

A quimioprofilaxia de doenças transmissíveis por transfusão em componentes lábeis hemoterápicos

Chemoprophylaxis of transfusion-transmitted agents in labile blood components

Silvano Wendel¹

Desde a descoberta que a violeta de genciana poderia inativar formas vivas circulantes de *Trypanosoma cruzi* no sangue doado^{39,40}, muito esforço foi dispendido na obtenção e desenvolvimento de agentes que pudessem inativar agentes infecciosos transmitidos por transfusões de componentes lábeis.

Para que um composto possa ser considerado como eficaz e eficiente na inativação de patógenos transfusionais, este deve preencher os seguintes requisitos¹⁸: ser ativo nas temperaturas e pH em que são preservados os diferentes componentes hemoterápicos, ser ativo no sangue sob forma não diluída, não afetar as vias energéticas e metabólicas das plaquetas e hemácias, não afetar as estruturas e funções das proteínas plasmáticas e nem interferir com a sua capacidade antigênica ou criar neo-antígenos; além disso, deve ser considerado seguro e não causar danos ao receptor do componente transfundido. Infelizmente, poucos agentes preencheram completamente estes critérios⁵².

Desta forma, a violeta de genciana, embora eficaz na prevenção da transmissão do *T. cruzi* transfusional (e talvez para *Toxoplasma gondii*²²), pelo seu efeito limitado a alguns patógenos e ação deletéria sobre as plaquetas, nunca teve o seu uso em larga escala na prática hemoterápica.

Com o aparecimento do HIV na década de 80 e o descobrimento de novos agentes virais transmitidos por via transfusional (HCV, HTLV I/II, etc.), a constatação de que bactérias também criam sérios problemas ao receptor, e o recente descobrimento de agentes emergentes ou re-emergentes na população mundial, o processo de inativação universal de patógenos presentes no sangue doado passou a ser uma meta prioritária na pesquisa hemoterápica. Desta forma, ao longo dos últimos 10 anos, vários compostos foram pesquisados e desenvolvidos^{4 10 13 48}.

Os processos atuais de inativação de patógenos em componentes hemoterápicos (concentrado de glóbulos,

Since when gentian violet was recognized as an effective inactivation compound against live forms of *Trypanosoma cruzi* in whole blood^{39,40}, much effort was put to develop inactivating agents that could be rapidly and easily applied to labile blood components.

To be considered as appropriate as a pathogen blood inactivating agent, some requirements are demanded¹⁸: be active at temperatures and pH where blood components are stored, be active in undiluted concentration, promote no damage to the energetic red cells and platelet pathways, no effect on the various structures and functions from plasmatic proteins, nor to interfere in their antigenic profile or promote neoantigens; besides, it has to be considered as safe and pose no threat to the blood recipient. Unfortunately, quite a few compounds fulfill such requirements⁵².

Thus, although gentian violet is beyond doubt effective to prevent transfusion-transmission *T. cruzi* (and possibly *Toxoplasma gondii*²²), due to the limited action against other major pathogens and considerable side effects on platelets, it was never used as a large scale procedure.

When HIV became a transfusion problem in the 80's and new infective agents were really recognized as able to be transmitted by blood transfusions (HCV, HTLV I/II, etc), added to that bacterial contamination (even though left as a secondary problem until recently) is also a major threat to recipients, and that emergent or re-emergent agents have to be considered in the transfusion safety scenario, the universal blood labile components inactivation became a major target in blood transfusion research. So, after 10 years of intensive research, several inactivating compounds arrived to a more mature and viable step^{4 10 13 48}.

The current inactivation pathogen procedures to labile blood components (packed red cells, platelets,

1. Diretor Médico do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês, São Paulo, SP e Pós-graduando do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP.

Endereço para correspondência: Dr. Silvano Wendel. R. Adma Jafet 91, 01308-050 São Paulo, SP

Tel: 11 3255-7746 Fax: 11 3257-1290

e-mail: snwendel@uninet.com.br

Recebido para publicação em 28/3/2002.

plaquetas, plasma ou crioprecipitado) envolvem o contacto do agente inativador e processos subsequentes de remoção, através de sistemas integrados ao processo de coleta e processamento. Por ser uma atividade voltada à indústria de insumos, todo o sistema tem que ser validado por agências reguladoras, através de processos abrangentes e complexos utilizando modelos animais, avaliação das propriedades físico-químicas das diferentes frações protéicas, da sobrevivência das diversas células por ele preservado e por fim, das alterações finais em receptores humanos.

O primeiro processo comercial aplicado na inativação em larga escala de componentes plasmáticos foi o de *solventes e detergentes*²¹, que requer uma estrutura farmacêutica complexa, prestando-se à inativação de vírus providos de envelopes (HIV, HBV, HCV, HTLV I/II). Infelizmente, não inativam o HAV e o parvovírus B19^{23 53}; além disso, o seu alto custo e o pouco benefício adicional conferido¹, mesmo em pacientes com baixo risco de mortalidade, suplantando o custo aceitável por uma comunidade em termos de anos de vida ajustados por qualidade (QALY)⁴¹, não o torna uma alternativa interessante à maioria dos países.

A *foto-inativação* tem como princípio básico a aplicação de moléculas fotossensibilizantes, que se excitam por intermédio de fontes definidas e específicas de luz. A inativação dos patógenos ocorre ou por ação direta da geração de radicais de oxigênio ativo (e lesão da parede celular)³⁵, ou por modificação irreversível dos ácidos nucleicos dos patógenos presentes no sangue foto-inativado²⁹. Dentre os novos compostos foto-inativadores, são utilizados os fenotiazínicos²⁵, derivados porfirínicos^{4 38}, cianinas^{5 32}, psoralênicos^{9 54} e a riboflavina (vitamina B2)¹². Até o momento, três procedimentos já estão em ensaios clínicos ou fase final de testes de desenvolvimento.

Fenotiazínicos. As propriedades inativantes do azul de metileno em combinação com a luz no espectro visível permite com que este corante hidrofílico produza radicais livres de oxigênio, na dosagem final de 1 μ mol (320 μ g/L) a cada unidade de plasma fresco congelado. Este tipo de tratamento inativa vírus envelopados e, provavelmente, degrade ácidos nucleicos do parvovírus B19²²; o seu mecanismo de ação sobre protozoários ainda não é bem conhecido. Mais de um milhão de unidades de plasma fresco congelado já foram utilizadas desde 1992 na Alemanha, Suíça, Espanha e Escócia^{2 4 44}. Unidades de crioprecipitado preparados com este tratamento apresentam uma queda em torno de 40% de F VIII e fibrinogênio, embora ainda em níveis satisfatórios²⁰. Por ser um agente altamente hidrofílico, não tem a capacidade de penetrar completamente no interior da célula e portanto, não se presta à inativação de patógenos intracelulares. Este problema tem sido minimizado com a investigação da ação do azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB) que tem a capacidade de

plasma or cryoprecipitate) demand an initial contact between the inactivation agent and subsequent removal, through integrated systems linked to the collection and processing of blood components. Since this is primarily an industrial manufacturing process, the whole procedure has to be validated by regulatory agencies, using comprehensive and complex investigation protocols, including animal models, physico-chemical disturbances on plasmatic proteins, and survival of peripheral blood cells which underwent such treatment; finally, human studies have to be completed.

The first large scale commercial inactivation procedure applied on blood labile components was the solvent/detergent process²¹, which demands a complex pharmaceutical facility; this method is highly effective against enveloped viruses (HIV, HBV, HCV, HTLV I/II). Unfortunately, no action is attainable against HAV and parvovirus B19^{23 53}; besides, the high cost and the little benefit achieved¹, even for low mortality risk patients, surpasses the acceptable cost for a community as far as QALY (quality-adjusted life years) is concerned, making the solvent/detergent a process that does not promote a deep interest for wide application in most of the countries⁴¹.

The *photoinactivation* has, as a basic principle, the use of photosensitizing molecules, which are excited by defined lightwave sources. The pathogen inactivation will occur either by direct generation of singlet oxygen radicals (promoting a cell wall damage)³⁵, or due to irreversible changes induced in the pathogen nucleic acid²⁹. Among the new photoinactivating compounds, one can mention the phenothiazines²⁵, porphyrins^{4 38}, cyanines^{5 32}, psoralens^{9 54} and riboflavin (vitamin B2)¹². Until this moment, three methods are under final clinical assay evaluation.

Phenothiazines. The inactivating properties of methylene blue (MB) combined with the visible light renders this dye to generate free oxygen radicals, at the final dosage of 1 μ mol (320 μ g/L) per fresh frozen plasma unit. The method is suitable for inactivation of all enveloped viruses, and most likely, also active against parvovirus B19²²; the mechanism of action over protozoa is still unknown. More than a million fresh frozen plasma units have already been used since 1992 in Germany, Switzerland, Spain and Scotland^{2 4 44}. MB treated cryoprecipitate units show some 40% decrease in F VIII and fibrinogen, though still within acceptable levels²⁰. Since MB is a highly hydrophilic agent it is unable to penetrate in the cell wall and so, it cannot inactivate intracellular pathogens. This problem has been minimized with the use of 1,9-dimethylmethylene blue

inativar vírus com e sem envelopes, e também do *T. cruzi*^{50 51}. Outro agente promissor sob investigação é a tionina, útil apenas para concentrados de plaquetas, com manutenção da atividade celular e inativação de vários vírus (com e sem envelope)^{36 43}.

Psoraleno S-59. O primeiro agente psoralênico utilizado foi o 8-metoxipsoraleno (8-MOP)²⁸, cuja ação sobre linfomas de célula T e psoríase já era conhecida; porém, o processo de inativação para concentrados plaquetários era longo e impraticável. Desta forma, outros psoralenos foram desenvolvidos, culminando com um aminopsoraleno mais específico, denominado de S-59 (amotosalen HCl)^{10 11 26}, sendo ativo contra vírus, bactérias, treponemas, plasmódios, tripanossomas e leucócitos presentes nos concentrados plaquetários^{16 17 19 27 31 33}. Este agente já demonstra a sua eficiência após apenas 3 minutos de contacto na presença de raios UVA¹⁹. O sistema requer posterior remoção do psoralênico, o que é obtido por meio de máquinas desenvolvidas especificamente para este fim. Estudos clínicos em fase I e II demonstraram a segurança inicial do produto^{11 24}, e dois estudos em fase III foram realizados para a avaliação da eficácia dos concentrados plaquetários: um na Europa (EuroSPRITE, num total de 103 pacientes com trombocitopenia adquirida)⁷, e outro nos Estados Unidos (SPRINT, totalizando 671 pacientes trombocitopênicos secundários a câncer, na vigência de sangramento - ainda em fase final de avaliação)⁴⁷. Para o plasma fresco congelado no suporte de coagulopatias adquiridas, há dois estudos em fase III em andamento: um de intervenção clínica com um único braço em 34 pacientes (STEP-CC, com recuperação normal dos fatores I, II, V, VII, X, XI e XIII, Proteína C, S e AT-III)⁶, e um duplo cego em 121 hepatopatas (STEP-AC)¹¹; adicionalmente, um estudo duplo cego no manuseio de 30 pacientes com púrpura trombocitopênica trombótica (STEP-TTP) também está em evolução; os resultados preliminares ou finais destes estudos demonstram que o PFC tratado com o S-59 é capaz de repor os fatores II, VII, IX e X na mesma maneira que o plasma fresco congelado não tratado¹¹. Para o crioprecipitado, nenhuma alteração significativa foi observada quanto à concentração de fibrinogênio e F VIII³⁴. Este sistema encontra-se, portanto, em fase final de aprovação (HelinxTM) e estará disponível comercialmente num futuro bem próximo. Infelizmente, não se presta ao tratamento de concentrados de hemácias, havendo a necessidade de adoção de um sistema distinto para estes componentes (ver FRALE adiante).

Riboflavina. A vitamina B2 participa em várias reações de óxido-redução celular, além de importante papel na estrutura de várias enzimas. Por ser altamente solúvel, penetra rapidamente na célula. Desde a década de 60 já se conhecia a sua ação inativadora na presença de luz visível ou UV⁴⁹. A sua ação ocorre em concentração de 10µM com a irradiação em luz visível, induzindo ligações cruzadas aos ácidos nucleicos por

(DMMB), which inactivates enveloped and unenveloped viruses, and *T. cruzi*^{50 51}. Another promising agent is thionine, active only with platelet concentrates^{36 43}.

Psoralen S-59. The first psoralen that was used for inactivating purposes was 8-methoxypsoralen (8-MOP)²⁸, whose action against T cell lymphomas and psoriasis was already established; however the inactivating process was long and unpractical. Therefore, other psoralens were developed to a more specific aminopsoralen (S-59, amotosalen HCl)^{10 11 26}, active against viruses, bacteria, treponemes, plasmodia, trypanosomes and leukocytes present in platelet concentrates^{16 17 19 27 31 33}. This agent shows its action after only three minute exposure in the presence of UVA¹⁹. The system requires a subsequent psoralen removal, which is undertaken by specific machines. Phase I and II studies had all demonstrated the initial safety of the method^{11 24}, and two phase III studies were performed to evaluate the clinical efficacy of platelet concentrates: one in Europe (EuroSPRITE, with 103 patients with acquired thrombocytopenia)⁷, and the other in the United States (SPRINT, with 671 thrombocytopenic patients secondary to cancer under active bleeding (still in the final stage of evaluation)⁴⁷. For fresh frozen plasma, there are two phase III studies: one is a single arm clinical intervention study with 34 patients (STEP-CC, with normal recovery of factor I, II, V, VII, X, XI e XIII, Protein C, S and AT-III)⁶, and a double blind study in 121 chronic liver patients (STEP-AC)¹¹; additionally a double blind study dealing with 30 thrombotic thrombocytopenic patients (STEP-TTP) is also under investigation; preliminary results show that S-59 treated FFP is able to replace factors II, VII, IX and X in the same proportion on untreated FFP¹¹. For cryoprecipitate, no significant changes were found concerning fibrinogen and F VIII³⁴. This system is actually in the final steps of evaluation and will shortly be available in the market (HelinxTM). Unfortunately it is unsuitable for red cell concentrates, which require a different system (see FRALE).

Riboflavin. Vitamin B2 is a component of a series of cellular reactions, and also plays an important role in several enzyme structures. Due to its high solubility, it penetrates very quickly in the cell. The knowledge of the inactivating properties of riboflavin in the presence of visible light or UV goes back to the 60's⁴⁹. It is active at a 10µM concentration with visible light irradiation,

oxidação a moléculas de oxigênio presentes nos resíduos da guanina¹⁴, impedindo a replicação de agentes presentes no sangue tratado. Esta ação compromete a atividade de vírus com e sem envelopes, além de bactérias gram positivas e negativas, sem ação final deletéria sobre a capacidade funcional das plaquetas. Embora também se ligue à albumina e outras proteínas plasmática, a adição de ascorbato ao meio permite a boa preservação das mesmas. Por ser uma substância naturalmente encontrada no organismo (assim como seus metabólitos, inclusive os induzidos pela foto-irradiação), não é considerada até o momento como mutagênica ou tóxica⁴⁵. Sua ação como agente inativador em componentes lábeis tem sido extensamente estudada, com reduções de 4 a 6 log nos títulos de vírus (intra e extra celulares) e bactérias, sem efeitos consideráveis sobre as plaquetas ou fatores de coagulação. Os estudos sobre concentrados de hemácias se encontram numa fase mais preliminar.

Além dos agentes foto-inativadores, outros compostos desenvolvidos recentemente não necessitam da ação luminosa, podendo ser uma interessante alternativa em futuro próximo, especialmente para concentrados de hemácias:

Inactina (PEN 110). As etilenoiminas são compostos eletrofílicos de baixo peso molecular providas de uma cauda catiônica, com ampla difusão intracelular e ligação seletiva e irreversível aos sítios de guanina do DNA (sem produção de radicais livres de oxigênio), não sofrendo alterações do hematócrito do componente, sendo utilizada normalmente na produção de vacinas^{15,55}. Seus efeitos sobre componentes lábeis têm sido demonstrados contra vírus, bactérias, protozoários (incluindo plasmódios, babesia e cepa Silvio do *T. cruzi*), e sobre a capacidade proliferativa de linfócitos. Após o tratamento, existe a necessidade de remoção do agente por lavagem com processadoras celulares automáticas. Até o momento, estudos clínicos em fase I e II têm se voltado apenas para concentrados de hemácias^{3,8}.

FRALE. Sigla referente ao termo inglês *frangible anchor-linked effectors*, sendo substâncias com a capacidade de se ligar aos ácidos nucléicos após a sua ativação por mudanças no pH local; o seu principal componente é o S-303, que na dosagem de 100µg/mL, apresenta boa atividade contra o HIV, DHBV, VSV, BVDV e bactérias. Uma vez fixado aos ácidos nucléicos, este composto é naturalmente degradado a um agente de carga negativa e totalmente inativo (S-300); todavia, a fim de se aumentar a segurança do componente hemoterápico tratado, este produto é removido por fixação a uma matriz externa (que permanece dentro da bolsa de coleta) por todo o período de estocagem. Estudos em fase I e II não demonstraram alterações significativas quanto ao grau de hemólise, níveis de potássio extra celular, ATP ou da glicose, com recuperação *in vivo* pós-transfusional normal após 24

inducing cross-linking within the nucleic acid due to oxidation at guanine residues¹⁴, preventing the replication of pathogen agents that might be present in the treated blood. This action interrupts viral and bacteria replication, with no untoward effects upon the platelet function. Though it also links to albumin and other plasmatic proteins, the use of ascorbate renders a good preservation of these proteins. Since it is a natural substance, widely found in the organism (including their metabolites) it is not considered as mutagenic or toxic⁴⁵. The potential of inactivating properties in labile blood components is under an extensive scrutiny, showing a 4-6 log reduction on viral (intra and extra cellular) and bacteria, with no effect upon platelets or coagulation factors. However, the studies on red blood cell are still in an earlier phase.

In addition to the photo inactivating agents, other compounds have been developed recently, which do not need light exposure, being an interesting alternative to red blood cell inactivation.

Inactin (PEN 110). The ethylene imines are low molecular weight electrophilic compounds with a cationic tail, with great intracellular diffusion associated with an irreversible and selective linking to the DNA guanine residues (with no free radicals production), where no changes are seen due to variable hematocrit; this agent is widely used in vaccine production^{15,55}. The effects upon labile components are shown against viruses, bacteria, protozoa (including plasmodia, babesia, and *T. cruzi*); it also shows effect upon leukocytes. After treatment, one has to remove the agent by a special washing device. So far, phase I and II studies are directed toward red cell concentrates^{3,8}.

FRALE. An acronym for *frangible anchor-linked effectors*, these are compounds which have the capacity to be linked to nucleic acids after local pH changes; the main component is S-303, showing an excellent performance at the concentration of 100µg/mL against HIV, DHBV, VSV, BVDV and bacteria. Once fixed to the nucleic acid, it is naturally degraded into an inactive compound (S-300); however, in order to promote a further safety for the process, it is reduced to low levels using a compound absorption device (CAD), which remains inside the collection bag during the whole storage period. No significant changes are observed in

horas, assim como da sua sobrevivência média¹¹. Os estudos em fase III se encontram em fase final, envolvendo casos de transfusão aguda em 200 pacientes submetidos a bypass coronário e em 50 pacientes portadores de anemias crônicas (anemia falciforme ou talassemia).

Além da ação específica da inativação de patógenos, um efeito benéfico adicional quando o sistema de inativação se dirige contra os ácidos nucléicos refere-se à inibição da síntese de citoquinas, proliferação linfocitária e apresentação de antígenos, processos estes envolvidos na etiopatogenia das reações febris não hemolíticas e reação enxerto versus hospedeiro^{30 37 46}.

Estes fatos demonstram que, apesar do alto nível de segurança atingido pelos serviços transfusionais após o aparecimento do HIV, o projeto pioneiro de Nussensweig de se obter um agente que pudesse inativar patógenos transmitidos por transfusão diretamente dentro do recipiente de coleta do sangue doado passa a se tornar uma realidade viável em todo o mundo num futuro muito próximo, contribuindo-se para uma transfusão cada vez mais segura no que concerne à prevenção de doenças transmitidas por transfusões. Naturalmente, os altos custos envolvidos na implantação de uma nova metodologia irão cair à medida que a sua utilização for mais difundida, sendo uma alternativa excelente para regiões mais remotas e com sistemas hemoterápicos não muito bem desenvolvidos. Dúvidas ainda existem quanto à capacidade destes novos agentes de inativarem príons, mas a sua transmissão transfusional ainda é uma incógnita.

phase I and II studies concerning hemolysis, extra cellular potassium levels, ATP or glucose, with normal *in vivo* post-transfusional survival after 24 hours and normal half-life¹¹. Phase III studies are in the final stage, with 200 patients undergoing acute transfusions due to coronary heart bypass and in 50 chronic anemic patients (sickle cell disease or thalassemia).

Besides the specific inactivating agents upon pathogens, another benefit from these nucleic acid inactivation methods rely on the leukocytes, since it inhibits cytokines production, lymphocyte proliferation and antigen presentation, which are related to febrile non-hemolytic reaction and graft versus-host-disease^{30 37 46}.

These data show that, despite the high safety level achieved in the current days by most of the blood transfusion services after the HIV threat, the pioneer work of Nussensweig to obtain an agent that could inactivate all transfusion-transmitted agents inside the collection blood bag is becoming a reality that could be extensively applied all over the world, contributing to a safer blood transfusion. Naturally, the high costs related to the initial adoption of the systems will gradually decrease, once a more extensive use is observed, being an excellent choice for remote areas, particularly among blood transfusion services with limited resources and skills. There are still some doubts concerning the inactivating capacity upon prions, however transfusional transmission is not proved yet.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AuBuchon JP, Birkmeyer JD. Safety and cost-effectiveness of solvent-detergent-treated plasma. In search of a zero risk blood supply. *Journal of American Medical Association* 272: 1210-1214, 1994.
2. Aznar JA, Montoro JM, Bonnad S, Hurtado C, Soler MA, Miguel AD. Clotting factors in cryoprecipitate and cryosupernatant prepared from MB-treated fresh plasma. *Transfusion* 40: 493, 2000.
3. Beach K. Progress in improving the pathogen safety of red cell concentrates: clinical assessment. *Transfusion Clinique et Biologique* 8 (supl 1) 161, 2001.
4. Ben-Hur E, Moor ACE, Margolis-Nunno H. The photodecontamination of cellular blood components: mechanisms and use of photosensitization in transfusion medicine. *Transfusion Medicine Reviews* 9: 15-22, 1996.
5. Ben-Hur E, Rywkin S, Rosenthal I. Virus inactivation in red cell concentrates by photosensitization with phthalocyanines: protection of red cells but not of vesicular stomatitis virus with a water-soluble analogue of vitamin E. *Transfusion* 35:401-406, 1995.
6. Benjamin RJ, Dealcaron P, Shopnick R, Dugdale M, Smith P, Abshire T, Ortiz I, Matthew P, Cohen A, Konkole B, Streiff M, Ramies D, Wages D, Pinkoski L, Arroyo A, Valentine ME, Lazott R, Corash L, Kessler C, Hambleton J. Kinetics of coagulation factors in patients transfused with fresh frozen plasma (FFP) prepared by Helinx pathogen inactivation technology – The STEP CC trial. *Transfusion Clinique et Biologique* 8 (supl 1): 143, 2001.
7. Cazenave JP, Davis K, Corash L. Design of clinical trials to evaluate the efficacy of platelet transfusion: the euroSPRITE trial for components treated with Helinx™ technology. *Seminars Hematology* 38 (suppl 11):46-54, 2001.
8. Chapman J. Progress in improving the pathogen safety of red cell concentrates: preclinical assessment. *Transfusion Clinique et Biologique* 8 (supl 1): 60, 2001.
9. Ciavarino V. Preclinical safety of a nucleic acid-targeted Helinx™ compound: a clinical perspective. *Seminars Hematology* 38 (supl 11):12-19, 2001.
10. Corash L. Inactivation of viruses, bacteria, protozoa and leukocytes in platelet concentrates: current research perspectives. *Transfusion Medicine Reviews* 13: 18-30, 1999.
11. Corash L. Inactivation of infectious pathogens in labile blood components: meeting the challenges. *Transfusion Medicine Reviews* 8:138-145, 2001.
12. Corbin III F. Use of riboflavin for photoinactivation of pathogens in blood components. *Chinese Journal Blood Transfusion* 14 (supl):107-108, 2001.
13. Council of Europe. Pathogen Inactivation of labile blood products – Council of Europe Publishing, Strasbourg, 2001.
14. Douli T, Cadet J. Modification of DNA bases by photo-sensitized one-electron oxidation. *International Journal of Radiation Biology* 75: 571-581, 1999.

15. Edson CM, Purmal A. Viral inactivation in red blood cell concentrates by Inactine: mechanism of action and lack of effect on red cell physiology. *Transfusion* 39 (supl): 108S, 1999.
16. Gottlieb P, Margolis-Nunno H, Robinson R. Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms in blood components with a psoralen and ultraviolet light. *Photochemistry and Photobiology* 63: 562-565, 1996.
17. Grass JA, Hei DJ, Metchette K. Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by psoralen plus UVA. *Blood* 91:2180-2188, 1998.
18. Hammond DJ, Croft SL, Hogg J, Gutteridge WE. A strategy for the prevention of the transmission of Chagas' disease during blood transfusion. *Acta Tropica* 43:367-378, 1986.
19. Hanson CV. Photochemical inactivation of viruses with psoralens: an overview. *Blood Cells* 18: 7-25, 1992.
20. Hornsey VS, Young D, Prowse CV. Cryoprecipitate prepared from plasma treated with methylene blue using the Maco Pharma Maco-Tronic system. *Transfusion Clinique et Biologique* 8 (suppl 1):140, 2001.
21. Horowitz B, Bonomo R, Prince AM. Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 79: 826-831, 1992.
22. Iudicone P, Andreoni M, Lavorino C. Photodynamic treatment of fresh frozen plasma by methylene blue: effect on HIV, HCV and parvovirus B19. *Infusionsther Transfusionmed* 26: 262-266, 1999.
23. Klein HG, Dodd RY, Dzik WH. Current status of solvent/detergent-treated frozen plasma. *Transfusion* 39: 102-107, 1998.
24. Knutson F, Alfonso R, Dupuis K. Photochemical inactivation of bacteria and HIV in buffy-coat derived platelet concentrates under conditions that preserve *in vitro* platelet function. *Vox Sanguinis* 78:209-216, 2000.
25. Lambrecht B, Mohr H, Knüver-Hopf J, Schmitt H. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sanguinis* 60: 207-213, 1991.
26. Lin L, Cook DN, Wieseahn GP. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 37:423-435, 1997.
27. Lin L, Lukehart S, Molini B, Dupuis K, Alfonso R, Metzler P, Gregory D. Inactivation of *Treponema pallidum* in human concentrates by Helinx™ technology. *Transfusion Clinique Biologique* 8 (supl 1):152, 2001.
28. Lin L, Wieseahn GP, Morel PA, Corash L. Use of 8-methoxypsoralen and long wavelength ultraviolet radiation for decontamination of platelet concentrates. *Blood* 74: 517-525, 1989.
29. Lin L. Psoralen photochemical treatment of platelets. *Science and Medicine* 5:1-11, 1998.
30. Luban NLC. Prevention of Transfusion-Associated graft-versus-host disease by inactivation of T cells in platelet components. *Seminars in Hematology* 38 (supl 11):35-45, 2001.
31. Margolis-Nunno H, Bardossy L, Robinson R. Psoralen-mediated photodecontamination of platelet concentrates: inactivation of cell-free and cell-associated forms of human immunodeficiency virus and assessment of platelet function *in vivo*. *Transfusion* 37: 889-895, 1997.
32. Margolis-Nunno H, Ben-Hur E, Gottlieb P. Inactivation by phtalocyanine photosensitization of multiple forms of human immunodeficiency virus in red cell concentrates. *Transfusion* 36: 743-750, 1996.
33. Margolis-Nunno H, Robinson R, Ben-Hur E, Horowitz B. Quencher-enhanced specificity of psoralen-photosensitized virus inactivation in platelet concentrates. *Transfusion* 34: 802-810, 1994.
34. Mintz P, Avery NL, Moulaison SL, Flanagan HL, Boyd JC, Eden P, Johnson S, Smyers J, Wages D. Preparation of cryoprecipitate from photochemically treated fresh frozen plasma. *Transfusion* 40 (supl 1):71, 2000.
35. Mohr H, Lambrecht B, Selz A. Photodynamic virus inactivation of blood component. *Immunological Investigations* 24:73-85, 1995.
36. Mohr H, Oller K, Lambrecht B. Sterilization of platelet concentrates derived from *S. epidermidis* infected buffy-coat by treatment with thionine/light and UV-B. *Transfusion Clinique et Biologique* 8 (supl 1):13-005, 2001.
37. Moor ACE, van der Veen A, Dubbelman TMAR. Photodynamic sterilization of red cells and its effect on contaminating white cells: viability and mechanism of cell death. *Transfusion* 39: 599-607, 1999.
38. North J, Neyndorff H, Lévy JG. Photosensitizers as virucidal agents. *J Photochemistry and Photobiology* 17:99-108, 1993.
39. Nussenzweig V, Sonntag R, Biancalana A, Freitas JLP, Amato Neto V. Ação da violeta de genciana sobre o *T. cruzi in vitro*: sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. *Revista Paulista de Medicina* 42:57-58, 1953.
40. Nussenzweig V, Sonntag R, Biancalana A, Freitas JLP, Amato Neto V. Ação de corantes tri-fenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi in vitro*. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. *O Hospital* 44: 731-744, 1953.
41. Pereira A. The cost-effectiveness of transfusing virus-inactivated plasma instead of standard plasma. *Transfusion* 1999; 39: 479-487.
42. Pinho PLS, Amato Neto V, Duarte MIS, Cotrim JX, Moreira AAB, Sant'ana EJ, Campo R. Estudo experimental sobre possível atividade da violeta de genciana na profilaxia de transmissão de toxoplasmose por transfusão de sangue. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 27: 89-94, 1985.
43. Redecker-Klein A, Mohr H. Thionine/light for virus inactivation of platelet concentrates. *Vox Sanguinis* 74 (supl 2) 1302, 1998.
44. Simonsen AC, Sorensen H. Clinical tolerance of methylene blue virus-inactivated plasma. A randomized crossover trial in 12 healthy volunteers. *Vox Sanguinis* 77: 210-217, 1999.
45. Sisson TRC. Photodegradation of riboflavin in neonates. *Federal Proceedings* 46: 1883-1885, 1987.
46. Skripchenko A, Wagner SJ. Inactivation of WBC in RBC suspensions by photoactive phenothiazine dyes: comparison of dimethylene blue and MB. *Transfusion* 40: 968-975, 2000.
47. Slichter SJ, Corash L, Grabowski M. Viability and hemostatic function of photochemically treated (PCT) platelets in thrombocytopenic patients. *Blood* 94(supl 1): 376, 1999.
48. Suomela H. Inactivation of viruses in blood and plasma products. *Transfusion Medicine Reviews* 7: 42-57, 1993.
49. Tsugita A. Photosensitized inactivation of nucleic acids in the presence of riboflavin. *Biochemical and Biophysical Acta* 103:360-363, 1965.

50. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Mallory DA, Cincotta L. Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylmethylene blue. *Transfusion* 38: 729-737, 1998.
51. Wagner SJ, Skripchenko A, Pugh JC, Suchmann DR, Ijaz MK. Duck hepatitis B photoinactivation by dimethylene blue in RBC suspensions. *Transfusion* 41:1154-1158, 2001.
52. Wendel S, Dias JCP. Transfusion Transmitted Chagas Disease. *In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (eds) Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on Transfusion and Clinical Medicine. International Society of Blood Transfusion, p.103-133, Brazil 1992.*
53. Williamson LM; Allain JP. Virally inactivated fresh frozen plasma. *Vox Sanguinis* 69: 159-165, 1995.
54. Wollowitz S. Fundamentals of the Psoralen-Based Helinx™ Technology for Inactivation of Infectious Pathogens and Leukocytes in Platelets and Plasma. *Seminars in Hematology* 38(supl 11) 4-11, 2001.
55. Zhang QX, Edson C, Budwosky E, Purmal A. Inactine – a method for viral inactivation in red blood cell concentrates. *Transfusion* 38 (10S): 75S, 1998.