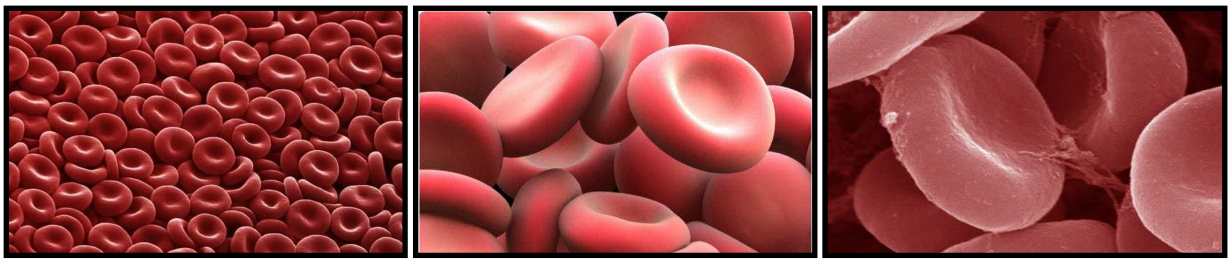
Homeostasis de sulfhidrilos intraeritrocitarios durante el almacenamiento de glóbulos rojos en las condiciones del banco de sangre.

Protección por N-acetil cisteína.



Florencia Amen Lorenzo

Tutora: Dra. Leonor Thomson

Tesina de Grado - Licenciatura en Bioquímica

Laboratorio de Enzimología – Fisicoquímica Biológica

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Diciembre 2011

Facultad de Ciencias
Universidad de la República
qb
UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA

Agradecimientos:

Quisiera agradecer especialmente a mi tutora Leonor, por toda la ayuda brindada, por permitirme y ayudarme en la realización de esta tesina y por integrarme al grupo de trabajo y a este laboratorio.

También quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Enzimología y Fisicoquímica Biológica, por hacer del ambiente de trabajo un lugar agradable, y por toda la colaboración brindada.

Finalmente le agradezco a mi familia por la motivación y el apoyo moral de todos los días y a mis amigos que me acompañaron durante toda la carrera.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Características de los glóbulos rojos humanos.---------- 13

1.1. Transporte de oxígeno.---------- 13

1.2. Obtención de energía: la vía de Embdern-Myerhof.---------- 14

1.3. GR y regulación vascular.---------- 14

2. Radicales libres y especies reactivas.---------- 16

2.1. Oxidación de lípidos de membrana.---------- 17

2.2. Oxidación de proteínas.---------- 18

3. Sistemas antioxidantes en los GR.---------- 19

3.1. Catalasa.---------- 20

3.2. Superóxido dismutasa.---------- 21

3.3. Glutation Peroxidasa.---------- 21

3.4. Peroxiredoxinas.---------- 22

3.4.1. Peroxiredoxina 2.---------- 24

3.5. Antioxidantes no enzimáticos.---------- 25

3.5.1. Glutatión.---------- 25

3.5.2. α-tocoferol.---------- 26

3.5.3. Ascorbato.---------- 26

3.5.4. β-caroteno.---------- 27

3.6. N-acetilcisteína.---------- 27

4. Senescencia.---------- 28

4.1. Modelo de eriptosis.---------- 28

4.2. Modelo de clustering de la banda 3.---------- 29

5. Glóbulos rojos en conservación.---------- 31

5.1. Lesiones de almacenamiento.---------- 31

5.1.1. Cambios en la conformación.---------- 32

5.1.2. Cambios bioquímicos.---------- 33

OBJETIVOS

6. Objetivo General.---------- 37

7. Objetivos Específicos.---------- 37

7.1. Medida de la concentración y estado redox de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular.---------- 37

7.2. Estudio del estado redox de proteínas intracelulares.---------- 37

7.3. Capacidad de consumo de H_2O_2 por la maquinaria antioxidante.---------- 37

MATERIALES Y MÉTODOS

8. Reactivos y equipos.---------- 39

9. Obtención de las muestras.---------- 39

10. Agregado de N-acetil cisteina.---------- 39

11. Lavado y lisis celular.---------- 39

11.1. Lavados con PBS.---------- 39

11.2. Lavado y pretratamineto con NEM.---------- 40

12. Cuantificación celular.---------- 40

13. Cuantificación de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular mediante reacción de Ellman.---------- 40

14. Consumo de peróxido extracelular por la maquinaria antioxidante de los glóbulos rojos.---------- 41

15. Concentración de hemoglobina intracelular.---------- 41

16. Electroforesis y Western Blot.---------- 41

16.1. SDS-PAGE y Western Blot en 1 dimensión (1D).---------- 41

16.2. Electroforesis y Western Blot diagonales.---------- 41

16.3. Electroforesis y Western Blot diagonales, pretratamiento con NEM.--- 42

16.4. Estadística.---------- 42

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

17. Cuantificación de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular.---- 44

18. Consumo de peróxido extracelular por la maquinaria antioxidante de los glóbulos rojos.---------- 48

19. Concentración de Hemoglobina intracelular.---------- 51

20. Electroforesis y Western Blot.---------- 54

20.1. SDS-PAGE y Western Blot en una dimensión (1D).---------- 54

20.2. Electroforesis y Western Blot diagonales.---------- 55

20.3. Electroforesis y Western Blot diagonales, pretratamiento con NEM.--- 57

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

REFERENCIAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

GR ---------- Glóbulo rojo

Hb ---------- Hemoglobina

2,3-DFG ---------- 2, 3-Difosfoglicerato

NOS ---------- Óxido nítrico sintasa

EDRF ---------- Factor de relajación vascular derivado del endotelio

sGC ---------- Guanilato ciclasa soluble

cGMP ---------- 3',5'-guanosina monofosfato cíclico

$O_2^{\bullet-}$ ---------- Radical superóxido

$HO_2^{\bullet}$ ---------- Radical perhidoxilo

H_2O_2 ---------- Peróxido de Hidrógeno

$^{\bullet}OH$ ---------- Radical hidroxilo

$ONOO^-$ ---------- Peroxinitrito

NO ---------- Óxido Nítrico

$ROO^{\bullet}$ ---------- Radical peroxilo

ROOH ---------- Hidroperóxidos Orgánicos

ER ---------- especies reactivas

EROs ---------- Especies reactivas del oxígeno

CAT ---------- Catalasa

SOD ---------- Superóxido dismutasa

GPx ---------- Glutatión Peroxidasa

GSH ---------- Glutatión

Prx ---------- Peroxiredoxina

GSSH ---------- Glutatión disulfuro

TrxR ---------- Tiorredoxina reductasa

GR ---------- Glutatión reductasa

2Cys Prx ---------- Peroxiredoxina de 2 Cisteínas

1Cys Prx ----------Peroxiredoxina de 1 Cisteina

NAC ---------- N-acetil cisteína

MetHb ---------- Metahemoglobina

CPD ---------- Citrato, Fosfato, Dextrosa

SAGM ---------- Sodio, Adenina, Glucosa, Manitol

PAGGSM ---------- Fosfato, Adenina, Glucosa, Guanosina, Salino, Manitol

SNO-Hb ---------- S-nitrosotiol, hemoglbina

NEM ---------- N-etilmaleimida

DTNB ---------- Ácido 5-5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)

TNB ---------- Ácido 2-nitro5-tiobenzoico

DTPA ---------- Ácido dietilen triamino pentaacético

ABTS ---------- 2,2'-acino-bis(3-etilbenzatiasolina-6-ácido sulfónico)

RESUMEN

La transfusión de glóbulos rojos (GR), es un procedimiento vital, cuyo objetivo primario es colaborar en el mantenimiento de la oxigenación de los tejidos y los órganos en casos de hemorragia o anemia. Los concentrados de eritrocitos son los productos sanguíneos más frecuentemente transfundidos, y las soluciones de almacenamiento corrientemente en uso permiten la conservación de los mismos durante 42 días.

Durante el almacenamiento, los GR sufren una serie de alteraciones estructurales y funcionales, conocidas como lesiones de almacenamiento. Las mismas incluyen cambios en la morfología, exposición de fosfatidil serina, vesiculación, y eventualmente lisis celular.

Con el fin de examinar la condición redox de los GR en el almacenamiento bajo las condiciones del banco de sangre, se evaluaron los sulfhidrilos de alto y bajo peso molecular. La concentración de sulfhidrilos de bajo peso molecular disminuyó a partir del día 21 de almacenamiento llegando a menos del 50% del valor inicial. Conjuntamente con la oxidación de los tioles de bajo peso molecular, empleando electroforesis diagonal y western blot, se encontró un aumento en los agregados proteicos con sulfhidrilos intracelulares, así como una disminución en la concentración de la peroxiredoxina 2 (Prx2), una peroxiredoxina de 2 cisteínas típica, y la enzima antioxidante más abundante en los GR. También se evaluó el estado de oxidación de la hemoglobina intracelular, encontrándose un aumento progresivo en la forma meta dentro del glóbulo. A pesar de los cambios encontrados en el estado redox intracelular no se encontraron variaciones en la capacidad de estas células para consumir peróxido de hidrógeno agregado al medio extracelular.

INTRODUCCION

1. Características de los glóbulos rojos humanos.

Los eritrocitos o glóbulos rojos humanos (GR), son el principal componente celular de la sangre. Estas células producidas en el estroma de la médula ósea, en un proceso llamado eritropoyesis, en el cual células madres pluripotenciales hematopoyéticas se diferencian de entre varios precursores en reticulocitos. Durante este proceso de diferenciación el núcleo se degenera y es extruído (Korell, Coulter et al. 2011). Los reticulocitos resultantes contienen algunas mitocondrias y ARN residual (Gordon-Smith 2009). Estos migran a la circulación y en 1 o 2 días se diferencian en GR maduros, perdiendo los organelos restantes (Korell, Coulter et al. 2011).

Cada GR es un disco bicóncavo carente de organelos. Estas células ocupan normalmente el 45% del volumen en la sangre (hematocrito), siendo aproximadamente $5{,}4 \times 10^{12}$ células por litro en hombres y $4{,}5 \times 10^{12}$ células por litro en mujeres.

La forma de los GR es fisiológicamente importante debido a que mantiene una alta relación área:volumen, la cual facilita la difusión transmembrana (particularmente de oxígeno) y minimiza la distancia intracelular que debe difundir el oxígeno para combinarse con la hemoglobina.

La forma de los GR junto con la flexibilidad de su membrana plasmática permite a la célula flexionarse y distorsionarse, lo cual es a menudo necesario a medida que la misma atraviesa los capilares (Minors 2004). La forma normal de la célula es mantenida principalmente por cuatro proteínas, que forman el esqueleto de membrana, de estas la espectrina es la más abundante (Rossi, Giustarini et al. 2006).

Debido a la falta de organelos los GR maduros no pueden realizar síntesis proteica, renovación de proteínas o mitosis, tienen una vida media en la circulación limitada a 120 días, y deben obtener energía anaeróbicamente a través de la vía glucolítica (vía de Embden-Meyerhof) (Minors 2004).

1.1. Transporte de oxígeno.

Los GR son el único grupo celular responsable del transporte de oxígeno y dióxido de carbono hacia y desde los tejidos. Para cumplir con este rol los GR utilizan moléculas de hemoglobina (Hb), las cuales son producidas durante el proceso de maduración. La capacidad única de la Hb de unirse fuertemente al oxígeno en los pulmones y liberarlo en los tejidos donde se necesita, se debe a la función alostérica del 2,3-difosfoglicerato (2, 3-DFG) producido por la ruta de Embden-Myerhof. La importancia del 2,3-DFG reside en su habilidad para disminuir la afinidad de la molécula de Hb por el oxígeno. Esta propiedad depende de la cantidad de oxígeno unido a la molécula, el pH y la cantidad de 2,3-DFG presente.

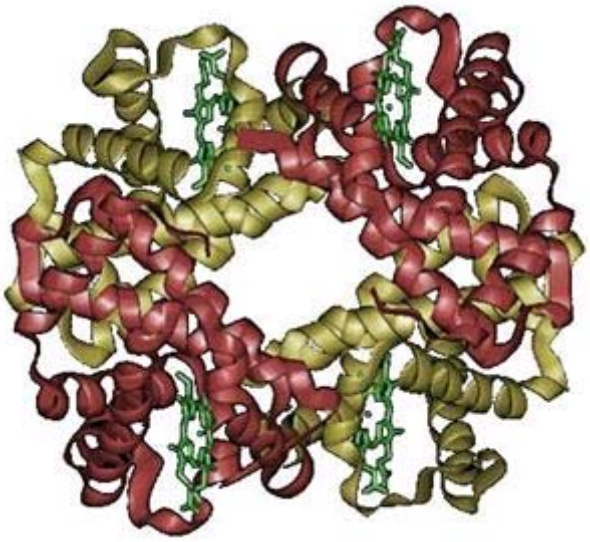


Figura 1. ***Representación de la hemoglobina.*** *Se muestran los cuatro grupos hemo en verde y las subunidades como lazos.*

Cuando la Hb se encuentra completamente desoxigenada, existe en la forma "taut" (forma T), en esta conformación tiene una baja afinidad por el oxígeno. Sin embargo cuando un átomo de oxígeno se une a cualquiera de los cuatro átomos de hierro en los anillos hemo, la molécula de 2,3-DFG no puede acceder al sitio de unión, proporcionándole una alta afinidad de unión al oxígeno a los restantes hierro de los grupos hemo (estado relajado o R) (Almac and Ince 2007).

1.2. Obtención de energía: la vía de Embdern-Myerhof.

Los GR catabolizan de forma anaerobia glucosa a ácido láctico por la vía de Embden-Myerhof. Como los mismos no almacenan glucógeno, deben catabolizar constantemente glucosa del medio extracelular por esta vía para obtener energía.

La vía de Embdern-Myerhof cumple 3 funciones en los GR. La primera es la producción de ATP, el cual es esencial para el funcionamiento de estas células, siendo el principal combustible de las mismas. El volumen celular de los GR es mantenido principalmente por la Na-K-ATPasa en la membrana plasmática, la cual elimina Na y agua de la célula. Por lo que en ausencia de ATP el Na es retenido, la célula se hincha y es eliminada de la circulación por los macrófagos.

La segunda función es la producción de 2,3-DPG por una vía alternativa llamada derivación de Rapoport-Luebering. Mientras que la tercer función es la producción de NADH, el cual es esencial para protección adicional contra el daño oxidativo a la célula, debido a que actúa como cofactor de la enzima metahemoglobina reductasa (Almac and Ince 2007).

1.3. GR y regulación vascular.

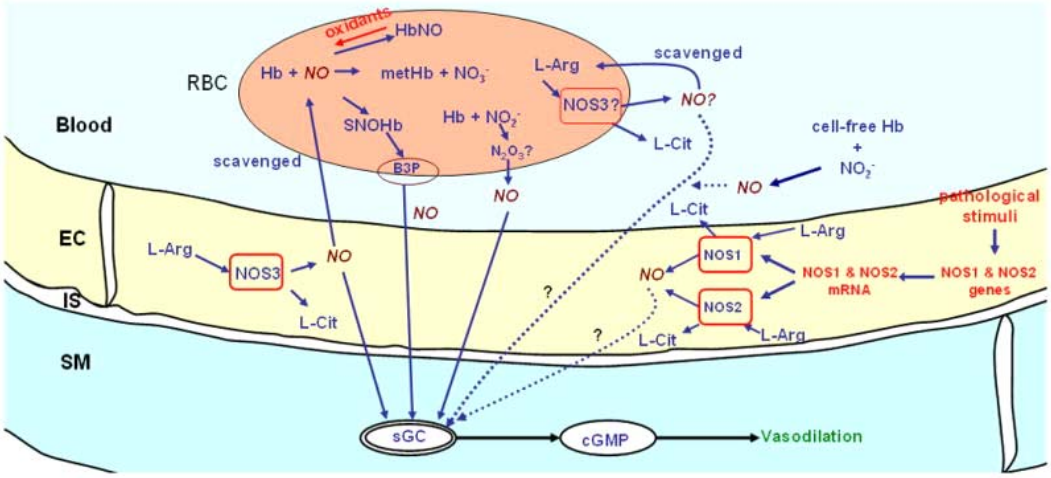


Figura 2. Interrelación entre el glóbulo rojo y NO*. La liberación de NO desde el eritrocito puede provenir de proteínas S-nitrosiladas, de la reducción de nitrito por proteínas con hemo, y de la hierro-nitrosil-hemoglobina. Otra fuente eritrocitaria es la NOS3 expresada en estas células. EC, célula endotelial; IS, espacio intersticial entre el endotelio y el músculo liso; RBC, glóbulo rojo; Hb, hemoglobina; B3P, banda 3; metHb, metahemoglobina; NO_2^-, nitrito; NO_3^-, nitrato; L-arg, L-arginina; L-cit, L-citrulina; cAMP, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; cGMP, guanosina 3',5'-monofosfato cíclico. Las fuente fundamental de NO del endotelio es la NOS3. Por su parte NOS1 y NOS2 pueden expresarse bajo condiciones patológicas (Chen and Popel 2009).*

Se ha encontrado evidencia que sostiene que los GR podrían tener un rol importante en la regulación vascular. Existiendo estudios que demuestran que los GR inducen la vasodilatación y promueven el transporte de oxígeno en condiciones de hipoxia (Shonat and Johnson 1997; Dietrich, Ellsworth et al. 2000).

Dos compuestos se han propuesto en relación a esta función: ATP y óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) (Crawford, Isbell et al. 2006). Los GR liberan ATP en respuesta a hipoxia, pH y estrés mecánico, y se piensa que el mismo, además de funcionar como una fuente intracelular de energía, puede servir como una molécula de señalización extracelular. La otra molécula propuesta, el NO se cree que es producido por los GR durante condiciones de hipoxia (Cosby, Partovi et al. 2003) .

La principal fuente NO a nivel biológico es enzimática, catalizada por tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS), a saber: la NOS neuronal o NOS1, la NOS inducible o NOS2, y la NOS endotelial o NOS3 (Eq. 1).

L-Arginina + O_2 + NADPH → L-citrulina + NO + $NADP^+$ (en presencia de FAD) (1)

A nivel vascular, el NO generado por la NOS3 se considera como la fuente fundamental del factor de relajación vascular derivado del endotelio (EDRF) (Ignarro, Buga et al.

1987; Moncada and Higgs 2006). Una vez formado, el NO difunde tanto hacia el espacio extravascular como hacia la luz del vaso (Lancaster 1994). En la pared vascular, el NO reacciona con la guanilato ciclasa soluble (sGC), la que cataliza la formación del 3',5'-guanosina monofosfato cíclico (cGMP) que induce vasodilatación. Dentro de la luz del vaso, el NO es atrapado rápidamente por la hemoglobina de los glóbulos rojos y convertido en productos relativamente inertes, nitrito y nitrato (Robinson and Lancaster 2005), acortando considerablemente la vida media del NO (Thomas, Liu et al. 2001; Jeffers, Xu et al. 2005). Por esto, durante varios años, se consideró a la sangre como un sitio donde el NO desaparecía. Una posibilidad interesante que en realidad la sangre pudiera actuar como transportadora del NO originado en el endotelio, y que este se liberara cuando y donde fuera necesario. Sin embargo, estudios in vitro y de modelado molecular sugirieron que la mayor parte del NO que alcanza la luz vascular es descompuesto por la hemoglobina (Gibson and Roughton 1957; Lancaster 1994). A pesar de los cálculos teóricos, surgieron pruebas experimentales que demostraron la biodisponibilidad del NO en sangre, en particular, su formación a partir de nitrito en medio ácido y en presencia de proteínas con grupos hemo como la hemoglobina (Huang, Shiva et al. 2005; Shiva, Huang et al. 2007). Otro vehículo importante sería la formación de complejos de tipo nitrosil-hemoglobina (Kashiwagi, Kajimura et al. 2002; Singel and Stamler 2005) y S-nitroso hemoglobina. El grado de asociación de este complejo varía con el nivel de oxígeno, lo cual aseguraría una adecuada provisión de NO en condiciones de hipoxia (Stamler, Singel et al. 2008). Adicionalmente, la generación de NO por parte de una NOS3 intra-eritrocitaria ha sido reportada como otra de las fuentes sanguíneas de esta molécula (Kleinbongard, Schulz et al. 2006).

2. Radicales libres y especies reactivas

Los radicales libres son especies químicas que presentan al menos un electrón no apareado. La mayoría de los radicales libres son en extremo reactivos y tienden a asociarse "apareando" el electrón libre.

Los radicales derivados del oxígeno son altamente tóxicos y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas, alterando su estructura y función biológica, lo que lleva a la disrupción de las actividades a nivel celular y tisular.

Estas especies se encuentran involucradas en diversos padecimientos como la carcinogénesis (Oberley and Oberley 1997), el envejecimiento (Kong and Lillehei 1998) y con desordenes de tipo neurológico como la epilepsia, la enfermedad de Huntington (Delanty and Dichter 1998) y el mal de Parkinson (Jenner 1998).

Los radicales libres se pueden formar en el interior de las células como producto de sus actividades fisiológicas normales (Bunker 1992), o mediante procesos patológicos como la isquemia/reperfusión. También pueden ser generados a partir de fuentes exógenas, como las radiaciones ionizante, ultravioleta, la visible o térmica, drogas

antitumorales, algunos productos químicos carcinogénicos, agentes contaminantes, pesticidas y humo del cigarro (Retel, Hoebee et al. 1993; Vilar-Rojas, Guzman-Grenfell et al. 1996), también diversos medicamentos pueden inducir la liberación de radicales libres (Wendel, Feuerstein et al. 1979; Song, Sha et al. 1998).

Las especies reactivas de oxígeno se forman por la reducción secuencial del oxígeno (O_2). Primeramente se produce el radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y el radical perhidroxilo ($HO_2^{\bullet}$), luego se genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y finalmente el radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$) (Retel, Hoebee et al. 1993). Otra especie altamente oxidante que se forma de la reacción limitada por difusión del radical superóxido con el óxido nítrico es el peroxinitrito ($ONOO^-$).

Las consecuencias de las reacciones de las especies reactivas (ER) con diferentes materiales celulares pueden ser muy variadas. Los objetivos celulares más frecuentemente atacados son: el ADN, los lípidos de membrana, así como proteínas y carbohidratos. A nivel de organelos, se ha observado que las mitocondrias son sumamente sensibles al estrés oxidativo, lo que se refleja en cantidades elevadas de oxidación en lípidos y proteínas, y en mutaciones del ADN mitocondrial (Lenaz 1998).

2.1. Oxidación de lípidos de membrana

El estrés oxidativo provoca la oxidación de los lípidos de membrana, lo que produce alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana. Con respecto a la permeabilidad se afecta tanto el transporte pasivo como el activo al alterarse la fluidez de la de la bicapa lipídica (Saran and Bors 1990).

Cuando los radicales hidroxilo se forman cerca de la membrana son capaces de extraer átomos de hidrógeno de los fosfolípidos que la componen, después de esta reacción aunque el hidroxilo original se ha inactivado, se forma un radical lipídico, el que después de un rearreglo molecular, puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo ($R\text{-}OO^{\cdot}$), este puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando más radicales lipídicos, mientras él mismo se transforma en hidroperóxido (R-OOH), el que en presencia de varios complejos metálicos puede descomponerse en más radicales, incluyendo entre ellos al radical hidroxilo. Reacciones de propagación extienden la cadena de lipoperoxidación a un número importante de moléculas vecinas, mientras que las reacciones de terminación detienen la cadena a través de recombinaciones o de la intervención de antioxidantes (Fig. 3).

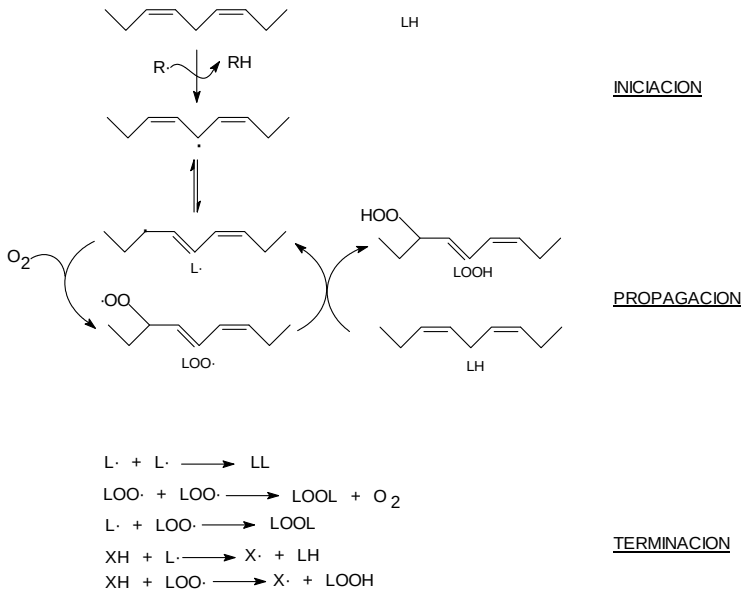


Figura 3. ***Las tres fases de la lipoperoxidación.*** *radical lipídico ($L^{\cdot}$), radical peroxilo ($LOO^{\cdot}$), hidroperóxido (LOOH), antioxidantes (XH). Modificado bajo autorización de: Trostchansky, A.; Trujillo, M.; Castro, L.; y Rubbo, H. Estudio de las modificaciones oxidativas de la lipoproteina de baja densidad (LDL): análisis de la oxidación del componente lipídico y proteico. Actividad Práctica UTI-DREMR Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, 2007.*

En ausencia de iones metálicos los hidroperóxidos pueden acumularse en la membrana y alterar su función, pueden transformarse en aldehídos, dentro de los que el más estudiado es el malondialdehído (Halliwell 1991). Alternativamente el radical peroxilo puede dar origen a peróxidos cíclicos, los que pueden descomponerse para formar radicales lipídicos (Bunker 1992; Dargel 1992). A este fenómeno globalmente se le denomina lipoperoxidación y en ausencia de algún proceso que la inhiba puede provocar la rápida destrucción de la fase lipídica de las membranas (Niki, Yamamoto et al. 1991).

Dentro del proceso mismo de la lipoperoxidación, los radicales que se forman pueden actuar también sobre las proteínas de membrana, inactivando receptores o enzimas unidas a las membranas (Dean, Thomas et al. 1986), y lipoproteínas plasmáticas (Girotti 1998).

Un incremento en la lipoperoxidación ha sido también asociado con el envejecimiento (Knight, Smith et al. 1987).

2.2. Oxidación de proteínas.

En proteínas y carbohidratos, ER pueden inducir fragmentación con la pérdida de la función de estas moléculas. Los aminoácidos aromáticos, la cisteína, los enlaces

disulfuro y los enlaces peptídicos son fragmentados alterándose su estructura y su función.

El radical hidroxilo es muy reactivo con las proteínas y puede causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos, pero en particular ataca a la tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, metionina y cisteína (Vilar-Rojas, Guzman-Grenfell et al. 1996), forma entrecruzamientos de tipo covalente e induce la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función, o en mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas. Las proteínas oxidadas son fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas debido a la formación de grupos carbonilo, a la creación de nuevos grupos N-terminales, o a cambios conformacionales de la molécula (Prinsze, Dubbelman et al. 1990).

Datos experimentales muestran que el peroxinitrito ($ONOO^-$) oxida a las proteínas de membrana y citoplásmicas, afectando su naturaleza física y química (Koppal, Drake et al. 1999).

Diversas reacciones de oxidación pueden convertir algunos residuos de aminoácidos, como la prolina, la arginina y la lisina, a derivados de tipo carbonilo. La presencia de este grupo químico se ha utilizado como un parámetro para evaluar el daño oxidativo en las proteínas (Oliver, Starke-Reed et al. 1990; Sundari, Wilfred et al. 1997).

En pacientes con envejecimiento prematuro, como la progeria, la cantidad de grupos carbonilo en sus células es significativamente mayor que las de individuos normales de la misma edad. Este incremento de proteínas dañadas podría relacionarse con deficiencias en su eliminación, o con un incremento en la tasa de oxidación de proteínas durante el envejecimiento (Leeuwenburgh, Hansen et al. 1998).

Las alteraciones conformacionales provocadas en las proteínas por ER se relacionan con la pérdida de la actividad catalítica de enzimas (Prinsze, Dubbelman et al. 1990). La inactivación de enzimas por la oxidación inducida por medio de radicales libres y la acumulación intracelular de proteínas oxidadas, podrían jugar un papel crítico en la alteración de las funciones celulares y en la muerte celular (Sundari, Wilfred et al. 1997). La disminución substancial en la concentración de las enzimas en la fisiología de la célula y la acumulación de cantidades masivas de proteínas dañadas compromete seriamente la integridad celular (Stadtman 1992). A nivel de la membrana plasmática, las alteraciones inducidas sobre sus proteínas afectan a los transportadores, los canales proteicos, los receptores o proteínas reguladoras y a los inmunorreguladores (Saran and Bors 1990). La combinación de todas estas alteraciones puede tener consecuencias letales para las células.

3. Sistemas antioxidantes en los GR.

Los GR se encuentran constantemente expuestos a estrés oxidativo debido al alto flujo de oxígeno y procesos de auto oxidación. Se define como estrés oxidativo al desbalance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, lo que puede causar daño y está relacionado con diversas patologías humanas.

El daño oxidativo puede ocurrir por un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs), las cuales pueden ser radicales libres (superóxido, hidroxilo, peroxilo, alcohoxilo, hidroperoxilo) o no (peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, oxígeno singulete, peroxinitrito). Si estos tienen una concentración muy elevada, se produce la oxidación de moléculas biológicas (proteínas, hidratos de carbono, ADN y lípidos) (Polidori, Stahl et al. 2001; María Martínez Sarrasague 2006).

Para defenderse del estrés oxidativo, los GR constan con un poderoso sistema antioxidante enzimático y metabólico. Las principales enzimas responsables de las defensas antioxidantes son catalasa, superóxido dismutasa, las peroxiredoxinas y glutatión peroxidasa.

3.1. Catalasa.

La catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) es una enzima tetramérica (240 kDa en mamíferos) y bisustrática con un grupo hemo. Esta se encarga de la conversión de peróxido de hidrógeno, resultante de la dismutación del superoxido, en oxígeno y agua (Eq. 2), siendo reciclada durante el ciclo catalítico, pero puede ser inactivada por exceso de superóxido (Lion, Crettaz et al. 2010).

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2 \quad (2)$$

En la mayoría de los casos presentan mecanismos catalíticos tipo ping-pong (enzima bisustrática sin formación de complejo ternario) con eficiencias catalíticas del orden $10^7\ M^{-1}s^{-1}$, que si bien son muy altas, son exclusivas para H_2O_2 ya que no puede actuar sobre otros sustratos.

En los eritrocitos la catalasa se encuentra mayoritariamente en el citosol, encontrándose también en pequeñas cantidades unida a la membrana (Allen, Cadman et al. 1977).

La catalasa protege a la hemoglobina en los GR, mediante la remoción de aproximadamente la mitad del peróxido de hidrógeno generado en los eritrocitos humanos normales (Gaetani, Galiano et al. 1989).

La misma se ha visto implicada como un factor importante en la inflamación, mutagenesis y prevención de la apoptosis (Halliwell and Gutteridge 1984; Sandstrom and Buttke 1993).

En humanos esta enzima esta codificada por un único gen ubicado en el cromosoma 11 y se expresa en todos los tejidos (Kittur, Hoppener et al. 1985). A pesar de su abundancia, la acatalasemia, una rara enfermedad hereditaria que resulta en la no expresión de catalasa, o en la expresión de una isoforma de menor actividad o inestable no compromete la viabilidad del organismo (Ogata 1991).

3.2. Superóxido dismutasa.

Esta enzima fue descubierta por Irwin Fridovich y Joe McCord (McCord and Fridovich 1969) y descripta en glóbulos rojos. Luego de su descubrimiento fue hallada en múltiples organismos, y su presencia demostró ser imprescindible para la vida aerobia (McCord, Keele et al. 1971).

La superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1), es una metaloenzima bisustrática (135kDa) que cataliza la dismutación del superóxido en peróxido de hidrógeno (Eq. 3) y oxígeno, auto reciclándose en el proceso.(Lion, Crettaz et al. 2010) La constante de reacción de la misma es del orden de $10^9\ M^{-1}s^{-1}$ (Fridovich 1989).

$$O_2\cdot^- + O_2\cdot^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \quad (3)$$

Esta reacción de dismutación utiliza la propiedad del radical superóxido de actuar como un oxidante o como un reductor, para deshacerse de su electrón extra o para captar otro. La SOD utiliza un radical superóxido para oxidar otro.

En mamíferos y la mayor parte de cordados existen tres isoformas SOD1 o Cu-Zn SOD, que es la forma citosólica; SOD2 o Mn-SOD, que se encuentra en las mitocondrias; y la SOD3 o EC-SOD, la forma extracelular, también dependiente de Cu y Zn (Weisiger and Fridovich 1973; Church, Grant et al. 1992; Carlsson, Jonsson et al. 1995). Además de estas, en los organismo procariotas existen formas dependientes de Mn, Fe y Ni (Ringe, Petsko et al. 1983; Stallings, Pattridge et al. 1985; Barondeau, Kassmann et al. 2004).

3.3. Glutation Peroxidasa.

La Glutatión Peroxidasa (GPx: EC 1.11.1.9) es la principal enzima en el sistema antioxidante dependiente de glutatión (GSH). La primera GPx, ahora llamada más comúnmente GPx citosólica o GPx1, fue descubierta en 1957 por Gordon C. Mills, como una enzima que protectora de la hemolisis por oxidación en los GR (Mills 1957). Al día de hoy se han identificado el menos 7 tipos de enzima (Rotruck, Pope et al. 1973; Papp, Lu et al. 2007).

La GPx cataliza la reducción de H_2O_2 en agua, con la subsiguiente oxidación de glutatión. La misma es reciclada por el sistema glutatión reductasa en forma dependiente de NADPH.

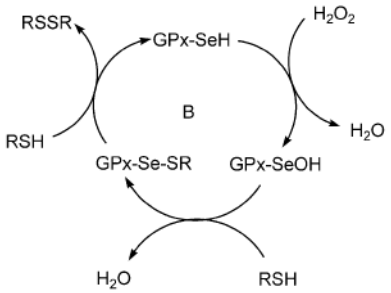


Figura 4. *Se observa un esquema de la reacción de la GPx con un tiol reductor (RSH) que en el caso de esta enzima es el GSH. Imagen obtenida de (Jacob, Giles et al. 2003).*

En vertebrados, se trata de una selenoenzima, siendo el sitio activo de la misma una selenocisteína (Chen, Dodia et al. 2000).

La GPx, al igual que la catalasa, puede utilizar H_2O_2 como sustrato. Sin embargo el ciclo redox del glutatión confiere mayor protección contra el estrés oxidativo medio, mientras que la catalasa confiere una mayor protección en casos de alto estrés oxidativo (Yan and Harding 1997).

3.4. Peroxiredoxinas.

Por último las peroxiredoxinas (Prx, 1.11.1.15) (Fig. 5) catalizan la reducción de H_2O_2, hidroperóxidos orgánicos y peroxinitrito (Lion, Crettaz et al. 2010), siendo la tercera proteína más abundante de los eritrocitos (Rinalducci, D'Amici et al. 2011).

Estas proteínas fueron descubiertas de forma independiente en varias oportunidades. Fueron vistas por microscopía electrónica por Harris (Harris 1968), como estructuras en forma de anillo asociadas a la membrana de los GR, y llamadas “torinas”. En 1980 fueron descriptas como un factor activador de las células natural killer y llamadas “MER5” “proteína de stress de macrófagos de 23kDa” o “calpromotina” (Flohe and Harris 2007).

En 1988 se descubrió una Prx en el sistema antioxidante de levadura “TSA” (Kim, Kim et al. 1988), en 1989 en Bacteria (Jacobson, Morgan et al. 1989), y en 1997 en tripanosoma (Nogoceke, Gommel et al. 1997).

Las Prx no presentan homología de secuencia significativa con otras peroxidasas. Tampoco contienen cofactores redox como hemo, flavinas o iones metálicos, sinó que se caracterizan por poseer un residuo de cisteína conservado y esencial para la catálisis en la región amino terminal llamada cisteína peroxidática (Chae, Uhm et al. 1994).

Aunque se trata en su mayoría de enzimas citosólicas, también existen Prx en la mitocondria, los cloroplastos, en peroxisomas, y asociadas con el núcleo y la membrana.

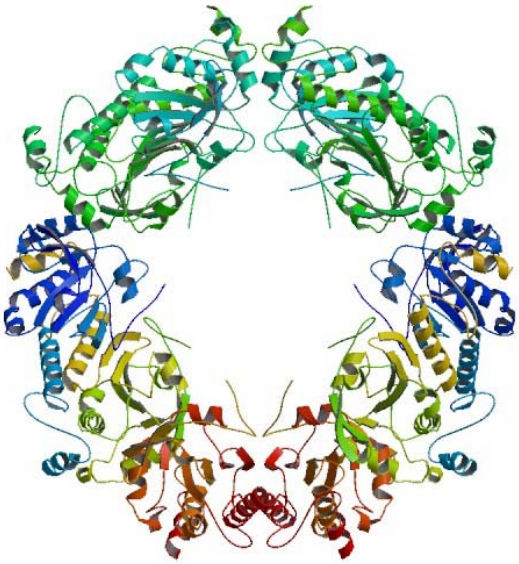


Figura 5. Peroxiredoxina de 2 cisteínas típica. *Peroxiredoxina 4 humana, en su forma reducida. Imagen obtenida de (Wang, Wang et al. 2011).*

En las células de mamífero los miembros de la familia de las Prx modulan los niveles de peróxido de hidrógeno inducido por citoquinas, lo cual media cascadas de señalización relacionadas con la prolifeación celular, diferenciación y apoptosis (Fujii and Ikeda 2002; Hofmann, Hecht et al. 2002).

Existen tres clases de peroxiredoxinas: Peroxiredoxinas de 2 cisteínas (2Cys Prx) típicas, en las que el ácido cisteín-sulfénico es atacado por la cisteína resolutiva de otra subunidad, resultando en la formación de un enlace disulfuro intersubunidad, o intermolecular, el cual puede ser reducido por tiorredoxina. 2Cys Prx atípicas, en las que la cisteína resolutiva se encuentra en la misma cadena polipeptídica y la reacción con la cisteína peroxidática resulta en la formación de un enlace disulfuro intramolecular, el cual es reducido por tiorredoxina. Finalmente, las peroxiredoxinas de 1 cisteína (1Cys Prx), sólo poseen la cisteína peroxidática, y el ácido cisteín sulfénico formado luego de la reacción con el peróxido es reducido por el GSH (Manevich, Feinstein et al. 2004).

Independientemente de la clase, el ciclo catalítico para la actividad peroxidasa en todas las Prx puede simplificarse a 3 pasos: peroxidación (reacción1), resolución (reacción 2) y reciclado (reacción 3). La peroxidación se produce en el sitio activo completamente plegado, el cual contiene cuatro residuos conservados: la cisteína peroxidática, arginina, treonina y prolina. Este microambiente en el sitio activo baja el valor de pKa de la cisteína peroxidática, el cual se encuentra en el rango de 5-6 (Ogusucu, Rettori et al. 2007; Nelson, Parsonage et al. 2008).

El anión tiolato ataca el peróxido para generar agua (o alcohol) y ácido Cys-sulfénico en el sitio activo (Poole 2007).

La resolución ocurre cuando la cisteína resolutiva ataca al ácido Cys-sulfénico para liberar agua y formar un enlace disulfuro inter subunidad. Finalmente el ciclo catalítico se completa, cuando el enlace disulfuro es reciclado (Hall, Karplus et al. 2009).

La tiorredoxina es reciclada por la tiorredoxina reductasa (TrxR) con equivalentes de reducción obtenidos del NADPH (Fig 5) (Felicia M. Low 2007). Mientras que el GSH es regenerado por el sistema glutatión reductasa.

Los GR humanos contienen Prx1, Prx2 (las cuales son Prx de 2 cisteínas típicas) y Prx 6 (Prx de 1 cisteína típica) (Rinalducci, D'Amici et al. 2011), siendo la más abundante la Prx2, con una concentración estimada dentro del glóbulo de 240µM (R. Blaine Moore and Plishker 1991).

3.4.1. Peroxiredoxina 2

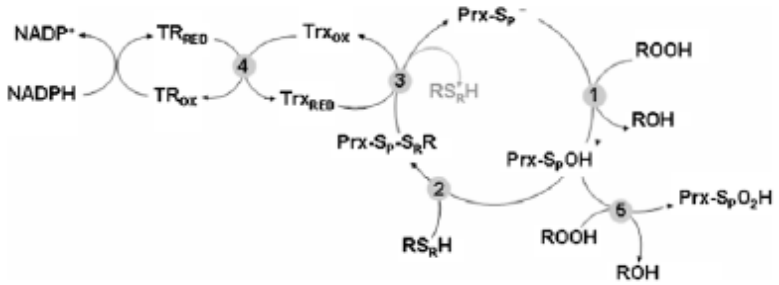


***Figura 6. Ciclo catalítico de una 2Cys Prx**, donde se observa 1, el ataque nucleolítico del sulfuro peroxidático al substrato (peróxido); 2, la reacción del ácido sulfenico con el tiol resolutivo; 3, la reducción del disulfuro; 4, la regeneración de la tioredoxina; y 5, la sobreoxidación del ácido sulfénico a ácido sulfínico. Imagen obtenida de* (Manta, Hugo et al. 2009).

La Prx 2 de mamíferos, es la tercera proteína en orden de abundancia en el GR (luego de la hemoglobina y la anhidrasa carbonica) (Manta, Hugo et al. 2009), y puede ser sobreoxidada por peróxido de hidrógeno a la forma ácido sulfínico o ácido sulfónico, suprimiéndose así la actividad peroxidasa de la misma y permitiendo la acumulación de peróxido de hidrógeno. Se ha sugerido que dicha acumulación puede actuar como una señal de transducción para varias vías (Felicia M. Low 2007).

Las 2 Cys Prx típicas forman dímeros tipo B o tipo A. Los tipo B (Nombre que adquieren por estar basados en hojas β) involucran la interacción borde-borde de la hoja β central de dos cadenas de Prx para dar una hoja β extendida (Wood, Poole et al. 2003). La interacción tipo A (de "alternativa") se basa en el empacado de una hélice α (hélice α3) con su contraparte en la otra cadena (Parsonage, Youngblood et al. 2005).

Si bien la unidad funcional mínima de la Prx 2 es dimérica, las estructuras cristalográficas muestran a la Prx2 como un decámero, formado por 5 dímeros (Karplus

and Hall 2007). Esta oligomerización es dependiente del estado redox de la proteína: la formación del enlace disulfuro debilita la estabilidad del decámero, por lo que la proteína en forma de disulfuro se presenta como dímero de tipo B, mientras que todos los demás estados de la proteína (C-SH, C-SOH, C-SO_2H, C-SO_3H) se espera estén presentes como decámeros estables (Wood, Poole et al. 2002; Guimaraes, Souchon et al. 2005).

3.5. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos se unen a los radicales libres, y los transfieren de sitios donde pueden provocar grandes daños (por ejemplo las membranas) a compartimentos celulares donde sus efectos son menos drásticos (por ejemplo el citoplasma), o los transforman en radicales menos agresivos.

3.5.1. Glutatión

Las defensas antioxidantes no enzimáticas de los GR están constituidas principalmente por GSH, un tiol de bajo peso molecular (Fig 7). El mismo es sintetizado de novo diariamente en el citoplasma de los GR, a partir de cisteína, glicina y ácido glutámico (Dekhuijzen 2004; Daniela Giustarini 2008). En un primer paso intervine la enzima γ-glutamilcisteina sintetasa, para formar γ-glutamilcisteína a partir de glutamato y cisteína (María Martínez Sarrasague 2006). En el segundo paso actúa la enzima glutatión sintetasa que forma glutatión a partir de glicina y γ-glutamilcisteína (Dekhuijzen 2004).

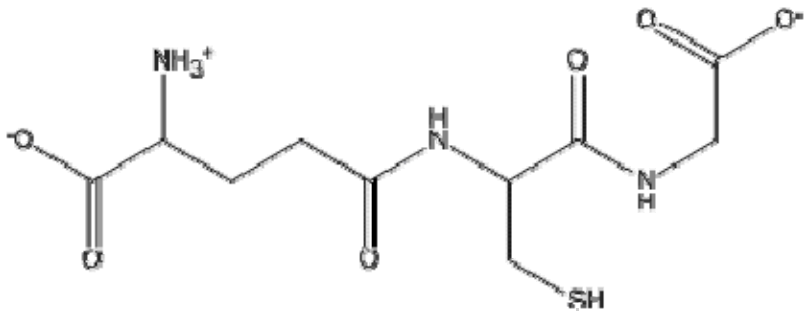


Figura 7. Fórmula química del GSH *o N- (N-L-gamma-glutamil-L-cisteinil) glicina, de peso molecular 307,33g/mol. Figura realizada con ChemDraw Ultra.*

El glutatión juega un papel importante en la protección celular contra el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Presenta una interacción sinérgica con otros agentes antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E y las superóxido dismutasas (Shan, Aw et al. 1990; Gerard-Monnier and Chaudiere 1996) y la capacidad de reactivar enzimas que son inhibidas al ser expuestas a altas concentraciones de oxígeno. El GSH también reacciona con peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos, en una reacción catalizada por la selenoenzima glutatión peroxidasa, para formar glutatión disulfuro (GSSG), el cual es reciclado nuevamente a GSH por el sistema

glutatión reductasa (GR) en forma dependiente de NADPH (Figura 8) (Flohe, Gunzler et al. 1973; Toppo, Flohe et al. 2009; Lion, Crettaz et al. 2010). En condiciones fisiológicas el balance GSH/GSSG se encuentra muy desplazado favoreciendo el GSH, proporcionando así una amortiguación eficiente (Lion, Crettaz et al. 2010).

Figura 8. Ciclo de oxidación-reducción de GSH.

Otros componentes importantes del sistema antioxidante no enzimático son α-tocoferol o vitamina E, β-caroteno, ascorbato o vitamina C, urato, bilirrubina y flavonoides.

3.5.2. α-tocoferol

El α-tocoferol está presente en las membranas celulares y en las lipoproteínas plasmáticas, y se caracteriza por presentar en su estructura un grupo -OH, del que el átomo de hidrógeno puede removerse fácilmente. Los radicales peroxilo formados durante la lipoperoxidación tienen una mayor afinidad por el α-tocoferol, que por las cadenas de los ácidos grasos adyacentes, la reacción convierte α-tocoferol en un radical, que es poco activo e incapaz de reaccionar con otros ácidos grasos, y de esta manera detiene la cadena de reacciones de la lipoperoxidación (Halliwell 1991; Bunker 1992). En este punto la vitamina C juega un papel importante ya que regenera la forma antioxidante de la vitamina E, además de que tiene la capacidad de reaccionar por sí misma con los radicales superóxido, hidroxilo y perhidroxilo (Odin 1997).

3.5.3. Ascorbato

La mayoría de los animales y plantas pueden sintetizar ascorbato a partir de glucosa, pero los humanos y otros primates , perdieron la enzima requerida para el último paso de la síntesis, la gulonolactona oxidasa, por lo que estas especies deben consumirlo con la dieta.

La vitamina C actúa como cofactor de numerosas enzimas. Se encuentra en fase acuosa, y es capaz de eliminar los radicales libres de los compartimentos hidrofílicos de la célula, de la matríz extracelular y del sistema circulatorio, reduciéndolos y convirtiéndose en radical ascorbilo, muy poco reactivo, que puede desproporcionarse posteriormente a dehidroascorbato y nuevamente a ascorbato.

La vitamina C también participa en la protección de las moléculas hidrofóbicas, como las lipoproteinas del plasma sanguíneo y de los lípidos de membrana.

3.5.4. β-caroteno

El β-caroteno tiene dos funciones: en primer lugar actúa directamente como atrapador del oxígeno simple y de lipoperóxidos, y en segundo lugar puede ser transformado a vitamina A en el intestino humano (Bunker 1992). Tanto el β-caroteno como la vitamina A son antioxidantes solubles en lípidos aunque existen evidencias de los efectos perjudiciales de la suplementación con estos compuestos (Huang, Caballero et al. 2006).

3.6. N-acetilcisteína

Para sobrellevar los efectos deletéreos del estrés oxidativo es esencial mantener niveles adecuados de GSH (Dekhuijzen 2004).

La cisteína es el aminoácido limitante para la síntesis del GSH, ya que a diferencia de lo que ocurre con los otros dos aminoácidos, no se recupera y su concentración intracelular es muy baja (María Martínez Sarrasague 2006). Sin embargo la forma activa de la cisteína, L-cisteína es poco soluble en solventes acuosos, y no ingresa fácilmente al GR (Dekhuijzen 2004). Para eliminar estas desventajas existe como proveedor de cisteína la N-acetil cisteína (NAC), un precursor del aminoácido, que se puede suministrar por vía oral o intravenosa a fin de aumentar los niveles de cisteína cuando se necesita tener elevadas las concentraciones del GSH (María Martínez Sarrasague 2006). NAC con su radical acetilo y su función amina, puede ingresar fácilmente a los GR por medio de la banda 3, y desacetilarse dentro de los mismos, para formar cisteína (Dekhuijzen 2004; Raftos, Whillier et al. 2007).

Otro precursor de la cisteína es un análogo de la 5-oxoprolina, la oxotiazolidina carboxilato que también puede aumentar los niveles intracelulares de GSH (María Martínez Sarrasague 2006).

La NAC tiene propiedades antioxidantes directas e indirectas (Dekhuijzen 2004). Su grupo tiol libre es capaz de interaccionar con los grupos electrofílicos de las especies reactivas del oxígeno, esta interacción produce la formación de un intermediario NAC disulfuro (Langley and Kelly 1993). NAC también tiene un efecto antioxidante indirecto debido a su rol en la formación de GSH (Aruoma, Halliwell et al. 1989; Dekhuijzen 2004).

A demás de su rol como antioxidante, NAC tiene otros mecanismos de acción como inhibición de la activación de los neutrófilos, disminución en la fijación microbiana y vasodilatación (Aitio 2006).

Se ha demostrado que el tratamiento de pacientes con enfermedad pulmonar crónica obstructiva con 1,2 o 1,8mg de NAC diariamente durante 2 meses mejora la forma de

los GR, reduce la concentración de H_2O_2 en 38-54% y aumenta la concentración de tioles un 50-68% (Dekhuijzen 2004).

Además la NAC se emplea en la clínica médica en los casos de intoxicación por paracetamol. La dosis recomendada en estos casos es una carga inicial de 140 mg/kg seguida de 17 dosis de 70 mg/kg cada 4 horas por vía oral (Smilkstein, Knapp et al. 1988).

4. Senescencia

Debido a la naturaleza estática del proteoma y repertorio enzimático de los GR, no resulta sorprendente que los mismos sufran la pérdida progresiva de su función principal (transporte de oxígeno), durante su vida de aproximadamente 120 días en la cirulación.

Existen 2 modelos principales de senescencia que han sido propuestos para describir la alteración de los GR y la respuesta al estrés *in vivo*: el modelo de eriptosis y el modelo de agrupamiento o clustering de la banda 3 (Lion, Crettaz et al. 2010).

4.1. Modelo de eriptosis.

El término eriptosis describe un conjunto de mecanismos en funcionamiento en los GR en respuesta a varios tipos de stress, que se parece mucho a la vía de apoptosis clásica (Lion, Crettaz et al. 2010).

Un evento inicial en la lesión de los GR es el influjo de calcio iónico (Lang, Lang et al. 2003; Lang, Birka et al. 2004). Las razones de este aumento son desconocidas, pero la actividad alterada de canales catiónicos no específicos es a menudo mencionada como una posible causa (Lang, Kempe et al. 2005; Lion, Crettaz et al. 2010).

La elevación de la concentración intracelular de calcio, conduce directamente a la activación de la escramblasa (la proteína responsable de la translocación de fosfolípidos entre las dos monocapas de la bicapa lipídica de la membrana celular), la cual perturba la asimetría normal de la membrana de los GR y produce externalización de fosfatidilserina (Lang, Lang et al. 2003; Lang, Lang et al. 2005; Nicolay, Bentzen et al. 2007; Lion, Crettaz et al. 2010). A nivel intracelular el influjo de calcio activa las calpainas, una familia de proteasas de cisteína que son fisiológicamente inhibidas por la unión de calpastatina (Foller, Huber et al. 2008; Lang, Gulbins et al. 2008).

Luego de la liberación de calpastatina y la unión de calcio, las calpaínas se unen a la parte interna de la membrana, donde degradan proteínas del citoesqueleto.

El aumento de calcio también activa directamente la transglutaminasa 2, la cual entrecruza proteínas del citoesqueleto. La acción combinada de la degradación por

calpaína y de la transglutaminasa 2, es probablemente, responsable por la pérdida de plasticidad del citoesqueleto y de la deformabilidad celular (Lion, Crettaz et al. 2010).

Es también importante el rol del calcio en la disrupción de la interacción entre la Banda 3 con la proteína tirosina fosfatasa 1B. En condiciones fisiológicas, la tirosina fosfatasa 1B se une al dominio citosólico de la banda 3 y mantiene el estado de dos tirosinas fosforiladas (Low, Allen et al. 1987; Low, Willardson et al. 1991). Cuando la interacción es interrumpida por el calcio, el estado de fosforilación del dominio citosólico de la banda 3 es modificado, sirviendo esto posiblemente como mecanismo de señalización (Willardson, Thevenin et al. 1989).

El modelo de eriptosis explica la pérdida de deformabilidad celular y posibles alteraciones glicolíticas debido a modificación en las interacciones con el dominio citosólico de la banda 3, sin embargo este modelo no explica el remarcable control de la vida media en la circulación, y la relevancia del envejecimiento en la senescencia no ha sido establecida (Lion, Crettaz et al. 2010).

4.2. Modelo de clustering de la banda 3

En la circulación los GR tienen una vida media de 120 ± 4 días, es muy poco probable que un control tan preciso resulte de una acumulación progresiva de lesiones, resultando en la muerte y hemolisis del GR, es sin embargo mucho más probable que resulte de un mecanismo no lineal específico y controlado inducido en el torrente sanguíneo (Lion, Crettaz et al. 2010).

En los GR envejecidos la Banda 3 forma acúmulos (clusters) (figura 9), que son reconocidos por anticuerpos naturales, el mecanismo de formación de clusters no es completeamente conocido, pero es atribuido mayoritariamente a lesiones oxidativas, formación de hemicromo y polimerización con el dominio citosólico de la banda 3 (Arese, Turrini et al. 2005).

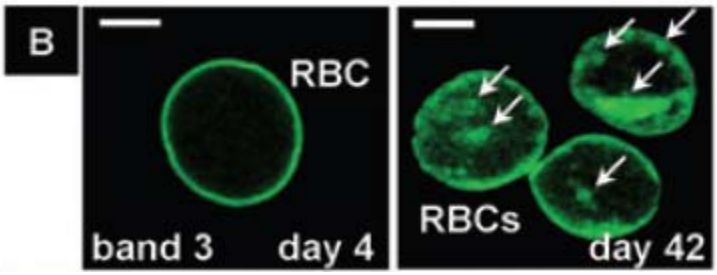


***Figura 9**. **Micrografía fluorescente de GR** almacenados en CPD-SAGM. En la izquierda se observa un GR de 4 días de almacenamiento, mientras que en la derecha se observan imágenes de GR almacenados por 42 días. En esta figura se puede observar la formación de clusters (flechas) durante el almacenamiento. Imagen obtenida de (Antonelou, Kriebardis et al. 2010).*

Los GR se encuentran constantemente expuestos a un flujo de oxígeno, en la unión al mismo, un electrón es transferido del hierro al oxígeno formando así un complejo superóxido-hierro férrico.

Normalmente el electrón compartido es devuelto al hierro con la liberación del oxígeno, sin embargo en algunos casos se da la captura del electrón por el oxígeno, formando superóxido, y hierro en estado férrico, produciendo la autooxidación de la hemoglobina en metahemoglobina (metHb o HbFe(III)) (Eq. 4) (Arese, Turrini et al. 2005).

$$HbFe(II)O_2 \xrightarrow{\text{autooxidación}} HbFe(III) + O_2^{\cdot-} \quad (4)$$ (Kanias and Acker 2010)

Esta metHb conteniendo ion Fe(III) es normalmente reciclada a Hb funcional por el sistema metHb reductasa, dependiente de NAD/NADH, pero puede también acumularse en el lado interno de la membrana del GR donde genera EROs por las reacciones de Fenton y Haber Weiss (Arese, Turrini et al. 2005).

La producción local de EROs puede ser altamente deletérea para las proteínas, resultando en la formación de compuestos derivados de hemoglobina, clivaje proteico, entrecruzamiento y modificaciones en la cadena lateral, y para la membrana misma por lipoperoxidación (Kanias and Acker 2010; Lion, Crettaz et al. 2010).

La formación de hemicromos es directamente responsable de alteraciones en la plasticidad del citoesqueleto y por lo tanto mayor rigidez del GR (Lion, Crettaz et al. 2010).

Se cree que los hemicromos contribuyen a la formación de clusters de la Banda 3 en la membrana (Arese, Turrini et al. 2005). En condiciones fisiológicas la banda 3 está presente en la membrana del GR como complejos tetraméricos con proteínas Rh (Lion, Crettaz et al. 2010). Esta asociación parece ser bastante dinámica, y cuando los hemicromos se acumulan y entrecruzan a los dominios citosólicos de la Banda 3 se produce la formación de multímeros de Banda 3 en la membrana (Lutz, Bussolino et al. 1987). El modelo más aceptado de senescencia de los GR debido al clustering de la Banda 3, establece que estos multímeros son reconocidos por anticuerpos naturales (más específicamente inmunoglobulina G) que tienen baja afinidad por la Banda 3 en condiciones fisiológicas, pero tienen afinidad aumentada por los clusters de Banda 3 (Low, Waugh et al. 1985; Kannan, Labotka et al. 1988; Bosman, Werre et al. 2008; Lion, Crettaz et al. 2010).

Finalmente los GR son removidos de la circulación mediante fagocitosis por los macrófagos del sistema retículo endotelial, principalmente en la médula ósea, el hígado y el bazo.

Luego de la destrucción la hemoglobina es degradada a hemo y globina, los aminoácidos de la globina son reutilizados en el metabolismo proteico, mientras que el hemo es degradado a biliverdina y hierro y este último es reutilizado en la generación de nuevos GR (Minors 2004).

5. Glóbulos rojos en conservación.

La transfusión sanguínea es un proceso vital, que logra salvar muchas vidas. Su principal objetivo es sustentar la oxigenación de los tejidos y de los órganos en casos de hemorragia masiva o anemia aguda.

Los concentrados de eritrocitos se obtienen a partir de donaciones de sangre completa, la cual es colectada en solución anticoagulante, típicamente, citrato, fosfato, dextrosa (CPD). A esta solución se le remueve el plasma y los leucocitos mediante centrifugación, y convencionalmente se almacenan los GR en solución de conservación a 4ºC. Siendo actualmente las soluciones más frecuentemente utilizadas SAGM (sodio, adenina, glucosa, manitol) y PAGGSM (fosfato, adenina, glucosa, guanosina, salino, manitol) (Lion, Crettaz et al. 2010).

La duración del almacenamiento de GR se define como el tiempo luego del cual el 75% de los GR transfundidos sobrevive en el torrente circulatorio del receptor por 24hs luego de la transfusión (Hess and Greenwalt 2002). La misma depende de la solución de almacenamiento utilizada siendo de 42 días para SAGM y de 50 días para PAGGSM (Lion, Crettaz et al. 2010).

Una forma de aumentar el tiempo de almacenamiento es mediante crioconservación; la misma consiste en el almacenamiento a -80 o -196ºC, el cual es posible mediante el agregado de un agente crioprotector como ser el glicerol (Valeri 1975). Sin embargo este método no es comunmente utilizado debido a que requiere un refrigerador de temperaturas ultra bajas, o un contenedor de nitrógeno líquido, y el transporte de los GR es muy difícil, o incluso imposible en algunas condiciones ambientales (Han, Quan et al. 2005).

5.1. Lesiones de almacenamiento.

Aunque las soluciones de almacenamiento cumplen con la función de minimizar las alteraciones deletéreas, las condiciones de almacenamiento no se parecen a las condiciones fisiológicas, lo que tiene como consecuencia alteraciones en los GR (Lion, Crettaz et al. 2010), las cuales pueden alterar su función biológica, a estos cambios se refiere como “lesiones de almacenamiento”.

Varios análisis recientes indican que el tiempo de almacenamiento de los glóbulos rojos se correlaciona directamente con los efectos adversos luego de la transfusión. Observándose que las transfusiones de eritrocitos con 15 o más días de

almacenamiento, se relacionan con resultados adversos que pueden llevar a la muerte del paciente (Buehler, Karnaukhova et al. 2011).

5.1.1. Cambios en la conformación.

Entre los principales cambios biomecánicos que sufren los GR se encuentra la alteración de la membrana. Durante el almacenamiento los GR sufren cambios morfológicos que progresivamente los transforman de discos bicóncavos deformables a equinocitos con salientes y finalmente a equinocitos esféricos (Nadeem, Chhabra et al. 2003). Estos cambios de forma son reversibles por transfusión en un principio, pero se vuelven irreversibles al final del período de almacenamiento (Hess and Greenwalt 2002; Lion, Crettaz et al. 2010).

En paralelo con estos cambios, se produce redistribución y pérdida de fosfolípidos en la membrana de los GR, debido a la formación de microvesículas (Hess and Greenwalt 2002; Almac and Ince 2007; Antonelou, Kriebardis et al. 2010). Estas son vesículas de menos de 0,5µm, ricas en fosfolípidos que son emitidas por los GR viables posiblemente como método de eliminación de compuestos deletéreos que de otra forma producirían lesiones celulares definitivas (Lion, Crettaz et al. 2010). Estos cambios producen una disminución en la deformabilidad de la membrana celular, lo que se asocia con una menor sobrevida durante las 24hs post transfusión (Hess and Greenwalt 2002; Almac and Ince 2007; Bosman, Werre et al. 2008).

Giel.J.Bosman y colaboradores estudiaron los cambios en las proteínas de membrana de los GR y las microvesículas durante el almacenamiento. La formación de microvesículas, es una característica de las células quiescentes y se asocia con la pérdida de simetría de la membrana del GR. La razón por la que las células forman microvesículas es para prevenir su eliminación, desasiéndose de moléculas señalizadoras de fagocitosis (Blum 2009).

Ellos encontraron 257 proteínas diferentes en la membrana de los GR al comienzo del almacenamiento, número que disminuye con el tiempo de almacenamiento, especialmente en el período entre 3 y 21 días de almacenamiento (Willekens, Roerdinkholder-Stoelwinder et al. 2003; Bosman, Lasonder et al. 2008). Esta disminución se debe principalmente a una disminución en el número de proteínas chaperonas, componentes del proteosoma y pequeñas proteínas G, proteínas que se ven aumentadas en las microvesículas con el almacenamiento. La composición proteica de las microvesículas también difiere de la composición de la membrana del GR en que las microvesículas contienen menor número de proteínas de membrana, mayor número de enzimas metabólicas y mayor contenido de Hb. Las vesículas prácticamente no contienen proteínas integrales de membrana ni componentes citoesqueléticos, con la excepción de actina y la Banda 3 (Bosman, Lasonder et al. 2008).

Los cambios en la estructura de la membrana, pueden activar mecanismos de remoción, que producen que las células sean eliminadas de la circulación. Por ejemplo la proteína Banda 3, un intercambiador de carbonato/cloruro, y la proteína más abundante de la membrana del eritrocito relacionada en el transporte de oxígeno, une anticuerpos y está relacionada con la eliminación de los GR de la circulación. Kriebardis et al, estudiaron la localización de la Banda 3, y encontraron que durante el almacenamiento el dominio citosólico de la banda 3 aparece en el citosol, demostrando un clivaje en la región N-terminal de la proteína y un cambio en la localización (Lion, Crettaz et al. 2010). Los mismos autores evidenciaron la acumulación de IgGs en la superficie celular , así como reorganización de proteínas lipid raft, acumulación de proteínas de membrana dañadas por oxidación y acumulación y agrupación de dímeros de hemoglobina en la parte interna de la membrana plasmática (Kriebardis, Antonelou et al. 2007).

La reorganización de la membrana se acompaña en algunos casos por la exposición de fosfatidilserina a la parte exterior de la membrana plasmática. Normalmente la fosfatidilserina es secuestrada al interior de la membrana por un sistema complejo compuesto por flipasa, flopasa y escamblasa (Lion, Crettaz et al. 2010).

5.1.2. Cambios bioquímicos.

Por otro lado el principal cambio bioquímico que sufren los GR almacenados es la pérdida de 2, 3-DPG. Este metabolito, responsable de la modificación alostérica de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, disminuye rápidamente durante las primeras dos semanas de almacenamiento hasta niveles casi indetectables (Almac and Ince 2007; Bennett-Guerrero, Veldman et al. 2007). Lo cual produce un aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, lo que podría explicar la disminución de la habilidad de repartir oxígeno que sufren los GR durante el almacenamiento. Sin embargo, esta consecuencia parece no ser de demasiada gravedad y los niveles de 2,3-DPG parecen comenzar a restaurarse luego de la transfusión (Raat, Verhoeven et al. 2005), siendo los niveles de recuperación observados de 25-30% luego de una hora, 50% luego de 24hs y 100% luego de tres días.

Otro cambio bioquímico que ocurre en las células almacenadas es la disminución en los niveles intracelulares de ATP (Raat, Verhoeven et al. 2005). Esta molécula además de poseer un rol secundario en la deformabilidad de membrana, es crucial para la función de los GR, debido a su rol central en el metabolismo y como fuente de energía (Almac and Ince 2007).

La depleción de ATP y el pool de adenina en los GR no determina directamente su sobrevida, pero tiene un rol importante en el mantenimiento de estructura de la membrana celular y de la función celular, asociándose con la habilidad de los GR de

repartir oxígeno a las células, la cual se ve reducida en GR envejecidos (5 a 6 semanas de almacenamiento) (Bosman, Werre et al. 2008).

Otro efecto del almacenamiento de los GR que tiene impacto directo en su función es la pérdida de S-nitrosotiol-hemoglobina (SNO-Hb) (Bennett-Guerrero, Veldman et al. 2007; Isbell, Sun et al. 2008). En la circulación la vasodilatación es controlada por NO, cuando la tensión local de oxígeno es baja los eritrocitos liberan NO que induce vasodilatación local y permite que el flujo de GR coincida con la demanda de oxígeno. Se cree que SNO-Hb está involucrado en la generación de NO por los eritrocitos, aunque esta hipótesis es cuestionada (Lion, Crettaz et al. 2010).

Existe evidencia que el SNO-Hb desaparece de la sangre almacenada unos días luego de la colección, y esta disminución en SNO-Hb se correlaciona con una pérdida de actividad vasodilatadora en los GR almacenados (Hess and Greenwalt 2002; Bennett-Guerrero, Veldman et al. 2007; Reynolds, Ahearn et al. 2007). Sin embargo los niveles de NO, parecen ser restaurados rápidamente luego de las transfusión, tanto en células nuevas como envejecidas, por lo que los efectos de la biodisponibilidad de NO en sangre transfundida serían transitorios (Tsai, Hofmann et al. 2010).

Un efecto más clásico es el flujo de sodio y potasio, a la temperatura de almacenamiento de 4ºC, la bomba de sodio potasio se encuentra inactiva, resultando en el influjo de sodio en los eritrocitos, y una masiva pérdida de potasio hacia el medio de almacenamiento, lo que hace que la transfusión masiva sea peligrosa para los recién nacidos y para los niños, en los cuales es necesario el lavado celular o remoción del medio de almacenamiento.

Luego de la transfusión el restablecimiento de los niveles normales de sodio en las células lleva típicamente 24hs, mientras que la normalización de la concentración de potasio puede llevar hasta cuatro días (Lion, Crettaz et al. 2010).

Los glóbulos rojos conservados en solución de almacenamiento citrato, fosfato, dextrosa, adenina, por hasta 6 semanas, sufren daño oxidativo caracterizado por la unión de Hb desnaturalizada a los fosfolípidos de membrana y a proteínas del citoesqueleto. La incidencia del daño a la membrana inducido por Hb aumenta en función del período de almacenamiento, alcanzando niveles significativos de aductos Hb-membrana luego de 35 días (Buehler, Karnaukhova et al. 2011). Por lo que se cree que los cambios de membrana se deben principalmente a la oxidación de la hemoglobina, rápida pérdida de hemo y luego captación de hemo en la membrana.

El primer evento que activa esta reacción en cadena comienza con la unión de Hb al extremo citoplasmático de la banda 3 en la membrana de glóbulos rojos (Nagababu, Mohanty et al. 2010). Como deoxyHb tiene mayor afinidad por la banda 3 que oxyHb, las condiciones de hipoxia de la microcirculación favorecen la unión a la membrana. La

oxigenación parcial de Hb que permite la unión a la membrana, aumenta también el índice de autoxidación de Hb.

La autooxidación de Hb unida a la membrana produce un pool de H_2O_2, el cual puede ser removido por peroxiredoxina o por glutatión peroxidasa, la actividad de estas enzimas depende del poder reductor NADPH/NADH, el cual disminuye con la edad de las células.

Bajo estas condiciones, el H_2O_2 reacciona con Hb iniciando así un ciclo redox destructivo que resulta en la formación de productos de degradación del hemo.

En la circulación, el hemo liberado de la Hb durante la hemólisis de los GR, es inmediatamente oxidado a su estado férrico (algunas veces llamado hemina), el cual puede catalizar la formación de EROs, lo que conlleva daños en los GR (Buehler, Karnaukhova et al. 2011).

OBJETIVOS

6. Objetivo General

Este proyecto propone el estudio del efecto del almacenamiento sobre la concentración y funcionalidad de los antioxidantes citosólicos de los concentrados de glóbulos rojos, y el efecto que tiene sobre éstos el agregado de N-acetil cisteína a la solución de conservación.

7. Objetivos Específicos

7.1. Medida de la concentración y estado redox de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular.

Para la observación del estado de los glóbulos rojos a distintos tiempos de almacenamiento en presencia y en ausencia NAC se realizará una medida de la concentración y estado redox de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular mediante el método de Ellman.

7.2. Estudio del estado redox de proteínas intracelulares.

Mediante la realización de electroforesis, electroforesis diagonales y western blots se observará, el estado de la Prx2 a diferentes períodos de almacenamiento.

También se observará el estado redox de la hemoglobina, mediante la medida de metahemoglobina intracelular.

7.3. Capacidad de consumo de H_2O_2 por la maquinaria antioxidante.

Se observará la capacidad de consumo de H_2O_2 por medio de la maquinaria antioxidante intracelular, como forma de medir el estado de las enzimas intracelulares, y su cambio con el almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

8. Reactivos y equipos

Se utilizaron reactivos obtenidos de Sigma, AppliChem y Acros organics.

Las medidas de absorbancia se realizaron en lector de placas Microplate reader (Mrc), exceptuando las medidas para determinación de concentración de hemoglobina, las cuales se realizaron en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo), y las medidas puntuales para cuantificación de H_2O_2 las cuales se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50.

Todas las centrifugaciones fueron llevadas a cabo en ultracentrífuga SIGMA.

9. Obtención de las muestras.

Los concentrados de glóbulos rojos humanos fueron aportados por el Banco de Sangre del Hospital de Clínicas y se preservaron en las mismas condiciones que en el banco (en solución SAGM a 4ºC). Previo a la obtención de los mismos se obtuvo el consentimiento de los donantes así como la aprobación del comité de ética del Hospital de Clínicas.

Se trató siempre de bolsas de donantes AB positivo, conteniendo aproximadamente 400 ml totales, incluyendo, además del concentrado de GR, 100 ml de SAGM (solución salina de adenina, glucosa y manitol) y 68 ml de CPD (citrato, fosfato, glucosa).

Se realizaron extracciones periódicas de los mismos, en condiciones estériles, para su análisis.

10. Agregado de N-acetil cisteina

Para el agregado de N-acetil cisteína (NAC) se dividió el contenido de una bolsa de transfusión en 2 bolsas. El procedimiento se realizó en condiciones estériles conectando ambas bolsas mediante sus tubuladuras.

A una bolsa se le agrego NAC diluido en PBS, y filtrado con filtro sartorius minisart de tamaño de poro 0.20µM. Se trabajó con una concentración final de NAC igual a 1mM.

A la otra bolsa se le agregó un volumen equivalente de PBS, filtrado del mismo modo.

11.Lavado y lisis celular.

11.1. Lavados con PBS

Se realizan 3 lavados del concentrado de GR con PBS (10mM fosfato, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,4), para lo que se centrifuga durante 10minutos a 1000xg y 4ºC para bajar los GR, se descarta el sobrenadante y se remplaza el mismo con el volumen equivalente de PBS.

Finalmente se lisa con un volumen de solución hipotónica (PBS diluido 10 veces).

11.2. Lavado y pretratamineto con NEM.

Se realizan 3 lavados del concentrado de GR con PBS (10mM fosfato, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,4), como fue descrito previamente.

Se centrifuga durante 10 minutos a 1000xg y 4ºC para bajar los GR, los cuales se resuspenden en PBS conteniendo 100mM N-etilmaleimida (NEM) y se incuban 15 minutos a temperatura ambiente, según descripto por (Low, Hampton et al. 2007).

Finalmente se lisa con buffer de lisis no reductor (2mM fosfato, 14mM NaCl, 0,3mM KCl, pH7,4, NEM 10mM).

12. Cuantificación celular.

Posteriormente a los lavados realizados luego de cada extracción se realiza un conteo del número de células totales, a modo de trabajar siempre con la misma cantidad. El conteo se realiza mediante una cámara de Neubauer, y utilizando un microscópio óptico XDS-1B.

13. Cuantificación de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular mediante reacción de Ellman.

Luego de lavar y lisar los GR, se precipitan las membranas centrifugando durante 15 minutos a 7000xg. El sobrenadante es aislado y ultrafiltrado durante 30min a 5000xg y 4ºC, vortexeado durante 1 min y filtrado nuevamente el mismo tiempo y en las mismas condiciones. Se utilizan filtros de tamaño de poro igual a 10kD (Millipore, IL), a modo de obtener el contenido citosólico de bajo peso molecular (menor a 10kDa).

Una vez obtenido el contenido citosólico de bajo peso molecular se procede a cuantificar los grupos sulfhidrilos del mismo mediante el método de Ellman (Butterworth, Baum et al. 1967; Dietz and Rubinstein 1972; Eyer and Podhradsky 1986; Learmonth 1996). El mismo se basa en la reacción cuantitativa del tiol con el ácido 5-5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), lo que produce una mezcla de disulfuros y ácido 2-nitro5-tiobenzoico (TNB), el cual puede ser cuantificado por la absorbancia del anión a 412nm(Kinsella 1975; Riddles, Blakeley et al. 1979; Woodward, Tate et al. 1993; Learmonth 1996).

Las medidas se realizaron por triplicado.

La curva de calibración se realizó con glutatión de concentraciones entre 6 y 250µM en buffer 100mM fosfato de potasio conteniendo 100µM ácido dietilen triamino pentaacético (DTPA).

La reacción fue llevada a cabo en placas de 96 pocillos (grener-Microlon), y se utilizaron diluciónes (1/5 y 5/2) del contenido citosólico filtrado.

14. Consumo de peróxido extracelular por la maquinaria antioxidante de los glóbulos rojos.

Los GR, luego de lavados son tratados con H_2O_2 1mM (en PBS) durante, 5 o 30 minutos y a 37ºC.

Luego del tratamiento se centrifuga la mezcla a 1000xg para bajar las células, se alícuota el sobrenadante y se congela a -20ºC hasta su procesamiento.

Finalmente se cuantifica el H_2O_2 extracelular remanente mediante oxidación del compuesto 2,2'-acino-bis(3-etilbenzatiasolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) en presencia de peroxidasa de rábano (HRP) (Ekaterina N. Kadnikova 2002; Huang, Ou et al. 2005).

Para la cuantificación se utilizan placas de 96 pocillos (grener-Microlon), y diluciones (1/5, 1/10 y 1/20) del sobrenadante previamente congelado. Las medidas se realizan por triplicado.

15. Concentración de hemoglobina intracelular.

Se observó el estado de oxidación de la hemoglobina intracelular, mediante la medida de la concentración de metahemoglobina en los GR con el tiempo. Para ello se midió la absorbancia de un lisado de GR en los picos de absorción de la metahemoglobina: 500nm ($\varepsilon_{Hemoglobina}$= 10,5 $mM^{-1}cm^{-1}$), y 623nm ($\varepsilon_{Hemoglobina}$= 3.63 $mM^{-1}cm^{-1}$). Y se observó cómo varía la misma con el tiempo de almacenamiento, y con el agregado al inicio del mismo de NAC.

Para la cuantificación se utilizan placas de 96 pocillos (grener-Microlon), y diluciónes (1/200) del sobrenadante previamente congelado. La absorbancia se midió por triplicado.

16. Electroforesis y Western Blot

16.1. SDS-PAGE y Western Blot en 1 dimensión (1D).

A modo de observar la enzima peroxiredoxina 2, se corre SDS-PAGE a 60V, con el contenido citosólico de los GR, en gel de poliacrilamida 12,5%, y con concentrador 5%. Finalmente se revela mediante tinción con Coomassie Colloidal Blue o Western Blot anti Prx2. Para este se utiliza como anticuerpo primario anticuerpo monoclonal de ratón Anti Prx2, y como anticuerpo secundario anticuerpo anti ratón conjugado a peroxidasa (Kompoliti K. 2010).

16.2. Electroforesis y Western Blot diagonales

Para las electroforesis diagonales se utilizó el método descripto por Brian McDonagh (McDonagh 2009).

Se corre una primera dimensión de electroforesis desnaturalizante con buffer de la muestra sin β-mercaptoetanol a 60V (Braun, Kinkl et al. 2007; McDonagh 2009). Se recorta el carril, se trata con ditriotreitol (DTT) 2% y luego con iodoacetamina (IAM) 2,5%, en buffer de equilibración (6M Urea, 0,375M Tris, 2% SDS, 20% glycerol, pH 8,8). Para luego correr la segunda dimensión a 60V (Braun, Kinkl et al. 2007; McDonagh 2009).

Finalmente se revela mediante tinción con Coomassie Colloidal Blue o realizando un Western Blot anti Prx2 (Kompoliti K. 2010).

16.3. Electroforesis y Western Blot diagonales, pretratamiento con NEM.

Se corren las electroforesis diagonales previamente descriptas, con el citosol de los GR que fueron tratados con NEM, por lo que contienen bloqueados los grupos tiol.

16.4. Estadística.

En todos los casos se utilizó un mínimo de 3 muestras para los cálculos, y se expresaron los resultados como el promedio ± el desvío estándar.

Para la medida del grado de significancia de los datos obtenidos se utilizó el test ANOVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

17. Cuantificación de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular.

La reacción de Ellman, que se empleó para la determinación de sulfhidrilos de bajo peso molecular dentro de los eritrocitos, es ampliamente utlizada para medir la concentración de tioles en una muestra. Los tioles reaccionan con el ácido 5-5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) DTNB, produciendose así una ruptura del enlace disulfuro para dar 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB^-).

En solución acuosa, neutra o alcalina NTB^- se ioniza a NTB^{2-}, un compuesto de color amarillo. El NTB^{2-} puede ser cuantificado mediante medida de absorbancia en el visible (412nm).

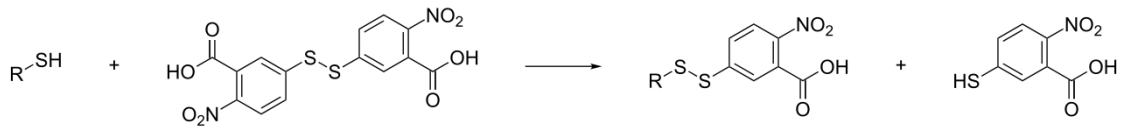


Figura 10. Reacción del DTNB con un tiol (R-SH).*Se trata de una reacción rápida y estequiométrica, en la que un mol de tiol produce un mol de NTB libre.*

Se realizó una curva de calibración a partir de las absorbancias obtenidas mediante el método de Ellman, para distintas concentraciones de GSH. A las absorbancias obtenidas por triplicado se les restó el blanco y se promediaron, para luego graficarlas frente a las concentraciones de GSH correspondientes.

Este procedimiento se repitió para cada experimento, por lo que debido a la gran cantidad de curvas de calibración realizadas sólo se muestra una de manera ilustrativa (Figura 11).

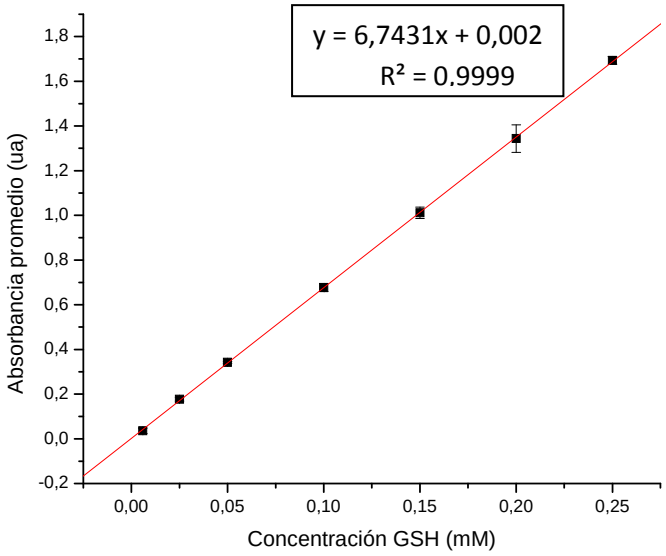


Figura 11. Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de GSH. *Este modelo de curva fue utilizado para la obtención de la concentración de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular.*

A partir de las curvas de calibración realizadas se obtuvo el coeficiente de extinción molar (6,74 $mM^{-1}cm^{-1}$), que se empleó para calcular la variación en las concentraciones de sulfhidrilos de bajo peso molecular con el tiempo de almacenamiento. Luego de lisar los glóbulos y aislar mediante centrifugación la fracción citosólica, los sulfhidrilos de bajo peso molecular se separaron de las proteínas mediante ultrafiltración (filtros de 10 kDa). Las medidas se realizaron por triplicado y al menos en 2 muestras distintas, luego se promediaron y se calculó el desvío estándar. En la tabla 1 se pueden observar los resultados.

En las bolsas de concentrados de GR para almacenamiento, el hematocrito corresponde aproximadamente al 70% del volumen total, siendo el volumen corpuscular medio de un GR $9x10^{-14}$ L. Con estos datos se puede obtener, a partir de la concentración de sulfhidrilos en el contenido citosólico total de los GR (tabla 1), la concentración si se tratara de una solución conteniendo únicamente GR.

Primero se calcula la cantidad de células en un litro de solución, si la misma contuviera únicamente células (hematocrito = 100%).

1 célula ~ $9x10^{-14}$ L
X ~ 1 L → X = $1,1x10^{13}$ células

Sin embargo las bolsas de almacenamiento contienen un hematocrito de aproximadamente el 70%, por lo que se calcula la cantidad de células por litro, para una bolsa de almacenamiento.

Tabla 1. *Variación en la concentración de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo PM con los días de almacenamiento en los concentrados de GR.*

Concentración SH de bajo peso molecular (mM)		
Días de almacenamiento	**Muestra suplementada con PBS**	**Muestra suplementada con NAC 1mM**
3	1,70 ± 0,09	1,02 ± 0,86
21	0,22 ± 0,05	0,57 ± 0,06
42	0,60 ± 0,01	0,62 ± 0,02
60	0,81 ± 0,06	0,44 ± 0,03

$1{,}1\times10^{13} \times \frac{70}{100} = 8\times10^{12}$ células por litro

Finalmente se calcula la concentración por litro de GR.

$[SH]_{tot} \sim 8\times10^{12}$ células
$X \sim 1{,}1\times10^{13}$ células $\rightarrow X = [SH]_{GR}$

Donde $[SH]_{tot.}$ corresponde a la concentración de sulfhidrilos de bajo peso molecular obtenida en el filtrado, y $[SH]_{GR.}$ Corresponde a la concentración de sulfhidrilos de bajo peso molecular en una solución conteniendo únicamente GR.

Existe un cálculo más sencillo para obtener la concentración de sulfhidrilos para una solución de GR, el cual consiste en multiplicar la concentración obtenida en el filtrado por 100/70.

A partir de los datos de la tabla 1 y utilizando la fórmula:

$$[SH]_{GR} = [SH]_{tot} \cdot \frac{100}{70}$$

Donde $[SH]_{GR.}$ Corresponde a la concentración de sulfhidrilos de bajo peso molecular en una solución únicamente de GR, y $[SH]_{tot.}$ corresponde a la concentración de sulfhidrilos de bajo peso molecular obtenida en el filtrado.

Se obtiene la concentración de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular (mol por litro) por unidad, o lo que es lo mismo la concentración promedio dentro de cada GR. A partir de los cuales se grafica la concentración de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo PM para GR en función del tiempo de almacenamiento de

los mismos, tanto para las muestras que fueron suplementadas con NAC como para las que no lo fueron (Figura 12).

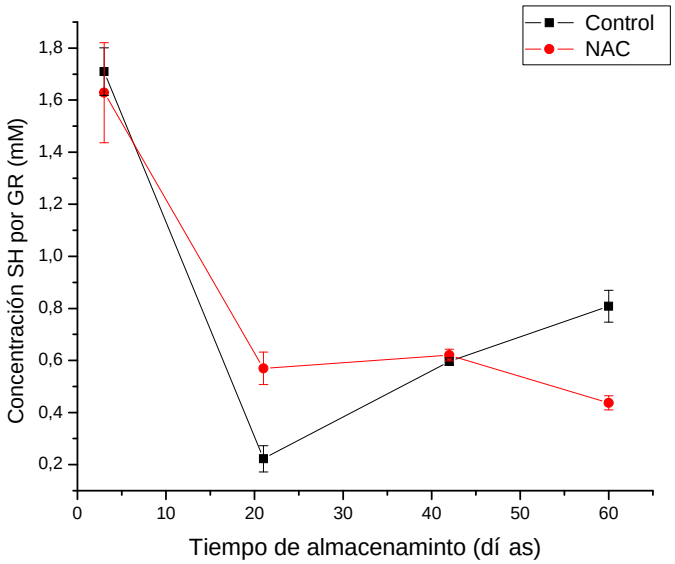


Figura 12. Gráfico de concentración de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo PM en función de los días de almacenamiento del concentrado*. Se observan en rojo las muestras suplementadas con NAC, y en negro el control.*

Tanto para la sangre almacenada con NAC como para la que fue almacenada en condiciones estándar (solución SAGM sin NAC), se observa una concentración inicial alta de sulfhidrilos de bajo PM (2,4 ± 0,1 mM para los GR sin suplementar con NAC y 2,33 ± 0,27mM para los glóbulos suplementados con NAC), la cual se encuentra disminuida en más del 50% el día 21 de almacenamiento, alcanzando un valor de 0,32 ± 0,07 mM para los GR sin suplementar con NAC y 0,81 ± 0,09 mM para los glóbulos suplementados con NAC.

La caída en la concentración de estos sulfhidrilos parece seguir una tendencia exponencial, ya que a partir del día 21 de almacenamiento la concentración de los mismos permanece estable (hasta el día 60 de almacenamiento), siendo promedialmente, la caída en la concentración de sulfhidrilos de bajo peso molecular de 67% para los GR suplementados con NAC y 68% para el control.

Estos datos parecen indicar que los cambios significativos en la concentración de GSH, así como de otros sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular se dan durante los primeros días de almacenamiento de los GR, observándose una disminución en la concentración de péptidos antioxidantes en los GR envejecidos.

No se observaron cambios significativos en la concentración de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo PM con el agregado de NAC, a las concentraciones utilizadas en este trabajo.

Una posible razón por la que no se encontraron variaciones significativas en los GR suplementados con NAC podría deberse a que la concentración utilizada fuera demasiado baja.

Considerando que la concentración de GSH intracelular de los GR ronda los 2mM, la suplementación de la bolsa con NAC 1mM podría no ser suficiente para cubrir las necesidades de todos los GR.

Por otro lado, se realizaron estudios preliminares para evaluar la toxicidad de NAC sobre los GR, los cuales utilizaron concentraciones finales de NAC hasta 2,5 mM. Estos estudios demostraron que no existe toxicidad para los GR en las concentraciones de NAC utilizadas.

Se sugiere repetir los experimentos, suplementando las bolsas con concentraciones mayores de NAC.

18. Consumo de peróxido extracelular por la maquinaria antioxidante de los glóbulos rojos.

El compuesto 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiasolina-6-ácido sulfónico) o ABTS (Figura 13) puede ser utilizado junto con H_2O_2 como un sustrato para las peroxidasas, y puede ser utilizado para seguir la cinética de reacción de una peroxidasa con peróxido de hidrógeno, o simplemente para cuantificar la cantidad de peróxido de hidrógeno en una muestra.

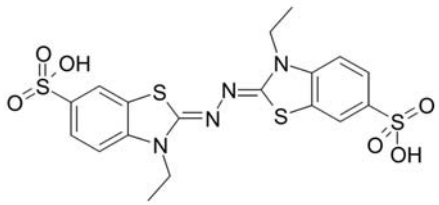


***Figura 13. Estructura del compuesto2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiasolina-6 ácido sulfónico)**, más comúnmente conocido como ABTS.*

El ABTS tiene la capacidad de actuar como un donante de electrones para el H_2O_2, deprotonándose. Cuando los grupos sulfonato son completamente deprotonados el ABTS existe como un dianión.

La peroxidasa facilita la reacción del ABTS con el H_2O_2, transformándolo en $ABTS^{\cdot+}$, de color verde, con un máximo de absorbancia a los 420nm (ε= 3,6x10^4 $mM^{-1}cm^{-1}$) (Han, Choi et al. 2005).

A partir de las absorbancias obtenidas a dicha longitud de onda, se realiza una curva de calibración de absorbancia en función de concentración de peróxido de hidrógeno.

Este procedimiento fue repetido para cada muestra, por lo que debido a la gran cantidad de curvas de calibración realizadas sólo se muestra una de manera ilustrativa (Figura 14).

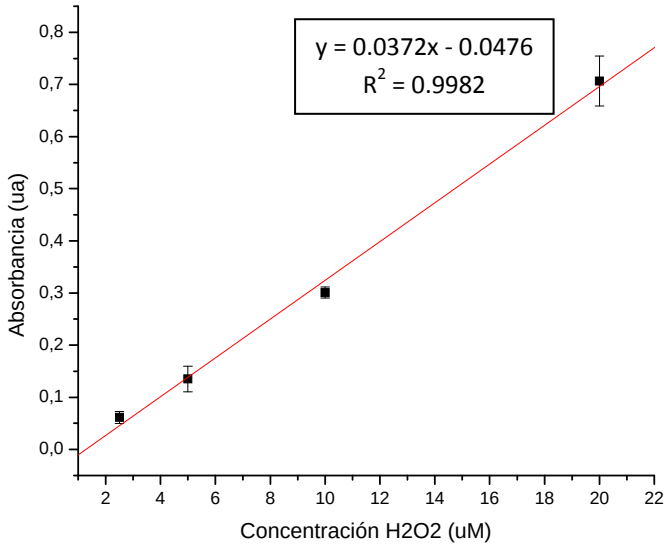


Figura 14. Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de H_2O_2. *Este modelo de curva fue utilizado para la obtención de la concentración de H_2O_2 remanente extracelularmente luego de exposición a los GR, y su maquinaria antioxidante.*

A partir de la curva de calibración se obtienen las concentraciones de H_2O_2 remanentes luego de la exposición de los GR (con diferentes tiempos de almacenamiento) al peróxido de hidrógeno. Esto nos da una idea de cómo varía la funcionalidad de la maquinaria antioxidante de los GR con el tiempo de almacenamiento de los mismos.

Los ensayos se realizaron por triplicado y con al menos 3 muestras distintas. Luego se promedió y se calculó el desvío estándar, datos que se pueden observar en la tabla 3.

Utilizando el test ANOVA con $\alpha = 0,05$ no se observaron diferencias significativas en el cambio en la concentración de H_2O_2 remanente; la maquinaria antioxidante intracelular parece ser capaz de consumir la misma cantidad de H_2O_2, ya sea para las muestras nuevas y envejecidas, así como para las suplementadas con NAC y luego envejecidas.

Tabla 2. Concentración de H_2O_2 remanente luego de exponer los GR a H_2O_2 1mM.

Concentración H_2O_2 remanente (µM) luego de 5 min de exposición		
Días de almacenamiento	**Muestras suplementadas con PBS**	**Muestras suplementadas con NAC 1mM**
3	55 ± 38	207 ± 26
42	92 ± 101	139 ± 55
Concentración H_2O_2 remanente (µM) luego de 30 minutos de exposición.		
Días de almacenamiento	**Muestras suplementadas con PBS**	**Muestras suplementadas con NAC 1mM**
7	166 ± 39	111 ± 41
28	111 ± 18	174 ± 11
35	55 ± 14	37 ± 15
42	98 ± 39	141 ± 37
60	171 ± 40	183 ± 60

Estos resultados no concuerdan con lo esperado, lo cual sería una disminución en la capacidad de consumo de H_2O_2 de los GR con el tiempo de almacenamiento.

La falta de diferencias significativas podría deberse a la hemoglobina extracelular. Es probable que los GR con mayores tiempos de almacenamiento posean membranas más debilitadas y sean más sensibles a la lisis por H_2O_2. Esto produciría mayor cantidad de lisis celular al tratar los GR envejecidos con H_2O_2, y por lo tanto mayor cantidad de hemoglobina en el PBS extracelular de GR envejecidos, lo que podría interferir con la medida de absorbancia, ya que la hemoglobina absorbe a la longitud de onda a la que se realizaron las medidas de absorbancia (420nm). Esto produciría que al aumentar los niveles de la misma se produzca una interferencia con la absorbancia del ABTS. Por lo tanto los valores de H_2O_2 remanente podrían haberse visto disminuidos durante el almacenamiento, y no haber sido notados debido a un aumento en la lisis celular (y por lo tanto de hemoglobina extracelular) al tratar las células envejecidas con H_2O_2. En este caso se sugiere una medida de concentración extracelular de hemoglobina, luego de la exposición a H_2O_2, de GR con distintos días de almacenamiento.

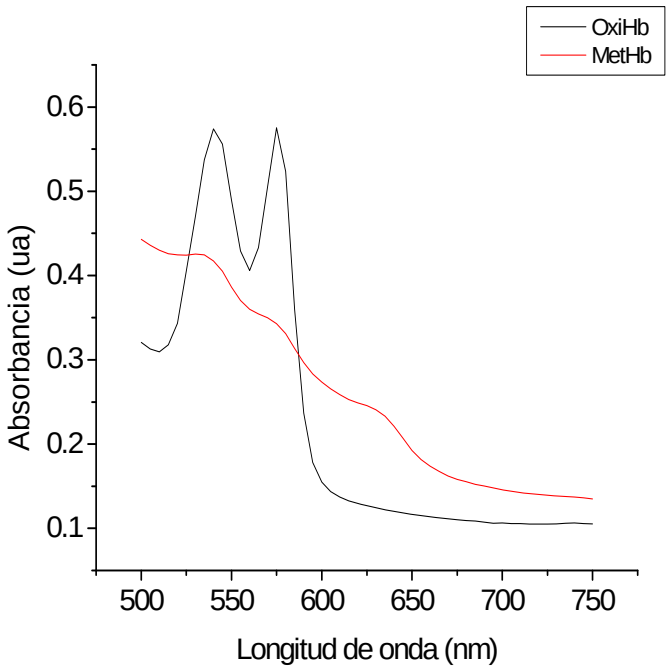
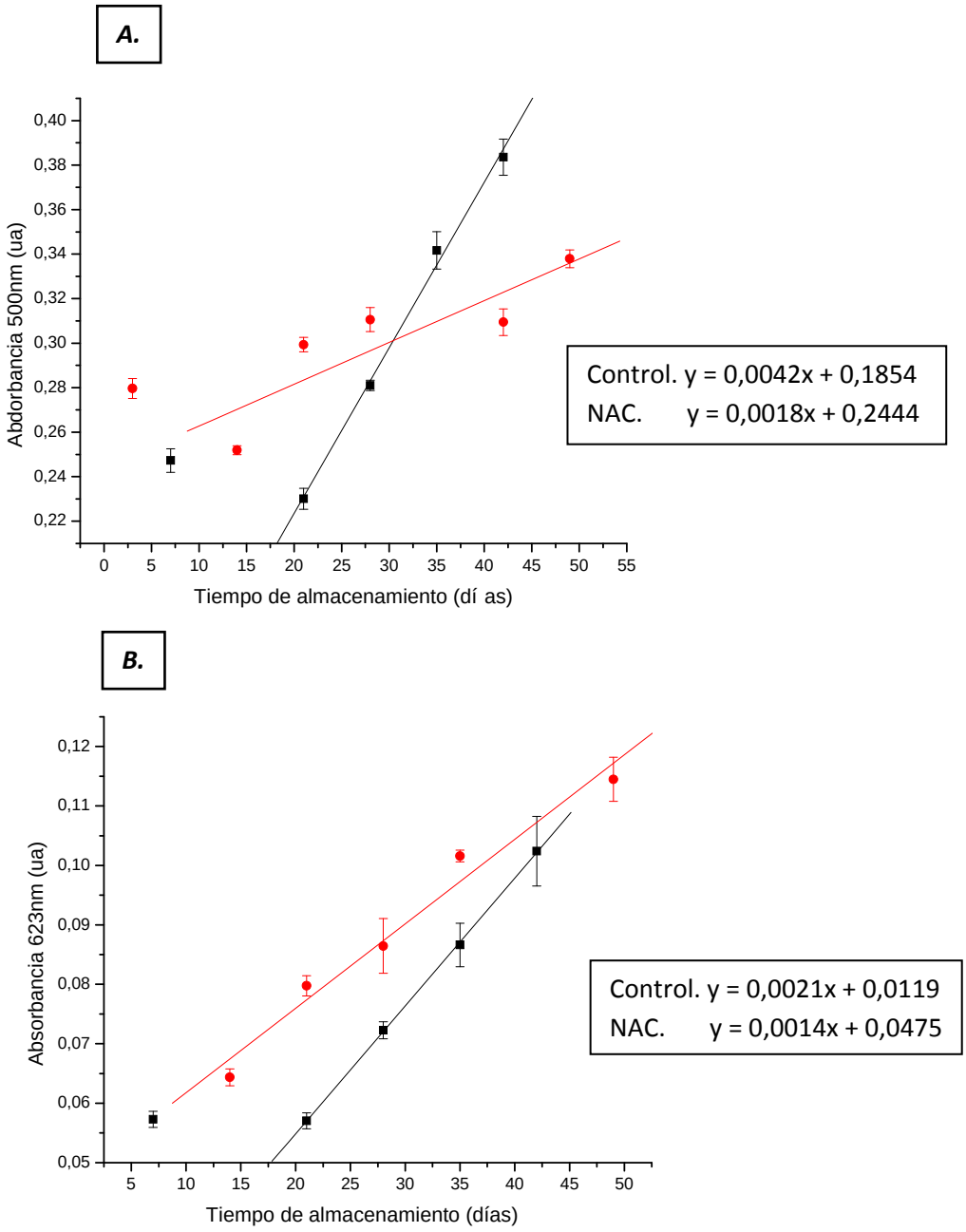


Figura 15. Espectros para oxy y meta-hemoglobina humana. *Se observan las diferencias en las absortividades a las distintas longitudes de onda para la oxi y meta hemoglobina. La oxihemoglobina se obtuvo a partir del lisado de glóbulos rojos frescos. La metahemoglobina se preparó a partir de hemoglobina comercial.*

19.Concentración de Hemoglobina intracelular

La hemoglobina es la molécula encargada de transportar el oxígeno a cada célula del organismo. Se trata de una proteína, compuesta por 4 cadenas polipeptídicas, cada una unida a un grupo hemo, y tiene un peso molecular de 64 kDa. El grupo hemo está formado por una porfirina unida a hierro que puede estar en forma oxidada (Fe^{3+}) o en forma reducida (Fe^{2+}). La forma reducida es la única capaz de unirse al O_2 (oxihemoglobina) y se trata de la forma predominante en los eritrocitos sanos. Por otro lado la forma oxidada (metahemoglobina) es incapaz de unirse al O_2 y se encuentra de forma minoritaria en los GR sanos en circulación. Estas dos moléculas pueden ser diferenciadas por sus espectros de absorción (figura 15).

Para observar como varía el estado de redox de los glóbulos rojos con el tiempo de almacenamiento estudiamos la variación en el estado de oxidación de la hemoglobina. Para evaluar la evolución de la metahemoglobina medimos absorbancia a longitudes de onda donde el espectro de absorción de este estado redox (Fe^{3+}) se diferencia claramente del de la oxihemoglobina (Fe^{2+}), 500 y 623 nm (Fig. 15). Las absorbancias obtenidas pueden observarse en la figura 16.



Poner el R

Figura 16. Gráficos de absorbancia para la metahemoglobina *obtenidos a λ=500nm (A) y a λ=623nm (B), en función de la cantidad de días de almacenamiento para la sangre suplementada con PBS (cuadrados negros) y con NAC (circulos rojos).*

En la figura 16 A se observa que los valores de absorbancia a 500 nm se mantienen constantes para ambas muestras hasta el día 21 donde se observa un aumento de la misma. El aumento de absorbancia es menor en las muestras suplementadas con NAC. Lo mismo se observa en la figura 16B con los valores de absorbancia a 623 nm.

De aquí en adelante se considerarán los valores de absorbancia a 623nm (figura 16B) debido a que a esta longitud de onda la diferencia entre la absorbancia debida a

metahemoglobina y la absorbancia generada por la presencia de oxihemoglobina son mayores, y la oxihemglobina no presenta absorbancia considerable (ver figura 15).

Conociendo el coeficiente de absortividad molar de la hemoglobina para esta longitud de onda es 3.63 $mM^{-1}cm^{-1}$, es posible calcular la concentración intracelular de metahemoglobina, y su evolución con el tiempo de almacenamiento, utilizando la ley de Lambert Beer: $A= \varepsilon.c.d$

Así se obtiene la concentración inicial aproximada de metahemoglobina de 11 $\pm$ 3 µM y al día 42 de 28 $\pm$ 2 µM para las muestras sin suplementar con NAC, y la concentración inicial 20,1 ± 0,8 µM y final 22,6 $\pm$ 0,5 µM de metahemoglobina para las muestras suplementadas con NAC. Lo que supone un aumento de 2.5 veces en la muestra sin suplementar, mientras que el aumento fue sólo de un 12% en la muestras suplementadas con NAC. Consideramos este resultado sumamente prometedor, si bien preliminar, en cuanto a la capacidad del NAC de prevenir el envejecimiento de los glóbulos rojos en los concentrados almacenados para transfusión.

Utilizando la fórmula: [metHb por GR] = [metHb en el lisado]. $\frac{100}{70}$

Se halla la concentración de metahemoglobina inicial de 15 ± 4 µM, que aumentó hasta 40 ± 3 µM al día 42 para las muestras control. En el caso de las muestras suplementadas con NAC la concentración inicial de 29 ± 1 µM pasó a ser de 32,3 ± 0,7 µM al día 42. Estas cifras nos sirven para comparar con la concentración intra eritrocitaria de hemoglobina, que es cercana a 5.5 mM, por lo que durante el período en estudio la metahemoglobina pasó de ser menor o igual a 0.5 % de la hemoglobina total a ser de un 0.7 % en ausencia de suplementación, una cantidad que probablemente de por sí no comprometa significativamente la funcionalidad del glóbulo rojo transfundido, como esperábamos dado que a los 42 días aún el preparado se considera apto para transfusión.

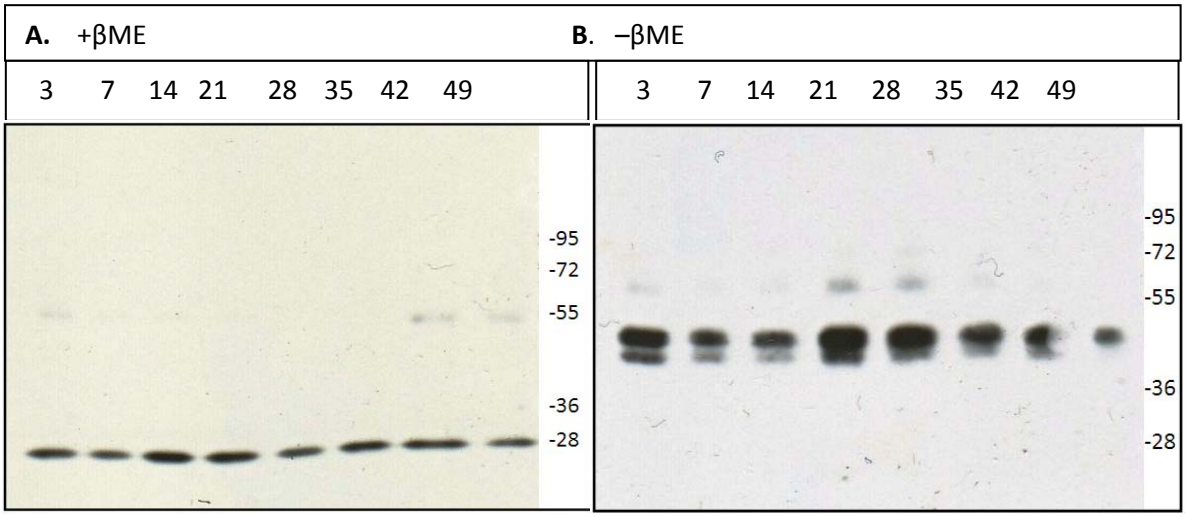


Figura 16. WB anti Prx2 *de la fracción citosólica aislada de glóbulos rojos almacenados en las condiciones de la sangre de banco utilizando buffer de la muestra con βME (A), y sin βME (B). Sobre los carriles se observan los días de almacenamiento de cada muestra, y a la derecha los valores del estándar de peso molecular en kDa.*

Observando las pendientes de las gráficas para el control y las muestras suplementadas con NAC se observa en ambos casos una mayor pendiente para el control, siendo el aumento de 0,021 UA/día para el control y 0,014 UA/día para las muestras suplementada con NAC. Esto indicaría que si bien en ambos casos la concentración de metahemoglobina aumenta durante el almacenamiento, la suplementación con NAC podría disminuir la oxidación de la hemoglobina. La oxidación de la oxihemoglobina intracelular con el almacenamiento (Fe^{2+}=O →Fe^{3+}) se podría relacionar con la generación de especies capaces de oxidarla que podrían provenir, entre otros, de leucocitos presentes en el concentrado. Entonces, a partir de los datos de ΔA/día obtenidos de la gráfica y sabiendo el coeficiente de absortividad de la metahemoglobina a 623 nm, que el volumen ocupado por los glóbulos rojos es del 70% del total de la bolsa y que el volumen total del concentrado es de 400 mL podemos aproximarnos al cálculo de generación de especies reactivas en la bolsa, asumiendo (de manera simplista) que la mayor parte de las especies generadas van a oxidar la hemoglobina. La especies reactivas que alcanzan a la hemoglobina en ausencia de suplementación resultó ser de 1.4 µmoles/día, y en el caso de las bolsas suplementadas de 1.1 µmoles/día. El agregado de NAC a la concentración empleada (1 mM) fue capaz de atrapar, al menos en parte las especies oxidantes generadas durante el almacenamiento, y se están planificando experimentos futuros empleando concentraciones mayores del antioxidante.

20. Electroforesis y Western Blot.

20.1. SDS-PAGE y Western Blot en una dimensión (1D).

SDS-PAGE (de sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis, o electrophoresis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Es una técnica que permite la separación de proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética (en función de la longitud de la cadena polipeptídica, masa molecular, modificaciones postraduccionales, etc). El SDS (dodecilsulfato sódico) desnaturaliza las proteínas, y permite que las mismas adquieran una relación carga/másа idéntica, migrando en función de su peso molecular.

Una vez separadas las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF Y reveladas mediante Western Blot. Utilizando anticuerpo primario anti Prx2 monoclonal de ratón, y anticuerpo secundario anti ratón conjugado a HRP.

Las electroforesis tradicionales se realizaron para lisado de glóbulos rojos con distintos días de almacenamiento, y en presencia o ausencia del agente reductor βME, el cual es capaz de reducir los puentes disulfuro entre Prx. Los resultados obtenidos pueden ser observados en la figura 16.

En la figura 16 B se observan bandas de aproximadamente 44kDa que podrían corresponderse con dímeros de Prx 2. También se observan en algunos carriles bandas de mayor peso molecular que podría tratarse de agregados proteicos con la Prx2.

En la figura 16 A se observan bandas de aproximadamente 28 kDa, que podrian corresponderse con la Prx 2 en su estado monomérico (aprox 21kDa), ya que los puentes disulfuro que mantenían unido el estado dimérico fueron reducidos con el agregado de βME. Nuevamente se observan bandas de mayor peso molecular, las cuales seguramente se correspondan con agregados proteicos.

La enzima Prx 2, en condiciones desnaturalizantes, se encuentra mayoritariamente en forma dimérica (figura 16 B), con un peso molecular aparente de 44kDa. El estado de esta enzima no parece cambiar durante el almacenamiento de los GR, ya que no se observaron cambios significativos en las bandas con el almacenamiento.

Al someter el contenido citosólico del GR a condiciones reductoras (βME) y desnaturalizantes (SDS), se observa la Prx 2 en forma monomérica (21kDa) (figura 156A). Esto indica que la forma dimérica observada en el GR se debe a la presencia de puentes disulfuro uniendo los monómeros de Prx 2.

20.2. Electroforesis y Western Blot diagonales

La electroforesis diagonal es un método simple para el análisis de puentes disulfuro inter e intra catenarios. Esta técnica se basa en dos electroforesis secuenciales, no

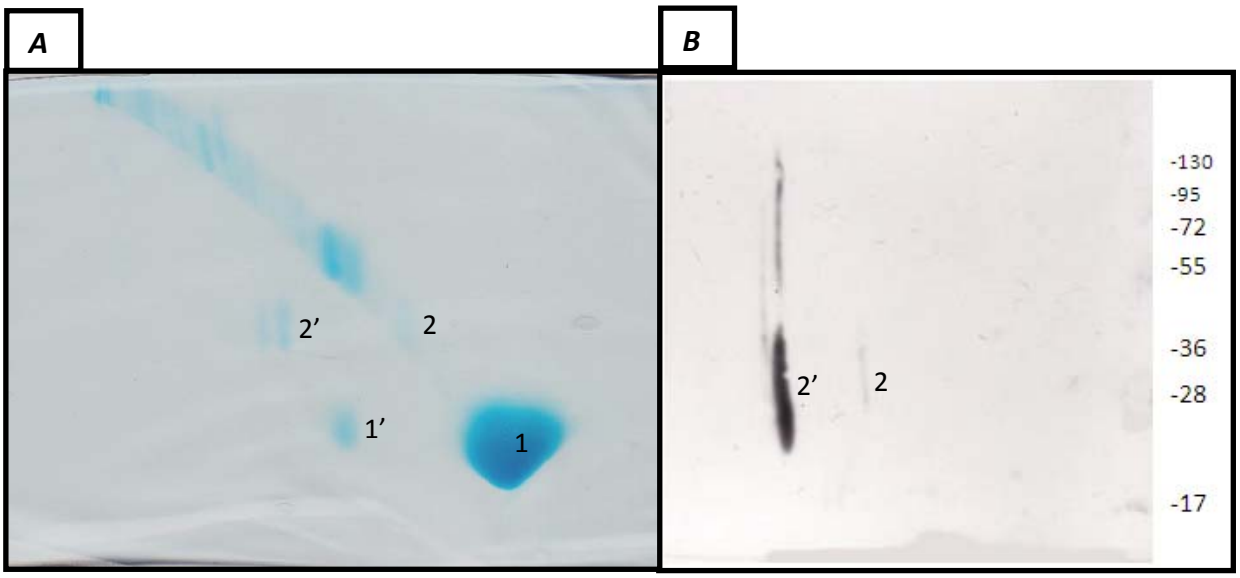


***Figura 18. Electroforesis diagonal para contenido citosólico total de GR**, con 21 días de almacenamiento. La misma fue teñida con cumassie coloidal (A), o revelada mediante Westwen Blot anti Prx2 (B).*

reductoras y reductoras. Inicialmente se realiza una electroforesis de lisado de GR en condiciones no reductoras, y en buffer alquilante para prevenir el intercambio tiol-disulfuro. Luego se recorta el carril de la primera electroforesis, se trata con agente reductor y se coloca sobre un nuevo gel para correr una segunda electroforesis, en condiciones reductoras.

Finalmente las proteínas que no contienen puentes disulfuro forman una diagonal en el gel, debido a que corren igual en ambas electroforesis. Sin embargo las proteínas que contienen puentes disulfuro intercatenarios corren por debajo de la diagonal, debido a que en condiciones reductoras tienen menor peso molecular, mientras que las proteínas que tienen puentes disulfuro intracatenarios corren por encima de la diagonal ya que en su forma desplegada tienen mayor peso molecular aparente.

Se realizaron electroforesis diagonales para lisados de GR, los cuales fueron revelados mediante tinción con Cumassie Colloidal o por Western Blot anti Prx2. En la figura 18 A se observa una mancha grande sobre la diagonal entorno a los 17 kDa, que corresponde a la hemoglobina (1), al igual que un spot menor de peso molecular similar que se correspondería con dímeros de hemoglobina que se redujeron con el agregado de DTT (1'). Por su parte, la una fracción de la Prx2 se encontraba inicialmente como monómero como una banda tenue sobre la diagonal de PM aproximado de 28kDa (2), parte se encontraba como dímero y no fue reducida con el tratamiento con DTT, se observa como una banda de mayor peso molecular (aproximadamente 55kDa) en la diagonal. Finalmente la Prx que migró en la primera dimensión como dímero, y que luego fue reducida por el tratamiento con DTT se observa como una banda oscura por debajo de la diagonal.

Las electroforesis diagonales de contenido citosólico de GR, demostraon la presencia de varias proteínas con puentes disulfuro intercatenarios

Para mejorar las bandas y otorgarles mayor precisión, en los siguientes geles que se realizó se utilizó una primera parte del gel de poliacrilamida al 5% (gel concentrador).

20.3. Electroforesis y Western Blot diagonales, pretratamiento con NEM.

El pretratamiento de los GR con NEM, permite el bloqueo de sus grupos tiol, evitándose por lo tanto oxidaciones de los mismos que pudieran darse durante la manipulación posterior a la lisis celular.

En este caso se observó mediante electroforesis diagonal el contenido citosólico, y particularmente la Prx 2, de los GR con distintos tiempos de almacenamiento, pretratados con NEM. Los resultados para las muestras sin almacenar, y con 42 y 60 días de almacenamiento pueden observarse en la figura 19. En el western blot revelado con el anticuerpo anti-Prx 2 de los glóbulos rojos sin almacenar (Fig. 19 A) se puede observar un gran spot correspondiente a Prx 2 monomérica, la cual migró como monómero en ambas dimensiones. Para la Prx 2 dimérica se observan 2 spots, uno sobre la diagonal que corresponde a la Prx 2 que no fue reducida con el tratamiento con DTT, y otro por debajo de la diagonal que corresponde a la Prx 2 reducida previo a la segunda dimensión.

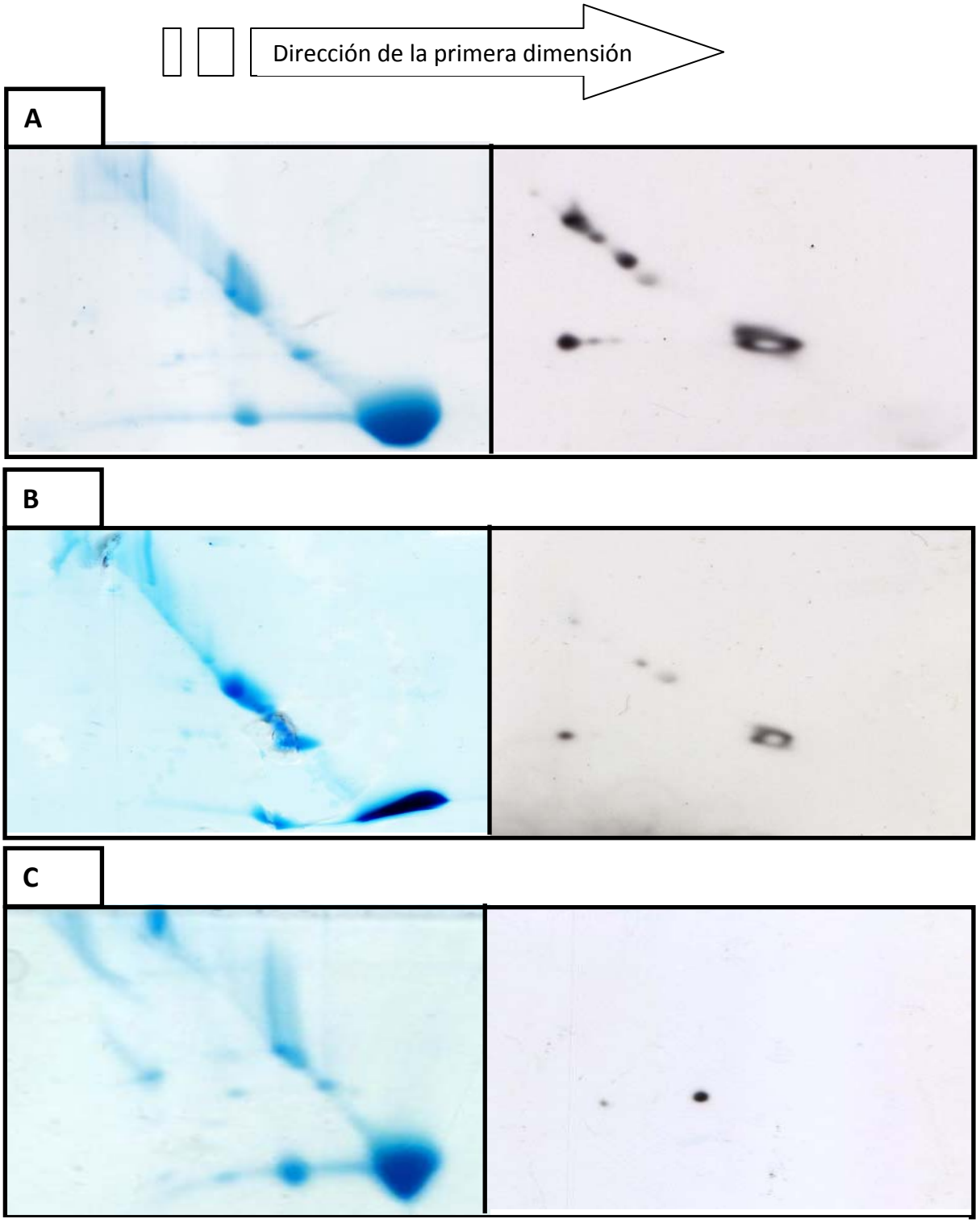


Figura 19. Electroforesis diagonales (izquierda) y Western Blot anti Prx 2 (derecha) *del citosol de GR con distinto tiempo de almacenamiento y pretratado con NEM. (A) Sin almacenar, (B) 42 días de almacenamiento y (C) 60 días de almacenamiento en las condiciones del banco de sangre. Se marca con una flecha la Prx 2 en su forma monomérica.*

En la sangre sin almacenar (Figura 19 A) además de lo mencionado anteriormente, se

observa en la diagonal Prx 2 formando agregados con otras proteínas, los cuales no son disociados con el agregado de DTT. También se observa, a la derecha de la Prx 2 que fue reducida por DTT, spots de Prx 2 que se encontraban inicialmente unidos a otras proteínas y fueron separados en la segunda dimensión, lo que indica que la unión probablemente fuera por puente disulfuro.

Todos los spots de Prx 2 observados por Western Blot disminuyen durante el almacenamiento, lo que indica una disminución en la concentración de la enzima. Los agregados que la misma forma también disminuyen, siendo, el día 60 de almacenamiento, la concentración de los mismos inapreciable por Western Blot.

La razón de la disminución en la concentración de Prx 2 probablemente sea un aumento en los agregados que la misma forma con la membrana, los cuales aumentan durante el almacenamiento aerobio, como fue descripto por (Rinalducci, D'Amici et al. 2011). Sin embargo la concentración de proteína total, observada mediante tinción con cumassie coloidal, no parece disminuir durante el almacenamiento.

En las figuras de la izquierda (tinción con colloidal) se observa un aumento en los agregados proteicos unidos por puentes disulfuro, lo que se observa como mayor cantidad de spots que migran por debajo de la diagonal. Algunos de estos agregados involucran una unión con la hemoglobina mediante enlace disulfuro, lo que se observa en el gel como bandas que migran con el peso molecular de la hemoglobina, pero por debajo de la diagonal. Además para el día 60 de almacenamiento (figura 19 C) las bandas no se observan como spots, sino como líneas.

El pretratamiento del contenido citosólico de GR con NEM, aumentó la cantidad de Prx 2 monomérica que se observa en los Western Blot diagonales, esto indicaría que gran parte de la oxidación de la enzima observada previamente ocurre durante la manipulación de los GR previa a la electroforesis, como fue demostrado por (Low, Hampton et al. 2007), sin embargo, incluso durante los primeros días de almacenamiento de los GR existe una cantidad apreciable de Prx 2 que se encuentra en forma dimérica.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los estudios realizados demostraron un deterioro considerable en los GR almacenados en solución de almacenamiento SAGM, el cual comienza a ser notorio en la mitad del período de almacenamiento, el cual es de 42 días.

Al estudiar los péptidos antioxidantes de bajo peso molecular, de los cuales el principal es el GSH, se observó una disminución exponencial en la concentración de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular, los cuales disminuyeron durante los primeros 21 días de almacenamiento en más de un 50%, pasando de una concentración inicial de 2,44 ± 0,13 mM, para los GR sin suplementar con NAC, a una concentración de 0,32 ± 0,07 mM en los GR de 21 días de almacenamiento. La suplementación con NAC 1mM no proporcionó protección frente a la disminución en la concentración de sulfhidrilos intracelulares de bajo peso molecular, estos experimentos se repetirán con un agregado mayor de NAC.

En lo que respecta a la concentración intracelular de hemoglobina, se observó un marcado aumento en la concentración de metahemoglobina con el almacenamiento, la cual comienza a ascender luego de 21 días, lo que sugiere la oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina en este período. Proceso que fue disminuido por la suplementación de NAC 1mM, por lo que se repetirán los experimentos con mayor concentración de NAC agregado.

Como perspectiva se planea estudiar la variación en las concentraciones citosólicas de oxihemoglobina durante el almacenamiento.

Por otro lado no se observaron cambios en la capacidad de consumo de H_2O_2 extracelular por parte de la maquinaria antioxidante de los GR. Estos resultados sugieren un aumento en la lisis celular producida por H_2O_2 en los GR envejecidos.

Mediante electroforesis diagonal se observó un aumento durante el almacenamiento en complejos proteicos unidos por enlace disulfuro.

Con respecto a la Prx 2, la misma pudo observarse en su estado dimérico (unido por puente disulfuro) y monomérico, tanto en los Western Blot tradicionales como en los diagonales. También se observó la formación de complejos con otras proteínas. La concentración de esta enzima parece disminuir con el tiempo de almacenamiento, posiblemente debido a la formación de complejos con proteínas de membrana. La formación de los complejos mencionados será estudiada por Western Blot anti Prx2, para proteínas de membrana.

Los Western Blot bidimensionales para GR pretratados con NEM demostraron que la Prx 2 de GR, se encuentra en condiciones desnaturalizantes (SDS) principalmente en forma dimérica, en la que los monómeros están unidos por puentes disulfuro, reducibles por βME o DTT.

En cuanto a la suplementación de las bolsas de almacenamiento de GR con NAC 1mM, la misma produjo cambios que afectaron sólo alguno de los parámetros analizados, sin embargo es probable que esta concentración sea demasiado pequeña para que los cambios producidos fueran más apreciables, por lo que se repetirá el almacenamiento de bolsas de concentrado de GR con concentraciones mayores de NAC.

REFERENCIAS

Aitio, M. L. (2006). "N-acetylcysteine -- passe-partout or much ado about nothing?" Br J Clin Pharmacol **61**(1): 5-15.
Allen, D. W., S. Cadman, et al. (1977). "Increased membrane binding of erythrocyte catalase in hereditary spherocytosis and in metabolically stressed normal cells." Blood **49**(1): 113-23.
Almac, E. and C. Ince (2007). "The impact of storage on red cell function in blood transfusion." Best Pract Res Clin Anaesthesiol **21**(2): 195-208.
Antonelou, M. H., A. G. Kriebardis, et al. (2010). "Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol." Transfusion **50**(2): 376-89.
Arese, P., F. Turrini, et al. (2005). "Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes." Cell Physiol Biochem **16**(4-6): 133-46.
Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1989). "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." Free Radic Biol Med **6**(6): 593-7.
Barondeau, D. P., C. J. Kassmann, et al. (2004). "Nickel superoxide dismutase structure and mechanism." Biochemistry **43**(25): 8038-47.
Bennett-Guerrero, E., T. H. Veldman, et al. (2007). "Evolution of adverse changes in stored RBCs." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 17063-8.
Blum, A. (2009). "The possible role of red blood cell microvesicles in atherosclerosis." Eur J Intern Med **20**(2): 101-5.
Bosman, G. J., E. Lasonder, et al. (2008). "The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions." Transfusion **48**(5): 827-35.
Bosman, G. J., J. M. Werre, et al. (2008). "Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion." Transfus Med **18**(6): 335-47.
Braun, R. J., N. Kinkl, et al. (2007). "Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins." Anal Bioanal Chem **389**(4): 1033-45.
Buehler, P. W., E. Karnaukhova, et al. (2011). "Blood aging, safety, and transfusion: capturing the "radical" menace." Antioxid Redox Signal **14**(9): 1713-28.
Bunker, V. W. (1992). "Free radicals, antioxidants and ageing." Med Lab Sci **49**(4): 299-312.
Butterworth, P. H., H. Baum, et al. (1967). "A modification of the Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups." Arch Biochem Biophys **118**(3): 716-23.
Carlsson, L. M., J. Jonsson, et al. (1995). "Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6264-8.
Chae, H. Z., T. B. Uhm, et al. (1994). "Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7022-6.
Chen, J. W., C. Dodia, et al. (2000). "1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities." J Biol Chem **275**(37): 28421-7.
Chen, K. and A. S. Popel (2009). "Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma." Biorheology **46**(2): 107-19.
Church, S. L., J. W. Grant, et al. (1992). "Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping." Genomics **14**(3): 823-5.
Cosby, K., K. S. Partovi, et al. (2003). "Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation." Nat Med **9**(12): 1498-505.
Crawford, J. H., T. S. Isbell, et al. (2006). "Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation." Blood **107**(2): 566-74.
Daniela Giustarini, A. M., Isabella Dalle-Donne, Ranieri Rossi (2008). "Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids

" Blood Cells, Molecules, and Diseases **40**: 174-179.
Dargel, R. (1992). "Lipid peroxidation--a common pathogenetic mechanism?" Exp Toxicol Pathol **44**(4): 169-81.
Dean, R. T., S. M. Thomas, et al. (1986). "Free-radical-mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane. Roles for lipid radicals." Biochem J **240**(2): 489-94.
Dekhuijzen, P. N. (2004). "Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **23**(4): 629-36.
Delanty, N. and M. A. Dichter (1998). "Oxidative injury in the nervous system." Acta Neurol Scand **98**(3): 145-53.
Dietrich, H. H., M. L. Ellsworth, et al. (2000). "Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(4): H1294-8.
Dietz, A. A. and H. M. Rubinstein (1972). "Laboratory note--standardization of the Ellman reaction." Clin Biochem **5**(2): 136-8.
Ekaterina N. Kadnikova, N. M. K. (2002). "Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol–gel glass.: Effects of glass matrix on reactivity." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **18**(1-3): 39-48.
Eyer, P. and D. Podhradsky (1986). "Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent." Anal Biochem **153**(1): 57-66.
Felicia M. Low, M. B. H., Alexander V. Peskin, and Christine C. Winterbourn (2007). "Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte." RED CELLS **109**: 2611-2617.
Flohe, L., W. A. Gunzler, et al. (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." FEBS Lett **32**(1): 132-4.
Flohe, L. and J. R. Harris (2007). "Introduction. History of the peroxiredoxins and topical perspectives." Subcell Biochem **44**: 1-25.
Foller, M., S. M. Huber, et al. (2008). "Erythrocyte programmed cell death." IUBMB Life **60**(10): 661-8.
Fridovich, I. (1989). "Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas." J Biol Chem **264**(14): 7761-4.
Fujii, J. and Y. Ikeda (2002). "Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein." Redox Rep **7**(3): 123-30.
Gaetani, G. F., S. Galiano, et al. (1989). "Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes." Blood **73**(1): 334-9.
Gerard-Monnier, D. and J. Chaudiere (1996). "[Metabolism and antioxidant function of glutathione]." Pathol Biol (Paris) **44**(1): 77-85.
Gibson, W. H. and F. J. Roughton (1957). "The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin." J Physiol **136**(3): 507-24.
Girotti, A. W. (1998). "Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems." J Lipid Res **39**(8): 1529-42.
Gordon-Smith, T. (2009). "Structure and function of red and white blood cells." Medicine **37**(3): 119-124.
Guimaraes, B. G., H. Souchon, et al. (2005). "Structure and mechanism of the alkyl hydroperoxidase AhpC, a key element of the Mycobacterium tuberculosis defense system against oxidative stress." J Biol Chem **280**(27): 25735-42.
Hall, A., P. A. Karplus, et al. (2009). "Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions." Febs J **276**(9): 2469-77.
Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease." Am J Med **91**(3C): 14S-22S.
Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochem J **219**(1): 1-14.

Han, M. J., H. T. Choi, et al. (2005). "Purification and characterization of laccase from the white rot fungus Trametes versicolor." J Microbiol **43**(6): 555-60.
Han, Y., G. B. Quan, et al. (2005). "Improved preservation of human red blood cells by lyophilization." Cryobiology **51**(2): 152-64.
Harris, J. R. (1968). "Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts." Biochim Biophys Acta **150**(3): 534-7.
Hess, J. R. and T. G. Greenwalt (2002). "Storage of red blood cells: new approaches." Transfus Med Rev **16**(4): 283-95.
Hofmann, B., H. J. Hecht, et al. (2002). "Peroxiredoxins." Biol Chem **383**(3-4): 347-64.
Huang, D., B. Ou, et al. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." J Agric Food Chem **53**(6): 1841-56.
Huang, H. Y., B. Caballero, et al. (2006). "The efficacy and safety of multivitamin and mineral supplement use to prevent cancer and chronic disease in adults: a systematic review for a National Institutes of Health state-of-the-science conference." Ann Intern Med **145**(5): 372-85.
Huang, Z., S. Shiva, et al. (2005). "Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control." J Clin Invest **115**(8): 2099-107.
Ignarro, L. J., G. M. Buga, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9.
Isbell, T. S., C. W. Sun, et al. (2008). "SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation." Nat Med **14**(7): 773-7.
Jacob, C., G. I. Giles, et al. (2003). "Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function." Angew Chem Int Ed Engl **42**(39): 4742-58.
Jacobson, F. S., R. W. Morgan, et al. (1989). "An alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties." J Biol Chem **264**(3): 1488-96.
Jeffers, A., X. Xu, et al. (2005). "Hemoglobin mediated nitrite activation of soluble guanylyl cyclase." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **142**(2): 130-5.
Jenner, P. (1998). "Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease." Mov Disord **13 Suppl 1**: 24-34.
Kanias, T. and J. P. Acker (2010). "Mechanism of hemoglobin-induced cellular injury in desiccated red blood cells." Free Radic Biol Med **49**(4): 539-47.
Kannan, R., R. Labotka, et al. (1988). "Isolation and characterization of the hemichrome-stabilized membrane protein aggregates from sickle erythrocytes. Major site of autologous antibody binding." J Biol Chem **263**(27): 13766-73.
Karplus, P. A. and A. Hall (2007). "Structural survey of the peroxiredoxins." Subcell Biochem **44**: 41-60.
Kashiwagi, S., M. Kajimura, et al. (2002). "Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules: alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein microfluorography." Circ Res **91**(12): e55-64.
Kim, K., I. H. Kim, et al. (1988). "The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O2 mixed-function oxidation system." J Biol Chem **263**(10): 4704-11.
Kinsella, M. C. a. J. E. (1975). "Sensitivity of the molar absorptivity value to sample and instrument characteristics, with reference to the ellman reagent (DTNB)." International Journal of Biochemistry **6**(12): 877-883.
Kittur, S. D., J. W. Hoppener, et al. (1985). "Linkage map of the short arm of human chromosome 11: location of the genes for catalase, calcitonin, and insulin-like growth factor II." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(15): 5064-7.
Kleinbongard, P., R. Schulz, et al. (2006). "Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase." Blood **107**(7): 2943-51.

Knight, J. A., S. E. Smith, et al. (1987). "Reference intervals for plasma lipoperoxides: age-, sex-, and specimen-related variations." Clin Chem **33**(12): 2289-91.
Kompoliti K., V. L. (2010). Encyclopedia of Movement Disorders, Academic Press
Kong, Q. and K. O. Lillehei (1998). "Antioxidant inhibitors for cancer therapy." Med Hypotheses **51**(5): 405-9.
Koppal, T., J. Drake, et al. (1999). "Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in Alzheimer's disease." J Neurochem **72**(1): 310-7.
Korell, J., C. V. Coulter, et al. (2011). "A statistical model for red blood cell survival." J Theor Biol **268**(1): 39-49.
Kriebardis, A. G., M. H. Antonelou, et al. (2007). "Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation." Transfusion **47**(7): 1212-20.
Lancaster, J. R., Jr. (1994). "Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8137-41.
Lang, F., C. Birka, et al. (2004). "Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis." Adv Exp Med Biol **559**: 211-7.
Lang, F., E. Gulbins, et al. (2008). "Eryptosis, a window to systemic disease." Cell Physiol Biochem **22**(5-6): 373-80.
Lang, F., K. S. Lang, et al. (2003). "Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte." Pflugers Arch **447**(2): 121-5.
Lang, K. S., P. A. Lang, et al. (2005). "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." Cell Physiol Biochem **15**(5): 195-202.
Lang, P. A., D. S. Kempe, et al. (2005). "PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death." Cell Death Differ **12**(5): 415-28.
Langley, S. C. and F. J. Kelly (1993). "N-acetylcysteine ameliorates hyperoxic lung injury in the preterm guinea pig." Biochem Pharmacol **45**(4): 841-6.
Learmonth, A. A. a. M. (1996). Estimation of Disulfide Bonds Using Ellman's Reagent.
Leeuwenburgh, C., P. Hansen, et al. (1998). "Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats." Am J Physiol **274**(2 Pt 2): R453-61.
Lenaz, G. (1998). "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 53-67.
Lion, N., D. Crettaz, et al. (2010). "Stored red blood cells: a changing universe waiting for its map(s)." J Proteomics **73**(3): 374-85.
Low, F. M., M. B. Hampton, et al. (2007). "Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte." Blood **109**(6): 2611-7.
Low, P. S., D. P. Allen, et al. (1987). "Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding." J Biol Chem **262**(10): 4592-6.
Low, P. S., S. M. Waugh, et al. (1985). "The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging." Science **227**(4686): 531-3.
Low, P. S., B. M. Willardson, et al. (1991). "Contribution of the band 3-ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability." Blood **77**(7): 1581-6.
Lutz, H. U., F. Bussolino, et al. (1987). "Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7368-72.
Manevich, Y., S. I. Feinstein, et al. (2004). "Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3780-5.
Manta, B., M. Hugo, et al. (2009). "The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2." Arch Biochem Biophys **484**(2): 146-54.

María Martínez Sarrasague, D. A. B., Marcela Zubillaga, Alfredo Hager, Tomás De Paoli, José Boccio (2006). "Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis." Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana: 45-51.

McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-55.

McCord, J. M., B. B. Keele, Jr., et al. (1971). "An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(5): 1024-7.

McDonagh, B. (2009). "Diagonal electrophoresis for detection of protein disulphide bridges." Methods Mol Biol **519**: 305-10.

Mills, G. C. (1957). "Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown." J Biol Chem **229**(1): 189-97.

Minors, D. S. (2004). "Physiology of red and white blood cells " Anaesthesia &intensive care medicine **5**(5): 174-178.

Moncada, S. and E. A. Higgs (2006). "Nitric oxide and the vascular endothelium." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 1): 213-54.

Nadeem, A., S. K. Chhabra, et al. (2003). "Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma." J Allergy Clin Immunol **111**(1): 72-8.

Nagababu, E., J. G. Mohanty, et al. (2010). "Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells." Life Sci **86**(3-4): 133-8.

Nelson, K. J., D. Parsonage, et al. (2008). "Cysteine pK(a) values for the bacterial peroxiredoxin AhpC." Biochemistry **47**(48): 12860-8.

Nicolay, J. P., P. J. Bentzen, et al. (2007). "Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by amiodarone." Cell Physiol Biochem **20**(6): 1043-50.

Niki, E., Y. Yamamoto, et al. (1991). "Membrane damage due to lipid oxidation." Am J Clin Nutr **53**(1 Suppl): 201S-205S.

Nogoceke, E., D. U. Gommel, et al. (1997). "A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in Crithidia fasciculata." Biol Chem **378**(8): 827-36.

Oberley, T. D. and L. W. Oberley (1997). "Antioxidant enzyme levels in cancer." Histol Histopathol **12**(2): 525-35.

Odin, A. P. (1997). "Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action." Mutat Res **386**(1): 39-67.

Ogata, M. (1991). "Acatalasemia." Hum Genet **86**(4): 331-40.

Ogusucu, R., D. Rettori, et al. (2007). "Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics." Free Radic Biol Med **42**(3): 326-34.

Oliver, C. N., P. E. Starke-Reed, et al. (1990). "Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 5144-7.

Papp, L. V., J. Lu, et al. (2007). "From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health." Antioxid Redox Signal **9**(7): 775-806.

Parsonage, D., D. S. Youngblood, et al. (2005). "Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin." Biochemistry **44**(31): 10583-92.

Polidori, M. C., W. Stahl, et al. (2001). "Profiles of antioxidants in human plasma." Free Radic Biol Med **30**(5): 456-62.

Poole, L. B. (2007). "The catalytic mechanism of peroxiredoxins." Subcell Biochem **44**: 61-81.

Prinsze, C., T. M. Dubbelman, et al. (1990). "Protein damage, induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals." Biochim Biophys Acta **1038**(2): 152-7.

R. Blaine Moore, M. V. M., Stephanie K. Shriver, Vipul N. Mankad, and and G. A. Plishker (1991). "Reconstitution of Ca2+-dependen K+ Transport in Erythrocyte Membrane Vesicles Requires a Cytoplasmic Protein." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **266**: 18964-18968.

Raat, N. J., A. J. Verhoeven, et al. (2005). "The effect of storage time of human red cells on intestinal microcirculatory oxygenation in a rat isovolemic exchange model." Crit Care Med **33**(1): 39-45; discussion 238-9.

Raftos, J. E., S. Whillier, et al. (2007). "Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes." Int J Biochem Cell Biol **39**(9): 1698-706.

Retel, J., B. Hoebee, et al. (1993). "Mutational specificity of oxidative DNA damage." Mutat Res **299**(3-4): 165-82.

Reynolds, J. D., G. S. Ahearn, et al. (2007). "S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 17058-62.

Riddles, P. W., R. L. Blakeley, et al. (1979). "Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination." Anal Biochem **94**(1): 75-81.

Rinalducci, S., G. M. D'Amici, et al. (2011). "Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions." Transfusion **51**(7): 1439-49.

Rinalducci, S., G. M. D'Amici, et al. (2011). "Oxidative stress-dependent oligomeric status of erythrocyte peroxiredoxin II (PrxII) during storage under standard blood banking conditions." Biochimie **93**(5): 845-53.

Ringe, D., G. A. Petsko, et al. (1983). "Structure of iron superoxide dismutase from Pseudomonas ovalis at 2.9-A resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(13): 3879-83.

Robinson, J. M. and J. R. Lancaster, Jr. (2005). "Hemoglobin-mediated, hypoxia-induced vasodilation via nitric oxide: mechanism(s) and physiologic versus pathophysiologic relevance." Am J Respir Cell Mol Biol **32**(4): 257-61.

Rossi, R., D. Giustarini, et al. (2006). "Membrane skeletal protein S-glutathionylation and hemolysis in human red blood cells." Blood Cells Mol Dis **37**(3): 180-7.

Rotruck, J. T., A. L. Pope, et al. (1973). "Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase." Science **179**(73): 588-90.

Sandstrom, P. A. and T. M. Buttke (1993). "Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4708-12.

Saran, M. and W. Bors (1990). "Radical reactions in vivo--an overview." Radiat Environ Biophys **29**(4): 249-62.

Shan, X. Q., T. Y. Aw, et al. (1990). "Glutathione-dependent protection against oxidative injury." Pharmacol Ther **47**(1): 61-71.

Shiva, S., Z. Huang, et al. (2007). "Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration." Circ Res **100**(5): 654-61.

Shonat, R. D. and P. C. Johnson (1997). "Oxygen tension gradients and heterogeneity in venous microcirculation: a phosphorescence quenching study." Am J Physiol **272**(5 Pt 2): H2233-40.

Singel, D. J. and J. S. Stamler (2005). "Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin." Annu Rev Physiol **67**: 99-145.

Smilkstein, M. J., G. L. Knapp, et al. (1988). "Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985)." N Engl J Med **319**(24): 1557-62.

Song, B. B., S. H. Sha, et al. (1998). "Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo- and vestibulo-toxicity." Free Radic Biol Med **25**(2): 189-95.
Stadtman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging." Science **257**(5074): 1220-4.
Stallings, W. C., K. A. Pattridge, et al. (1985). "The structure of manganese superoxide dismutase from Thermus thermophilus HB8 at 2.4-A resolution." J Biol Chem **260**(30): 16424-32.
Stamler, J. S., D. J. Singel, et al. (2008). "SNO-hemoglobin and hypoxic vasodilation." Nat Med **14**(10): 1008-9; author reply 1009-10.
Sundari, P. N., G. Wilfred, et al. (1997). "Does oxidative protein damage play a role in the pathogenesis of carbon tetrachloride-induced liver injury in the rat?" Biochim Biophys Acta **1362**(2-3): 169-76.
Thomas, D. D., X. Liu, et al. (2001). "The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O2." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 355-60.
Toppo, S., L. Flohe, et al. (2009). "Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme." Biochim Biophys Acta **1790**(11): 1486-500.
Tsai, A. G., A. Hofmann, et al. (2010). "Perfusion vs. oxygen delivery in transfusion with "fresh" and "old" red blood cells: the experimental evidence." Transfus Apher Sci **43**(1): 69-78.
Valeri, C. R. (1975). "Simplification of the methods for adding and removing glycerol during freeze-preservation of human red blood cells with the high or low glycerol methods: biochemical modification prior to freezing." Transfusion **15**(3): 195-218.
Vilar-Rojas, C., A. M. Guzman-Grenfell, et al. (1996). "Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins." Arch Med Res **27**(1): 1-6.
Wang, X., L. Wang, et al. (2011). "Structural insights into the peroxidase activity and inactivation of human peroxiredoxin 4." Biochem J.
Weisiger, R. A. and I. Fridovich (1973). "Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization." J Biol Chem **248**(13): 4793-6.
Wendel, A., S. Feuerstein, et al. (1979). "Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo." Biochem Pharmacol **28**(13): 2051-5.
Willardson, B. M., B. J. Thevenin, et al. (1989). "Localization of the ankyrin-binding site on erythrocyte membrane protein, band 3." J Biol Chem **264**(27): 15893-9.
Willekens, F. L., B. Roerdinkholder-Stoelwinder, et al. (2003). "Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation." Blood **101**(2): 747-51.
Wood, Z. A., L. B. Poole, et al. (2002). "Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins." Biochemistry **41**(17): 5493-504.
Wood, Z. A., L. B. Poole, et al. (2003). "Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling." Science **300**(5619): 650-3.
Woodward, J., J. Tate, et al. (1993). "Comparison of Ellman's reagent with N-(1-pyrenyl)maleimide for the determination of free sulfhydryl groups in reduced cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei." J Biochem Biophys Methods **26**(2-3): 121-9.
Yan, H. and J. J. Harding (1997). "Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase." Biochem J **328 (Pt 2)**: 599-605.