



APLICACIÓN DE N-ACETILCISTEÍNA COMO PROTECTOR DEL DAÑO A LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS GLÓBULOS ROJOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN EL BANCO DE SANGRE

Florencia Tomasina
Tutora: Dra. Leonor Thomson
2012

Dedicada enteramente a mis hermanos, mis padres, mis abuelos, mis
primos, mis tíos y mis amigos que me dio la vida.

Agradecimientos

Sin lugar a dudas a mis hermanos y mis padres que me dieron todas las herramientas y las oportunidades para que me pudiera desarrollar. La tesis es suya también. A mis primos y tíos de la vida que siempre están.

A mi tutora Leonor que me permitió dar mis primeros pasos en el área. Aprovecho también para agradecer con los que tuve el placer de compartir horas de trabajo conjunto con los cuales aprendí mucho Florencia A, Claudio y Laura.

A todos mis compañeros y jefes Ana, Beatriz, Claudio, Daniel, Ernesto, Flor A, B y S, Gabi, Gerardo, Inés, Laura, Leo, Lía, Lucía, Mage, Maggie, Majo, Nicolás, Rodrigo, Seba y Stephanie del Laboratorio de Enzimología-Fisicoquímica biológica que hacen que el trabajo sea un lugar placentero.

A la Dra. María Noel Álvarez y a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas en el Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina que me permitió aprender mucho sobre el cultivo de macrófagos.

A mis amigas que me dio la vida Paula, Sofía, Manuela y Stefi.

Y muy especialmente a mis ex-compañeros, mis grandes amigos, los que se toparon, me bancaron y aprendo mucho a diario (en orden cronológico de haberlos conocido): Mauri, Santi, Flor, Lu, Nadia, Yan, Claudio y Gabi.

Resumen

La sangre, tejido líquido cuyo componente celular mayoritario es el eritrocito, es responsable del transporte de oxígeno, nutrientes, hormonas, etc. Actualmente la sangre destinada a transfusión es desplasmatazada y el concentrado de glóbulos se conserva con una solución que contiene glucosa, adenina y manitol en medio salino hasta el momento de transfundirla. En estas condiciones el período máximo de almacenamiento es de 42 días debido al deterioro prematuro de los eritrocitos que sufren entre otras alteraciones cambios en la membrana plasmática que llevan a microvesiculización y exposición de fosfatidilserina. Es en este contexto que nos propusimos estudiar el uso de un antioxidante que apague la cadena de oxidaciones generadas dentro de la unidad de manera de prolongar el uso de la sangre desplasmatazada por encima de los 42 días. El antioxidante seleccionado fue la N-acetilcisteína (NAC). En bolsas de concentrados de glóbulos rojos mantenidas bajo las condiciones del banco de sangre durante 42 días se registró un aumento en la concentración de hemoglobina extracorpúscular, una disminución en la capacidad antioxidante total en la fracción intracelular analizada mediante el ensayo de TEAC, aumento de las proteínas de membrana y evidencias de proteínas nitradas en la membrana. Por otro lado, no se registró aumento en la oxidación lipídica a nivel de la membrana eritrocitaria analizada mediante la técnica de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Asimismo en lo que respecta a las bolsas conservadas en presencia de NAC se ha podido determinar una leve mejoría con relación a los índices anteriores.

Índice

Agradecimientos.....	3
Resumen	4
Abreviaturas	7
Introducción	9
Los eritrocitos	9
Proteínas de membrana del eritrocito	9
Lípidos de membrana de los eritrocitos	12
Especies reactivas y antioxidantes	12
Los eritrocitos en la transfusión	14
El paso de los eritrocitos durante su periodo de almacenamiento	15
Modificaciones a nivel de las proteínas	16
Modificaciones a nivel lipídico	17
Proceso de eriptosis	20
Macrófagos.....	21
Propuesta.....	22
Objetivos generales y específicos.....	25
Diseño metodológico.....	26
Materiales y Métodos.....	28
Glóbulos rojos (GR).....	28
Preparación de la membrana y fracción citosólica	29
Estudio de oxidación lipídica.	29
Concentración de Hb	30
Solubilización de las proteínas de membrana y posterior cuantificación por el método del ácido bicinconínico (BCA).....	30
Electroforesis de proteínas de membrana	31
Western blot.....	31
Capacidad antioxidante	31
Co-cultivo Macrófagos-eritrocitos.....	32
Estadística	32
Resultados	34
1. Sobrevida celular. Índice de hemólisis	34
2. Estado oxidativo de los componentes fundamentales de la membrana eritrocítica, a saber lípidos y proteínas.....	36
2A. Valoración de la lipoperoxidación en las membranas	37
2B. Evaluación de las proteínas de membranas.....	39
2.C. Valoración de la nitración de las proteínas de membrana.	42
3- Capacidad antioxidante total intracelular.....	43
4- Escenario post transfusión.....	46
Conclusiones.....	50

Perspectivas.....	53
Anexo.....	54
Referencia.....	56

Abreviaturas

ABTS - ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

BCA – Del inglés: Bicinchoninic Acid, Ácido Bicinconínico

BSA - Albúmina de suero bovino

BSA-NO₂ - Albúmina de suero bovino nitrada

CPD - Citrato-Fosfato-Dextrosa

DMSO - Dimetil sulfóxido

DPG - Difosfoglucosa

GR - Glóbulos rojos

GR+NAC - Glóbulos rojos con N-acetil-cisteína

Hb - Hemoglobina

MetHb - metaHemoglobina

MDA - Malóndialdehído

NAC - N-acetil-cisteína

OxyHb - oxyHemoglobina

PAGE – Electroforesis Gel de poliacrilamida

PBS - Buffer fosfato salino

dPBS - dulbecco PBS

PMA – de la sigla en inglés: phorbol myristate acetate, acetato de forbolmistrato

PUFA -Ácidos grasos poli-insaturados

Prx – Peroxiredoxinas

PS - Fosfatidil-Serina

RNS - especies reactivas al nitrógeno

ROS - especies reactivas al oxígeno

SAG-M - En medio salino adenina, glucosa y manitol

SDS - Dodecilsulfato sódico

TBA - Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – de la sigla en inglés: Thiobarbituric acid reactive substances, Especies reactivas al Ácido tiobarbitúrico

TEAC – de la sigla en inglés: trolox equivalent antioxidant capacity, Capacidad antioxidante total equivalentes a Trolox

Introducción

Los eritrocitos

El sistema circulatorio tiene como función fundamental hacer accesible nutrientes, oxígeno, hormonas, etc, a todas las células del organismo, así como la remoción de desechos metabólicos. Esta función es responsabilidad de la sangre, un tejido líquido cuyo componente celular mayoritario es el eritrocito (1). La sangre contiene aproximadamente $4-5 \times 10^9$ eritrocitos/mL, representando aproximadamente el 96% de todas las células de la sangre.

El término eritrocito deriva de dos palabras griegas: erythros (rojo) y kytos (hueco). Son células bicóncavas, con forma de disco sin núcleo, con un diámetro de 7.5×10^{-3} mm y 2×10^{-3} mm de alto aproximadamente. La vida promedio en la circulación de éstos es de 100-120 días en humanos y es determinada por la producción en la medula ósea y su remoción de la circulación por el hígado y el bazo, predominantemente (2, 3). La producción de los eritrocitos es controlada por el regulador primario eritropoyético, la eritropoyetina (4), mientras que la eliminación de los eritrocitos envejecidos a nivel del bazo es el resultado del reconocimiento específico para la fagocitosis por parte de los macrófagos locales (5, 6).

Cada eritrocito contiene aproximadamente 3×10^8 moléculas de Hemoglobina (Hb) (7). Esta altísima concentración intracelular le permite cumplir con la función esencial del transporte de gases desde y hacia los pulmones (7), además de ser la responsable del color rojo característico de la sangre.

Proteínas de membrana del eritrocito

La forma discoide bicóncava de un eritrocito normal asegura la difusión rápida del O_2 hacia sus moléculas de hemoglobina y lo ubican no más allá de $1 \mu\text{m}$ de la superficie celular (8). Son fácilmente deformables lo que les permite el seguro pasaje a través del sistema capilar (7). Las regiones del borde y de la concavidad de un eritrocito no ocupan posiciones fijas sobre la membrana celular. La membrana “rueda” a lo largo de

la célula al mismo tiempo que mantiene su forma, de manera semejante a la huella de un tractor. Esta propiedad mecánica notable de la membrana del eritrocito resulta de la presencia de una red submembranosa de proteínas que funcionan como un “esqueleto” de la membrana. La proteína espectrina, que recibe ese nombre porque se descubrió en eritrocitos fantasmas, da cuenta de aproximadamente el 75% del esqueleto de la membrana del eritrocito. Compuesta por dos cadenas polipeptídicas similares, una subunidad α de 280 kDa y otra β de 246 kDa, cada una de las cuales está constituida por segmentos repetitivos de 106 residuos que se pliegan en espirales enrollados helicoidales α de tres hebras. Estos grandes polipéptidos están enroscados de manera laxa para formar un dímero $\alpha\beta$ flexible de aproximadamente 1000 Å de longitud, dos de estos heterodímeros, se asocian además en una disposición cabeza-cabeza para formar un tetrámero. Hay aproximadamente 100.000 tetrámeros de espectrina por célula, que están entrecruzados en ambos extremos mediante una malla proteica densa e irregular que subyace la membrana plasmática del eritrocito (8). La espectrina también se asocia con una proteína de 1880 residuos conocida como anquirina, que se une a una proteína integral de membrana que constituye un canal iónico, conocido como Banda 3. Esta unión ancla el esqueleto a la membrana. La actina también está formando parte de este esqueleto, al igual que las proteínas 4.1R, dematina, tropomiosina y tropomodulina (9-12).

En la figura 1, se muestra un esquema que representa la conjunción de proteínas que forman el citoesqueleto de los glóbulos y como éstas se encuentran asociadas en la membrana. Además de observar otras proteínas transmembrana fundamentales como la banda 3.

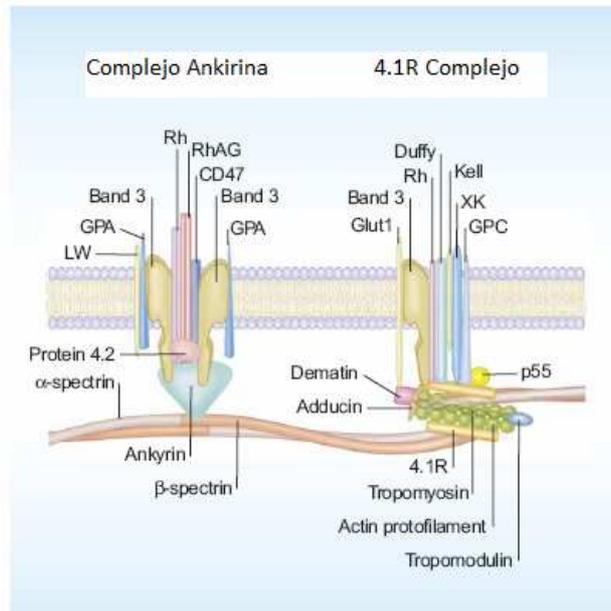


Figura 1. Esquema representativo de la membrana de los eritrocitos. La membrana es una estructura compuesta por lípidos en los cuales se ancla en dos dimensiones una malla elástica de proteínas que forman el esqueleto al que se suman proteínas transmembrana que se encuentran embebidas en la bicapa lipídica (13).

Existen más de 50 proteínas transmembrana con variada abundancia desde cientos a millones de copias por eritrocito. Algunas fracciones de estas proteínas definen los diversos grupos sanguíneos. Las proteínas de membrana exhiben heterogeneidad de funciones, actuando como proteínas de transporte, como proteínas de adhesión implicadas en la interacción de los eritrocitos entre ellos así como también con las células endoteliales, asimismo actúan como receptores de señales y un gran grupo aún con funciones desconocidas (7).

Dentro de las proteínas enfocadas en el transporte se encuentra la banda 3 (transporte de aniones), la aquaporina 1 (transportadora de agua), Glut1 (transportadora de glucosa y del ácido L-dehidroascórbico), transportador de urea, RhAG (transportador de gases, probablemente de dióxido de carbono), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransportadores, $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransportadores, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ cotransportadores, $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ cotransportadores y canal de Gardos (canal de K^+ dependiente de Ca^{2+}). Las proteínas con función de adhesión incluyen a ICAM-4, que interactúa con integrinas y con la proteína laminina (14-18).

Lípidos de membrana de los eritrocitos

En lo que respecta a los lípidos de la membrana de los eritrocitos, estos se componen de manera proporcional entre el colesterol y los fosfolípidos (9). Fosfatidilcolina y esfingomielina están predominantemente localizadas en la monocapa exterior, mientras que gran parte de la fosfatidiletanolamina y toda la fosfatidilserina (PS), junto con el fosfoinositol minoritario constituyen la capa interna de la membrana (19, 20). Existen diferentes tipos de transportadores de fosfolípidos tanto dependientes de energía como independientes, que están implicados en generar y mantener la asimetría de los fosfolípidos (21, 22). Las “Flipasas” transportan los fosfolípidos desde la capa externa a la capa interna, las “Flopasas” hacen el camino contrario de manera dependiente de energía. Las “escramblasas” mueven los fosfolípidos de manera bidireccional sin consumir energía. Se han descrito los “lipid rafts” o bolsas lipídicas en la membrana plasmática del eritrocito enriquecidos en colesterol y esfingolípidos asociados con proteínas específicas de membrana que incluye flotillinas, estomatina, proteína G y receptores adrenérgicos (23, 24).

Los eritrocitos al ser lisados y sus membranas aisladas, generan unas partículas membranosas que se conocen como eritrocitos fantasmas porque, al volver a las condiciones fisiológicas, se sellan nuevamente para formar partículas incoloras que retienen su forma original pero que están desprovistas de citoplasma (8).

Especies reactivas y antioxidantes

Las especies reactivas que abarcan tanto el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) como el superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y también peroxinitrito (ONOO^-) pueden difundir hacia dentro del eritrocito, utilizando canales aniónicos como la banda 3 (25) o por difusión simple. Esto le impone tanto a los eritrocitos circulantes como a los presentes en los concentrados a ser transfundidos, importantes exigencias en cuanto a capacidad antioxidantes y estado redox de los mismos. Puesto que los glóbulos están en continua exposición al oxígeno, es vital mantener el estado redox de los mismos.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) de acuerdo a su propio nombre, derivan y presentan una reactividad mayor en comparación con la molécula de oxígeno (26, 27). No sólo comprenden radicales libres, como el superóxido, el radical hidroxilo, peróxidos radicalares y los alcoxilos radicalares, también incluyen al peróxido, al oxígeno singulete y al ácido hipocloroso (27). Por definición, los radicales libres son átomos o moléculas que poseen uno o más electrones desapareados. Los electrones son más estables cuando se encuentran apareados en orbitales: dos electrones apareados con diferentes direcciones en sus espines. Por ende, los radicales son generalmente menos estables que los de naturaleza no radicalar (28).

Los efectos ejercidos por el conjunto de moléculas reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) en la vasculatura están estrechamente asociados al eritrocito, considerando su alta densidad (45% del volumen plasmático total), las enzimas antioxidantes que porta y la alta concentración de Hb intracelular que hacen que esta célula sea tanto fuente como resumidero de especies reactivas en la circulación.

Los antioxidantes pueden ser definidos como sustancias que se oponen a la oxidación o que inhibe las reacciones promovidas por oxígeno o hidroperóxidos. Los antioxidantes son enzimas o otros compuestos orgánicos que son capaces de neutralizar el efecto del daño en los tejidos (29).

Tomando en cuenta la facilidad a la exposición que posee el eritrocitos al estrés oxidativo sumado a la característica de poseer baja (o nula) capacidad a la síntesis de nuevas proteínas y lípidos que remplacen el daño generado en las moléculas es de esperarse que dentro del eritrocitos se encuentre con una batería importante de enzimas antioxidantes como ser la superóxido dismutasa (CuZnSOD), catalasa, glutatión peroxidada (GPx), metahemoglobina reductasa (30) y cuatro representantes de la familia de las peroxirredoxinas (Prxs) (31, 32). La Prx-2 es una peroxidasa dependiente de tiol de 2-Cys (33). Reside en el citoplasma como dímero y decámero en equilibrio dinámico (34). Se ha reportado la capacidad de la Prx-2 de prevenir la oxidación de la hemoglobina (30). El glutatión es otro indispensable antioxidante que se encuentra en concentración cercana a los 2 mM, sintetizado a expensas de los aminoácidos que lo conforman (glicina, glutamato y cisteína) por la enzima L-glutamato-cisteína ligasa y glutamato sintetasa (35). El glutatión (GSH) el cual

reacciona con las especies reactivas del oxígeno para formar GSSG, el cual es reciclado a GSH nuevamente por el sistema de glutatión reductasa que es NADPH dependiente.

Los eritrocitos en la transfusión

La función básica de transportar oxígeno, como se comentaba anteriormente es realizada por los eritrocitos por lo que, una pérdida abundante de este tejido es un problema clínico de extrema gravedad que requiere de un tratamiento de emergencia, consistente en transfusión de sangre total o más frecuentemente de concentrados de glóbulos rojos. Considerando que se utilizan cerca de 90 millones de unidades de concentrado de eritrocito por año en el mundo (36) es de extrema importancia la conservación de la sangre y sus componentes en caso de necesidad de transfundir. Es por este motivo que se viene trabajando desde hace un largo tiempo en el tema de la conservación. En el pasado la única manera de poder transfundir, es decir transferencia de sangre o de un componente sanguíneo de una persona (donante) a otra (receptor), era con el donante al lado del receptor. El componente sanguíneo que se transfunde más habitualmente son los concentrados de glóbulos rojos, que pueden restablecer la capacidad de la sangre para transportar oxígeno. Este componente puede transfundirse a un receptor con hemorragia o anemia grave (37).

Hoy en día, en los bancos de sangre, la sangre se extrae en presencia de una solución que contiene citrato, fosfato y dextrosa (CPD) (38), a la cual se le quita el plasma por centrifugación, y el concentrado de glóbulos obtenido se lo conserva con otra solución que contiene glucosa, adenina y manitol en medio salino (SAGM) para una administración posterior. Estos agregados mantienen el fosfato intracelular y la glucosa en los eritrocitos permitiendo obtener el ATP necesario para las funciones celulares. Esta solución se conserva a 4°C en una bolsa de transfusión estéril de dietil-hexil-ftalato que permite el pasaje de gases dentro de la bolsa. Dicha bolsa inclusive, frena la pérdida de la membrana de los eritrocitos por microvesiculación al ingresar componentes de las bolsas a la solución de concentrado de glóbulos (39). Por último, el manitol presente en la solución de conservación actúa como estabilizador de

membrana que permite reducir hasta en un 50% la hemólisis y como atrapador de especies reactivas al oxígeno que se generan durante el período de almacenamiento por la presencia de oxígeno (40, 41). Bajo estas condiciones el período autorizado máximo de utilización de los concentrados de los eritrocitos es de 42 días.

El paso de los eritrocitos durante su periodo de almacenamiento

El concentrado de eritrocito tiene un período máximo de utilización relativamente corto, de 42 días. Sin embargo, aún dentro de ese período se han reportado cambios en la concentración de potasio, difosfoglicerato (DPG), ATP, lípidos y cambios a nivel de la membrana. Asimismo, se ha observado que los eritrocitos se vuelven más rígidos y la unidad más ácida, con aumento de la concentración de hemoglobina (Hb) extracorpúscular (42) y lípidos biológicamente activos libres (43). Muchos de estos procesos de cambio son generados por oxidaciones que ocurren dentro de las células produciendo modificaciones irreversibles tanto a nivel proteico así como en los lípidos de membrana.

El factor de que este concentrado de glóbulos este frente a la presencia de oxígeno lo deja latente a sufrir oxidaciones. Estudios donde preservan al concentrado de glóbulos en condiciones anaeróbicas (en presencia de helio) logran observar una clara disminución de la oxidación en las proteínas de membrana (44).

Actualmente, tanto para las normas Europeas así como las de Estados Unidos prevén un límite máximo de hemólisis de 0.8% y de 1% respectivamente al final del período de conservación de los concentrados de eritrocitos (42). Estudios recientes muestran que las tasas de hemólisis al final del período máximo de conservación se correlaciona no sólo con la hemólisis generada inicialmente sino que también depende del donador; los autores plantean que la sangre de algunos individuos “tienen características que no son adecuadas para el almacenamiento” (“poor storage characteristics”), resultando en un “donador característico no definido todavía” (45). El sobrenadante obtenido del concentrado de los eritrocitos recién donado es transparente y sin color. Sin embargo, el sobrenadante del concentrado de eritrocitos hemolítico es de color rosado-rojo, como resultado del incremento en la concentración de hemoglobina libre (46). Varios autores han descrito que luego de transcurrido el período máximo de conservación se

observa un aumento del 0.24% en la cantidad de hemoglobina extracorpúscular para los glóbulos suspendidos en medio salino con adenina y manitol (46, 47).

Modificaciones a nivel de las proteínas

La proteína transmembrana “banda 3”, encargada del intercambio de cloruros por bicarbonatos, muestra alteraciones progresivas en su estructura durante el período de almacenamiento. Estos cambios se los asocia con degradación y/o la formación de agregados macromoleculares con otras moléculas (48, 49). Una de las proteínas que forma complejos con la banda 3 es la hemoglobina (50). Información adicional obtenida mediante inmunoblots muestra un aumento en la susceptibilidad de la banda 3 a la degradación proteolítica, asociado a un incremento en la exposición de epítopes que están asociados en el reconocimiento de los eritrocitos viejos *in vivo* por auto-anticuerpos (44, 51). El rol central de la banda 3 de mantener la forma del eritrocito se hace evidente por la relación entre las alteraciones en la estructura de la banda 3, la morfología del eritrocito y la deformidad celular. En la figura 2 se puede observar que la migración de la porción N-terminal citosólica de la banda 3 a la cara externa de la membrana celular durante el almacenamiento se acompaña de los cambios morfológicos que se producen en el eritrocito (44).

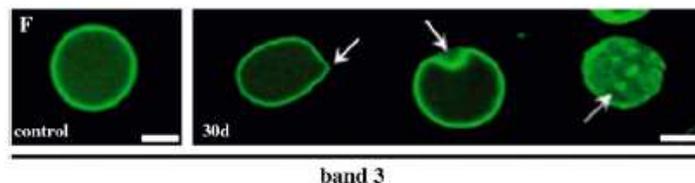


Figura 2. Inmuno fluorescencia de la porción N-terminal citosólica de la banda 3, la cual surge en la parte exterior de la membrana luego de 30 días de conservación de los eritrocitos en las condiciones del banco de sangre (44).

Existe evidencia también sobre cambios en las proteínas de membrana generadas por especies reactivas del oxígeno al reaccionar con las proteínas. La literatura plantea que las mayores proteínas modificadas son las del citoesqueleto. Durante los primeros siete días de almacenamiento, la degradación oxidativa se observó prevalentemente en la banda 4.2, de forma menos pronunciada en las bandas 4.1 y 3, al igual que en la

espectrina. Asimismo, se observa un incremento de productos proteicos unidos a la membrana (52). Se ha reportado la presencia de la proteína citosólica peroxirredoxina-2 junto con la hemoglobina unida a la membrana plasmática, ambas oxidadas (53). Se ha puesto en consideración la utilización de la peroxirredoxina-2 como candidata a ser un biomarcador de lesiones oxidativas de los eritrocitos durante su almacenamiento en las condiciones del banco de sangre en conjunto con la valoración de la formación de malondialdehído (MDA) (53).

El transporte del oxígeno por parte de los eritrocitos depende del mantenimiento intracelular de la Hb en su forma reducida. La Hb es más o menos esférica, con un diámetro de casi 5,5 nm. Es una proteína tetramérica que contiene cuatro grupos prostéticos hemo, uno asociado a cada una de las cadenas polipeptídicas (54). Cuando la Hb es oxidada a meta Hb, el hierro del grupo hemo se transforma en Fe^{3+} , que es incapaz de fijar oxígeno. Normalmente los eritrocitos contienen menos de 1 % de metaHb (54).

Modificaciones a nivel lipídico

Muchos de estos procesos de cambio son generados por oxidaciones que ocurren dentro de las células provocando modificaciones irreversibles como la formación de hidroperóxidos lipídicos en la membrana plasmática. Estos hidroperóxidos y grupos carbonilo nuevos aumentan la permeabilidad de la membrana, porque producen nuevos centros hidrofílicos en los fosfolípidos, inductores de cambios en la fluidez natural y permeabilidad (55).

La lipoperoxidación es una reacción en cadena en la cual el carbono en la posición alílica de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por su sigla en inglés) reacciona con moléculas reactivas del oxígeno, formando radicales peroxilos ($ROO\cdot$). El radical alílico puede luego obtener el átomo de hidrógeno desde un PUFA cercano, transformándose en un lipoperóxido ROO-H, y creando entonces un nuevo radical centrado en carbono, llevando a que se repita luego el proceso descrito (Fig. 3). El evento de abstraer el protón de inicio es normalmente realizado por oxidantes. El aumento de insaturaciones en los ácidos grasos hace que sean más propenso a peroxidación. En

subsecuentes reacciones, los lipoperóxidos pueden generar una gran variedad de productos finales.

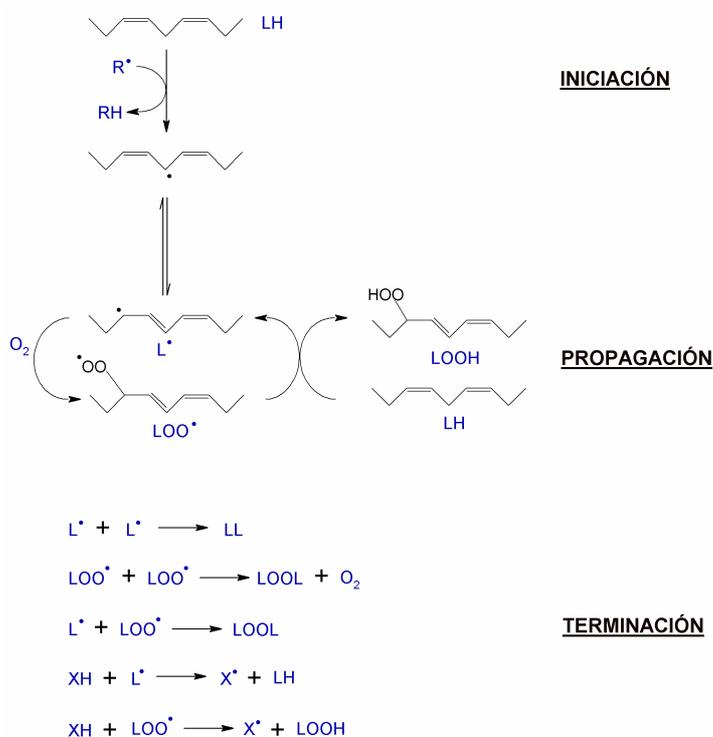


Figura 3. Esquema de las fases de la lipoperoxidación de lípidos insaturados. Las fases incluyen un proceso de iniciación en el que un carbono pierde un hidrógeno por un agente oxidante (R[•]) formando un radical, el cual al reaccionar con oxígeno molecular forma un radical lipoperóxido, que al reaccionar con otro lípido insaturado forma un hidroperóxido lipídico al igual que un nuevo lípido radical (fase de propagación). En la fase de terminación, los radicales lipídicos reaccionan entre sí formando nuevos compuestos (LOOL), o se apagan mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno de algún compuesto antioxidante. LH: lípido; L[•]: radical (centrado en el carbono) lipídico; LOOH: hidroperóxido lipídico; LOO[•]: radical lipoperóxido; XH: compuesto antioxidante. Modificado de: Trostchansky, A.; Trujillo, M.; Castro, L.; y Rubbo, H. Estudio de las modificaciones oxidativas de la lipoproteína de baja densidad (LDL): análisis de la oxidación del componente lipídico y proteico. Actividad Práctica UTI-DREMR Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, 2007.

El MDA es el mayoritario de los diversos productos finales de bajo peso molecular formados por la descomposición de ciertos productos lipídicos peroxidados primarios y secundarios (56). En la figura 4, se observa uno de los modelos propuestos para la formación del MDA a partir de un ácido graso insaturado (de membrana plasmática de eritrocito, por ejemplo) con la formación de un enlace interno monocíclico entre oxígenos que formaban parte de peróxidos en el mismo lípido. También se plantea la posibilidad de formación de enlaces internos del tipo bicíclico de la misma forma descrita o mediante la reacción entre dos lipoperóxidos. Para todas estas vías, el MDA

aparece como producto final de la lipoperoxidación. En eritrocitos conservados bajo las condiciones del banco de sangre se ha reportado un aumento en el nivel de MDA a nivel de fosfolípidos de membrana (57).

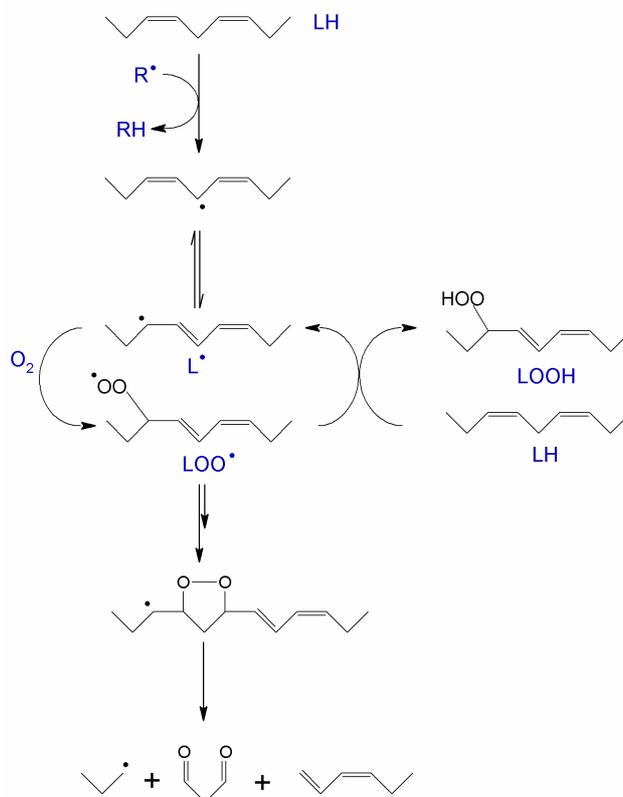


Figura 4. Esquema de un modelo propuesto de lipoperoxidación de un ácido graso de membrana con la formación de MDA como uno de los productos finales de la lipoperoxidación. El modelo incluye la formación de un enlace interno monocíclico entre los oxígenos de los radicales lipoperoxilo (56).

Desde la mitad del siglo XIX, numerosos derivados del ácido tiobarbitúrico (TBA) han sido preparados y estudiados como potenciales drogas, tintas y fotosensibilizadores. Muchas de estas derivaciones toman ventaja en el hecho de que el ácido tiobarbitúrico actúa como nucleófilo en ácido catalizando reacciones con compuestos con carbonilos (aldehídos y cetonas). En 1948, Bernheim y colaboradores propusieron que la oxidación de fosfolípidos puede ser la responsable de la formación de TBARS (58) en el homogenizado y analizó el desarrollo de la reactividad de TBA durante la autooxidación individual de lípidos y PUFASs (59). Estos estudios generaron evidencia de que los derivados lipídicos contienen 3 carbonos y al menos un carbonilo. A medida que estos datos se fueron obteniendo se fue reconociendo la utilidad del método del TBA como test para la peroxidación lipídica, bajo condiciones ácidas.

En la figura 5, se observa un esquema de como el TBA reacciona con el MDA formando un producto fluorescente que absorbe a 532 nm y emite a 552 nm. Con este método se puede por lo tanto, tener una cuantificación de formación de producto de lipoperoxidación, que empleamos en nuestros estudios como un índice de modificación de membrana en nuestros estudios sobre envejecimiento de glóbulos rojos, como veremos más adelante.

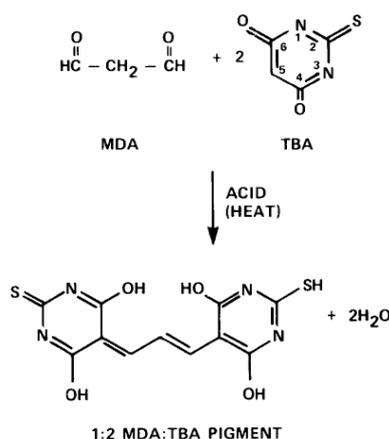


Figura 5. Esquema de la reacción del TBA con el MDA formando un producto coloreado y fluorescente. La detección del MDA (producto final de la lipoperoxidación) por el método de TBA permite determinar los niveles de oxidación de los lípidos de membrana, entre otros (56).

Proceso de eriptosis

El conjunto de alteraciones mencionadas anteriormente pueden conducir al proceso denominado como eriptosis, que es un tipo de apoptosis que sucede en el eritrocito. Estas células, a pesar de carecer de núcleo y mitocondria, comparten mecanismos propios de las etapas finales de la apoptosis, incluyendo la activación de proteasas, la externalización de PS y la formación de microvesículas apoptóticas. Estos fenómenos se consideran como típicos de los eritrocitos envejecidos presentes en las bolsas de transfusión durante periodos prolongados. En la eriptosis, se identifican claramente la pérdida de potasio intracelular, la activación de canales de calcio, la contracción celular, la activación de caspasas, la activación de esfingomielinasa y la activación de escramblasas (enzimas translocadoras de fosfolípidos) con la consiguiente externalización de PS (60, 61). Estos eventos son mecanismos necesarios para el

reconocimiento y fagocitosis por macrófagos del sistema fagocítico mononuclear, promoviendo su destrucción no inflamatoria lo que evita la hemólisis intravascular sumamente peligrosa (31, 32).

Los principales mecanismos moleculares involucrados en el inicio de la eriptosis son disminución de la carga energética de la célula con disminución de la relación ATP/ADP con aumento concomitante de AMP, disminución del poder reductor del eritrocito evidenciado por el aumento de la relación NADP/NADPH y disminución de la relación glutatión reducido/oxidado. Alguna de estas señales moleculares o las tres son el punto de convergencia de los factores que pueden provocar eriptosis (envejecimiento, estrés metabólico, daño tóxico, infecciones, etc.). Las tres formas de estrés metabólico que pueden inducir eriptosis, estrés energético, oxidativo y osmótico, producen un incremento de calcio intracelular. Para el caso del estrés oxidativo, la disminución de glutatión reducido incrementa la permeabilidad al calcio a través del canal de cationes (61).

Macrófagos

En los procesos inflamatorios, se produce el reclutamiento de células pertenecientes al sistema inmune innato hacia el sitio de lesión, entre estas células figuran los monocitos/macrófagos, responsables de la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en el denominado “estallido respiratorio”. In vitro, se ha reportado en macrófagos murinos J774 que frente a la presencia de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) induce la liberación de superóxido por parte de las células por 90-120 minutos. La activación, lleva al ensamblaje de los



componentes citosólicos de la NADPH oxidasa con su componente de membrana (figura 6), lo que lleva a que libere superóxido (Eq. 1), el cual puede dismutar tanto espontáneamente ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7) como a velocidad controlada por difusión en presencia de superóxido dismutasa (SOD, $k \sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), para generar peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Eq. 2) (62).

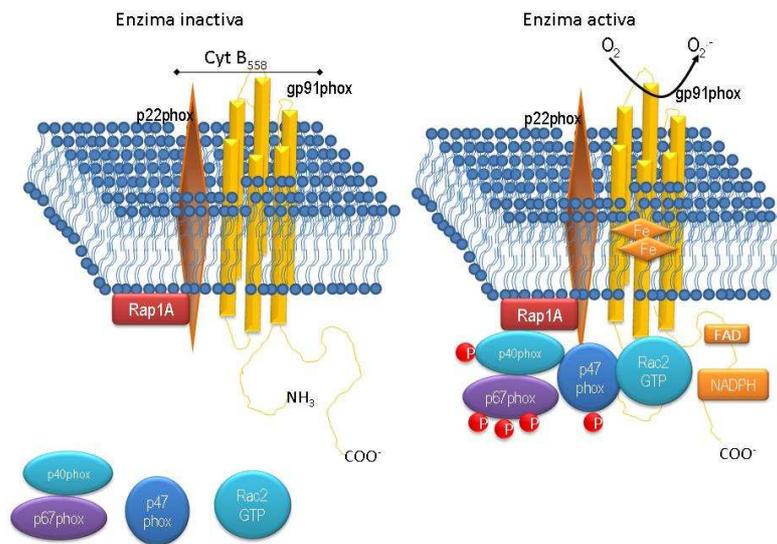


Figura 6. NADPH oxidasa con su componente de membrana en la parte izquierda separada de su componente citosólico. Frente al agregado de PMA el componente citosólico se ensambla con la parte de membrana de la NADPH oxidasa lo que genera la activación de la enzima (Modificado de Assari, Medical Immunology 2006 5:4).

Propuesta

Partiendo del conocimiento del rol del estrés oxidativo en el envejecimiento celular en general y de los eritrocitos sometidos a las condiciones del banco de sangre en particular, nos propusimos estudiar el impacto del agregado de un antioxidante sobre la estabilidad de los componentes eritrocíticos modificados por largos períodos de almacenamiento. Considerando a un antioxidante como cualquier sustancia que se presenta a baja concentración comparada con su sustrato oxidable, inhibiendo significativamente la oxidación de ese sustrato (63).

El antioxidante seleccionado es un derivado del aminoácido cisteína, la N-acetilcisteína (NAC), antioxidante no tóxico, compuesto que contiene un tiol con actividad antioxidante que incrementa los niveles de capacidad reductora de la célula (64). Tiene la ventaja de su seguridad y empleo clínico previo como agente mucolítico y en el tratamiento de las sobredosis con paracetamol, en dosis de 200-600 mg/día para adultos y niños mayores de 7 años. NAC es un residuo de cisteína acetilado, con un

óptimo estado redox de su tior que le permite mantener y proteger a la célula del stress oxidativo. Mantiene el estado reducido del glutatión lo que promueve un balance positivo redox dentro de la célula . [26].

Estudios *in vitro* muestran su capacidad de contrarrestar efectos inducidos por oxidantes potentes como el peroxinitrito, interviniendo en el mantenimiento del estado redox de los GR, previniendo los cambios estructurales microscópicos generados durante situaciones de estrés oxidativo (figura 7) y colaborando en la expresión “correcta” de los marcadores de senescencia (65). Asimismo, se ha observado al NAC con capacidad de disminuir la lipoperoxidación de membranas, así como también evitar el daño en la misma (66). NAC tiene capacidad directa de atrapar especies reactivas del oxígeno, así como también al ácido hipocloroso (HOCl) (67).

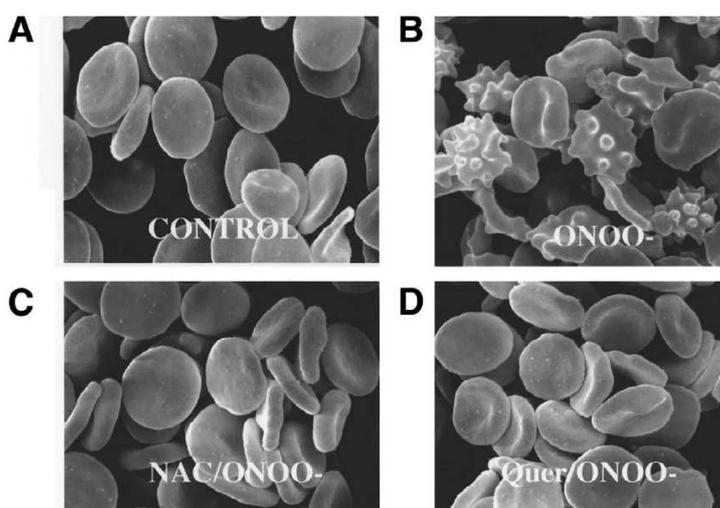


Figura 7. Microscopía de barrido. La forma normal discoide (A) fue marcadamente alterada por la exposición a ONOO-, el cual induce a la formación de ‘acantocitos’ (eritrocitos espinosos) con un número importante de espículas (blebs) en la superficie (B). Pre-incubación con NAC (NAC/ONOO-) (C) o quercetina (Quer/ONOO-) (D) previenen la formación de las espículas (65).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) un país para que se encuentre con autosuficiencia de hemocomponentes necesita que al menos el 5% de sus pobladores donen sangre. Actualmente según estadística del centro de hemoterapia del hospital de Clínicas menos del 2.93% de los uruguayos dona sangre {Decaro, 2010 #79}. Considerando entonces, que existe a nivel nacional una preocupación por el escaso número de donantes con la paradójica situación de deber descartar unidades que alcanzan los cortos 42 días de almacenamiento. Es en este contexto que se plantea

este proyecto. Lograr disminuir las unidades descartadas al mostrar evidencias claras para aumentar la vida útil de las mismas mediante el uso de un antioxidante, que prevenga la cadena de oxidaciones generadas dentro en la unidad, permitirá prolongar el uso de las unidades por encima de los 42 días.

Objetivos generales y específicos

Generales: Estudio de la protección por N-acetilcisteína de las modificaciones oxidativas de la membrana plasmática eritrocitaria durante el almacenamiento en el banco de sangre con el fin de incrementar el período de biodisponibilidad para transfusiones.

Específicos: Evaluar el efecto que el almacenamiento per se y el efecto de la N-acetilcisteína sobre las unidades de eritrocitos concentrados sometidos a las condiciones del banco de sangre, analizando:

1. La sobrevivencia celular. Midiendo hemoglobina extracorpúscular como índice de hemólisis.
2. El estado oxidativo de los componentes fundamentales de la membrana eritrocítica, a saber lípidos y proteínas, mediante valoración de la oxidación de lípidos, el estado de agregación de las proteínas de membrana, además de nivel de nitración mediante western blot.
3. El estado redox intracelular, estudiando la evolución de la capacidad antioxidante total de la fracción intracelular.
4. Susceptibilidad de los GR a la lisis y/o fagocitosis por macrófagos control o activados para la producción de O_2^- en co-cultivos.

Diseño metodológico

Estrategia de investigación

Los concentrados de glóbulos fueron preparados a partir de sangre fresca donada al Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas, luego de la firma de consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de dicho Hospital. Cada una de las muestras se separó en dos alícuotas idénticas una de las cuales se trató con NAC y la otra con PBS como control y se mantuvieron en bolsas de preservación de sangre y hemoderivados, bajo las mismas condiciones del banco de sangre. El efecto de la adición de NAC sobre el deterioro celular inducido por el envejecimiento en condiciones de almacenamiento se valoró estudiando:

1. La sobrevida celular con el fin de correlacionar las modificaciones oxidativas de los componentes de la membrana plasmática con la pérdida de viabilidad celular. Para ello se evaluó la lisis celular midiendo la evolución de la concentración de Hb libre en el medio extracelular del concentrado mediante espectrofotometría.
2. Para evaluar las alteraciones oxidativas de los componentes de la membrana plasmática; se cuantificó la concentración de MDA mediante la medida de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), una técnica ampliamente empleada como índice de peroxidación lipídica. Continuando con esta línea se evaluó a las proteínas de membrana de manera cualitativa empleando geles desnaturizantes y más cuantitativamente por el método del BCA de manera de poder observar si existe un aumento de las proteínas a medida que envejecen los eritrocitos. Además, se utilizaron técnicas de Western blot para observar la presencia de proteínas nitradas a nivel de la membrana.
3. Para evaluar el estado redox intracelular, se midió el estado de los antioxidantes totales mediante la técnica TEAC (Trolox equivalente antioxidant capacity) en la fracción citosólica.

4. Para evaluar la labilidad de los eritrocitos al estrés oxidativo se cuantificó la hemoglobina extracorpúscular generada al exponer los glóbulos a macrófagos activados con PMA en un sistema de co-cultivo.

Materiales y Métodos

Los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Las medidas de cuantificación de hemoglobina, así como sus espectros fueron realizadas en un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-visible.

Las medidas en placa de los distintos métodos (TBARS, TEAC y BCA) fueron realizadas en el lector de microplacas absorbancia/fluorescencia UV/vis Varioskan Flash.

Glóbulos rojos (GR)

Los concentrados de eritrocitos a analizar fueron aportados por el Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas, donde se prepararon los concentrados, que se fraccionaron en dos bolsas, las cuales se preservaron en las mismas condiciones que en el banco (en solución SAGM a 4°C). A una de las bolsas resultantes se le adicionó NAC en una concentración de 1 mM, y a la otra el solvente (PBS), procediéndose como se muestra en la figura 8. La concentración del antioxidante (NAC 1 mM) se calculó en base a la concentración utilizada en la referencia Grinberg L. et al (2005) (68). Se preparó una concentración stock de 170 mM en buffer fosfato salino (PBS, fosfato 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4), de manera de sólo tener que agregar un mL por bolsa. En todos los casos las incubaciones de las unidades, que duraron hasta 80 días y con toma de muestra cada semana, fue bajo condiciones estériles, y empleando las bolsas originales.

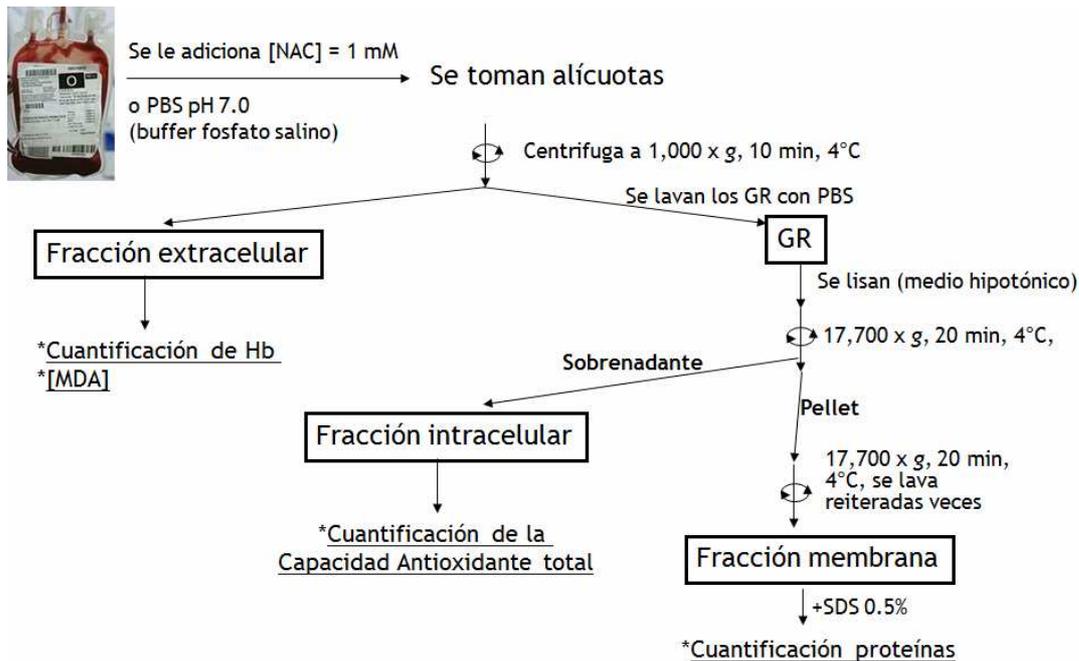


Figura 8. Esquema del procedimiento realizado.

Preparación de la membrana y fracción citosólica

Los glóbulos rojos se centrifugaron a 1.000 x g por 10 minutos de manera de separar las células de la fracción extracelular. Luego se sustituyó con PBS el mismo volumen quitado, y se centrifuga a la misma velocidad. Se reiteró el proceso de lavado por tres oportunidades. Los GRs se lisaron con 1 volumen de buffer fosfato de sodio 5 mM pH 8 (buffer de lisis, hipotónico), se congelaron posteriormente y las membranas se aislaron mediante centrifugación (20 minutos a 27,000 x g). El sobrenadante corresponde a la fracción citosólica. Para continuar con la preparación de la membrana, al pellet se le repuso el mismo volumen de sobrenadante obtenido con buffer de lisis. Se los sometió a lavados retirados hasta obtener una membrana blanca (6-7 lavados). Para evitar la ulterior oxidación lipídica se agregó beta-hidroxi-tolueno (BHT) 0.0375 % (69).

Estudio de oxidación lipídica.

Para estudiar la presencia de productos de oxidación lipídica empleamos la técnica de medida de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se preparó solución de TCA/TBA/HCl (15 % w/v de tricloroacético, 0.375 % w/v de ácido tiobarbitúrico en 0.25 N HCl). Para la reacción, partiendo de 500 µL de la fracción extracelular se la volvió a centrifugar a 1.000 x g de manera de asegurarnos que no haya glóbulos en

ella, se le agregó 1 mL de la solución de TBA al sobrenadante y se los mezcló enérgicamente. Se calentó a ebullición durante 30 minutos, se dejó enfriar y se centrifugó durante 10 minutos a 2,200 x g por 10 minutos (56, 70). Se midió fluorescencia, con una longitud de onda de excitación de 532 nm y de emisión de 553 nm para obtener la concentración de malóndialdehído. Se realizó cada vez una curva de calibración con malóndialdehído bis (dietilacetal) en un rango entre 0.05-0.9 μM (70).

Concentración de Hb

La concentración de oxy-Hb y meta-Hb en la fracción extracelular obtenida como se describió anteriormente, se determinó espectrofotométricamente por medida de la absorbancia a 577 nm y 630 nm. Para determinar la concentración se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración de oxy-Hb } (\mu\text{M}) = 66 A_{577} - 80 A_{630};$$

$$\text{Concentración de metaHb } (\mu\text{M}) = 279 A_{630} - 3 A_{577} \quad (71).$$

Para determinar el porcentaje de Hb en la fracción extracelular, se cuantificó la concentración total de Hb en la bolsa y a esa concentración se corresponde con el 100% de la Hb. Para determinar esto, se lisó los eritrocitos como se describió anteriormente y luego se cuantificó esta solución como se describió previamente. A partir de esta concentración se determina específicamente el porcentaje de concentración de Hb que corresponde de este 100%.

Solubilización de las proteínas de membrana y posterior cuantificación por el método del ácido bicinónico (BCA)

Una fracción de las membranas aisladas se masa en balanza analítica y se disuelve en detergente SDS (2.5 %) en volumen adecuado (dilución 1/10). Con la masa y el volumen se determina una "densidad relativa" para poder normalizar las muestras. La cuantificación se realizó con un kit de BCA (SIGMA). Para este método se preparó el reactivo mezclando 50 partes de A (ácido biocinónico) con 1 parte de B (4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se hizo una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de entre 0.2-1 mg/mL. Para una placa de 96 pocillos se colocaron 8 partes del

reactivo con una parte de muestra (200 μ L de reactivo + 25 μ L de muestra). Se hizo una incubación de 15 minutos a 37 °C. Se midió absorbancia a 562 nm.

Electroforesis de proteínas de membrana

Para evaluar las proteínas de membrana realizamos electroforesis SDS-PAGE (poliacrilamida al 10% gel resolutivo y de 5 % para el gel concentrador). El pellet lavado reiteradas veces correspondiente a la membrana del eritrocito, se solubilizó con SDS 2.5 %, y se agitó hasta solubilizarlo totalmente. Se preparan las proteínas de membrana en buffer de la muestra (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.053% azul de bromofenol) conteniendo β -mercaptoetanol para la corrida de electroforesis de manera de obtener una concentración de proteínas de 15 μ g/carril. La desnaturalización de la muestra se realiza con calentamiento a 100°C durante 3 minutos, en buffer de carga. El revelado de las proteínas se realizó por tinción con Coomassie coloidal o por tinción de plata.

Western blot

Las proteínas separadas en SDS-PAGE en condiciones reductoras se transfirieron a una membrana de PVDF toda la noche a 20 V y 4°C. Las membranas se bloquearon por una hora a temperatura ambiente con 3% BSA/TBS (50 mM Tris y 150 mM NaCl). Luego del bloqueo la membrana se incubó durante una hora con una dilución 1/2000 del anticuerpo policlonal de conejo anti-nitrotirosina generado en el laboratorio (ver adjunto), en 1% BSA/ TBS-Tween 0.1% con agitación. Se realizan tres lavados con TBS-Tween 0.1% (5, 10 y 15 minutos) y se incubó por una hora con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano diluido 1/5000 en 1% BSA/ TBS-Tween con agitación. Nuevamente se repitieron los lavados. La detección se realizó usando quimioluminiscencia (ECL Plus, BioRad) como técnica de revelado y autoradiografía.

Capacidad antioxidante

Mediante el ensayo de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) se determinó la capacidad antioxidante de la fracción citosólica de los GR. El ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) 5.00×10^{-4} M se preparó en PBS pH

8.0. A 99 mL de esta solución se le agregó 1 mL de persulfato de sodio (6.89×10^{-3} M), incubándose durante 16 hrs en la oscuridad para obtener la forma oxidada de la molécula. El ABTS oxidado (190 μ L/pozo) se sembró en placa de 96 pocillos con 10 μ L de muestra, la cual consistió en la fracción citosólica obtenida como anteriormente se describió, diluida 1:100 en agua destilada. La curva de calibración se realizó empleando trolox como estándar en un rango de concentración de 0.1-1 mM. La placa se incubó por 30 minutos a 37°C, y se leyó la absorbancia a 734 nm (72).

Co-cultivo Macrófagos-eritrocitos

Empleando co-cultivo de eritrocitos y macrófagos activados con PMA para la producción de superóxido por la NADPH oxidasa se estudió la resistencia de los GR al estrés oxidativo generadas mediante observación de la integridad celular y propensión a la fagocitosis mediante observación del co-cultivo por microscopía óptica 1000X (células fijadas) y por la cuantificación de Hb libre: Macrófagos J774 en confluencia, cultivados en RPMI con 5% CO₂ a 37°C se recogieron y sembraron en una nueva placa de cultivo, a la cual previamente se le colocó un cubre objeto en el pocillo (lavado previamente con etanol y secado) . Se sembraron en el mismo medio en estufa con 5% CO₂ a 37°C, hasta confluencia (3 días), se quitó el medio y se agregaron 5 eritrocitos por macrófago (en una placa de 6 pocillos se estima unos 5×10^6 macrófagos) en Dulbecco's PBS (dPBS, NaCl 137 mM, l-Arg 1 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 0.9 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaH₂PO₄ 1.5 mM, NaH₂PO₄ 8.1 mM, Glucosa 5.5 mM). Los macrófagos se activaron con PMA (1 mg/mL). El co-cultivo se mantuvo por dos horas en estufa, a 37°C, con 5% CO₂. Luego, se recogió el sobrenadante al cual se le midió la absorbancia a 577 nm y a 630 nm de manera de cuantificar la Hb libre (índice de hemólisis). Se lavó con dPBS, de manera de sacar todo eritrocito que no hayan sido fagocitados. Luego se dejó 10 minutos con buffer de lisis de glóbulo. Se tomó un portaobjetos y se le colocó una gota de solución de fijación. Sobre dicha gota suavemente, de manera de no generar burbujas, se colocó el cubreobjetos que contiene las células. Luego se sellaron con un esmalte los preparados. Se miró al microscopio óptico.

Estadística

Los estudios se realizaron por triplicado para cada una de las muestras, los datos se reportan como la media \pm el desvío estándar, la diferencias entre las medias de la condición control y con el agregado del fármaco se calcularon mediante el test de student, considerando significativas diferencias con $p < 0.05$.

Resultados

1. Sobrevida celular. Índice de hemólisis

Los eritrocitos tienen alta concentración de hemoglobina en su citosol por lo que si ésta es detectada en el medio extracelular es porque algún eritrocito se lisó. Es por eso que se lo toma como índice de hemólisis celular. Un aumento en la concentración extracelular implica un aumento en hemólisis. Espectrofotométricamente es sencillo de detectar tanto en su forma de oxihemoglobina (OxyHb), así como en su forma oxidada (metahemoglobina). En la figura 9, se muestra un espectro de una muestra de fracción extracelular. Con el pico característico a 577 nm correspondiente a la OxyHb, mientras que de manera menos pronunciado (para esta muestra en particular) a 630 nm un hombro correspondiente a la metaHb.

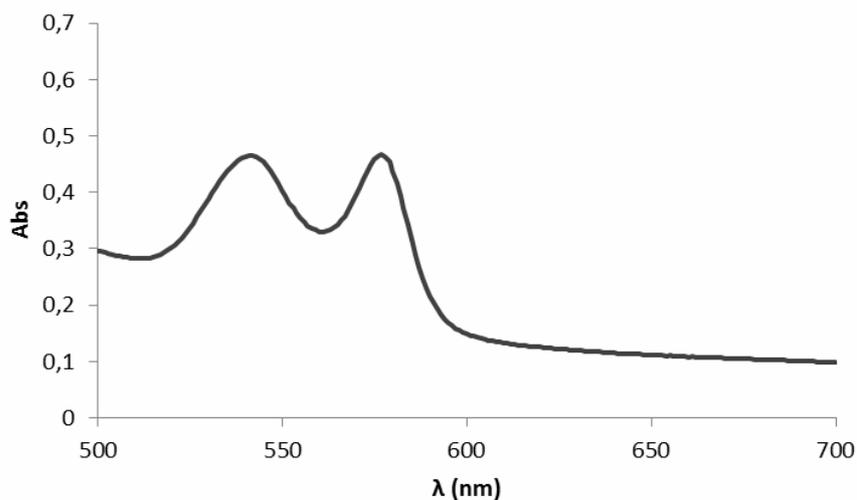


Figura 9. Espectro de una fracción extracelular (en una dilución 1/100) obtenida de un concentrado de glóbulos rojos de 21 día de conservado. Los picos a 540 y 577 nm corresponde a la OxyHb mientras que el hombro a 630 nm a metaHb.

En la figura 10, se observa un gráfico de barras que resume las distintas concentraciones obtenidas a lo largo del tiempo de conservación de las distintas bolsas. Se observa en la misma que para las bolsas control (en gris, señaladas como GR) a medida que aumenta el tiempo de conservación del concentrado de glóbulos rojos, la hemoglobina que se encuentra en la fracción extracelular es mayor. Lo que

indica que al pasar el tiempo en estas condiciones ocurre hemólisis en el concentrado de los eritrocitos con una diferencia significativa para un $p < 0.05$.

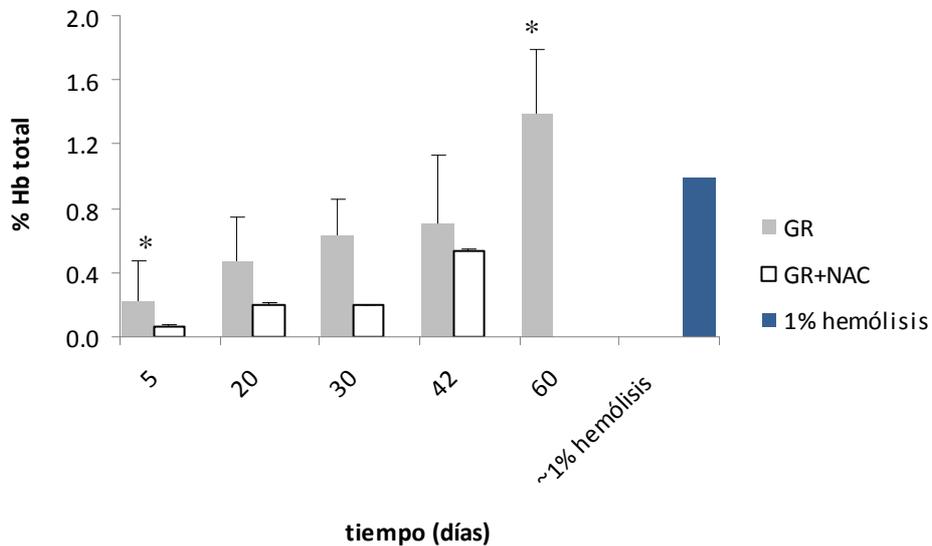


Figura 10. Se grafica el porcentaje de hemoglobina total del concentrado de glóbulos rojos que se encuentra en la fracción extracelular en función del tiempo de conservación en las condiciones del banco de sangre. La barra en gris (GR) corresponde a las bolsas que no poseen agregado de NAC, mientras que las blancas (GR+NAC) las que sí poseen el antioxidante. La columna azul corresponde con el 1% de hemólisis, valor utilizado por países europeos como índice máximo que puede registrarse al final del período de 42 días en el concentrado de glóbulos rojos. Corresponde a un $n=5$ para GR y un $n=2$ para GR+NAC. El * corresponde con una diferencia de $p < 0.05$. El # corresponde a una diferencia de $p < 0.5$.

Para las bolsas que se le han agregado el antioxidante NAC (barras blancas) la hemoglobina final obtenida es menor a lo largo del período y desde la primera toma es menor que la que corresponde a la bolsa a la que sólo se le agregó el mismo volumen del solvente (PBS).

Asimismo un dato no menor, es lo que indica la columna azul, la misma está señalando el 1% de la hemoglobina total que para los índices europeos y americanos corresponde con el máximo de hemoglobina que se puede encontrar en una bolsa al final del período de conservación. Los datos obtenidos nos indican que tanto para la bolsa control como para la del agregado del NAC, dentro del período máximo (42 días) no se supera este límite (0.75% y 0.6% respectivamente). Para el día 60 (fuera del límite

autorizado) se observa que la hemoglobina libre es mayor al límite de 1%. No se tiene datos para la bolsa con NAC de dicho día.

En la figura 11, se muestra en porcentaje la concentración de metHb libre, de manera de analizar el estado de oxidación de la misma en la fracción extracelular de la misma, se observa como esta aumenta a medida que transcurre el tiempo. A los glóbulos a los cuales se les adicionó NAC al medio de conservación, la concentración de metHb es prácticamente constante a lo largo del período, no observándose en este caso diferencias significativas respecto al primer día de muestreo. Se observa diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar los distintos días para los GR+NAC y el control GR. Con una concentración mayor y estadísticamente significativa de metHb para el caso del control en comparación con la de los glóbulos con NAC. Por lo que se observa que la presencia del antioxidante mantiene a la hemoglobina en su estado reducido.

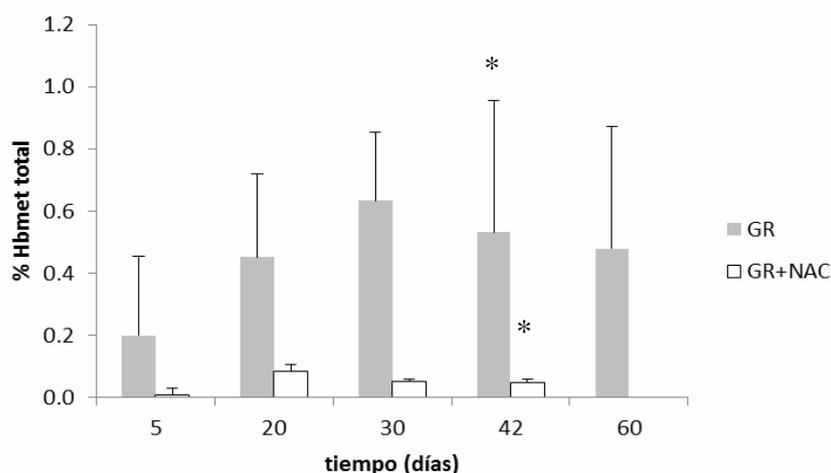


Figura 11. Se grafica el porcentaje de la hemoglobina total del concentrado de glóbulos rojos que se encuentra en la fracción extracelular en forma de meta Hb en función del tiempo de conservación en las condiciones del banco de sangre. La barra en gris (GR) corresponde a las bolsas que no poseen agregado de NAC, mientras que las blancas (GR+NAC) las que sí poseen el antioxidante 1 mM. * corresponde con un $p < 0.05$.

2. Estado de oxidación de los componentes fundamentales de la membrana eritrocítica, a saber lípidos y proteínas.

2A. Valoración de la lipoperoxidación

Un método para conocer el estado de las membranas en cuanto a la oxidación de sus lípidos, es cuantificar la presencia de malóndialdehído, producto mayoritario final de la lipoperoxidación. El método de medida de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que reacciona con aldehídos formando un producto coloreado. La desventaja de usar este método en particular es que no sólo, de manera específica reacciona con el MDA, también puede reaccionar con otros aldehídos, lo que puede llevar a sobreestimación. Para el método se realiza una curva de calibración con Malondialdehído bis (dietilacetal) (figura 12). Asimismo, en el momento de poner a punto esta técnica, la misma se realizaba midiendo la absorbancia a 532 nm, pero el método no tenía sensibilidad suficiente para detectar la baja concentración de malóndialdehído formada en la fracción extracelular, por lo que se modificó la técnica, valorando el producto de reacción del ácido tiobarbitúrico con fluorescencia, pasando de una sensibilidad de 0.5 μM para la detección espectrofotométrica a 0.05 μM para la técnica de fluorescencia (Figura 12). Además, se obtuvieron mejores R^2 en general para el método fluorescente comparado con el método espectrofotométrico.

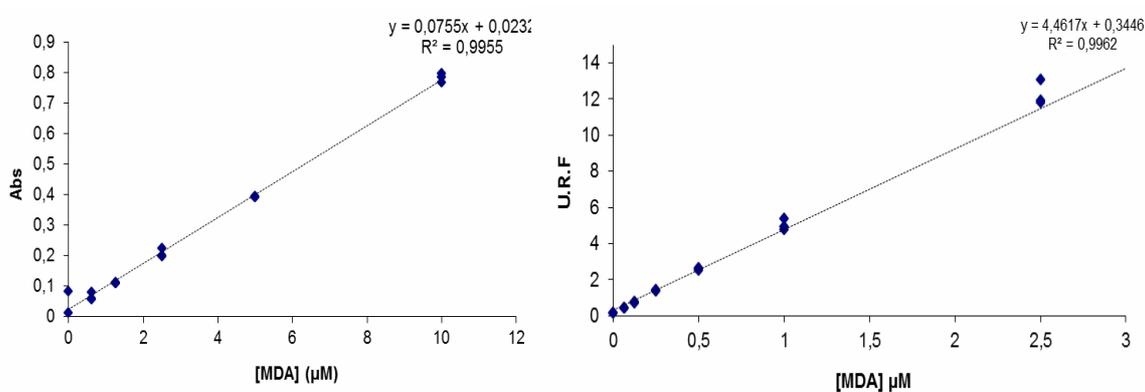


Figura 12. Curvas de calibración de MDA para el método de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico. La curva de la izquierda corresponde a la realizada mediante por espectrofotometría, con una sensibilidad de detección de 0.5 μM de MDA. La curva de la derecha corresponde al método utilizando fluorescencia, con una sensibilidad de 0.05 μM .

En la figura 13, se observa el seguimiento de la formación de MDA en la fracción extracelular. No se detectó ningún cambio significativo a lo largo de los 42 días. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las muestras conservadas en ausencia y en presencia de NAC.

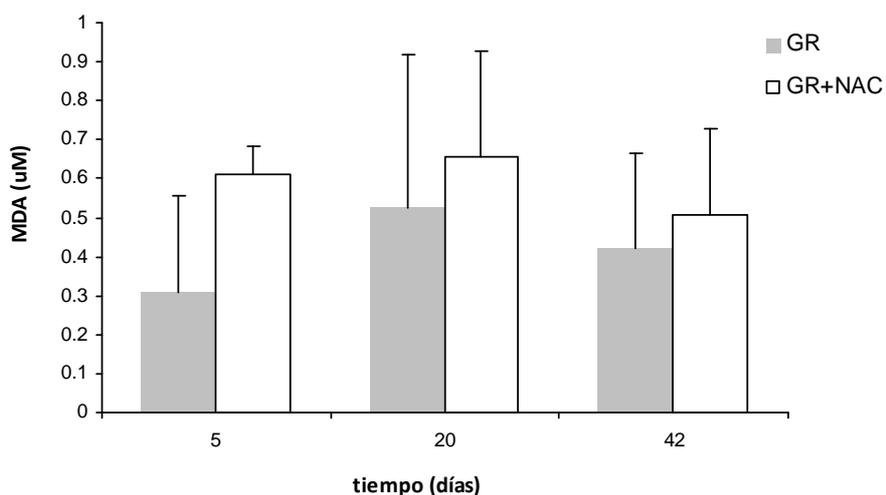


Figura 13. Seguimiento de la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en la fracción extracelular. Las barras en gris corresponden a las muestras sin el agregado del antioxidante, mientras las barras en blanco corresponden a las muestras con el agregado de NAC.

Por lo que, se puede desprender dos hipótesis al respecto. La primera hipótesis a plantearse es directamente que no existe una formación de productos de lipoperoxidación significativa y que por lo tanto, con lo que respecta a los lípidos de membrana estos no sufrirían una oxidación notoria durante el período de conservación. La otra hipótesis a plantearse es el método, a pesar de los cambios realizados en la técnica para obtener mayor sensibilidad no son suficientes y se debe mejorar el método. Algunos autores plantean realizar esta técnica acoplada a HPLC. Lo que no sólo se podría detectar con mayor sensibilidad sino que también se podría descartar algunas moléculas que absorben a la misma longitud de onda, evitando sobreestimaciones.

2B. Evaluación de las proteínas de membrana

Por medio de la técnica del ácido bicinonínico (BCA) se cuantificó la concentración de las proteínas en la membrana de los eritrocitos. Se expresa lo obtenido como proteína/g de peso húmedo de membrana. De esta manera se puede normalizar la concentración en la membrana del eritrocito.

Para el método BCA, es necesario realizar una curva de calibración para poder cuantificar la concentración de proteína (figura 14). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar de concentración proteica.

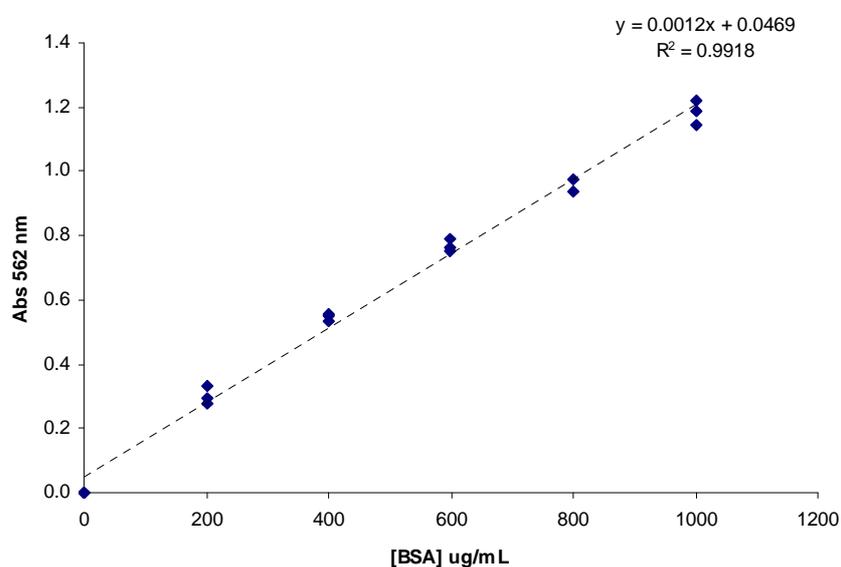


Figura 14. Curva de calibración para el método BCA. Se grafica la absorbancia a 562 obtenida del método en función de la concentración de albúmina de suero bovino ([BSA]). Ecuación de recta obtenida: $Y = 0.0012x + 0.0469$. Se utiliza la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar de proteína total.

Para poder visualizar si existe efectivamente una diferencia en la cantidad de proteínas por fracción de membrana, se realizó un gráfico de [proteína]/mg de membrana húmeda (figura 15). Se observó un aumento de la concentración de proteína que hay por cantidad de membrana a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento de los concentrados de los glóbulos. Para las muestras conservadas con el antioxidante NAC, se observó una disminución en la velocidad de formación de los agregados

proteicos asociados a la membrana eritrocítica. La pendiente correspondiente a los eritrocitos protegidos con el NAC fue 5 veces menor que en los GR control.

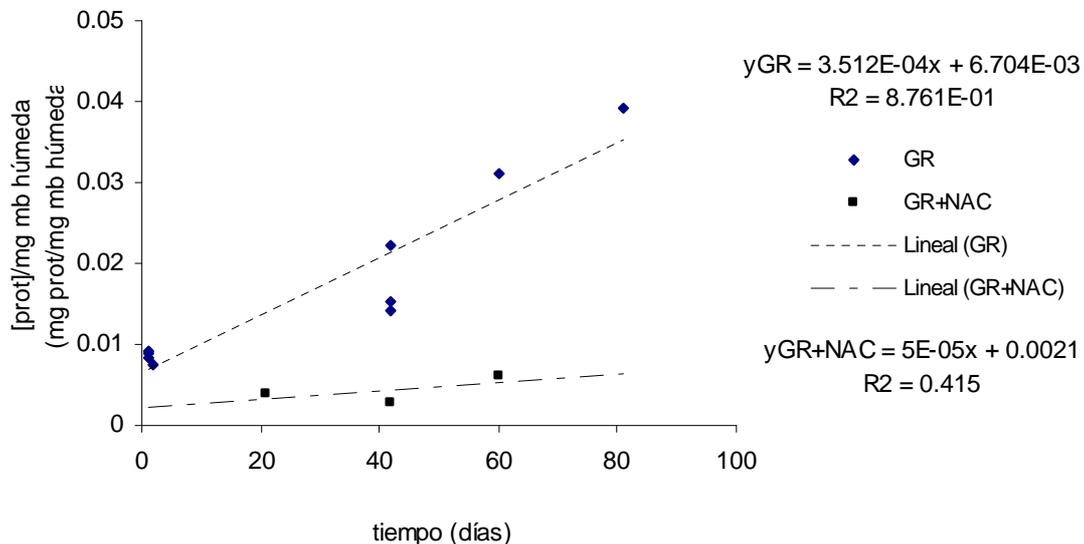


Figura 15. Se grafican las distintas concentraciones de proteínas que se obtienen por mg de membrana húmeda en relación con el tiempo de almacenado. La tendencia de las membranas conservadas con NAC (GR+NAC) y sin el agregado del antioxidante (GR).

La observación que se desprende es que a medida que los eritrocitos se encuentran más tiempo en la bolsa de transfusión, aumentan las proteínas asociadas a la membrana. Este dato reafirma con lo que plantean otros autores, como mencionaba en la introducción, que hay determinadas proteínas que al oxidarse se las encuentra asociadas a la membrana, como por ejemplo, la hemoglobina y la peroxirredoxina 2 (53). Generando por lo tanto, aductos lipoproteicos, así como también proteína-proteína.

Con lo que respecta a la visualización de las proteínas en el gel SDS-PAGE, se observa en la figura 16, para el día 1 de conservación (carril 1), existe una banda cercana a los 100 kDa y otra de 76 kDa. Estas pueden deberse a la glucoforina y a la banda 4.1 respectivamente. Este mismo comportamiento se observa para las muestras a las que se les adicionó NAC 1.0 mM (carriles 5, 6 y 7). Pero lo que respecta a las muestras de 42 días de la bolsa de control, el comportamiento varió. Se observa un aumento en bandas de mayor peso molecular (de 250 kDa). Esto coincide con observaciones

previas de la formación de macro complejos, agregados de proteínas, entre proteínas del citoesqueleto y proteínas de membrana (48, 49). Asimismo, al realizar un gel 12.5% se observaba que muchos aglomerados proteicos no lograban alcanzar la parte resolutive del gel en los carriles que contenían las membranas de eritrocitos conservados más allá del día 42. Por tal motivo se realizó un gel al 10% de poliacrilamida de manera de que estos aglomerados se resuelvan mejor (Fig. 17). Asimismo se probó la posibilidad de utilizar gel de agarosa 0.5% para que las proteínas de mayor peso molecular puedan separarse. De igual forma no se obtuvieron mejores resultados.

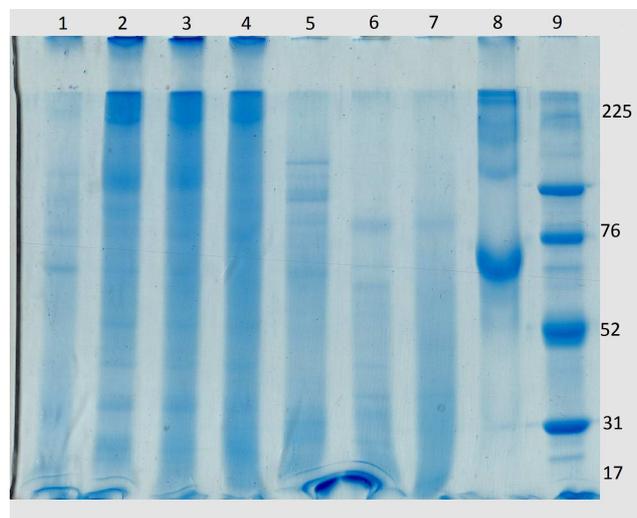


Figura 16. SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie-Coloidal con 2-mercaptoetanol (condiciones reductoras). Se sembró en todos los carriles 15 μ g de proteína. Carriles: 1_membrana de GR día 1; 2_membrana de GR de 42 días; 3_membrana de GR de 60 días; 4_membrana de 80 días; 5_membrana de GR+NAC de 1 día; 6_membrana de GR+NAC de día 21; 7_membrana de GR+NAC de 42 días; 8_Control BSA-NO₂; 9_Marcador de peso molecular.

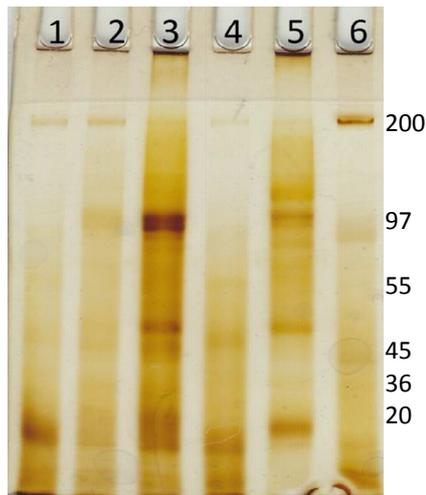


Figura 17. SDS-PAGE 10% teñido con plata. Se sembró en todos los carriles 20 μ g de proteína. Carriles: 1_membrana de GR día 1; 2_membrana de GR de 20 días; 3_membrana de GR de 42 días; 4_membrana de GR+NAC de 1 día; 5_membrana de GR+NAC de día 20; 6_membrana de GR+NAC de 42 días.

De esta manera se puede visualizar el mismo comportamiento que para el caso del Colloidal con un aumento en las proteínas de alto peso molecular y de proteínas en general en la membrana (aumento en el número de bandas).

La conclusión que se puede destacar de esta sección, es que con respecto a la membrana control hay un aumento en la cantidad de proteínas que se ve reflejado en un aumento de las bandas para el día 42, esto no es lo que pasa si se observa lo que le sucede a los GR+NAC, sin aumento de proteínas y sin aumento en el número de bandas.

2.C. Valoración de la nitración de las proteínas de membrana.

De manera de observar si las proteínas de membrana son blanco de modificaciones oxidativas, se estudió la nitración de estas mediante western blot empleando un anticuerpo policlonal específico..

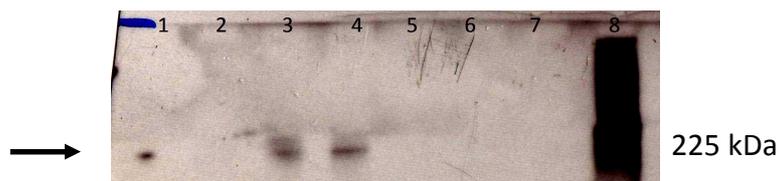


Figura 18. WB-anti nitrotirosina a partir de un SDS-PAGE 10%. Se sembró en todos los carriles 15 μ g de proteína. Carriles: 1_membrana de GR día 1; 2_membrana de GR de 42 días; 3_membrana de GR de 60

días; 4_membrana de 80 días; 5-7: membrana de GR incubadas en presencia de NAC por 1; 21; y 42 días, respectivamente; 8_Control BSA-Nt. La flecha indica la línea donde se observa las bandas.

En la figura 18, se observa el WB de las proteínas de membrana a distintos tiempos de conservación con y sin el antioxidante. Asimismo, se realizó un control positivo con albúmina bovina nitrada (BSA-Nt) de manera de asegurar que el WB funciona correctamente (carril 8).

Las membranas no tratadas con NAC e incubadas por tiempos prolongados (60 y 80 días), carriles 3 y 4, presentan una banda de unos 225 kDa positivas para la presencia de nitrotirosina. Esta banda tiene un peso molecular comparable con los agregados de alto peso molecular que observamos en el gel (figura 16 y figura 17). Muy probablemente se deben a la formación complejos proteicos de gran peso molecular oxidados. Para los glóbulos hasta día 42 no se observa nitración. Reiterada evidencia de el por qué 42 días se emplea como fecha límite. Para los carriles con los glóbulos con antioxidantes (GR+NAC) en la figura 18, ninguno de sus carriles muestra alguna banda, por lo que no se registra proteínas nitradas en la membrana.

3- Capacidad antioxidante total intracelular.

Se utilizó la técnica de TEAC (Capacidad antioxidante total como equivalentes a Trolox). Mediante esta técnica se estudió el curso de la capacidad total antioxidante de la fracción citosólica. En la figura 19, se observa el cambio en el espectro del ABTS cuando éste se encuentra reducido y oxidado. La concentración de antioxidantes presentes en las muestras se reportan como equivalentes de trolox. En la figura 20, se observa una curva de calibración con dicho antioxidante.

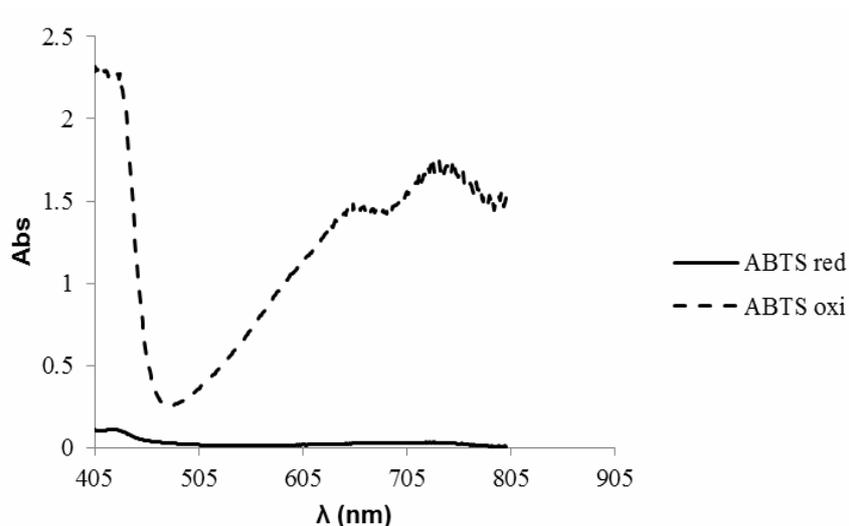


Figura 19. Espectros del ABTS previo a la oxidación con persulfato de sodio (ABTS reducido) y luego de 16 horas con persulfato (ABTS oxidado). Se observa los tres picos característicos en el ABTS oxidado que no se observa en el ABTS reducido a 450 nm, 630 nm y 732 nm.

Se puso a punto la técnica tomando en cuenta que varios autores plantean que suelen reportar capacidades antioxidantes no reales por no medir la muestra cuando haya llegado al punto final, es decir que los antioxidantes totales hayan reaccionado con el ABTS oxidado. Por tal motivo, se realizó el seguimiento de cada muestra para, en cada una de estas, obtener el punto final. En el gráfico de la figura 21, se ejemplifica una muestra en particular, observando cómo esta al cabo de unos minutos de reacción llega al punto final. Como control se siguió al ABTS oxidado de manera de verificar que la caída observada se deba a la presencia de antioxidantes en la muestra y no por la decoloración del reactivo.

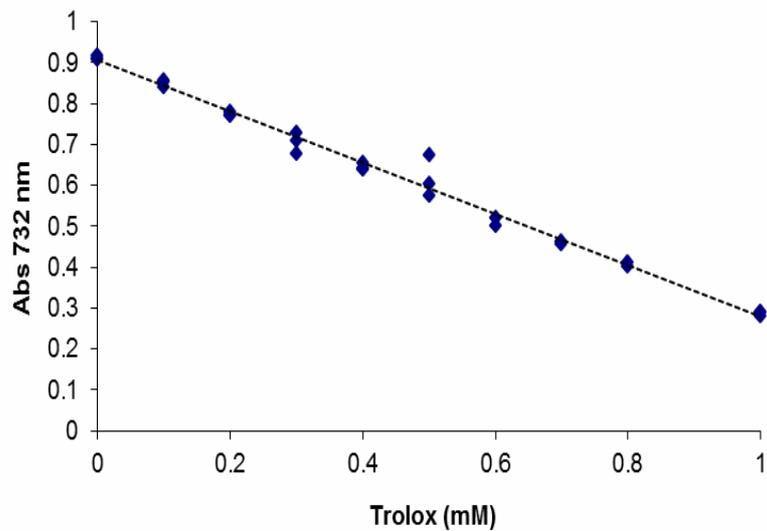


Figura 20. Curva de calibración para la técnica TEAC. Se realiza una curva de calibración con Trolox (antioxidante) en un rango entre 0.1-1.0 mM. Los valores se reportan como equivalente de Trolox. Se obtuvo para este ejemplo una ecuación de recta igual a $y = -0,6245x + 0,9046$.

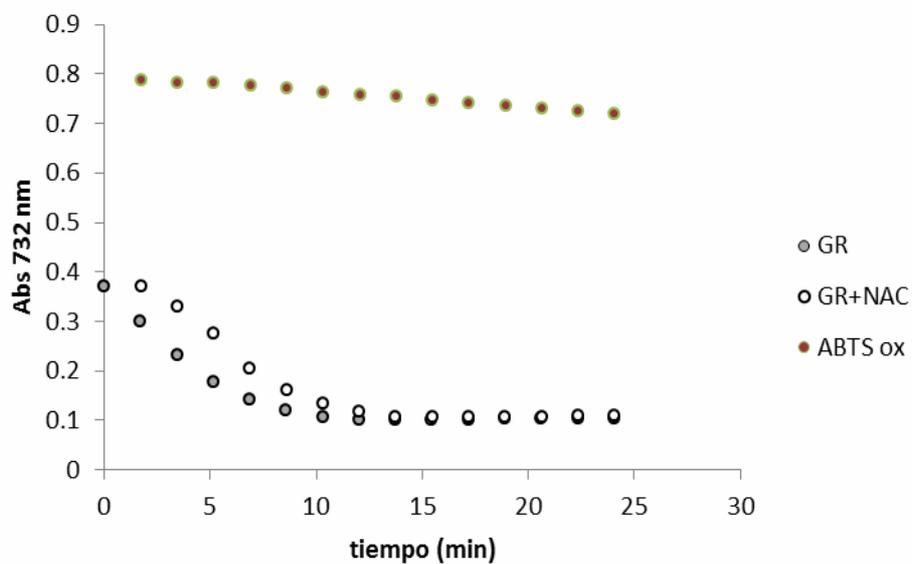


Figura 21. Curva cinética del método TEAC. Se ejemplifica con dos muestras del inicio del período de conservación tanto para la muestra control (GR) como para con el agregado del antioxidante (GR+NAC). Asimismo, se observa como a lo largo del transcurso de la reacción la absorbancia del ABTS oxidado permanece prácticamente constante en el periodo que dura la reacción. Para este caso no existen diferencias significativas para el GR y el GR+NAC.

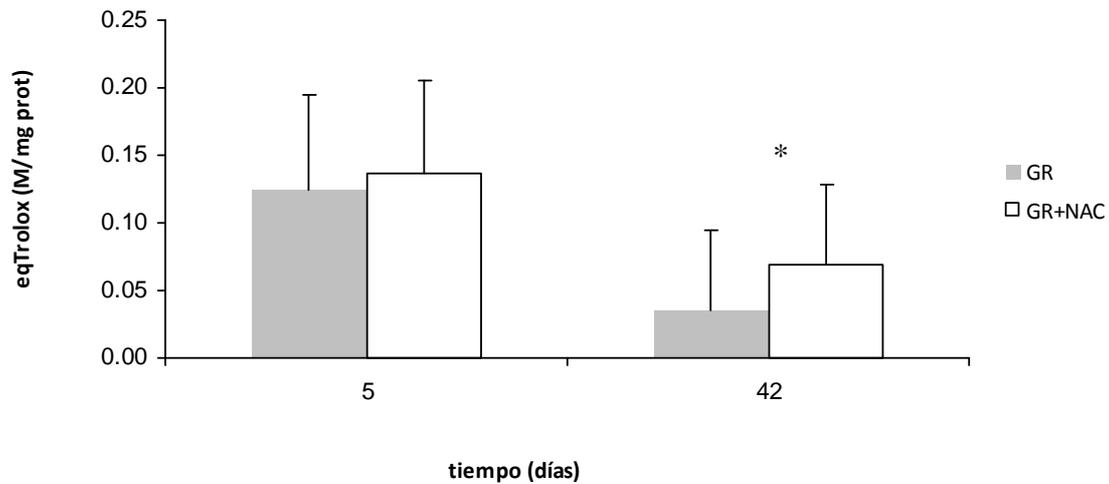


Figura 22. Se gráfica la capacidad antioxidante total en equivalentes de trolox por mg de proteína en función del tiempo de conservación. En gris corresponde a las muestras control, mientras en blanco a las que se le agregaron NAC. Con una diferencia significativa para un $p < 0.05$ al comparar día 5 con día 42 para ambos casos así como también para las muestras con y sin NAC para el día 42. Existen diferencias significativas para $p < 0.5$ entre los GR y los GR+NAC.

Se observa disminución de la capacidad antioxidante total tanto para la muestra control así como para la que se le ha agregado el antioxidante. Como se muestra en el gráfico de la figura 22, la bolsa control muestra una disminución de un 72 % en lo que respecta a su capacidad antioxidante a los 42 días de conservación. No existe diferencia significativa, al inicio del periodo de conservado, entre la capacidad antioxidante total entre la bolsa control y la bolsa con NAC. Pero, para lo que respecta a la bolsa con el agregado de NAC al final del período de los 42 días, los GR presentan en su citosol una capacidad antioxidante total mayor. Observando una disminución de la capacidad total en un 50 % en los glóbulos con NAC. Esto es indicio que el NAC genera un redox más favorable para los glóbulos al final del periodo.

A los 60 días de conservado los GR observan una disminución de la capacidad antioxidante en más de un 90 % (este dato no se muestra en el gráfico).

4- Escenario post transfusión.

El objetivo de esta parte consta en poner en contexto de estrés oxidativo al eritrocito que se encuentra en la bolsa de transfusión. La elección de colocarlo en un cultivo de

macrófagos se basa en que éste muy probablemente al ser transfundido se encuentre con macrófagos y células de kruppfer presentes en los órganos encargados de remover los glóbulos rojos senescentes o en un contexto oxidativo. De esta manera, se observó la viabilidad que presentaban los mismos en un cultivo de macrófagos activados con PMA para la producción de superóxido por la NADP oxidasa. En la figura 23, se observa una fotografía de cultivo de macrófagos murinos en confluencia.

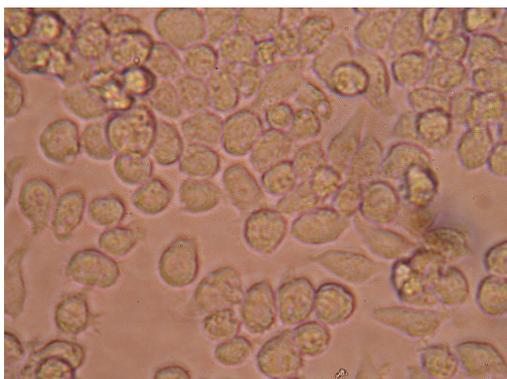


Figura 23. Microscopía óptica campo claro 1000X de cultivo de macrófagos murinos J774.

En el gráfico de la figura 24, se logra observar que un mismo eritrocito, en cuanto a tiempo en la bolsa de transfusión, frente a un macrófago activado por PMA, que libera superóxido continuamente por dos horas, es más lábil a sufrir hemólisis (detectado por la Hb libre) a los 30 días de envejecimiento en la bolsa cuando no se le ha agregado NAC. La diferencia de hemoglobina extracorpúscular entre los glóbulos conservados con o sin el antioxidante es un poco mayor al 50 %.

Asimismo, de manera de asegurar que la hemólisis no se deba al DMSO (disolvente del PMA) se realizó un control pertinente. No se observa diferencias significativas entre la muestra con y sin DMSO, por lo que la hemoglobina que se encuentra en el medio se debe a eritrocitos que se lisaron por el procedimiento y no por el método utilizado.

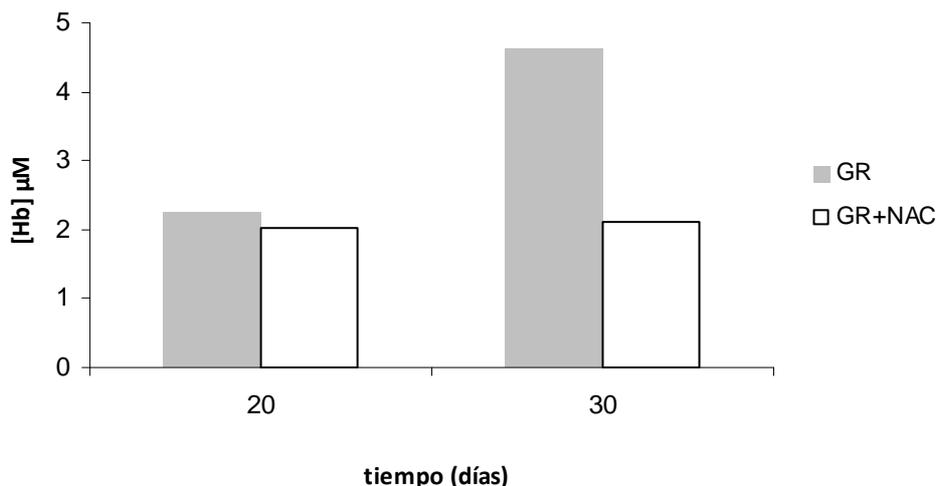


Figura 24. Hemólisis inducida por la exposición a macrófagos activados. Macrófagos J774 fueron activados para la producción de superóxido mediante el agregado de PMA y la labilidad de los glóbulos rojos incubados por 20 y 35 días bajo las condiciones del banco de sangre en ausencia (barra gris) y en presencia (barra blanca) de NAC 1 mM se midió como la aparición de hemoglobina libre.

Además de poder estudiar la labilidad de los eritrocitos de ser lisados en el contexto inflamatorio entre un eritrocito preincubado con NAC y otro que no, se observa mediante microscopía óptica como un eritrocito recién extraído (figura 25, izquierda), no altera de manera morfológica a los macrófagos. Mientras que un eritrocito con 42 días de conservado logra generar cambios morfológicos en los macrófagos (figura 25, derecha). Se los nota potencialmente más expandidos y con espinas, que es un indicativo de macrófagos activos para la fagocitosis.

A pesar que la microscopía no permite distinguir y asegurar que lo que marcan las flechas en la figura 14 son eritrocitos, parecería que si lo fueran por su forma cóncava.

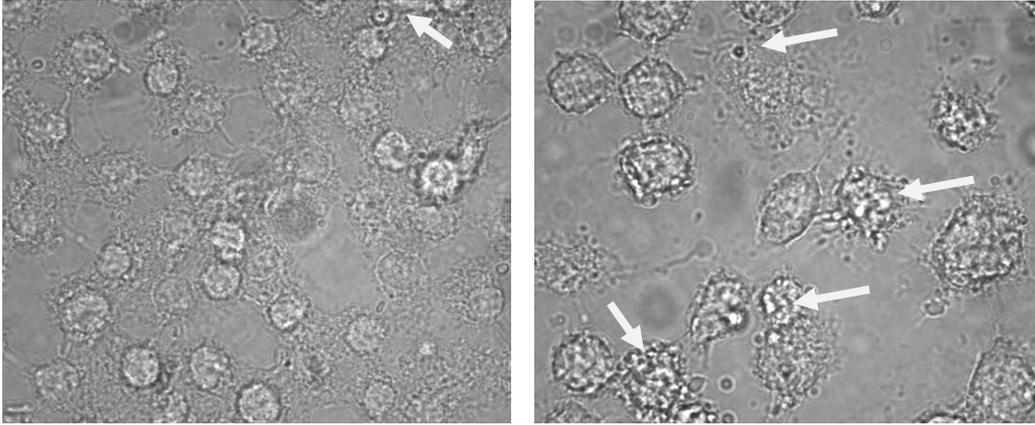


Figura 25. Microscopia óptica 1000X. Izquierda, co-cultivo de macrófagos murinos J774 con eritrocitos frescos. Derecha, co-cultivo de macrófagos murinos J774 con eritrocitos de 45 días de conservado. Las flechas blancas indican posibles eritrocitos fagocitados.

Esta última evidencia, muestra claramente que los eritrocitos sufren algún proceso de cambio que hace que sean más factibles a la fagocitosis. Falta realizar un control con NAC, para poder observar si el antioxidante logra apagar estos cambios evitando que sean más factibles a la fagocitosis.

Conclusiones

En un recorrido in vitro de diferentes procesos que sobrepasa la vida del eritrocito destinado a la transfusión se puede concluir que existe un aumento en la presencia de hemoglobina extracorpúscular, indicando que ocurre hemólisis celular. A pesar de dicha evidencia, la hemoglobina registrada no supera el 1% de la hemoglobina total en el eritrocito al final del período de 42 días, porcentaje que se toma como límite máximo en la Unión Europea y en Estados Unidos. Ya para los días mayores a los 42 días la hemoglobina extra corpúscular supera este límite. La mayor parte de esta hemoglobina, se encuentra en su forma oxidada, meta hemoglobina.

Para la bolsa con el agregado del antioxidante NAC, estos índices de hemoglobina son menores. Probablemente el dato más notorio es la baja en la presencia de meta hemoglobina. Por lo que se podría decir que el NAC podría generar verdaderamente un ambiente favorable a la prevención de la oxidación de la hemoglobina.

Durante los 42 días de conservado no se observan cambios significativos con lo que respecta a la lipoperoxidación de la membrana. Posiblemente mejorando la sensibilidad del método de detección del malóndialdehído se podrán observar cambios.

Sí se observan cambios a nivel de la membrana en cuanto a la composición proteica de la misma. La cuantificación de las proteínas de membrana muestra un aumento en la concentración de las mismas. En el mismo sentido, el SDS-PAGE muestra un aumento de proteínas de alto peso molecular, que muy probablemente se deba a agregados proteicos nuevos que se forman a medida que los eritrocitos envejecen. Estos agregados, están unidos por enlace covalente ya que no se separan en presencia de SDS, posiblemente unidos por di-tirosinas ya que el β -mercaptoetanol no los reduce, y se los encuentra inclusive dentro de los 42 días de conservación. Hilando más fino, se observa que este nuevo agregado proteico de mayor peso molecular aparece nitrado en el Western Blot, otro indicio de oxidación de tirosinas. El ambiente oxidante generado en su gran mayoría por la presencia del oxígeno, podría explicar la formación de los agregados proteicos a nivel de la membrana.

Por su parte, las bolsas de concentrados de glóbulos rojos preparadas en los laboratorios de hemoterapia del país no son leuco-depletadas, por lo que los glóbulos blancos presentes también podrían ser fuente de las especies reactivas responsables de los cambios observados. En la activación de estas células la meta-Hb liberada podría también jugar un rol importante, dado que se ha visto que la presencia tanto de Hb como de su producto de degradación, la hemina, son capaces de estimular la generación de interleuquinas y de generar especies reactivas del oxígeno (73) (74).

Asimismo, se ha planteado por otros autores la formación de micro-vesículas que se desprenden del eritrocito a medida que éste envejece con proteínas ancladas oxidadas (75) (50, 55). Esto sería una nueva evidencia, aumento de proteínas en la membrana y la nitración de algunas. Continuando con este modelo, entra dentro de la misma lógica considerar que la baja en la capacidad antioxidante total citosólica podría explicar el por qué el aumento de proteínas que al no contar con capacidad para ser reducidas se oxidan y terminen ancladas en la membrana se con lípidos o otras proteínas.

En este mismo sentido apunta la evidencia aportada con el co-cultivo de macrófagos, en el mismo, se puede observar que los macrófagos frente al agregado de eritrocitos frescos y de 42 días de envejecimientos tienen un cambio en el comportamiento. Para los envejecidos se los observa mucho más activos es decir explayados, morfológicamente diferentes, sumado a evidencia cualitativa de aumento de fagocitosis para los eritrocitos más envejecidos. En cuanto al comportamiento del eritrocito en el co-cultivo con macrófagos activados con PMA para la producción de superóxido por la NADPH oxidasa se los observa más factibles a ser lisados a los eritrocitos envejecidos.

Muy probablemente los cambios observados a nivel de la membrana generen modificaciones que perturban el buen funcionamiento de la misma. El aumento de proteínas en ella, formando agregados de alto peso molecular resistentes a la desnaturalización y reducción de disulfuros y además modificadas oxidativamente por nitración como lo mostramos en la figura 18, podrían explicar por qué son más lábiles a la lisis lo que tendría como consecuencia el aumento en la hemoglobina extra corpuscular, que observamos (figura 10). De la misma forma, los cambios a nivel del

perfil proteico en la membrana plasmática eritrocitaria (figuras 15, 16 y 17) que concuerdan con reportes previos de otros autores (49-51), junto a modificaciones en el perfil lipídico de las monocapas (55) y a variaciones en el contenido de ácido siálico (76), serían responsables de desencadenar las alteraciones morfológicas de los macrófagos y el aumento en la fagocitosis hacia los GR senescentes que mostramos.

Con lo que respecta al agregado de NAC, no se puede concluir definitivamente si el agregado del NAC podría asegurar un aumento en los días hábiles de la bolsa de concentrado de eritrocitos. Pero si tomar la evidencia de mejoras en la calidad de los mismos. No se observa un aumento considerable en las proteínas de membrana tanto en el SDS-PAGE como en la cuantificación por BCA, lo que podría justificar la menor disposición a la factibilidad de lisis de los eritrocitos y el menor índice de hemoglobina extra corpuscular. Sumado a que al final del período se lo observa con una mayor capacidad antioxidante total que podría justificar los anteriores puntos.

Perspectivas

Se debería mejorar la detección de oxidación de los lípidos y poder identificar cuáles son las proteínas que se ven aumentadas en la membrana de los eritrocitos. Observar otro tipo de oxidación de las proteínas y no sólo la nitración como por ejemplo con el un anticuerpo anti-DMPO.

Asimismo, para poder concluir que el NAC verdaderamente servirá como un aditivo para poder aumentar la vida útil de la bolsa de transfusión es necesario procesar más bolsas de transfusión y más días. Inclusive será necesario probar con concentraciones mayores de NAC para la bolsa de concentrados de los glóbulos rojos.

Identificar PS como marcador de envejecimiento celular a lo largo de los días.

Anexo

Purificación de Ac-Anti Nitro Tirosina a partir de suero de conejo

Se partió de un volumen de suero de conejo de 63 mL. Al mismo se le agrega sulfato de amonio al 45% lento y en agitación a 4°C. En este caso, al 45% corresponde con 26.2 g/100 mL de suero. Se deja por 5 horas. Lo obtenido se centrifuga por 30 minutos a 10.000 x g a 4°C. El sobrenadante obtenido (fracción que contiene los anticuerpos), se le completa a 50% de sulfato de amonio (implica 2.9g/100 mL). El sobrenadante es centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos. En este paso el pellet es el que contiene los anticuerpos, el cual es resuspendido en PBS.

Para quitar el sulfato de amonio se realizó una diálisis. Las membranas para diálisis son previamente hidratadas con agua corriente por una hora, y luego lavadas en dos oportunidades con agua destilada por 30 minutos. Posteriormente, se coloca el resuspendido y se dializa contra PBS bajo agitación a 4°C, durante 3 días, cambiando el PBS en 8 oportunidades.

Lo obtenido de la diálisis se ultra concentra, mediante el uso de un concentrador usando nitrógeno gas y una membrana de filtro de 10 kDa.

La absorbancia obtenida en este paso a 280 nm para una dilución 1/10 fue de 0.400, tomando el $\epsilon = 1.5 \text{ (mg/mL)}^{-1}$, la concentración es de 2.7 mg/mL. Esta muestra concentrada es pasada por un columna de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr-4B). La preparación de la columna implica una etapa de hidratación de la sefarosa en buffer 0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl pH 8.3. Junto con nitrotirosina 2.5 mM (PM = 226.19 g/mL). Se preparó 1 gramo en un volumen de 7 mL. Esta solución se deja en rotación a 4°C toda la noche.

Se empaqueta la columna en un soporte.

Se realizan sucesivos lavados a la columna:

A- 10 volúmenes de Tris- pH 7.5 [10 mM]

B- 10 volúmenes de Gly pH 2.5 [100 mM]

C- 10 volúmenes de Tris pH 8.8 [10 mM] (el pH al final debe ser de 8.8 sino continuar con el Tris pH 8.8).

D- 10 volúmenes de etanolamina pH 11.5 [10 mM]

E- 10 volúmenes de Tris pH 7.5 [10 mM]

Luego de los lavados y equilibrada la columna, se deja que eluya todo. A esta resina se la deja equilibrando con el suero concentrado (al suero previamente se lo diluyó al medio con Tris [10 mM] pH 7.5. Se deja equilibrando en rotación toda la noche a 4°C. Se empaqueta nuevamente la columna, a la cual se realizan los siguientes lavados:

A- 20 volúmenes de Tris pH 7.5 [10 mM]

B- 20 volúmenes de Tris pH 7.5 [10 mM], NaCl [500 mM]

C- 10 volúmenes de Tris pH 7.5 [10 mM]

La elución ácida de los anticuerpos se realiza con 10 volúmenes de [100 mM] de Gly pH 2.5. Se toman distintas alícuotas (1 volumen) de la elución en 750 µL de 1M Tris pH 8.0.

Posteriormente se lava la columna con Tris pH 8.8 [10 mM] hasta obtener pH 8.8.

La elución básica se realiza con 10 volúmenes de etanolamina [0.1 mM] pH 11.5 (preparado fresco). Se recolecta cada volumen de la columna en 750 µL de 1 M Tris pH 8.0.

Se lava la columna con 10 mM Tris pH 7.5, hasta obtener pH 7.5

Se concentra el eluido ácido y el básico con el equipo Amicon, usando nuevamente un filtro para 10kDa. Se mezclan los eluidos. Se realizan varios lavados en el concentrador con PBS de manera de obtener un pH final entre 7-8.

Se verificó la presencia del anticuerpo mediante técnica de ELISA. La placa fue sensibilizada con BSA-Nt y con KLH-Nt. Se realizó un control positivo con otro anticuerpo anti-Nt.

Referencia

- (1) Guyton, A. C. (2001) *Tratado de Fisiología Médica*, 10 ed., M. Graw-Hill.
- (2) Berlin, N. I., and Bark, P. D. (1975) *The Red Blood Cell*, 2 ed., Academic Press, New York
- (3) Beutler, E., Lichtman, M. A., Coller, B. S., Kipps, T. J., and Seligsohn, U. (1995) *Production and destruction of erythrocytes*, 6 ed., McGraw-Hill, New York
- (4) Krantz, S. B. (1991) Erythropoietin. *Blood* 77, 419-34.
- (5) Bennett, G. D., and Kay, M. M. (1981) Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp Hematol* 9, 297-307.
- (6) Horn, S., Gopas, J., and Bashan, N. (1990) A lectin-like receptor on murine macrophage is involved in the recognition and phagocytosis of human red cells oxidized by phenylhydrazine. *Biochem Pharmacol* 39, 775-80.
- (7) Schaller, J., Gerber, S., Kämpfer, U., Lejon, S., and Trachsel, C. (2008) *Human Blood Plasma Proteins Structure and Function*, John Wiley & Sons.
- (8) Voet, D., and Voet, J. G. (2006) *Bioquímica*, 3 ed.
- (9) Walensky, L. D., Mohandas, N., and Lux, S. E. (2003) *Blood, Principles and Practice of Hematology* 2nd ed., Lippincott Williams & Wilkins.
- (10) Bennett, V. (1989) The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* 988, 107-21.
- (11) Bennett, V., and Baines, A. J. (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81, 1353-92.
- (12) Mohandas, N., and An, X. (2006) New insights into function of red cell membrane proteins and their interaction with spectrin-based membrane skeleton. *Transfus Clin Biol* 13, 29-30.
- (13) Mohandas, N., and Gallagher, P. G. (2008) Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112, 3939-48.
- (14) Bennett, V. (1983) Proteins involved in membrane--cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. *Methods Enzymol* 96, 313-24.
- (15) Nicolas, V., Le Van Kim, C., Gane, P., Birkenmeier, C., Cartron, J. P., Colin, Y., and Mouro-Chanteloup, I. (2003) Rh-RhAG/ankyrin-R, a new

- interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem* 278, 25526-33.
- (16) Reid, M. E., Takakuwa, Y., Conboy, J., Tchernia, G., and Mohandas, N. (1990) Glycophorin C content of human erythrocyte membrane is regulated by protein 4.1. *Blood* 75, 2229-34.
 - (17) Marfatia, S. M., Lue, R. A., Branton, D., and Chishti, A. H. (1994) In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. *J Biol Chem* 269, 8631-4.
 - (18) Salomao, M., Zhang, X., Yang, Y., Lee, S., Hartwig, J. H., Chasis, J. A., Mohandas, N., and An, X. (2008) Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8026-31.
 - (19) Verkleij, A., Zwaal, R., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., and van Deenen, L. (1973) The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 323, 178-193.
 - (20) Zwaal, R. F., and Schroit, A. J. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89, 1121-32.
 - (21) Daleke, D. L. (2008) Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* 15, 191-5.
 - (22) Sims, P. J., and Wiedmer, T. (2001) Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* 86, 266-75.
 - (23) Salzer, U., and Prohaska, R. (2001) Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 97, 1141-3.
 - (24) Murphy, S. C., Samuel, B. U., Harrison, T., Speicher, K. D., Speicher, D. W., Reid, M. E., Prohaska, R., Low, P. S., Tanner, M. J., Mohandas, N., and Haldar, K. (2004) Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood* 103, 1920-8.
 - (25) Denicola, A., Souza, J. M., and Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3566-71.
 - (26) Pardini, R. S. (1995) Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch Insect Biochem Physiol* 29, 101-18.
 - (27) Murrant, C. L., and Reid, M. B. (2001) Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 55, 236-48.
 - (28) Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 42, 569-605.

- (29) Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53, 1841-56.
- (30) Stuhlmeier, K. M., Kao, J. J., Wallbrandt, P., Lindberg, M., Hammarstrom, B., Broell, H., and Paigen, B. (2003) Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem* 270, 334-41.
- (31) Daugas, E., Cande, C., and Kroemer, G. (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 8, 1131-3.
- (32) Hermle, T., Shumilina, E., Attanasio, P., Akel, A., Kempe, D. S., Lang, P. A., Podolski, M., Gatz, S., Bachmann, R., Bachmann, C., Abele, H., Huber, S., Wieder, T., and Lang, F. (2006) Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C710-7.
- (33) Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28, 32-40.
- (34) Kristensen, P., Rasmussen, D. E., and Kristensen, B. I. (1999) Properties of thiol-specific anti-oxidant protein or calpromotin in solution. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 127-31.
- (35) de Atauri, P., Ramirez, M. J., Kuchel, P. W., Carreras, J., and Cascante, M. (2006) Metabolic homeostasis in the human erythrocyte: in silico analysis. *Biosystems* 83, 118-24.
- (36) Giarratana, M. C., Rouard, H., Dumont, A., Kiger, L., Safeukui, I., Le Penec, P. Y., Francois, S., Trugnan, G., Peyrard, T., Marie, T., Jolly, S., Hebert, N., Mazurier, C., Mario, N., Harmand, L., Lapillonne, H., Devaux, J. Y., and Douay, L. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* 118, 5071-9.
- (37) Sharp, M., and Dohme. (2005) (Dohme, M. S., Ed.) pp capítulo 153, Madrid, España.
- (38) Shields, C. E. (1969) Effect of adenine on stored erythrocytes evaluated by autologous and homologous transfusions. *Transfusion* 9, 115-9.
- (39) Hill, H. R., Oliver, C. K., Lippert, L. E., Greenwalt, T. J., and Hess, J. R. (2001) The effects of polyvinyl chloride and polyolefin blood bags on red blood cells stored in a new additive solution. *Vox Sang* 81, 161-6.
- (40) Hogman, C. F., Hedlund, K., and Sahlestrom, Y. (1981) Red cell preservation in protein-poor media. III. Protection against in vitro hemolysis. *Vox Sang* 41, 274-81.
- (41) Beutler, E., and Kuhl, W. (1988) Volume control of erythrocytes during storage. The role of mannitol. *Transfusion* 28, 353-7.

- (42) Hess, J. R., Sparrow, R. L., van der Meer, P. F., Acker, J. P., Cardigan, R. A., and Devine, D. V. (2009) Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions. *Transfusion* 49, 2599-603.
- (43) Greenwalt, T. J., McGuinness, C. G., and Dumaswala, U. J. (1991) Studies in red blood cell preservation: 4. Plasma vesicle hemoglobin exceeds free hemoglobin. *Vox Sang* 61, 14-7.
- (44) Lion, N., Crettaz, D., Rubin, O., and Tissot, J. D. Stored red blood cells: a changing universe waiting for its map(s). *J Proteomics* 73, 374-85.
- (45) McAteer, M. J., Dumont, L. J., Cancelas, J., Rugg, N., Vassallo, R., Whitley, P., Graminske, S., and Friedman, K. Multi-institutional randomized control study of haemolysis in stored red cell units prepared manually or by an automated system. *Vox Sang* 99, 34-43.
- (46) Gkoumassi, E., Dijkstra-Tiekstra, M. J., Hoentjen, D., and de Wildt-Eggen, J. Hemolysis of red blood cells during processing and storage. *Transfusion*.
- (47) Saunders, C., Herbert, P., Rowe, G., Hayward, M., Wilkins, K., Milligan, J., Stenning, M., Seacombe, A., and Prowse, C. (2005) In-vitro evaluation of the PALL Leukotrap Affinity Prion Reduction Filter as a secondary device following primary leucoreduction. *Vox Sang* 89, 220-8.
- (48) Bosman, G. J., and Kay, M. M. (1988) Erythrocyte aging: a comparison of model systems for simulating cellular aging in vitro. *Blood Cells* 14, 19-46.
- (49) Messana, I., Ferroni, L., Misiti, F., Girelli, G., Pupella, S., Castagnola, M., Zappacosta, B., and Giardina, B. (2000) Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation. *Transfusion* 40, 353-60.
- (50) Bosman, G. J., Lasonder, E., Luten, M., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Novotny, V. M., Bos, H., and De Grip, W. J. (2008) The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 48, 827-35.
- (51) Bosman, G. J., Lasonder, E., Groenen-Dopp, Y. A., Willekens, F. L., Werre, J. M., and Novotny, V. M. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro. *J Proteomics* 73, 396-402.
- (52) D'Amici, G. M., Rinalducci, S., and Zolla, L. (2007) Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res* 6, 3242-55.
- (53) Rinalducci, S., D'Amici, G. M., Blasi, B., Vaglio, S., Grazzini, G., and Zolla, L. Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. *Transfusion* 51, 1439-49.
- (54) Nelson, D., and Cox, M. M. (2006) *Lehninger. Principles of biochemistry*, 4 ed., Freeman and company.

- (55) Londero, D., and Lo Greco, P. (1996) Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in plasma. *J Chromatogr A* 729, 207-10.
- (56) Janero, D. R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9, 515-40.
- (57) Dumaswala, U. J., Zhuo, L., Jacobsen, D. W., Jain, S. K., and Sukalski, K. A. (1999) Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radic Biol Med* 27, 1041-9.
- (58) Kohn, H. I., and Livers edge, M. (1944) On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine , emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J. Pharmacol* 82, 292-300.
- (59) Bernheim, F., Bernheim, M. L. C., and Wilbur, K. M. (1948) The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *J.Biol.Chem* 174, 257-264.
- (60) Lang, F., Lang, K. S., Lang, P. A., Huber, S. M., and Wieder, T. (2006) Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiol (Oxf)* 187, 191-8.
- (61) Lang, F., Lang, K. S., Lang, P. A., Huber, S. M., and Wieder, T. (2006) Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal* 8, 1183-92.
- (62) Alvarez, M. N., Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol* 359, 353-66.
- (63) Cervellati, R., Honer, K., Furrow, S. D., Neddens, C., and Costa, S. (2001) The Briggs-Rauscher Reaction as a test to measure the activity of antioxidants. *Helv. Chim. Acta* 84, 3533-3547.
- (64) Witko-Sarsat, V., Gausson, V., Nguyen, A. T., Touam, M., Drueke, T., Santangelo, F., and Descamps-Latscha, B. (2003) AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int* 64, 82-91.
- (65) Matarrese, P., Straface, E., Pietraforte, D., Gambardella, L., Vona, R., Maccaglia, A., Minetti, M., and Malorni, W. (2005) Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *Faseb J* 19, 416-8.
- (66) Yajima, D., Motani, H., Hayakawa, M., Sato, Y., Sato, K., and Iwase, H. (2009) The relationship between cell membrane damage and lipid peroxidation under the condition of hypoxia-reoxygenation: analysis of the mechanism using antioxidants and electron transport inhibitors. *Cell Biochem Funct* 27, 338-43.

- (67) Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., and Butler, J. (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6, 593-7.
- (68) Grinberg, L., Fibach, E., Amer, J., and Atlas, D. (2005) N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 38, 136-45.
- (69) Casey, J. R., Lieberman, D. M., and Reithmeier, R. A. (1989) Purification and characterization of band 3 protein. *Methods Enzymol* 173, 494-512.
- (70) Stocks, J., and Dormandy, T. L. (1971) The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 20, 95-111.
- (71) Winterbourn, C. C. (1990) Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol* 186, 265-72.
- (72) Walker, R. B., and Everette, J. D. (2009) Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *J Agric Food Chem* 57, 1156-61.
- (73) Liu, X., and Spolarics, Z. (2003) Methemoglobin is a potent activator of endothelial cells by stimulating IL-6 and IL-8 production and E-selectin membrane expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1036-46.
- (74) Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G. M., Eaton, J. W., and Balla, G. (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100, 879-87.
- (75) Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H., and Papassideri, I. S. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion* 50, 376-89.
- (76) Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J. P., Estaquier, J., Huart, J. J., Ameisen, J. C., Aminoff, D., and Montreuil, J. (1998) Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80, 173-95.