más significativa (84% de los estudios utilizaban este tipo de Hb para sus experimentos). Esto se asocia con la gran accesibilidad y el bajo costo económico que implica la obtención de este tipo de sangre (Napolitano, 2009; Winslow, 2008).

Una de las técnicas más importantes para la purificación de proteínas y otras biomoléculas es la filtración de flujo tangencial (TFF) o filtración de flujo cruzado (CFF) (Elmer et al., 2011). Tres de los estudios mencionados en la Tabla 1 (N1 a N3) (Elmer et al., 2009, 2011; Palmer et al., 2009) se basaron en esta técnica. Como se mencionó antes, la TFF consiste en la separación física de los componentes de la solución por medio de filtros. Esta técnica presenta limitaciones como el bloqueo de los poros de las membranas por un exceso y acumulación de desechos celulares. Esta acumulación puede comprometer la integridad de las membranas; por otro lado, también se han

registrado presencia de trazas de impurezas de muy bajo peso molecular (como catalasas) en la concentración del producto final (Elmer et al., 2010). Sin embargo, los beneficios del TFF como la simpleza, adaptabilidad, rapidez y accesibilidad, la hacen una técnica bastante atractiva para implementar el aislamiento de Hb a gran escala (Elmer et al., 2011).

Otra técnica ampliamente utilizada para la separación de biomoléculas es la cromatografía de intercambio iónico. Seis de los estudios de la Tabla 1 (N4 a N9) se basan en esta técnica (Andrade et al., 2004; Dimino & Palmer, 2007; Elmer et al., 2011; Hu & Su, 2003; Lu et al., 2004; Sun & Palmer, 2008). En comparación con la TFF, esta técnica también hace una separación física de los componente de la solución hemolítica y puede usarse a gran escala. Sin embargo, esta es una técnica un poco más compleja, pero más eficaz ya que se obtiene un concentrado ultrapuro de Hb (Dimino & Palmer, 2007).

Por otro lado, en los últimos años se ha estado estudiando un tipo de técnica novedosa para el aislamiento de Hb basado en partículas magnéticas de impresión molecular. Cinco de los estudios de la Tabla 1 (N10 a N14) se basan en la generación de nanopartículas de diferentes materiales que contengan sitios de reconocimiento y/o afinidad por las moléculas de Hb (Su et al., 2018; Wang et al., 2018; Wang, Guan, et al., 2019; Wang, Tan, et al., 2019; Z. Zhang & Li, 2018) . Esta técnica presenta una ventaja importante sobre el resto, ya que al acumular varias moléculas de Hb alrededor de una partícula (como un molde), esta puede ir generando una cápsula más grande y saltarse directamente al ensamblaje de los transportadores sin necesidad de realizar más modificaciones (Wang, Guan, et al., 2019). No obstante, cabe recalcar que la purificación de Hb de estos estudios no estaba enfocada directamente con el desarrollo de HBOCs, sino a la purificación de Hb en otras aplicaciones.

A continuación, cuatro de los estudios la Tabla 1 (N15 a N18) presentan variaciones de las técnicas principales como TFF o cromatografía de afinidad (Cheng et al., 2008; Fan et al., 2023; Stocker-Majd et al., 2008; Stojanović et al., 2012). Sin embargo, estos resultaron en técnicas más

complejas y con resultados menos eficaces (Stocker-Majd et al., 2008). Finalmente, el estudio N19 detalla la producción y purificación de Hb recombinante, esta técnica se presentó como una propuesta interesante de alternativa al uso de sangre de origen animal y la producción continua de Hb. Sin embargo, dado que las células productoras son bacterias simples de *E. coli* dificulta alcanzar las estructuras terciarias y cuaternarias de la Hb (Buehler & Alayash, 2008; Natarajan et al., 2011).

Analizando la información obtenida en las Tablas 2 y 3, los autores buscan modificar o encapsular a las moléculas de Hb para que sean funcionales en el torrente sanguíneo. Este proceso de ensamblaje debe aumentar el tiempo de circulación de la Hb, mantener la estabilidad del tetramero de Hb, y reducir los efectos secundarios de estos transportadores (Sen Gupta, 2019).

La modificación más simple y sencilla es la polimerización, tres de los estudios de la tabla 2 (N1 a N3) se basan en esta (Chen et al., 2023; Harrington & Wollocko, 2010; Jonathon S Jahr & Varma, 2004). Los HBOCs basados en esta modificación pertenecen a la primera generación de transportadores. Actualmente, existen productos comerciales cuyo uso ha sido aprobados por la FDA, entre los principales se resalta a Polyheme, HemAssist, Oxyvita, Hemopure y Oxyglobin (Chen et al., 2023). No obstante, a diferencia de los transportadores de segunda o tercera generación, estos presentan mucha más probabilidad de extravasación y creación de inmunocomplejos (Cabral et al., 2009). Otros transportadores de primera generación incluyen la Hb reticulada o entrecruzada (*cross-linking*). Cinco de los estudios la Tabla 2 (N4 a N8) se basan en esta (Buehler et al., 2006; Tao Li et al., 2017; Lu et al., 2005; Qi et al., 2016; Simoni et al., 2012). El objetivo de esta técnica es dar estabilidad al transportador y mantener su estructura cuaternaria, generalmente se usa complementaria a otra modificación química (Tao Li et al., 2017). Es una técnica simple que también cuenta con productos como HemoTech (Simoni et al., 2012), sin embargo, la mayoría de transportadores en esta categoría como YQ23 o DCLHB se encuentran aún en estudios preclínicos (Buehler et al., 2006; Tao Li et al., 2017; Lu et al., 2005). Los transportadores de primera generación

han estado asociados con varios efectos adversos como extravasación de las moléculas, vasoconstricción, formación de inmunocomplejos, desintegración de la Hb en dímeros o monómeros, entre otros (Charbe et al., 2022). Es por esto que si bien son técnicas sencillas, se debe encontrar maneras de reducir estas complicaciones.

Por otro lado, los HBOCs de segunda generación engloban a aquellos transportadores donde la Hb está asociada o conjugada con diferentes moléculas (Jia et al., 2016). Cinco de los estudios de la Tabla 2 (N9 a N13) se basan en esta técnica (Bian & Chang, 2015; Paciello et al., 2016; Webster et al., 2017; J. Zhang et al., 2018; Zheng et al., 2007). Las moléculas que pueden unirse a la Hb pueden ser polímeros como dextrano (J. Zhang et al., 2018), proteínas como albúmina (Zheng et al., 2007) o enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT), y/o anhidrasa carbónica (CA) (Bian & Chang, 2015). Estas últimas son especialmente significativas ya que buscan replicar dos funciones importantes que realizan los eritrocitos de forma fisiológica: la eliminación de radicales libres y el transporte de CO<sub>2</sub> (Bian & Chang, 2015). En el estudio N13 de la Tabla 2 indican que la SOD y CAT pueden presentar ventajas sobre los otros transportadores ya que se encargan de eliminar radicales libres de oxígeno incrementados durante los episodios de isquemia (Bian & Chang, 2015). La SOD también disminuye el superóxido que forma peroxinitrato a partir de óxido nítrico (NO), esto disminuye la vasoconstricción generada por el óxido de nitrato. De igual manera, se ha evidenciado que existe un incremento intracelular de pCO<sub>2</sub> durante episodios de shock hipovolémicos y este tiene una relación directa con el incremento de la mortalidad en estos pacientes (Sims et al., 2001), de esta forma, la CA ayuda con la movilización de CO<sub>2</sub> fuera de los tejidos y con la regulación del estado ácido-base de la sangre (Bian et al., 2011). El complejo PolyHb-SOD-CAT-CA es un tipo de HBOCs que está siendo ampliamente estudiado debido a sus beneficios, sin embargo, a diferencia de los primeros estudios, aún no cuenta con la aprobación de la FDA para su aplicación clínica o comercialización (Bian & Chang, 2015).

Los últimos dos estudios de la Tabla 2 (N14 y N15) muestran un nuevo tipo de Hb libre que tiene potencial como transportador de oxígeno. Estas son hemoglobinas acelulares que se encuentran de forma natural en organismos como *Arenicola marina* (Zal et al., 2022) o *Lumbricus terrestris* (Savla et al., 2020). En estas especies la Hb tiene un mayor peso molecular y pueden circular libremente en su torrente, entregando oxígeno en los diferentes tejidos sin extravasarse (Zal et al., 2022). A diferencia del resto de trabajos presentados en la Tabla 2, estos transportadores presentan la ventaja de ser poco inmunogénicos y no necesitan modificaciones químicas adicionales para que sean funcionales (Savla et al., 2020; Zal et al., 2022). A diferencia de los estudios en *Lumbricus terrestris*, la Hb aislada de *Arenicola marina* tiene una forma comercial aprobada por la FDA enfocada para la conservación de órganos destinados al trasplante (Zal et al., 2022). Si bien son moléculas prometedoras, simples y eficaces, es necesario tener una investigación más profunda sobre sus potenciales efectos adversos o sobre la forma de potenciarlos.

Los HBOCs encapsulados pertenecen a la tercera y última generación de transportadores descritos en la Tabla 3. Estos surgen como una solución a las limitaciones que presentaban los transportadores de primera y segunda generación de la Tabla 2 (Jia et al., 2016; Napolitano, 2009). Cinco de los estudios de la Tabla 3 (N1 a N5) se enfocan en la evaporación de disolvente por doble emulsión, esta es una de las principales técnicas para la formación de cápsulas (Coll-Satue et al., 2021; Liu et al., 2012; Qiu et al., 2003; Sheng et al., 2008; Zhao et al., 2007). Coll-Satue, et al., (2021)(Coll-Satue et al., 2021), indican que esta técnica se basa en la generación de emulsiones, es decir, la formación de un sistema de dos fases líquidas que no son miscibles la una con la otra. Comparado con las técnicas descritas en los ensayos N6 y N7 de la Tabla 3 (Kim et al., 2019; Rameez et al., 2008), esta es una técnica sencilla, ampliamente usada para la encapsulación de otras moléculas, y es muy adaptable en cuanto al uso de diferentes materiales para su elaboración de acuerdo con la necesidad del ensayo (Liu et al., 2012). Sin embargo por el momento ningún producto basado en esta técnica se encuentra en estudios clínicos.

Otra técnica de encapsulación es el autoensamblaje. Los estudios N6 (Kim et al., 2019) y N7 (Rameez et al., 2008) de la Tabla 3 se basan en esta metodología. Si bien existen algunos experimentos para encapsular fármacos que utilizan esta metodología, el mecanismo de formación no está completamente claro y no es una técnica sencilla de replicar (Rameez et al., 2008). Esto explica por qué aún no se ha propuesto su uso en ensayos clínicos.

De igual forma, otra técnica que ha sido más estudiada para la encapsulación de Hb es el ensamblado de capa por capa (*Layer-by-layer method*). Dos de los estudios de la tabla 3 (N8 y N9) representan esta técnica, donde se forman cápsula huecas en base a una plantilla (Duan et al., 2007; Jia et al., 2012). Al igual que la técnica de doble emulsión de los estudios 1 al 5, esta es una técnica simple y ampliamente adaptable a diferentes materiales y formas. Estas características la hacen bastante significativa para que los transportadores puedan alcanzar capilares especialmente pequeños, replicando la flexibilidad de los eritrocitos (Duan et al., 2007; Jia et al., 2012).

El estudio N10 de la Tabla 3 de (Pacheco et al., 2023) representa una técnica novedosa que busca disminuir al mínimo la respuesta inmune que algunos polímeros pueden generar; usando la fibroína de seda como un biopolímero con mayor citocompatibilidad. Este ensayo usa una modificación de la evaporación de solventes por doble emulsión y presenta resultados prometedores. Adicionalmente, este tipo de biopolímero ha sido usado exitosamente en la encapsulación de otras drogas de uso oncológico (H. Li et al., 2016). Si bien este tipo de cápsulas presentan una buena propuesta a futuro, es necesario realizar más investigaciones sobre los efectos secundarios de su uso ya que por el momento han sido probadas solo en modelos murinos.

A diferencia de las tablas anteriores, la Tabla 4 no se basa en estudios experimentales debido a la información limitada sobre los vehículos para administración parenteral de los fármacos. La revisión de Manchanda et al. (2020) citada en la Tabla 4 explica los diferentes medios y sistemas disponibles para la administración de fármacos por vía parenteral. Estos autores destacan que la mayoría de los fármacos líquidos disponibles en el mercado están compuestos por agua de inyección

ultrapura y excipientes acordes a las propiedades físico-químicas del fármaco y a la vía de administración: subcutánea, intramuscular o intravenosa. Por lo tanto, los productos en el mercado compuestos por agua ultrapura con electrolitos adicionales son comúnmente utilizados en fluidoterapia y se denominan vehículos acuosos (Jonathon S Jahr & Varma, 2004; Manchanda et al., 2020). El fármaco aprovecha las propiedades inocuas y la alta compatibilidad de estos materiales con el torrente sanguíneo para llegar a su sitio de acción (MacDonald & Pearse, 2017). De hecho, algunos transportadores como HemoPure, un HBOC aprobado por la FDA, utilizan lactato de Ringer como vehículo para la administración farmacológica del producto (Jonathan S Jahr et al., 2008);Jahr et al., 2008). Dado que la mayoría de los HBOC son hidrofílicos, se pueden utilizar diferentes cristaloides para entregar el transportador al torrente sanguíneo. Por otro lado, también están disponibles coloides, que son materiales más pesados y comúnmente utilizados para resucitación en casos de choque hipovolémico. Sin embargo, debido a su composición, podrían alterar la composición química de los transportadores a menos que estos utilicen cápsulas lipídicas en lugar de polímeros. No obstante, no se dispone de información detallada sobre estas interacciones. Otro producto ampliamente utilizado en el área experimental es el suero fetal bovino (SFB), un producto sanguíneo derivado de bovinos utilizado para enriquecer medios de crecimiento celular (van der Valk et al., 2018). Dada su alta inocuidad y sus orígenes, teóricamente debería ser compatible con el torrente sanguíneo y podría funcionar como vehículo. Sin embargo, esta función del SFB aún no ha sido probada en ningún fármaco o biofármaco.

Por otro lado, es importante recalcar que si bien existen técnicas más novedosas, el factor económico que implica el desarrollo de un fármaco complicado y poco eficaz, tiene efectos negativos en la implementación en el área de medicina veterinaria. Muchas veces este factor es el que vuelve inaccesibles las terapias en muchos lugares. Así mismo, la mayoría de los transportadores aprobados por la FDA son principalmente de primera generación, a pesar de que presentan varios efectos adversos. Como se mencionó, uno de los efectos secundarios de los

transportadores de Hb libre es la falla renal aguda y la acumulación de inmunocomplejos (Charbe et al., 2022; Chen et al., 2023). Dado que perros y gatos son especialmente sensibles a este tipo de patologías, es necesario buscar alternativas. Por lo tanto, es importante que se realice una investigación más profunda sobre los transportadores de segunda y tercera generación a nivel de ensayos preclínicos y clínicos para poder obtenerlos en el mercado para su aplicación en animales de compañía. Como se analizó anteriormente, no es un proceso extremadamente complicado y presentan menos efectos adversos que los transportadores de generaciones iniciales.

### *Conclusión*

En conclusión, los HBOCs son un biofármacos para los cuales existen diversas técnicas y materiales para lograr su construcción y ensamblaje. Existen técnicas mucho más simples y eficaces en comparación con otras, y así mismo, cada una presenta ventajas y limitaciones propias de cada una. Es importante conocer cada uno, para diseñar un prototipo de HBOC para aplicarlo exitosamente en medicina veterinaria como una alternativa a las transfusiones sanguíneas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alayash, A. I. (2014). Blood substitutes: why haven't we been more successful? *Trends in Biotechnology*, 32(4), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.02.006>
- Andrade, C. T., Barros, L. A. M., Lima, M. C. P., & Azero, E. G. (2004). Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions. *International journal of biological macromolecules*, 34(4), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.05.003>
- Beeston, D., Charnock, J., & Cook, S. (2020). Current fluid and blood product availability in veterinary setting: a survey of UK small animal practices. *The Journal of small animal practice*, 61(12), 738–743. <https://doi.org/10.1111/jsap.13242>
- Bian, Y., & Chang, T. M. S. (2015). A novel nanobiotherapeutic poly-[hemoglobin-superoxide dismutase-catalase-carbonic anhydrase] with no cardiac toxicity for the resuscitation of a rat model with 90 minutes of sustained severe hemorrhagic shock with loss of 2/3 blood volume. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 43(1), 1–9. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.964554>
- Bian, Y., Rong, Z., & Chang, T. M. S. (2011). Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase-carbonic anhydrase: a novel biotechnology-based blood substitute that transports both oxygen and carbon dioxide and also acts as an antioxidant. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, 39(3), 127–136. <https://doi.org/10.3109/10731199.2011.581052>
- Blais, M.-C., Berman, L., Oakley, D. A., & Giger, U. (2007). Canine Dal blood type: A red cell antigen lacking in some Dalmatians. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(2), 281–286. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb02961.x>

- Buehler, P. W., & Alayash, A. I. (2008). All hemoglobin-based oxygen carriers are not created equally. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1784*(10), 1378–1381.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.12.009>
- Buehler, P. W., Boykins, R. A., Norris, S., & Alayash, A. I. (2006). Chemical characterization of diaspirin cross-linked hemoglobin polymerized with poly(ethylene glycol). *Analytical Chemistry*, *78*(13), 4634–4641. <https://doi.org/10.1021/ac060188q>
- Cabrales, P., Sun, G., Zhou, Y., Harris, D. R., Tsai, A. G., Intaglietta, M., & Palmer, A. F. (2009). Effects of the molecular mass of tense-state polymerized bovine hemoglobin on blood pressure and vasoconstriction. *Journal of Applied Physiology*, *107*(5), 1548–1558.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00622.2009>
- Chang, T. M. S. (2006). Blood substitutes based on nanobiotechnology. *Trends in Biotechnology*, *24*(8), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.06.005>
- Charbe, N. B., Castillo, F., Tambuwala, M. M., Prasher, P., Chellappan, D. K., Carreño, A., Satija, S., Singh, S. K., Gulati, M., Dua, K., González-Aramundiz, J. V., & Zacconi, F. C. (2022). A new era in oxygen therapeutics? From perfluorocarbon systems to haemoglobin-based oxygen carriers. *Blood Reviews*, *54*, 100927. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2022.100927>
- Chen, L., Yang, Z., & Liu, H. (2023). Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Where Are We Now in 2023? *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *59*(2). <https://doi.org/10.3390/medicina59020396>
- Cheng, D.-H., Chen, X.-W., Shu, Y., & Wang, J.-H. (2008). Selective extraction/isolation of hemoglobin with ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate (BtmsimPF<sub>6</sub>). *Talanta*, *75*(5), 1270–1278. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.044>
- Coll-Satue, C., Jansman, M. M. T., Thulstrup, P. W., & Hosta-Rigau, L. (2021). Optimization of Hemoglobin Encapsulation within PLGA Nanoparticles and Their Investigation as Potential Oxygen Carriers. *Pharmaceutics*, *13*(11).  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111958>

- Dimino, M. L., & Palmer, A. F. (2007). Purification of bovine hemoglobin via fast performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 856(1-2), 353–357.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.040>
- Duan, L., He, Q., Yan, X., Cui, Y., Wang, K., & Li, J. (2007). Hemoglobin protein hollow shells fabricated through covalent layer-by-layer technique. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.223>
- Elmer, J., Buehler, P. W., Jia, Y., Wood, F., Harris, D. R., Alayash, A. I., & Palmer, A. F. (2010). Functional comparison of hemoglobin purified by different methods and their biophysical implications. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(1), 76–85.  
<https://doi.org/10.1002/bit.22659>
- Elmer, J., Harris, D., & Palmer, A. F. (2011). Purification of hemoglobin from red blood cells using tangential flow filtration and immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(2), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.021>
- Elmer, J., Harris, D. R., Sun, G., & Palmer, A. F. (2009). Purification of hemoglobin by tangential flow filtration with diafiltration. *Biotechnology Progress*, 25(5), 1402–1410.  
<https://doi.org/10.1002/btpr.217>
- Fan, J.-P., Lai, Z.-T., Mao, D.-Y., Xie, C.-F., Chen, H.-P., & Peng, H.-L. (2023). Preparation of a silk fibroin/gelatin composite hydrogel for high-selectively adsorbing bovine hemoglobin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 660, 130869.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130869>
- Harrington, J. P., & Wollocko, H. (2010). Pre-clinical studies using OxyVita hemoglobin, a zero-linked polymeric hemoglobin: a review. *Journal of artificial organs : the official journal of*

*the Japanese Society for Artificial Organs*, 13(4), 183–188.

<https://doi.org/10.1007/s10047-010-0528-6>

Holowaychuk, M. K., Leader, J. L., & Monteith, G. (2014). Risk factors for transfusion-associated complications and nonsurvival in dogs receiving packed red blood cell transfusions: 211 cases (2008-2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(4), 431–437. <https://doi.org/10.2460/javma.244.4.431>

Hu, T., & Su, Z. (2003). A solid phase adsorption method for preparation of bovine serum albumin-bovine hemoglobin conjugate. *Journal of Biotechnology*, 100(3), 267–275. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00246-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00246-8)

Jahr, Jonathan S, Moallempour, M., & Lim, J. C. (2008). HBOC-201, hemoglobin glutamer-250 (bovine), Hemopure (Biopure Corporation). *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(9), 1425–1433. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.9.1425>

Jahr, Jonathon S, & Varma, N. (2004). PolyHeme. Northfield Laboratories. *IDrugs : the investigational drugs journal*, 7(5), 478–482.

Jamieson, C. A., Baillie, S. L., & Johnson, J. P. (2022). Blood Transfusion in Equids-A Practical Approach and Review. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(17). <https://doi.org/10.3390/ani12172162>

Jia, Y., Cui, Y., Fei, J., Du, M., Dai, L., Li, J., & Yang, Y. (2012). Construction and Evaluation of Hemoglobin-Based Capsules as Blood Substitutes. *Advanced functional materials*, 22(7), 1446–1453. <https://doi.org/10.1002/adfm.201102737>

Jia, Y., Duan, L., & Li, J. (2016). Hemoglobin-Based Nanoarchitectonic Assemblies as Oxygen Carriers. *Advanced Materials*, 28(6), 1312–1318. <https://doi.org/10.1002/adma.201502581>

Kim, J., Jeong, S., Korneev, R., Shin, K., & Kim, K. T. (2019). Cross-Linked Polymersomes with Reversible Deformability and Oxygen Transportability. *Biomacromolecules*, 20(6), 2430–2439. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00485>

- Kisielewicz, C., & Self, I. A. (2014). Canine and feline blood transfusions: controversies and recent advances in administration practices. *Veterinary anaesthesia and analgesia*, *41*(3), 233–242. <https://doi.org/10.1111/vaa.12135>
- Kuo, K. W., & McMichael, M. (2020). Small animal transfusion medicine. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, *50*(6), 1203–1214. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.001>
- Lanevski, A., & Wardrop, K. J. (2001). Principles of transfusion medicine in small animals. *The Canadian Veterinary Journal. la Revue Veterinaire Canadienne*, *42*(6), 447–454.
- Le Gal, A., Thomas, E. K., & Humm, K. R. (2020). Xenotransfusion of canine blood to cats: a review of 49 cases and their outcome. *The Journal of small animal practice*, *61*(3), 156–162. <https://doi.org/10.1111/jsap.13096>
- Li, H., Tian, J., Wu, A., Wang, J., Ge, C., & Sun, Z. (2016). Self-assembled silk fibroin nanoparticles loaded with binary drugs in the treatment of breast carcinoma. *International journal of nanomedicine*, *11*, 4373–4380. <https://doi.org/10.2147/IJN.S108633>
- Li, Taihang, Jing, X., & Huang, Y. (2011). Polymer/hemoglobin assemblies: biodegradable oxygen carriers for artificial red blood cells. *Macromolecular Bioscience*, *11*(7), 865–875. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000469>
- Li, Tao, Yang, G., Zhu, Y., Tzang, F. C., Lau, S.-H., Kwok, S.-Y., Wong, B. L., & Liu, L. (2017). Beneficial effects of novel cross-linked hemoglobin YQ23 on hemorrhagic shock in rats and pigs. *The Journal of Surgical Research*, *210*, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.11.045>
- Liu, M., Gan, L., Chen, L., Zhu, D., Xu, Z., Hao, Z., & Chen, L. (2012). A novel liposome-encapsulated hemoglobin/silica nanoparticle as an oxygen carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, *427*(2), 354–357. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.019>

- Lu, X., Zhao, D., & Su, Z. (2004). Purification of hemoglobin by ion exchange chromatography in flow-through mode with PEG as an escort. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, 32(2), 209–227. <https://doi.org/10.1081/bio-120037828>
- Lu, X., Zheng, C., Xu, Y., & Su, Z. (2005). Disuccinimidyl suberate cross-linked hemoglobin as a novel red blood cell substitute. *Science in China. Series C, Life Sciences*, 48(1), 49–60. <https://doi.org/10.1360/04yc0014>
- MacDonald, N., & Pearse, R. M. (2017). Are we close to the ideal intravenous fluid? *British Journal of Anaesthesia*, 119(suppl\_1), i63–i71. <https://doi.org/10.1093/bja/aex293>
- Manchanda, S., Das, N., Chandra, A., Bandyopadhyay, S., & Chaurasia, S. (2020). Fabrication of advanced parenteral drug-delivery systems. In *Drug Delivery Systems* (pp. 47–84). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814487-9.00002-8>
- Miglio, A., Stefanetti, V., Antognoni, M. T., Cappelli, K., Capomaccio, S., Coletti, M., & Passamonti, F. (2016). Stored canine whole blood units: what is the real risk of bacterial contamination? *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(6), 1830–1837. <https://doi.org/10.1111/jvim.14593>
- Moore, E. E., Johnson, J. L., Moore, F. A., & Moore, H. B. (2009). The USA Multicenter Prehospital Hemoglobin-based Oxygen Carrier Resuscitation Trial: scientific rationale, study design, and results. *Critical Care Clinics*, 25(2), 325–56, Table of Contents. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2009.01.002>
- Napolitano, L. M. (2009). Hemoglobin-based oxygen carriers: first, second or third generation? Human or bovine? Where are we now? *Critical Care Clinics*, 25(2), 279–301, Table of Contents. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2009.01.003>
- Natarajan, C., Jiang, X., Fago, A., Weber, R. E., Moriyama, H., & Storz, J. F. (2011). Expression and purification of recombinant hemoglobin in *Escherichia coli*. *Plos One*, 6(5), e20176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020176>

- Pacheco, M. O., Lutz, H. M., Armada, J., Davies, N., Gerzenshtein, I. K., Cakley, A. S., Spiess, B. D., & Stoppel, W. L. (2023). Silk Fibroin Particles as Carriers in the Development of All-Natural Hemoglobin-Based Oxygen Carriers (HBOCs). *BioRxiv*.  
<https://doi.org/10.1101/2023.03.01.530637>
- Paciello, A., Amalfitano, G., Garziano, A., Urciuolo, F., & Netti, P. A. (2016). Hemoglobin-Conjugated Gelatin Microsphere as a Smart Oxygen Releasing Biomaterial. *Advanced healthcare materials*, 5(20), 2655–2666. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600559>
- Palmer, A. F., Sun, G., & Harris, D. R. (2009). Tangential flow filtration of hemoglobin. *Biotechnology Progress*, 25(1), 189–199. <https://doi.org/10.1002/btpr.119>
- Pennisi, M. G., Hartmann, K., Addie, D. D., Lutz, H., Gruffydd-Jones, T., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Horzinek, M. C., Hosie, M. J., Lloret, A., Marsilio, F., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., Möstl, K., & European Advisory Board on Cat Diseases. (2015). Blood transfusion in cats: ABCD guidelines for minimising risks of infectious iatrogenic complications. *Journal of feline medicine and surgery*, 17(7), 588–593.  
<https://doi.org/10.1177/1098612X15588449>
- Qi, D., Wang, P., Chen, C., Guo, S., & Wang, X. (2016). Polymerization of modified diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) with 1,6-bismaleimic-hexane. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(4), 1069–1074.  
<https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1138488>
- Qiu, W., Meng, F.-T., Ma, G.-H., & Su, Z.-G. (2003). [The preparation of an artificial red blood cell substitute by W/O/W double emulsion methods]. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica*, 35(5), 467–472.
- Rameez, S., Alost, H., & Palmer, A. F. (2008). Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: a potential oxygen carrier. *Bioconjugate Chemistry*, 19(5), 1025–1032. <https://doi.org/10.1021/bc700465v>

- Savla, C., Munoz, C., Hickey, R., Belicak, M., Gilbert, C., Cabrales, P., & Palmer, A. F. (2020). Purification of *Lumbricus terrestris* Mega-Hemoglobin for Diverse Oxygen Therapeutic Applications. *ACS biomaterials science & engineering*, 6(9), 4957–4968. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.0c01146>
- Scharman, C. D., Burger, D., Shatzel, J. J., Kim, E., & DeLoughery, T. G. (2017). Treatment of individuals who cannot receive blood products for religious or other reasons. *American Journal of Hematology*, 92(12), 1370–1381. <https://doi.org/10.1002/ajh.24889>
- Sen Gupta, A. (2019). Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules. *Shock*, 52(1S Suppl 1), 70–83. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001009>
- Sheng, Y., Yuan, Y., Shan, X., Zhang, X., & Cao, X. (2008). [Study on mass transfer behavior of hemoglobin-based nanocapsule surface]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 25(4), 879–884.
- Simoni, J., Simoni, G., Wesson, D. E., & Feola, M. (2012). ATP-adenosine-glutathione cross-linked hemoglobin as clinically useful oxygen carrier. *Current drug discovery technologies*, 9(3), 173–187. <https://doi.org/10.2174/157016312802650797>
- Sims, C., Seigne, P., Menconi, M., Monarca, J., Barlow, C., Pettit, J., & Puyana, J. C. (2001). Skeletal muscle acidosis correlates with the severity of blood volume loss during shock and resuscitation. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 51(6), 1137–45; discussion 1145. <https://doi.org/10.1097/00005373-200112000-00020>
- Stocker-Majd, G., Hilbrig, F., & Freitag, R. (2008). Extraction of haemoglobin from human blood by affinity precipitation using a haptoglobin-based stimuli-responsive affinity macroligand. *Journal of Chromatography. A*, 1194(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.091>

- Stojanović, R., Ilić, V., Manojlović, V., Bugarski, D., Dević, M., & Bugarski, B. (2012). Isolation of hemoglobin from bovine erythrocytes by controlled hemolysis in the membrane bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(6), 1491–1506. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9543-9>
- Su, Y., Qiu, B., Chang, C., Li, X., Zhang, M., Zhou, B., & Yang, Y. (2018). Separation of bovine hemoglobin using novel magnetic molecular imprinted nanoparticles. *RSC advances*, *8*(11), 6192–6199. <https://doi.org/10.1039/c7ra12457k>
- Sun, G., & Palmer, A. F. (2008). Preparation of ultrapure bovine and human hemoglobin by anion exchange chromatography. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *867*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.02.014>
- Topuz, F., & Uyar, T. (2022). Advances in the development of cyclodextrin-based nanogels/microgels for biomedical applications: Drug delivery and beyond. *Carbohydrate polymers*, *297*, 120033. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120033>
- van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J. J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten*, *35*(1), 99–118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>
- Wang, J., Guan, H., Han, Q., Tan, S., Liang, Q., & Ding, M. (2019). Fabrication of Yb<sup>3+</sup>-Immobilized Hydrophilic Phytic-Acid-Coated Magnetic Nanocomposites for the Selective Separation of Bovine Hemoglobin from Bovine Serum. *ACS biomaterials science & engineering*, *5*(6), 2740–2749. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00074>
- Wang, J., Tan, S., Liang, Q., Guan, H., Han, Q., & Ding, M. (2019). Selective separation of bovine hemoglobin using magnetic mesoporous rare-earth silicate microspheres. *Talanta*, *204*, 792–801. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.069>

- Wang, J., Tan, S., Liang, Q., Sun, S., Han, Q., & Ding, M. (2018). Preparation of magnetic microspheres functionalized by lanthanide oxides for selective isolation of bovine hemoglobin. *Talanta*, *190*, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.059>
- Webster, K. D., Dahhan, D., Otto, A. M., Frosti, C. L., Dean, W. L., Chaires, J. B., & Olsen, K. W. (2017). Inside-Out" PEGylation of Bovine  $\beta$ -Cross-Linked Hemoglobin. *Artificial Organs*, *41*(4), 351–358. <https://doi.org/10.1111/aor.12928>
- Weiskopf, R. B., Beliaev, A. M., Shander, A., Guinn, N. R., Cap, A. P., Ness, P. M., & Silverman, T. A. (2017). Addressing the unmet need of life-threatening anemia with hemoglobin-based oxygen carriers. *Transfusion*, *57*(1), 207–214. <https://doi.org/10.1111/trf.13923>
- Winslow, R. M. (2008). Cell-free oxygen carriers: scientific foundations, clinical development, and new directions. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1784*(10), 1382–1386. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.032>
- Zal, F., Delpy, E., & Jahr, J. S. (2022). M101, the Hemoglobin from the Sea: History and Therapeutic Perspectives. In H. Liu, A. D. Kaye, & J. S. Jahr (eds.), *Blood substitutes and oxygen biotherapeutics* (pp. 345–351). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-95975-3\\_34](https://doi.org/10.1007/978-3-030-95975-3_34)
- Zaremba, R., Brooks, A., & Thomovsky, E. (2019). Transfusion medicine: an update on antigens, antibodies and serologic testing in dogs and cats. *Topics in companion animal medicine*, *34*, 36–46. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2018.12.005>
- Zhang, J., Wang, Y., You, G.-X., Wang, Q., Zhang, S., Yu, W.-L., Hu, T., Zhao, L., & Zhou, H. (2018). Conjugation with 20 kDa dextran decreases the autoxidation rate of bovine hemoglobin. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *46*(7), 1436–1443. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1371184>

- Zhang, Z., & Li, L. (2018). Efficient synthesis of molecularly imprinted polymers with bio-recognition sites for the selective separation of bovine hemoglobin. *Journal of Separation Science*, *41*(11), 2479–2487. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701479>
- Zhao, J., Liu, C.-S., Yuan, Y., Tao, X.-Y., Shan, X.-Q., Sheng, Y., & Wu, F. (2007). Preparation of hemoglobin-loaded nano-sized particles with porous structure as oxygen carriers. *Biomaterials*, *28*(7), 1414–1422. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.10.012>
- Zheng, C., Bi, J., Ma, G., & Su, Z. (2007). Polyethylene glycol improves conjugation of bovine hemoglobin and human serum albumin in a controlled ratio. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, *35*(6), 568–584. <https://doi.org/10.1080/10731190701586236>