

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA-Universidad de la República

Efecto de la leucorreducción sobre la vía glucolítica y el ciclo de las pentosas fosfato en glóbulos rojos almacenados para transfusión

Nicolás Silva Sallúa

Orientador: Matías Möller

Orientadora: Leonor Thomson

Laboratorios de Físicoquímica Biológica y Enzimología,
Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, octubre 2023



Agradecimientos

A mis orientadores, Leonor y Matías, por su disposición y acompañamiento durante todo mi proceso de formación y realización de este trabajo.

A quienes forman parte del Laboratorio de Enzimología y Fisicoquímica Biológica por permitirme formar parte de un grupo de trabajo envidiable y que, con la ayuda y paciencia de cada uno de ellos, este trabajo salió adelante.

A mis compañeros de Hemoterapia, por el apoyo durante mis ausencias y el aliento a continuar por este camino.

A mi familia y amigos, y especialmente a Mati, mi compañera de vida. Su amor incondicional fue fundamental para seguir adelante.

A la Universidad de la República y a la Facultad de Ciencias por abrirme las puertas y permitirme acceder a formación de calidad.

Finalmente, agradecer a las Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República (CSIC-UdelaR) por la financiación de diferentes etapas de este trabajo.

Abreviaturas

1,3BPG	1,3-bifosfoglicerato
2,3BPG, 2,3DPG	2,3-bifosfoglicerato, 2,3-difosfoglicerato
2PG	2-fosfoglicerato
3PG	3-fosfoglicerato
6PG	6-fosfogluconato
6PG-L	6-fosfoglucono lactona
ALDO	Aldolasa
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
FBP	Fructosa 1,6-bifosfato
fL	Femtolitro (10^{-15} L)
G6P	Glucosa 6-fosfato
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
Gpx	Glutación peroxidasa
GR	Glóbulo rojo
Grx	Glutarredoxinas
GSH	Glutación
HK	Hexoquinasa
LAC	Ácido láctico
LDH	Lactato deshidrogenasa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adnenina dinucleótido fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK	Fosfofructoquinasa-1
PGK	Fosfogliceratoquinasa
PPP	Ruta de las pentosas fosfato
PRP	Plasma rico en plaquetas
Prx	Peroxirredoxina
Ribo5P	Ribosa 5-fosfato
Ribu5P	Ribulosa 5-fosfato
RRL	Ruta Rapoport-Luebering
SD	Sangre desplasmaticada
TR	Tiorredoxina reductasa
Trx	Tiorredoxina

Resumen

La sangre desplasmatazada (SD) continúa siendo al día de hoy la principal herramienta terapéutica para los pacientes con anemia. Esta es obtenida a partir de donantes de sangre voluntarios y almacenada a 4°C por 42 días en un medio conservador que contiene glucosa, principal fuente energética del eritrocito. Durante ese período, los glóbulos rojos sufren alteraciones denominadas lesiones por almacenamiento que modifican sus características bioquímicas, metabólicas, morfológicas, antioxidantes, entre otras. A su vez, las unidades de SD pueden ser sometidas a un procedimiento denominado leucorreducción (LR), en el que se le extraen los leucocitos remanentes a la unidad, dejando un recuento por debajo de un nivel seguro para los pacientes. En nuestro país, la LR no se aplica de manera universal, sino en pacientes con patologías puntuales. En este proyecto proponemos la hipótesis que los glóbulos rojos LR almacenados para transfusión sufren menos daños metabólicos y oxidativos al estar menos expuestos a citoquinas y mediadores proinflamatorios producidos por los leucocitos remanentes de la unidad. Se midieron las concentraciones de ATP, NADP⁺ y NADPH y actividad de G6PDH en glóbulos rojos almacenados para transfusión de 3 donantes de sangre del Hospital de Clínicas, en los días 1, 7, 14, 21 y 42 de almacenamiento, en condiciones de leucorreducción y no leucorreducción. El ATP se midió utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC); el NADPH se cuantificó mediante un método de ciclado enzimático, midiendo la formación de MTT red en un lector de placas; mientras que la actividad de la G6PDH se realizó midiendo la formación de NADPH reducido en el tiempo. No se observaron diferencias significativas de ATP, NADP⁺ y NADPH entre unidades leucorreducidas y no leucorreducidas. El ATP disminuyó en todas las unidades a partir del día 21, mientras que el NADP⁺ y el NADPH se mantuvieron constantes. La actividad de la G6PDH se mantuvo durante todo el almacenamiento y no hubo diferencias entre unidades leucorreducidas y no leucorreducidas. Los resultados obtenidos sugieren que existen cambios en las rutas metabólicas a las que se destina la glucosa, disminuyendo el potencial energético, pero no así el poder antioxidante. A su vez, se pusieron a punto técnicas confiables para la medida de nucleótidos en glóbulos rojos, lo que facilitará aumentar el número de muestras y obtener resultados más precisos.

Palabras clave

Eritrocito, transfusión, leucorreducción, metabolismo

Contenido

Agradecimientos	2
Abreviaturas	3
Resumen.....	4
Palabras clave.....	5
Introducción	9
Formación del glóbulo rojo	9
Membrana.....	10
Lípidos	11
Proteínas	11
Glicosilaciones	12
Transporte a través de la membrana	13
Citoesqueleto	14
Citosol.....	14
Metabolismo del GR.....	18
Glucólisis.....	18
2,3-bifosfoglicerato	22
Ruta de las pentosas fosfato	24
Glucosa 6 Fosfato deshidrogenasa.....	26
Deficiencia G6PDH.....	26
Estrés oxidativo y sistemas antioxidantes.....	28
Fuentes oxidantes del glóbulo rojo	28
Sistemas antioxidantes del glóbulo rojo	31
Transfusión.....	35
Leucorreducción.....	36
Lesiones por almacenamiento	37
Hipótesis.....	39
Objetivos	39

General	39
Específicos	39
Materiales y métodos	40
Equipamiento y reactivos.....	40
Obtención de las muestras.....	40
Análisis de metabolitos por HPLC	43
Procesamiento de las muestras frescas y almacenadas para determinación de metabolitos por HPLC.....	43
Cuantificación de ATP por HPLC.....	45
Ciclado enzimático – NADPH.....	46
Método de extracción de NADPH 1	46
Método de extracción de NADPH 2	47
Cuantificación de NADPH	48
Concentración de Oxihemoglobina.....	49
Medida de actividad enzimática de la G6PDH	50
Medida de la actividad enzimática de G6PDH	50
Medida de ATP por luminiscencia	52
Reactivos y equipamiento	52
Método de cuantificación de ATP por quimioluminiscencia	53
Tratamiento con H ₂ O ₂	56
Análisis Estadístico	57
Resultados y discusión	58
Separación y cuantificación de ATP y NADPH intracelulares por HPLC	58
Cuantificación de ATP por HPLC.....	62
Curva de calibración	62
Glóbulos rojos frescos.....	64
Efecto de la leucorreducción y el almacenamiento en el ATP	64
Cuantificación de NADPH por ensayo acoplado	66

Efecto de la leuorreducción y el almacenamiento en NADPH y NADP total.....	66
Cinética enzimática - G6PDH.....	73
Efecto de la leuorreducción y el almacenamiento en la actividad de la G6PDH.....	73
Efecto del H ₂ O ₂ en el ATP	75
Discusión general	78
Conclusiones	82
Perspectivas	83
ANEXO	84
Referencias.....	88

Introducción

Los glóbulos rojos (GR) o eritrocitos son el tipo celular más abundante en la sangre periférica de los mamíferos. El GR en circulación tiene una vida de 120 días y presenta características tanto en su forma como en su estructura y composición que lo diferencian de cualquier otra célula del organismo. Su principal función es el transporte de gases, principalmente el oxígeno, desde los pulmones al resto de los tejidos. Los GR constituyen además uno de los medicamentos fundamentales según la OMS (Organization, 2015) ya que se utilizan para transfusiones sanguíneas en aquellos pacientes que requieren un aporte de capacidad de transporte del oxígeno, cuya disminución lleva a la anemia.

Por lo mencionado anteriormente es que el eritrocito presenta singularidades desde su formación, su vida y su muerte en el organismo. Se intentará, a continuación, profundizar y destacar los aspectos que hacen a estas células tan especiales y únicas.

Formación del glóbulo rojo

En el feto temprano de los mamíferos, incluyendo de humanos, la eritropoyesis se produce en el saco vitelino, a partir del tercer o cuarto mes se traslada al hígado y bazo, para centrarse definitivamente en la médula ósea después del séptimo mes. Los GR se forman a partir de una célula madre multipotente (o célula madre linfomieloide), quien da origen a todas las líneas celulares sanguíneas. A medida que avanza la diferenciación celular, los potenciales eritrocitos pasan por diferentes estadios, comenzando por una colonia de células pluripotentes de la línea germinal mieloide (CFU-M) que también dará origen a otras células de la sangre, pero ya no a todas. Luego se diferencian en células formadoras de colonias eritroides grandes y pequeñas (BFU-E y CFU-E, respectivamente), las cuales darán origen exclusivamente a los eritrocitos y no a otra línea celular (Figura 1). A partir de este momento, comienzan un proceso denominado eritropoyesis que dura aproximadamente 4 días, en que las células pasan por diferentes etapas (proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto poliortocromático, eritroblasto ortocromático) hasta llegar a una etapa previa a la liberación a la circulación sanguínea definida como reticulocitos. Durante este proceso las células van teniendo diferentes modificaciones características, entre otras: disminución y pérdida del núcleo, pérdida de organelos tales como los ribosomas, mitocondrias y retículo endoplasmático, disminución del tamaño celular, etc. (Figura 1). Una vez cumplido este proceso, el reticulocito es liberado al sistema sanguíneo periférico para completar su maduración a eritrocito. (Sans-Sabrafen et al., 2007) (Ogawa, 1993; Ogawa, 1994)

Además de la pérdida del núcleo y organelos, durante la maduración el eritrocito adquiere su forma característica aplanada de disco bicóncavo, con un tamaño aproximado de 7 μm de largo, 2 μm de espesor y un volumen aproximado de 90 fL (Figura 2). Esta forma bicóncava le confiere un área superficial de 140 μm^2 aproximadamente que genera un aumento en la relación superficie/volumen, favoreciendo de esta manera el intercambio de gases a través de la membrana y la deformabilidad del GR. Dicha forma bicóncava se debe en gran parte a la estructura de su membrana celular y su interacción con el citoesqueleto.

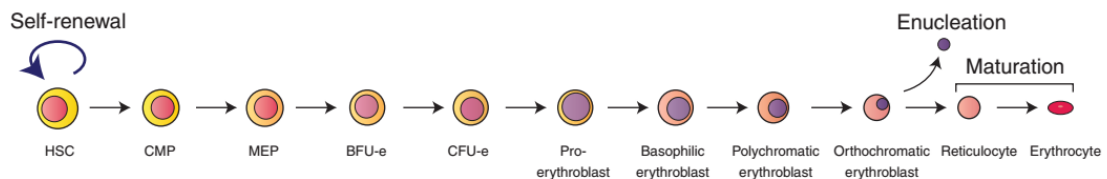


Figura 1. Eritropoyesis. Extraído de (Dzierzak & Philipsen, 2013)

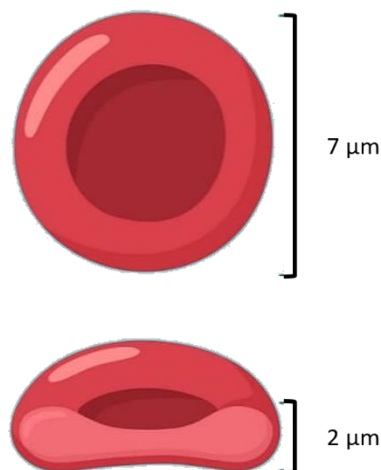


Figura 2. Glóbulo rojo, forma y dimensiones.

Membrana

La membrana plasmática del eritrocito presenta una estructura que obedece al modelo de mosaico fluido propuesto por Singer & Nicolson (Singer & Nicolson, 1972); compuesta por lípidos y proteínas, mayoritariamente glicosilados. Su estructura y característica le permite a la célula cumplir varias de sus funciones. Principalmente, favorece el intercambio de gases entre el interior y el exterior celular, pero también presenta características fisicoquímicas que contribuyen a su gran deformabilidad, aspecto importante en estas células debido a que deben atravesar vasos de pequeño calibre (menores a su tamaño), tanto en los capilares como a nivel esplénico. En este último aspecto juega un rol crucial el citoesqueleto anclado a la membrana del glóbulo rojo.

A continuación, se mencionan las principales características de cada uno de sus componentes.

Lípidos

El componente lipídico representa el 43% del peso seco de la membrana celular y se compone esencialmente de fosfolípidos (PL) 55% y colesterol 45% en fracción molar. Los PL de membrana se distribuyen tanto en la capa interna como en la externa, siendo predominantes en la monocapa externa la fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM) que presentan carga neta neutra, y en la monocapa interna la fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI) que presentan carga negativa e interactúan con el citoesqueleto (Daleke, 2008; Rothman & Lenard, 1977). Los ácidos grasos que componen los fosfolípidos son variables, siendo los menos saturados los que le aportan más fluidez a la membrana (Yawata, 2006). La pérdida de la asimetría de fosfolípidos de membrana, y especialmente la externalización de PS son marcadores específicos de senescencia que son reconocidos por los macrófagos que retiran de circulación a las células (Zwaal & Schroit, 1997). Esta pérdida de la asimetría se da en parte por la baja actividad de enzimas dependientes de ATP, como *flipasa* que mueve fosfolípidos desde la monocapa externa a la interna, y *escramblasa* que mueve fosfolípidos en ambas direcciones, manteniendo la asimetría (Mohandas & Gallagher, 2008). La deformación del GR provoca la activación del canal Piezo1, un canal mecano sensible que produce el ingreso de calcio al medio intracelular (Svetina, 2020). Esto tiene como consecuencia la activación de ATPasas de calcio con la finalidad de restablecer los niveles intracelulares de calcio, a expensas de un consumo de ATP. Este sistema de control de volumen requiere el consumo de ATP, también necesario para la actividad de la flipasa (Huisjes et al., 2018). El colesterol, por su parte, es un lípido neutro que le aporta rigidez a la membrana y se encuentra distribuido tanto en la monocapa externa como interna de la membrana.

Proteínas

Las proteínas de la membrana representan el 49% del peso seco. Estas se pueden separar en proteínas transmembrana y proteínas del citoesqueleto.

Dentro de las proteínas transmembrana se puede destacar a la banda 3 o intercambiador de aniones 1 (AE1), proteína más abundante presente en la membrana del glóbulo rojo y le siguen en abundancia proteínas del citoesqueleto como la actina, proteína 4.1, estomatina, ankirina y α y β espectrina (Bryk & Wiśniewski, 2017). La banda 3 es una proteína con un dominio transmembrana C-terminal encargado del intercambio de bicarbonato/cloruro, mientras que presenta un dominio citosólico N-terminal encargado del anclaje al citoesqueleto y sitio de unión al metabolón (*ver más adelante*) (Lux IV, 2016). Mediante un complejo sistema de uniones

representado en la Figura 3, la membrana se mantiene unida al citoesqueleto y le da a la célula la estabilidad mecánica y la plasticidad necesaria para cumplir su función de llegar a todos los tejidos atravesando pequeños capilares.

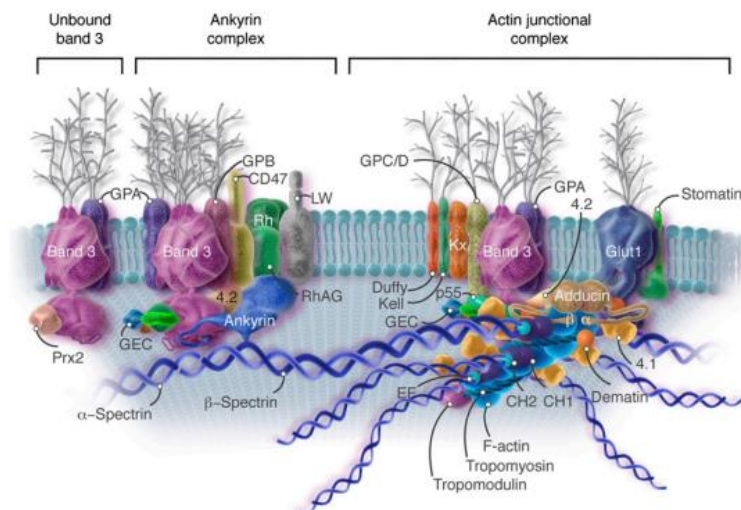


Figura 3. Modelo representando la compleja interacción entre las proteínas de membrana en torno a la Banda 3, y las proteínas del citoesqueleto. Extraído de (Lux IV, 2016).

En la membrana del glóbulo rojo también se hacen presentes diferentes proteínas con diferentes funciones que determinan los grupos sanguíneos. La presencia o ausencia de estas proteínas juegan un rol clave en la medicina transfusional y en la terapéutica (Daniels & Bromilow, 2011).

Glicosilaciones

Representan el 8% del peso seco de la membrana del eritrocito y se encuentran orientadas al exterior de la célula. Al igual que ocurre con las proteínas, algunos sistemas de grupo sanguíneos son de estructura glicosídica y por ende importantes en la medicina transfusional (Daniels & Bromilow, 2011). A la fecha de escrito este trabajo, la Sociedad Internacional de Transfusiones Sanguíneas (ISBT, por sus siglas en inglés) reconoce 45 sistemas de grupos sanguíneos, que incluyen 360 antígenos. Los antígenos están definidos por la generación de un anticuerpo dirigido contra él, ya sea como consecuencia de una exposición previa (inmune) o de origen aparentemente natural (ISBT, 2023). Ejemplos de antígenos que están formados por glicosilaciones en estructuras de la membrana son los del sistema ABO (en esencia son azúcares), MNS (asociados a glicoforinas), Diego (asociado a Banda3), etc. (Figura 4). (Daniels & Bromilow, 2011; Garratty et al., 2000)

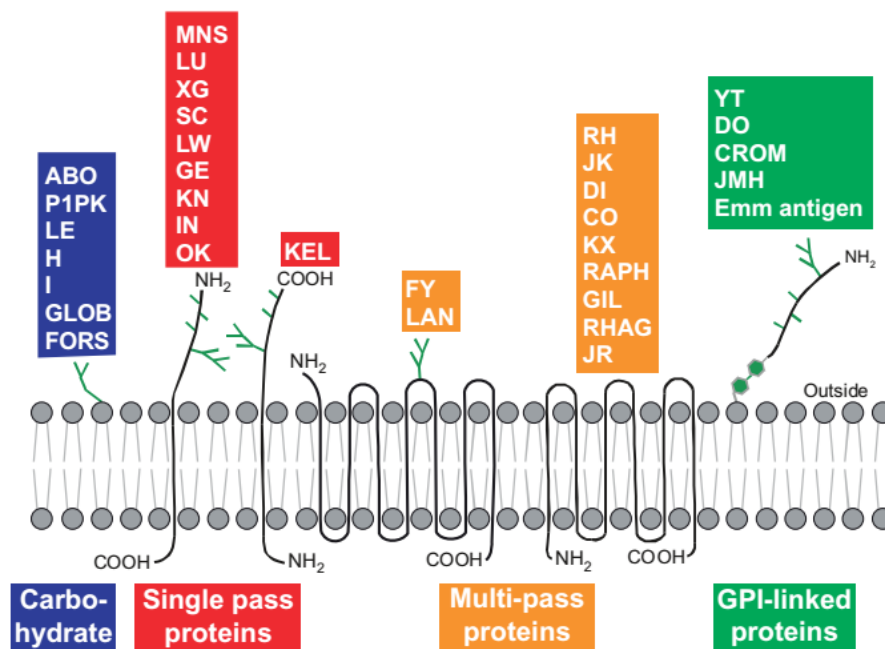


Figura 4. Asociación entre diversos sistemas de grupo sanguíneo eritrocitarios con la estructura de la membrana del glóbulo rojo. Extraído de (Reid et al., 2012).

Transporte a través de la membrana

La membrana de los eritrocitos permite el pasaje de diferentes moléculas. Dependiendo de su tamaño y carga, estas moléculas lograrán atravesar la membrana mediante difusión pasiva a través de la bicapa fosfolipídica como el oxígeno, el dióxido de carbono y el óxido nítrico (Möller et al., 2019; Signorelli et al., 2011); por difusión facilitada utilizando proteínas transmembrana como la glucosa a través de la proteína GLUT1 *SLC2A1* (Deng et al., 2014), el agua a través de acuaporinas *Aqp1* y como ya fue mencionado para el bicarbonato a través de la banda 3; o a través de transporte activo mediado como ocurre en el intercambio de iones con la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Toyoshima et al., 2011) o la ATPasa de calcio (Bogdanova et al., 2013) que mantienen las concentraciones de los iones intra y extracelulares constantes y alejadas del equilibrio. Estas bombas de iones mantienen el gradiente iónico y el volumen celular a expensas de ATP, por lo que una disminución en la concentración de ATP afectaría directamente la función de estas bombas.

El volumen intracelular es fundamental para mantener la función del glóbulo rojo y permitir su deformabilidad. Por esto, el eritrocito tiene distintos mecanismos que facilitan la pérdida o recuperación de agua. Dentro de estos mecanismos del ya mencionado intercambio de iones que definen la osmolaridad celular, se encuentra el canal Piezo1. Este canal es mecano sensible y al censar cambios en la forma de la membrana permite el ingreso de Ca^{2+} , que activará el canal Gardós (*KCNN4*) que permite la liberación de K^+ al medio extracelular y de esta manera por

osmolaridad facilita la salida de agua. La restauración del volumen se da por la expulsión de Ca^{2+} mediante la ATPasa de calcio, restableciendo la concentración intracelular de iones, promoviendo el reingreso de agua, restaurando el equilibrio osmótico. Estos cambios de volumen le permiten al glóbulo rojo atravesar pequeños capilares (Huisjes et al., 2018). Niveles por debajo de lo normal de ATP intracelular afectarían todo este mecanismo regulatorio.

Citoesqueleto

El citoesqueleto de los eritrocitos recubre la superficie interna de la membrana celular y cumple un rol fundamental en la deformabilidad y estabilidad de la célula. Está compuesto por complejos proteicos centrados en la proteína banda 3 (mencionada anteriormente) conformados principalmente por espectrina, actina, proteína 4.1R, ankyrina y proteínas asociadas a la actina. La espectrina es una proteína compuesta por dos cadenas orientadas en dirección opuesta (cadena alfa y cadena beta) conformando un dímero helicoidal, que a su vez se asocia a otro dímero conformando un tetrámero de 64 nm de largo. Los dominios cabeza y cola van a interactuar con las proteínas de anclaje 4.1R y ankyrina, y estas últimas interactúan con el dominio citosólico de la banda 3 (Figura 3). Estos complejos de anclaje junto con los filamentos de espectrina forman una malla con estructura pseudohexagonal.

Citosol

Los glóbulos rojos maduros carecen de núcleo y organelos. Esta característica distintiva, pese a privar a la célula de componentes celulares involucrados en el metabolismo que sí están presentes en otras células, le permite mayor rendimiento a la hora de cumplir su principal función: transportar el oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos unido a la hemoglobina. De las más de 2000 proteínas presentes en el eritrocito, la hemoglobina es la más abundante, seguida de la anhidrasa carbónica (CA1) y la peroxirredoxina 2 (Prx2) (Bryk & Wiśniewski, 2017).

La hemoglobina A es una proteína heterotetramérica, formada por dos pares idénticos de proteínas (2α y 2β), unidas cada una de ellas a un grupo hemo (Figura 6). Cada subunidad presenta un peso molecular de 16 kDa y se encuentra en el glóbulo rojo en una concentración aproximada de 20 mM por subunidad (Steinberg et al., 2018). Al átomo de hierro (Fe^{2+}) del grupo hemo se une de forma reversible una molécula de O_2 formando de esta manera la oxihemoglobina. Cuando el O_2 no se encuentra unido a hierro ferroso, se denomina desoxihemoglobina. El átomo de hierro puede ser oxidado Fe^{3+} (hierro férrico) y la hemoglobina convertida en metahemoglobina. La enzima metahemoglobina reductasa será la encargada de revertir esta oxidación a expensas de poder reductor de NADH, como veremos más adelante.

Las globinas de la hemoglobina son cadenas de aminoácidos que, al presentar pequeñas variaciones en la secuencia aminoacídica, dan lugar a diferentes cadenas que se denominan α -, β -, γ - y δ -globina, entre otras. Estas cadenas interactúan entre sí brindándole estabilidad a la molécula. Las cadenas que conformen el tetrámero de hemoglobina van a definir la identidad de la molécula; de esta manera podemos destacar la hemoglobina A (HbA), tetrámero predominante en adultos, formado por dos α -globinas y dos β -globinas.

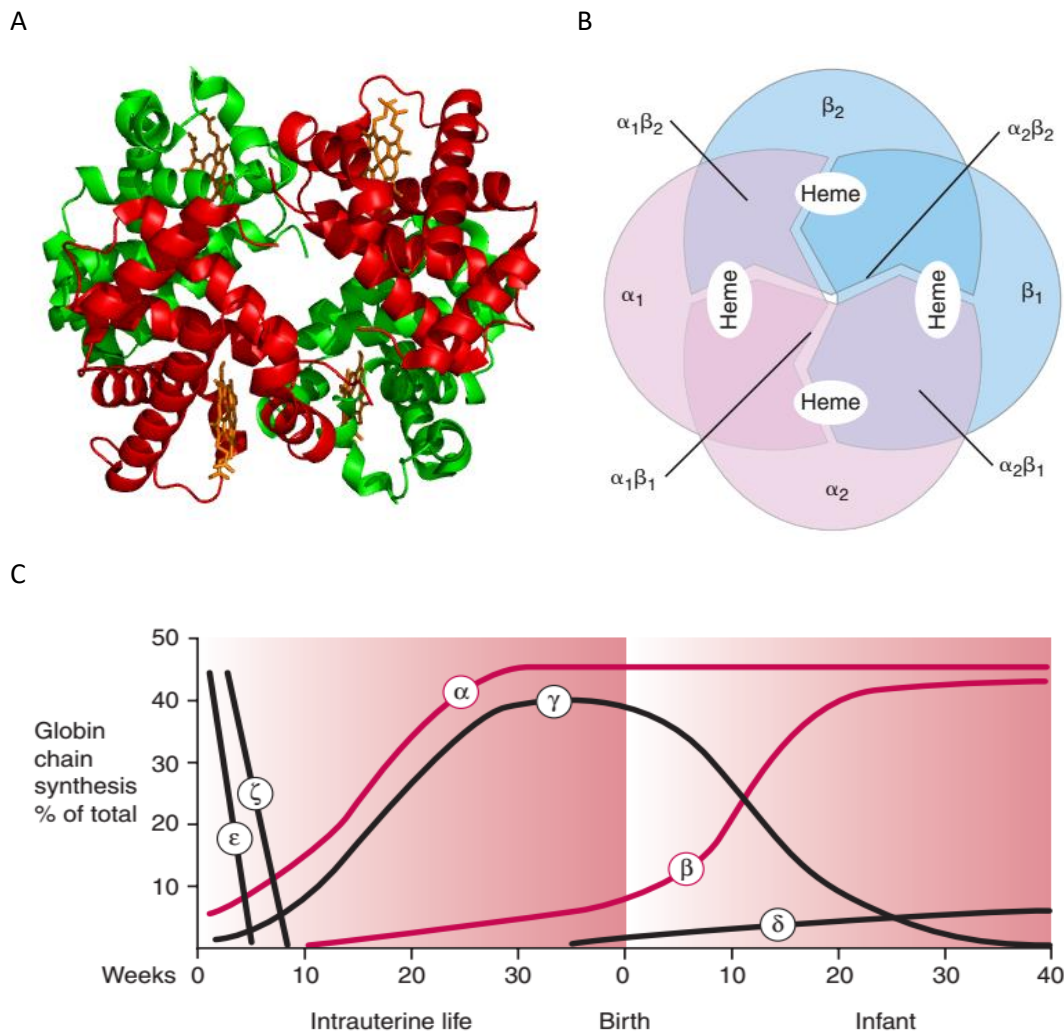


Figura 5. A. Estructura cristalográfica de la molécula de hemoglobina, con sus cadenas alfa (rojo), cadenas beta (verde) y grupos hemo (naranja) Extraída de: rcsb.org/structure/7VDE. **B.** Esquema de estructura cuaternaria de la hemoglobina A con sus 4 tetrámeros (2 alfa y 2 beta), cada uno unido a un grupo hemo respectivo. **C.** Representación temporal de la síntesis de las diferentes cadenas de globinas en las etapas intrauterina y primeras semanas del nacimiento. Las líneas rojas muestran las globinas alfa y beta, predominantes en el adulto. Las figuras B y C fueron extraídas de (Keohane et al., 2019).

No obstante, existen más tipos de hemoglobinas según las cadenas de globina que la conforman y la edad del individuo. La predominancia en la síntesis de diferentes cadenas de globinas se esquematiza en la Figura 5 C. Como se puede observar, durante la vida intrauterina y las

primeras semanas de vida predomina la hemoglobina fetal (HbF) formada por dos cadenas α y dos γ . La HbF presenta algunas características diferentes a la HbA, entre ellas, la particularidad de una mayor afinidad por el O_2 y que no presenta interacción con el 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) (Steiner & Gallagher, 2007).

La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (para de esta manera cumplir su función de transporte) puede representarse mediante una curva de saturación de hemoglobina en función de la presión parcial de oxígeno (Figura 6).

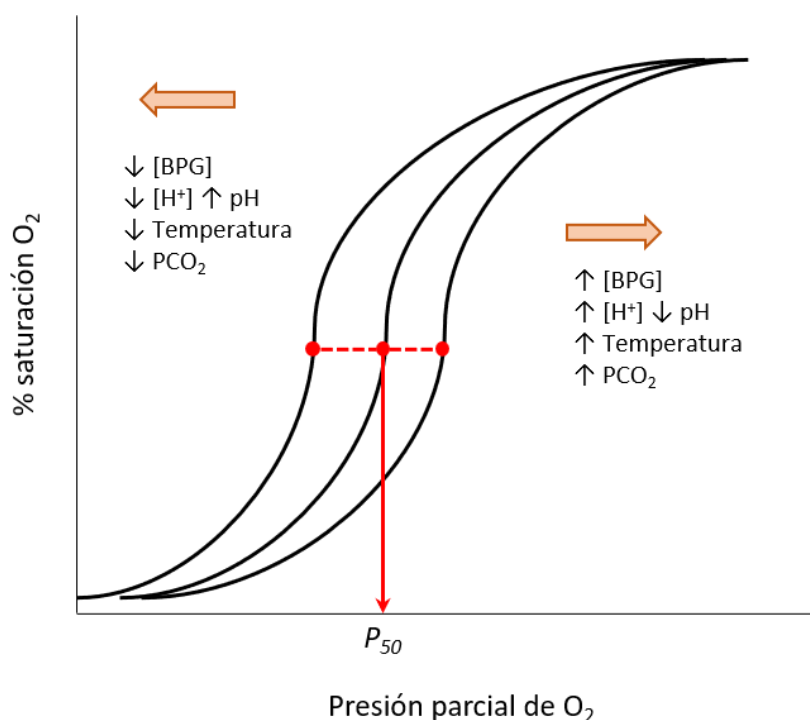


Figura 6. Curva de disociación de la hemoglobina con el oxígeno. Se muestra la saturación de oxígeno de la hemoglobina en función de la presión parcial de oxígeno. P_{50} define la presión parcial de O_2 a la que se alcanza una saturación del 50%. Cambios en las concentraciones de BPG y de H^+ , así como la temperatura y la presión parcial de CO_2 desvían la curva y modifican el P_{50} .

La unión del oxígeno a las moléculas de hemoglobina presenta un mecanismo cooperativo (forma sigmoidea del gráfico). Esto significa que al unirse una molécula de O_2 a la hemoglobina, aumenta la afinidad del resto de las moléculas de O_2 a los grupos hemo. El valor P_{50} define la presión parcial de O_2 a la que el 50% de la hemoglobina se encuentra oxigenada. Esta afinidad tan característica que le permite a la hemoglobina presentar alta afinidad en los pulmones (para capturar el O_2) y baja afinidad en los tejidos (para liberar O_2) se ve modificada por diferentes factores, a tener en cuenta: cambios en las concentraciones de H^+ (cambios en el pH, efecto Bohr), 2,3-BPG, CO_2 , cambios en la temperatura, entre otros. Más adelante se profundizará cómo interfiere especialmente el 2,3-BPG vinculado al metabolismo eritrocitario y al almacenamiento

de glóbulos rojos para transfusión. El desplazamiento de la curva a la izquierda representa un aumento de la afinidad, mientras que el desplazamiento a la derecha representa una disminución en la afinidad (Figura 6).

La anhidrasa carbónica (CA1) y la peroxirredoxina 2, son dos enzimas eritrocitarias que le siguen en abundancia en el GR a la Hb. La CA1 (EC 4.2.1.1) está encargada de catalizar reversiblemente la formación de ácido carbónico (H_2CO_3) a partir de CO_2 y agua (Keohane et al., 2019). La peroxirredoxina 2 es una enzima antioxidante presente en abundancia en el glóbulo rojo, y se profundizará sobre ella en la sección *Estrés oxidativo y sistemas antioxidantes*.

Metabolismo del GR

Tal como se mencionó anteriormente, el GR requiere de ATP como fuente de energía para el funcionamiento de una gran cantidad de sistemas encargados de mantener la forma y función de la célula. El GR, al no poseer mitocondrias que permitan la generación de ATP por fosforilación oxidativa, utiliza la glucólisis anaerobia como principal mecanismo de generación de energía a partir de glucosa. Esta glucosa también es fundamental en la generación de equivalentes reductores como el NADH y el NADPH, fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis redox de la célula. La glucosa ingresa al GR a través del transportador de membrana GLUT1 (no dependiente de insulina) donde puede ser fosforilada a glucosa 6-fosfato (G6P) por la enzima hexoquinasa. La G6P va a ser el sustrato principal tanto de la vía glucolítica como de la ruta de las pentosas fosfato.

A continuación, se describen los principales mecanismos involucrados en estos procesos.

Glucólisis

La glucólisis (o vía de Embden – Meyerhof) es una vía metabólica que consiste en una serie de reacciones que finaliza con la formación de dos moléculas de lactato a partir de una molécula de glucosa, generando en el proceso dos moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Figura 7) y equivalentes de reducción en forma de nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH). Si bien representa la primera etapa de generación de energía en forma de ATP en todas las células, es el único y exclusivo mecanismo en los glóbulos rojos maduros para la generación de ATP.

El ATP es un nucleótido de purina (adenina) unido a un azúcar (ribosa), y unida a la posición 5' de ésta se encuentran tres grupos fosforilo (trifosfato) unidos entre sí por enlaces de alta energía. La síntesis de ATP se da por la transferencia del grupo fosfato terminal a una molécula de ADP (adenosina 5'-difosfato), estabilizado por un catión divalente de Mg^{2+} .

La molécula de NADH está compuesta por un nucleótido de adenina y otro de nicotinamida unidos por un grupo fosfato. Es una coenzima que aporta poder reductor y en los GR su reducción depende de la vía glucolítica. Las reacciones catalizadas por deshidrogenasas liberan un equivalente de reducción como ion hidruro (un protón con dos electrones) que es transferido a una molécula de NAD^+ (oxidada). En las células que contienen mitocondrias, el NADH cumple un rol fundamental en el transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, en el glóbulo rojo aporta poder reductor para la reducción del piruvato a lactato y mantener la hemoglobina en estado reducido, evitando la acumulación de metahemoglobina, actuando como cofactor de la NADH b5 citocromo reductasa (metahemoglobina reductasa) (Mansouri & Lurie, 1993; Van Zwieten et al., 2014).

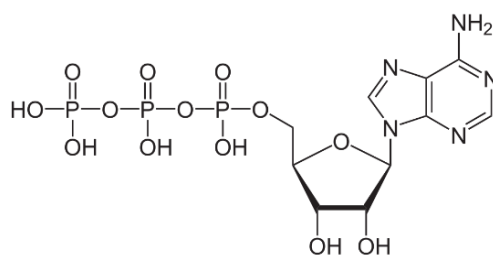
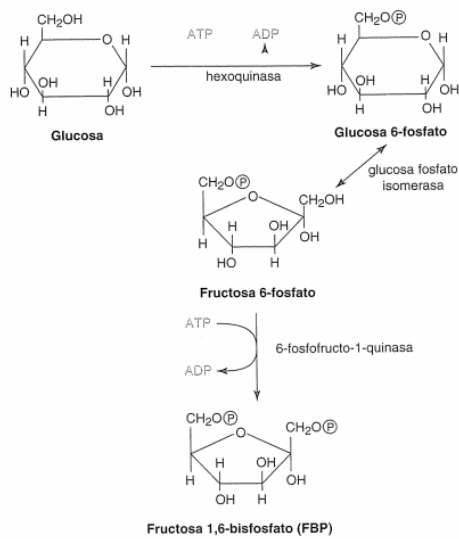


Figura 7. Estructura de la molécula de ATP. En glóbulos rojos es obtenida únicamente por la vía glucolítica.

La glucólisis puede ser dividida en tres fases para su estudio que comprenden la *fase de preparación*, la *fase de partición* y la *fase de oxidorreducción-fosforilación* (Devlin, 2019). Durante la *fase de preparación* tiene lugar la fosforilación de la glucosa a G6P catalizada por la hexoquinasa (HK) (EC 2.7.1.1), primer enzima glucolítica y reguladora de la vía. La reacción es irreversible y paradójicamente requiere de una molécula de ATP, pero es el paso que permite el inicio de la cascada glucolítica. La vía continúa con la acción de la glucosa 6 fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9) y posteriormente con la acción de la fosfofructoquinasa-1 (PFK) (EC 2.7.4), otra enzima reguladora de la vía glucolítica que también requiere de ATP. En la fase de preparación se obtiene como producto fructosa 1,6-bifosfato (FBP). En la *fase de partición* la enzima fructosa 1,6 bifosfato aldolasa (ALDO) (EC 4.1.2.13) se encarga de producir dos moléculas de 3 carbonos: dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3 fosfato (GAP). Posteriormente, la triosa fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1) cataliza la conversión de DHAP en GAP y de esta manera genera 2 moléculas de GAP que continuarán a la siguiente fase. Estas etapas se ven esquematizadas en la Figura 8.

A



B

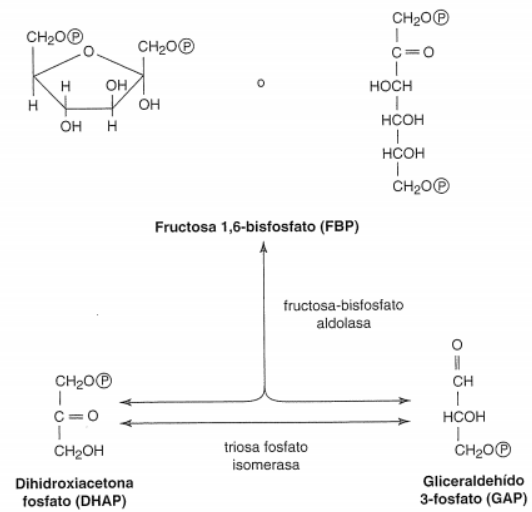


Figura 8. Reacciones que conforman las primeras dos fases de la vía glucolítica. A. Fase de preparación, iniciada por la reacción catalizada por la hexoquinasa. **B.** Fase de partición, determinada por las reacciones catalizadas por las enzimas fructosa difosfato aldolasa y triosa fosfato isomerasa. Extraído de (Devlin, 2019).

La tercera fase comienza con la oxidación de GAP catalizada por la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (EC 1.2.1.12) a expensas de una molécula de NAD^+ para formar 1,3-bifosfoglicerato y NADH. A partir de 1,3-bifosfoglicerato, la fosfoglicerato quinasa (EC 2.7.2.3) cataliza la generación de la primera molécula de ATP del proceso y se obtiene como producto una molécula de 3-fosfoglicerato. Teniendo en cuenta que de una única molécula de glucosa se formaron 2 de GAP, y por lo tanto 2 de 1,3-bifosfoglicerato, en este paso la vía glucolítica “recupera” las 2 moléculas de ATP requeridas en la fase de preparación.

Una vez formado el 3-fosfoglicerato, la enzima fosfoglicerato mutasa cataliza la producción de 2-fosfoglicerato. La vía continúa con la hidrólisis del 2-fosfoglicerato catalizada por la enolasa (EC 4.2.1.11) para producir fosfoenolpiruvato. Posteriormente la enzima piruvato quinasa (EC 2.7.1.40) cataliza una nueva fosforilación sintetizando ATP y conservando el compuesto de alta energía: piruvato. Este paso implica la generación de 2 nuevas moléculas de ATP a partir de una de glucosa. Finalmente, la vía glucolítica concluye con la formación de lactato catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), generando en el proceso catalítico la oxidación de una molécula de NADH para formar NAD^+ . La fase final de la glucólisis se representa en la Figura 9.

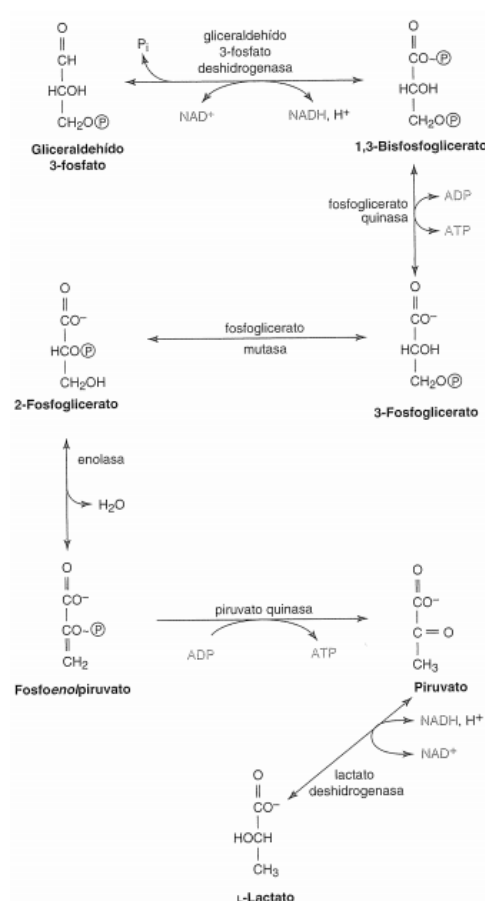


Figura 9. Reacciones que conforman la fase final de la vía glucolítica. Esquema de reacciones de la fase final de la glucólisis, que termina con la producción de lactato. Extraído de (Devlin, 2019).

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una proteína de importancia clínica como indicador de daño celular, particularmente es marcador de hemólisis de las células sanguíneas.

En los GR, la molécula de 1,3-bisfosfoglicerato también puede actuar como sustrato de la enzima 2,3 bifosfoglicerato mutasa (EC 5.4.2.4), desviando la vía glucolítica hacia la formación de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) por la vía Rapoport-Luebering (Van Wijk & Van Solinge, 2005), mecanismo profundizado en la siguiente sección.

En suma, a partir de una molécula de glucosa se generan dos de ácido láctico con la producción intermedia neta de 2 moléculas de ATP (si no hay formación intermedia de 2,3 DPG). Las dos moléculas de NADH formadas en la reacción catalizada por la GAPDH son utilizadas en la reacción de formación de lactato, por lo que su equivalencia final es nula. Cabe destacar que, con la producción de ácido láctico por la vía glucolítica, la célula se expone a cambios en el pH y en el equilibrio ácido-base. Como se mencionó anteriormente, el NADH será importante para mantener la hemoglobina como oxihemoglobina y evitar su sobreoxidación a metahemoglobina,

por lo que deberá regular su función entre la formación de ácido láctico y la reducción de la hemoglobina.

2,3-bisfosfoglicerato

Como se mencionó en la sección anterior, la enzima 2,3 bisfosfoglicerato mutasa comparte el 1,3-bisfosfoglicerato como sustrato con la enzima fosfoglicerato quinasa, y cataliza la formación de 2,3-BPG por la vía Rapoport-Luebering (Van Wijk & Van Solinge, 2005), una desviación de la vía glucolítica esquematizada en la Figura 10. La 1,3-bisfosfoglicerato mutasa es bifuncional catalíticamente y, cuando las condiciones lo requieren, tiene actividad fosfatasa, catalizando la hidrólisis del 2,3-BPG para formar 3-fosfoglicerato y de esta manera continuar con la vía glucolítica.

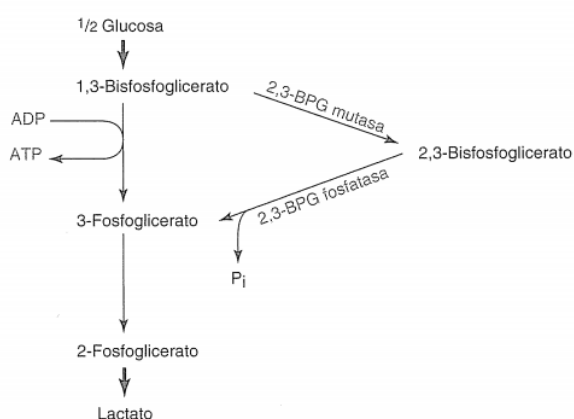


Figura 10. Vía Rapoport-Luebering. Desvío de la ruta glucolítica para la formación del intermediario 2,3-BPG. Extraído de (Devlin, 2019).

El 2,3-BPG es un intermediario entre la formación de 1,3-bisfosfoglicerato a 3-fosfoglicerato, privando a la célula de la generación de energía en forma de ATP. Sin embargo, el 2,3-BPG es una molécula de gran importancia en el glóbulo rojo porque regula la afinidad del oxígeno, promoviendo alostéricamente la liberación de oxígeno por la oxihemoglobina (Van Wijk & Van Solinge, 2005).

El 2,3-BPG se asocia a la hemoglobina con alta afinidad debido a que tiene 4 cargas negativas que interactúan con aminoácidos cargados positivamente (His y Lys) presentes en la interfase de las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ de la HbA. El 2,3-BPG estabiliza la conformación T (Tensa, desoxiHb) y por lo tanto disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. En cambio, a bajas concentraciones de 2,3-BPG aumenta conformación R (Relajada, oxiHb) (Keohane et al., 2019). Por lo cual, en la curva de disociación del oxígeno de la hemoglobina, un aumento de la concentración del 2,3-BPG desplaza la curva a la derecha, evidenciando un aumento del valor

P_{50} (presión parcial de oxígeno a la que se encuentra el 50% de la hemoglobina saturada por el oxígeno) (Figura 6). Este desplazamiento de la curva a la derecha se interpreta como una mayor capacidad de los eritrocitos de liberar oxígeno en los tejidos, al disminuir la afinidad de este por la hemoglobina (consecuencia de la inhibición alostérica ejercida por el 2,3-BPG). Es por este aspecto que el 2,3-BPG cumple un rol fundamental en los glóbulos rojos, sobre todo en condiciones de hipoxia (falta de oxígeno), tanto fisiológica (en los capilares) o no fisiológica (fumadores, anemia, altitud elevada). Como veremos más adelante, durante el almacenamiento para transfusión hay un decrecimiento de las concentraciones de 2,3-BPG que dificulta la liberación del oxígeno por los glóbulos rojos una vez transfundidos.

Asimismo, el 2,3-BPG unido a la hemoglobina interactúa con la proteína de membrana banda 3, cumpliendo un rol regulador también a este nivel (McMahon et al., 2021). Las enzimas de la vía glucolítica PFK, ALDO y GAPDH se unen formando un complejo enzimático que en condiciones de normoxia se encuentra unido al extremo citosólico N-terminal de la proteína banda 3. A este complejo se le unen las enzimas glucolíticas LDH, fosfofructoquinasa 1 y enolasa, y todas en su conjunto conforman el *metabolón*, un complejo multienzimático que inactiva parcialmente la glucólisis (Campanella et al., 2005; Puchulu-Campanella et al., 2013). En condiciones de baja concentración de oxígeno, en las que la hemoglobina se encuentra mayormente en su estado T, ésta compite con el *metabolón* por el sitio de unión a la banda 3, desplazándolo y activando la vía glucolítica que redundará en un aumento de las concentraciones de ATP (Campanella et al., 2005). De esta manera, el estado de oxigenación regula también la actividad metabólica de la célula (Stefanovic et al., 2013). A su vez, esta interacción entre la hemoglobina en estado T y el *metabolón* con la banda 3 es capaz de regular la ruta de las pentosas fosfato (*ver más adelante*), reduciendo su actividad cuando la desoxihemoglobina se encuentra unida a la proteína de membrana (Lewis et al., 2009). Este proceso se esquematiza en la Figura 11.

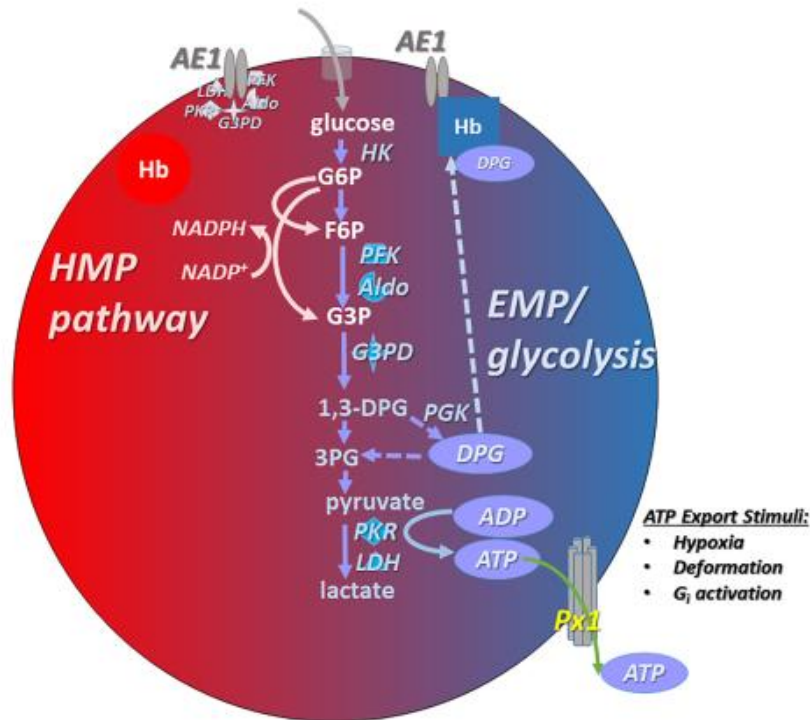


Figura 11. Representación esquemática de la interacción de la hemoglobina con la Banda 3, las enzimas de la vía glucolítica y formación del metabolón. En azul se representa la condición de hipoxia, mientras que en rojo se representa la condición de normoxia. Extraído de (McMahon et al., 2021).

Ruta de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés) o vía oxidativa de las pentosas fosfato es otra vía metabólica de gran importancia en el glóbulo rojo. Le aporta poder reductor en forma de dos moléculas de NADPH a partir de una de glucosa, utilizado por los principales sistemas antioxidantes presentes en la célula.

La molécula de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) comparte las mismas características estructurales que el NADH (*ver NADH*) pero presenta un fosfato adicional en el hidroxilo 2' de la porción de adenosina. Se muestra representado en la Figura 12. El NADPH también es un cofactor que participa como intermediario en reacciones de oxidorreducción.

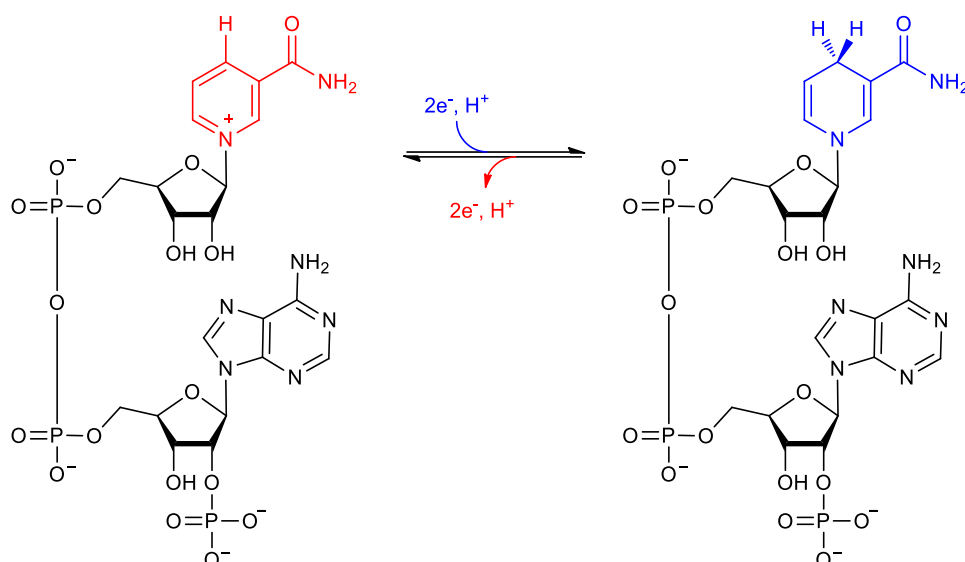


Figura 12. Estructura de la molécula de NADP⁺ y NADPH. Se muestra en rojo la nicotinamida oxidada y en azul la reducida, y se muestran los átomos de hidrógenos vinculados a esta reducción.

La PPP puede dividirse en dos fases, una oxidativa y otra no oxidativa. La primera enzima de la vía, y que da inicio a la fase oxidativa, es la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (EC 1.1.1.49) que cataliza la deshidrogenación de glucosa 6-fosfato (producto de la catálisis enzimática de la hexoquinasa) utilizando como cosustratos NADP⁺ y Mg²⁺, para dar como producto 6-fosfogluconolactona y NADPH. La G6PDH es la principal reguladora de la vía estimulada alostéricamente por la presencia de NADP⁺, e inhibida fuertemente por NADPH (Devlin, 2019). A nivel clínico, tiene un especial interés por ser la causante de una de las enzimopatías más prevalentes: la deficiencia de G6PDH genera una disminución en la producción de NADPH. Esta enzimopatía se profundizará en la siguiente sección.

La siguiente enzima que participa en la vía es la gluconolactonasa que cataliza la hidrólisis de 6-fosfoglucono-lactona para producir 6-fosfogluconato. La 6-fosfogluconato deshidrogenasa será la encargada de catalizar la deshidrogenación de 6-fosfogluconato con la consecuente reducción de otra molécula de NADP, y una nueva descarboxilación para liberar el producto de la reacción, ribulosa 5-fosfato. Posteriormente la ribosa isomerasa cataliza la isomerización de ribulosa 5-fosfato a ribosa 5-fosfato. Estos pasos se ven esquematizados en la Figura 13.

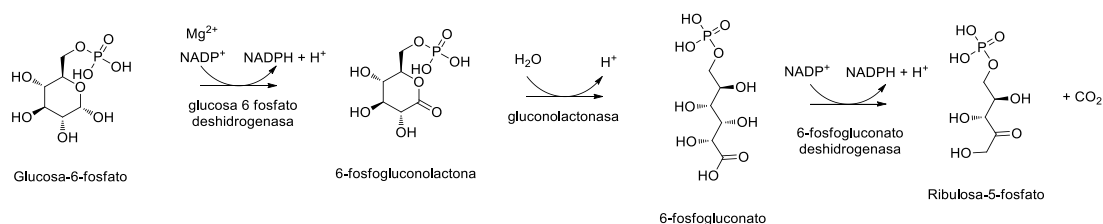


Figura 13. Vía de la ruta de las pentosas fosfato.

La ruta de las pentosas, de esta manera, completa su etapa oxidativa con la síntesis neta de dos moléculas de NADPH en el glóbulo rojo. Según los requerimientos, podría continuar en una serie de reacciones no oxidativas que generan gliceraldehído 3-fosfato y fructosa 6-fosfato, sustratos de la vía glucolítica (Figura 14)

Glucosa 6 Fosfato deshidrogenasa

Es una oxidoreductasa (EC 1.1.1.49) que cataliza la conversión de glucosa 6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactolona con la reducción de una molécula de NADP^+ y utilizando Mg^{2+} como cosustrato. Su forma activa está en forma de dímero o tetrámero, dependiendo del pH del medio. Cada monómero tiene 515 aminoácidos y un peso molecular de 59 kDa (Cappellini & Fiorelli, 2008). Es una enzima bisustrática de reacciones Bi-Bi (tiene dos sustratos y produce dos productos) de orden aleatorio en rápido equilibrio, con constantes cinéticas calculadas de k_{cat} 161 s^{-1} , K_m G6P $6,76 \text{ mM}$ y K_m NADP $54,8 \text{ mM}$ (Wang et al., 2002). Cataliza el primer paso y limitante de la vía de las pentosas fosfato.

Deficiencia G6PDH

La deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es la enzimopatía hereditaria más prevalente, y afecta a cientos de millones de personas en todo el mundo. Es un trastorno genético ligado al cromosoma X (Stincone et al., 2015). Como se explicó anteriormente, la G6PDH es la primera enzima de la vía de las pentosas fosfato (PPP), encargada de catalizar su primera reacción y regular la ruta. En esta reacción se genera un equivalente reductor (NADPH) y continúa la vía para generar otro. Esta deficiencia afectará todos los procesos redox NADPH-dependientes del glóbulo rojo ya que la PPP es el principal mecanismo para su generación. Esta deficiencia es la causante, por ejemplo, de anemias hemolíticas inducidas por fármacos y el favismo (Luzzatto & Arese, 2018).

Los pacientes con esta condición presentan valores de hemoglobina normales y generalmente son asintomáticos ya que comúnmente pueden hacer frente sin inconvenientes a los oxidantes fisiológicos. Sin embargo, frente a aumentos de estrés oxidativo dados por el consumo de algunos medicamentos o alimentos (como las habas, de alto consumo en la zona del Mediterráneo) no consiguen compensar de manera correcta el desequilibrio y esto se traduce en una reducción de la masa eritrocitaria por hemólisis (anemia hemolítica). Paradójicamente, los individuos portadores de esta deficiencia presentan resistencia a la malaria (o paludismo), enfermedad causada por el parásito *Plasmodium falciparum*, ofreciéndoles protección frente a la malaria no complicada, pero no así contra la malaria grave (Mbanefo et al., 2017). La hipótesis que surge de esta resistencia es que la imposibilidad de los eritrocitos de hacer frente al

desequilibrio oxidativo produce un contexto desfavorable para la supervivencia y desarrollo del parásito (Vega-Rodríguez et al., 2009). Esto está apoyado por la alta prevalencia de la deficiencia en zonas donde la malaria es endémica como lo son el África subsahariana, Oriente Medio y Sudeste asiático, donde los individuos generaron cierta resistencia. (Cappellini & Fiorelli, 2008) (<https://www.who.int/health-topics/malaria>).

En suma, el metabolismo eritrocitario incluye varias vías donde la glucosa es el principal sustrato. Posee varios destinos que presentan una compleja regulación y es utilizada por diferentes vías según los requerimientos. La Figura 14 resume las principales rutas metabólicas descritas hasta el momento.

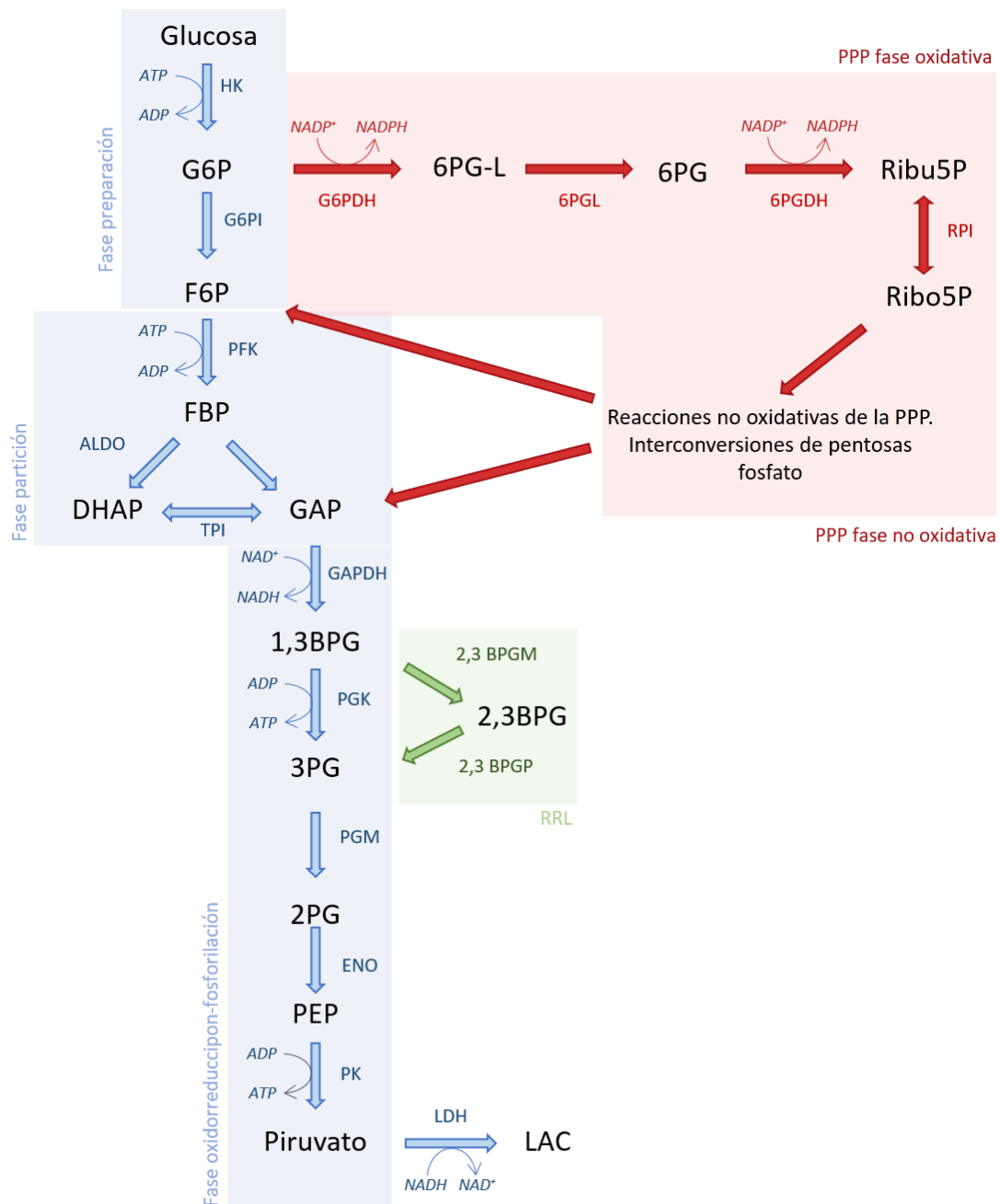


Figura 14. Interacción de las vías metabólicas en el glóbulo rojo. En azul: vía glucolítica, en rojo: vía de las pentosas fosfato (PPP), en verde: vía de Rapoport-Luebering (RRL). El nombre completo de cada componente se encuentra en la lista de abreviaturas.

Estrés oxidativo y sistemas antioxidantes

Fuentes oxidantes del glóbulo rojo

Los glóbulos rojos se encuentran en constante exposición a oxidantes tanto internos, como la autooxidación de hemoglobina debido a su función de transporte de O₂, como externos provenientes de las otras células sanguíneas y el endotelio vascular, principal productor de óxido nítrico (NO•).

Se define como radical libre a la molécula que contiene uno o más electrones desapareados. El oxígeno molecular (O_2) es un birradical ya que contiene dos electrones desapareados, lo que favorece su reducción por transferencia de electrones. Esta reducción univalente del oxígeno a agua produce radicales libres y especies reactivas del oxígeno, comúnmente conocidas como ROS (Figura 15). Las ROS presentan reactividad variable, participando en diferentes procesos, incluidos la señalización celular y los mecanismos de defensas ante patógenos. Adicionalmente, el daño oxidativo de biomoléculas, ADN, proteínas y lípidos, es un componente fundamental en múltiples patologías, además de disparador del envejecimiento celular (Radi, 2018).

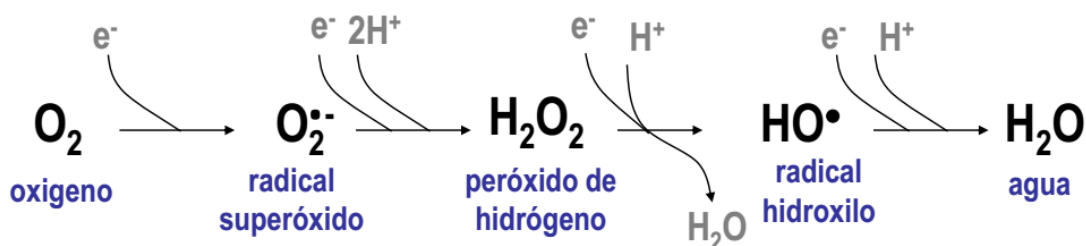


Figura 15. Representación esquemática de la reducción univalente del oxígeno (O_2) a agua (H_2O).

Por otra parte, el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) es una molécula que participa en procesos de señalización, entre los que se incluyen la regulación del tono vascular, de la agregación plaquetaria y la adhesión leucocitaria, además actúa como neurotransmisor. A su vez es un radical libre con capacidad oxidante débil, pero alta reactividad con el anión superóxido para formar peroxinitrito, entre otras especies reactivas del nitrógeno, comúnmente conocidas como RNS (Möller et al., 2019; Radi, 2018). En la Figura 16 se esquematizan las reacciones de formación de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno. El $NO^{\bullet}$ es producto de un conjunto de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS, EC 1.14.13.39) (Stuehr & Haque, 2019), que se expresan de manera constitutiva en el tejido endotelial y nervioso (eNOS o NOS1 y nNOS o NOS3, respectivamente), y como respuesta inflamatoria en las células del sistema inmune (iNOS o NOS2). El $NO^{\bullet}$ puede difundir a través de la membrana de las células, y en los glóbulos rojos reaccionar con la oxihemoglobina para formar metahemoglobina y nitrato (Joshi et al., 2002). En cambio, se sugiere que los eritrocitos podrían liberar ese $NO^{\bullet}$ en la microcirculación en condiciones de hipoxia y favorecer la vasodilatación (Allen et al., 2009).

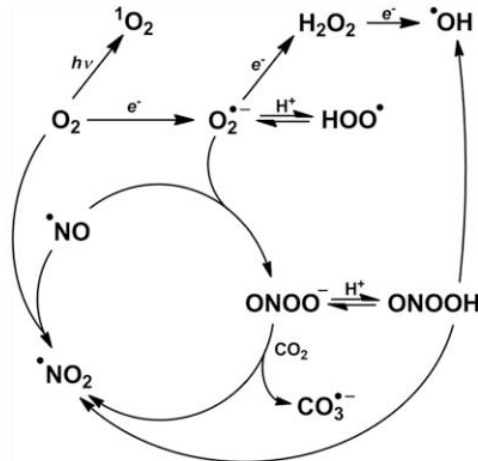


Figura 16. Formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Extraído de (Möller et al., 2019).

A continuación, se mencionan las especies reactivas implicadas en el daño oxidativo de los glóbulos rojos:

- Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Se produce por la reducción de un electrón del O_2 (Figura 16). En los eritrocitos tiene un origen endógeno principal que ocurre durante la autooxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina (Umbreit, 2007). Exógenamente puede ser producido por NADPH oxidasas (NOX2, EC 1.6.3.1) activadas durante los procesos inflamatorios, o por la respiración mitocondrial de leucocitos y células endoteliales. El $O_2^{\bullet-}$ es dismutado a O_2 y H_2O_2 , reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD1, EC 1.15.1.1). A su vez, puede reaccionar con $NO^{\bullet}$ para formar peroxinitrito (Möller et al., 2022).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La producción de H_2O_2 proviene en esencia de la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ y de determinadas oxidasas (Breton-Romero & Lamas, 2014). Esta molécula modula una gran variedad de funciones celulares como proliferación, supervivencia, reclutamiento de plaquetas, entre otras. El H_2O_2 tiene la capacidad de difundir a largas distancias. Recientemente se demostró que puede difundir por la membrana del eritrocito, sin necesidad de transporte facilitado por acuaporinas (Orrico et al., 2022). No es altamente reactivo per se, pero el H_2O_2 puede reaccionar con metales de transición a través de la reacción de Fenton, y producir el radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$), molécula altamente reactiva. En el glóbulo rojo hay una alta concentración de Fe^{2+} en el grupo hemo de la hemoglobina, pero en ciertas condiciones se encuentra libre, lo que hace altamente propicia la formación del radical hidroxilo (Brissot et al., 2018; Wang & Pantopoulos, 2011). Por ello es importante la presencia de una potente capacidad antioxidante capaz de reducir al H_2O_2 . Más adelante se mencionarán los recursos presentes en los eritrocitos para cumplir esta función.

- Radical hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$). Es un radical altamente oxidante y su reactividad es controlada por difusión. Se forma a partir de la reducción de H_2O_2 (Fenton). Dadas estas características, es muy relevante para la célula la descomposición del H_2O_2 para evitar su formación, lo que se logra en el GR gracias a una batería de enzimas que lo descomponen, como veremos más adelante (Möller et al., 2022).
- Peroxinitrito (ONOO^-). El peroxinitrito es una molécula altamente reactiva, y su formación es controlada por difusión a partir de $\text{NO}^\bullet$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Ferrer-Sueta & Radi, 2009). En glóbulos rojos son blanco de reacción la Prx2, enzima antioxidante de abundancia en estas células, y la oxihemoglobina, formando methemoglobina (Manta et al., 2009; Romero et al., 2003).

También se pueden mencionar como oxidantes relevantes en la sangre al dióxido de nitrógeno y al ácido hipocloroso, pero no se profundizarán dada su poca formación e impacto en las condiciones de este trabajo.

Sistemas antioxidantes del glóbulo rojo

Pese a esta fuerte producción de oxidantes y especies reactivas a las que se encuentran expuestos los glóbulos rojos durante su vida, estos poseen una compleja batería de sistemas antioxidantes entre los que se encuentran enzimas y moléculas de bajo peso que contribuyen a prevenir, remover o retardar el daño oxidativo, y mantener el equilibrio redox. A continuación, se describen los sistemas más relevantes presentes en los eritrocitos, pudiendo agruparse en enzimáticos y no enzimáticos:

Enzimáticos:

- Superóxido dismutasa (SOD EC 1.15.1.1). Como ya fue mencionado, la SOD cataliza la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a O_2 y H_2O_2 . Es una reacción que ocurre de manera espontánea, pero es acelerada por la enzima siendo el principal mecanismo de dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$. En el glóbulo rojo se encuentra presente la isoforma SOD1 (dismutasa de cobre y zinc). Es una proteína homodimérica presente en el glóbulo rojo en concentración $4\text{ }\mu\text{M}$ aproximadamente (Gleitzmann et al., 2016; McCord & Fridovich, 1969).
- Peroxirredoxinas (Prx EC 1.11.1.15). Son una familia de peroxidasas que catalizan la reducción del H_2O_2 y otros hidroperóxidos. Se encuentran presentes en todas las células, siendo las isoformas Prx1, Prx2 y Prx6 las presentes en los glóbulos rojos. La Prx2 es la peroxidasa más abundante, encontrándose en concentraciones aproximadas de $300\text{ }\mu\text{M}$, representando la tercera proteína más abundante del citosol eritrocitario (Bryk & Wiśniewski, 2017). El sitio activo está formado por dos subunidades de la proteína, que

contribuyen cada una con una cisteína altamente reactiva (peroxidática), que en su estado oxidado forman un enlace disulfuro intermolecular con otra cisteína de la subunidad vecina (resolutiva). La reducción de la enzima está a cargo del sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Trx/TR), que obtiene equivalentes reductores a partir del NADPH. En el glóbulo rojo la Prx2 se encuentra mayormente reducida, pero bajos niveles de NADPH, como en las deficiencias de G6PDH, pueden afectar su potencial antioxidante (Cheah et al., 2014). Una porción de Prx2 se encuentra unida a la membrana del glóbulo rojo, asociada al dominio citoplasmático de la banda 3, siendo esto un marcador de estrés oxidativo de la célula (Mullen et al., 2015).

- Tiorredoxina (Trx). Es una proteína pequeña (12 kDa). En los eritrocitos está presente la isoforma Trx1, y actúa como dador de electrones de enzimas como la Prx2. Trx vuelve a su estado reducido mediante la tiorredoxina reductasa y NADPH como cosustrato, formando el sistema Trx/TR.
- Tiorredoxina reductasa (TR, EC 1.8.1.9). Es una oxidorreductasa que contiene selenocisteína. Sus sustratos incluyen, aparte de la Trx, a las glutarredoxinas. Tiene un sitio de unión a FAD y a NADPH, quien aporta los equivalentes reductores (Zhong et al., 2000).
- Catalasa (EC 1.11.1.6). Es una enzima tetramérica, y cada subunidad contiene un grupo hemo fuertemente unido. Catalizan la descomposición de H_2O_2 en O_2 y agua. A priori, el poder reductor de la catalasa no proviene del NADPH que se encuentra fuertemente unido a la enzima, pero se propone que tiene efecto protector al impedir la inactivación de la catalasa por el H_2O_2 (Kirkman et al., 1999). La catalasa representa la segunda vía de consumo de H_2O_2 en los glóbulos rojos, luego de la Prx2 (Orrico et al., 2018).
- Glutación peroxidasa (Gpx EC 1.11.1.9). Es una enzima dependiente de tiol. Existen descritas 8 isoformas, estando presentes en el glóbulo rojo la Gpx1 y Gpx4, siendo la primera la más abundante (Bryk & Wiśniewski, 2017). El mantenimiento del estado reducido de la enzima involucra al GSH, glutación reductasa y, en definitiva, al NADPH. Gpx1 tiene como principal sustrato el H_2O_2 e hidroperóxidos pequeños, mientras que Gpx4 actúa sobre moléculas más grandes como hidroperóxidos de fosfolípidos de membrana (Flohé et al., 2011).
- Glutación reductasa (EC 1.6.4.2). Es una flavoenzima encargada de catalizar la transformación del disulfuro de glutación (GSSG) en glutación reducido (GSH) a expensas de NADPH. El GSH es un importante antioxidante de la célula, como se mencionará más adelante. Glutación reductasa en el eritrocito se encuentra principalmente en estado reducido dada la alta concentración de NADPH (Worthington & Rosemeyer, 1976).

- Glutarredoxinas (Grx EC 1.20.4.1). Son enzimas ubicuas que catalizan las reacciones de formación y reducción de enlaces disulfuros entre tioles de proteínas y GSH (CH, 2008). Por lo tanto, su poder antioxidante proviene de la molécula de GSH. En el glóbulo rojo se encuentra presente la isoforma Grx1, y es esencial para el equilibrio redox de proteínas que contienen grupos tiol (Terada et al., 1992).

No enzimáticos:

- Glutación (GSH). Es un tripéptido formado por ácido γ -glutámico, cisteína y glicina, y representa el antioxidante de bajo peso molecular más importante de las células. Es un tiol no proteico de suma importancia en la señalización redox. En los glóbulos rojos la concentración del glutación es cercana a los 3 mM, con una proporción 10 a 1 con respecto a la especie oxidada (GSSG). La biosíntesis intracelular está regulada por la disponibilidad de cisteína, y de la actividad de las enzimas que catalizan la síntesis del tripéptido (glutamato-cisteína ligasa y glutación sintetasa), ambas dependientes de ATP (Amen et al., 2017; Lu, 2013; Xiong et al., 2018). El glóbulo rojo produce GSH de novo y, a su vez el GSH es regenerado por la enzima glutación reductasa, como se mencionó anteriormente. Su reducción es la llave del poder antioxidante de los sistemas Grx y Gpx en el eritrocito.
- Ascorbato (vitamina C, AsCH). No puede ser sintetizado y es incorporado en la dieta. En la célula actúa como dador de electrones para formar el radical ascorbilo o el deshidroascorbato (DHA). Reduce radicales del citosol y al α -tocoferol en la membrana plasmática (Padayatty & Levine, 2016). Es incorporado al eritrocito como DHA por Glut1 y es reducido a ascorbato por Grx (Montel-Hagen et al., 2008).
- α -tocoferol (vitamina E). Es considerado el principal antioxidante de lípidos de membrana, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados (Traber & Atkinson, 2007). La formación del radical tocoferoxilo es producto de la acción antioxidante de la membrana y es reducido nuevamente a α -tocoferol por el ascorbato mediante la oxidación a radical ascorbilo (Niki, 1987).
- Ácido úrico. Representa el compuesto final del catabolismo de las purinas, producto de la enzima xantina oxidasa (XO, EC 1.17.3.2). El ácido úrico tiene la capacidad de reaccionar con los radicales peroxilo e hidroxilo. Si bien el glóbulo rojo no presenta XO, se encuentra expuesto a altas concentraciones de ácido úrico presente en el plasma (Wayner et al., 1987). En glóbulos rojos almacenados para transfusión de donantes con mayores niveles de ácido úrico se vieron menos lesiones de almacenamiento (Tzounakas et al., 2015).

En la figura 17 se esquematizan las interacciones entre oxidantes y antioxidantes en el glóbulo rojo descritas hasta el momento.

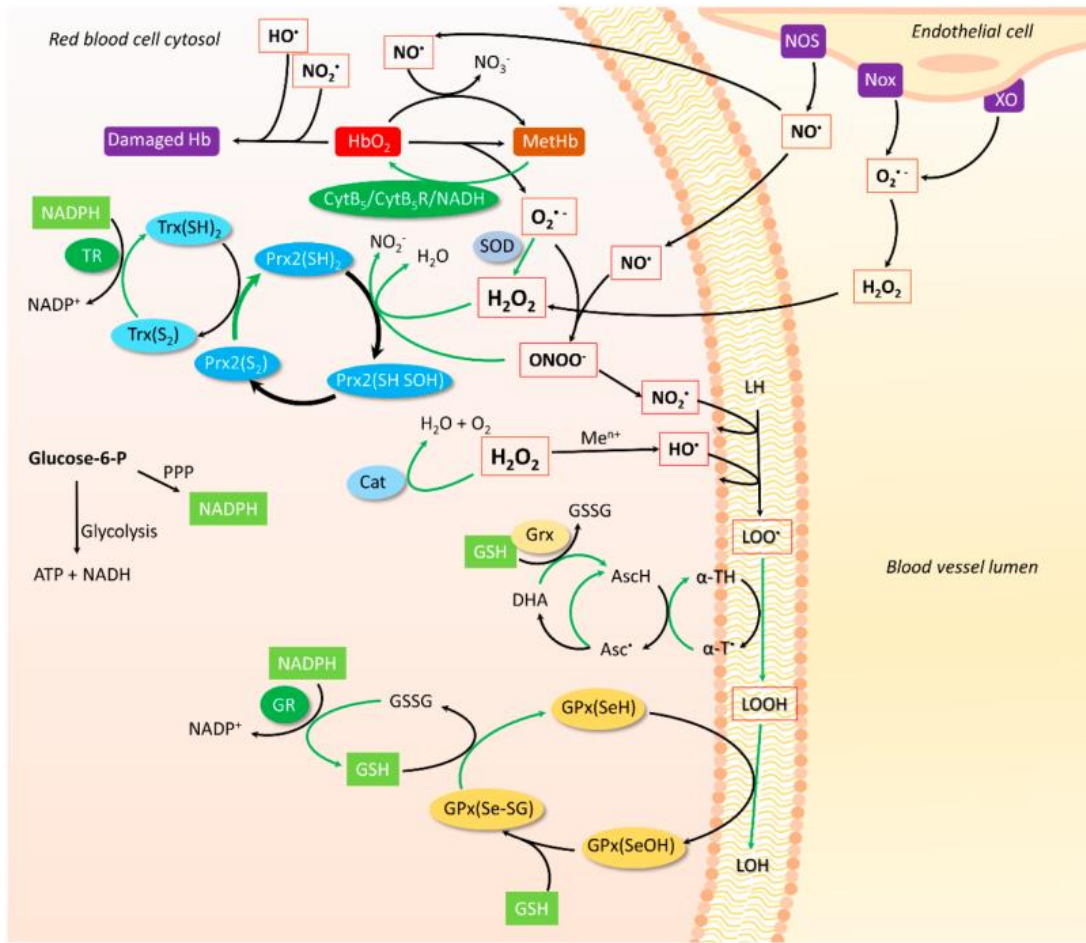


Figura 17. Representación esquemática de las principales reacciones redox en el glóbulo rojo. Extraído de (Möller et al., 2022).

Transfusión

Las transfusiones de sangre obtenida de donantes heterólogos (y procesada como se explicará más adelante), especialmente las de unidades de sangre desplasmatizada (SD), son la principal herramienta terapéutica en la actualidad para el tratamiento de diferentes tipos de anemias, y por consiguiente la restauración del correcto transporte de oxígeno a los tejidos.

En nuestro país, el primer registro escrito que se obtiene de realización de una transfusión de sangre se remonta al año 1877, y desde ese momento la obtención, producción y aplicación de hemoderivados ha ido en constante avance (Decaro J, 2010).

En la actualidad, la transfusión de SD está indicada con la finalidad de aumentar el transporte de oxígeno al corazón y los tejidos, capacidad disminuida como consecuencia de la anemia, definida según la OMS como valores de hemoglobina en sangre menores a 13 g/dl en varones mayores de 15 años y 12 g/dl en mujeres mayores de 15 años no embarazadas (VMNIS, 2007). Esta puede tener diferente etiología: quirúrgica, médica, traumática, entre otros. No obstante, no todos los individuos con valores de hemoglobina en sangre menores a los normales requerirán una transfusión de sangre, y se tienen en cuenta múltiples parámetros que definen la indicación: enfermedades previas, tratamientos, sintomatología clínica, condiciones de vida, etc. (Contreras, 2009). En este sentido, la Sociedad Española de Transfusión sanguínea y Terapia celular (SETS) no recomienda la transfusión de SD en pacientes asintomáticos y hemodinámicamente estables en unidades de cuidados intensivos (UCI) con valores de hemoglobina superiores a 7-8 g/dl (Arbona Castaño et al., 2015).

Las unidades de SD provienen principalmente de donantes voluntarios sanos, de entre 18 y 65 años de edad que cumplen con las condiciones para realizar la donación tanto físicas, paraclínicas, de estilos de vida, etc. (Salud, 2001). A estos donantes se les extrae un volumen aproximado de 450 ml de sangre total, la cual es procesada y fraccionada en diferentes hemocomponentes, principalmente SD, concentrados plaquetarios y plasma fresco. La SD mezclada con anticoagulante y solución aditiva es almacenada hasta 42 días a 4°C, el plasma fresco es congelado y conservado durante un año, mientras que el concentrado plaquetario se almacena a temperatura ambiente durante 5 días.

Una vez realizada la correcta indicación de SD, se realizan análisis pretransfusionales (tipificación de grupo sanguíneo ABO y Rh, y estudio serológico de enfermedades transmisibles) que garantizan la inocuidad para el paciente que recibe la transfusión. La SD es infundida al paciente utilizando un equipo estéril que incluya un filtro de 170-260 µm con el fin de retener pequeños coágulos, fibrina y macropartículas que puedan generar un daño al receptor. El componente es

administrado utilizando un acceso venoso (periférico o central) a una velocidad de infusión relativa de hasta 5-10 ml/kg/hora y no debiendo superar las 4 horas totales ya que aumenta el riesgo de contaminación bacteriana (Contreras, 2009). La transfusión óptima es aquella en que el 75% de los glóbulos rojos sobreviven por 24 horas en el receptor y aumenta la concentración de hemoglobina en 1 g/dl (Klein et al., 2007).

Leucorreducción

La *American Association of Blood Banks* (AABB) define a la leucorreducción como el procedimiento aplicado a unidades de SD con un recuento final de leucocitos remanentes menor a 5×10^6 por unidad para los estándares estadounidenses y un recuento menor a 1×10^6 por unidad para los estándares europeos (Medicines, 2020). Existen diferentes métodos de leucorreducción, siendo el más utilizado en nuestro país y el mundo el filtro leucorreductor, también utilizado en este trabajo. De esta manera el fabricante garantiza un recuento de leucocitos residuales menor a 2×10^5 de media en los productos finales (<https://www.medicaexpo.es/prod/terumo-bct/product-75244-850060.html>).

Según la Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología existen 2 tipos de leucorreducción: selectiva (LRS) y universal (LRU). La primera es aquella que se aplica a la SD seleccionada únicamente por indicaciones específicas según las características y patología del receptor, mientras que la segunda es la que se aplica de manera universal a todas las unidades de SD obtenidas en el banco de sangre (Inmunohematología, 2007).

En nuestro país se aplica la leucorreducción selectiva, indicada en pacientes que tienen antecedentes de reacciones febriles no hemolíticas transfusionales (RFNHT), en neonatos con un peso menor a los 1200 gr con el fin de disminuir el riesgo de citomegalovirus (Salud, 2001) y en pacientes con diferentes patologías hematológicas y trasplantados, propensos a generar una respuesta inmune frente a la exposición de antígenos HLA presentes en los leucocitos remanentes del donante (Dzik & Szczepiorkowski, 2007; Inmunohematología, 2007).

Como se mencionará en la siguiente sección, los glóbulos rojos almacenados sufren alteraciones estructurales, rotura de la membrana plasmática y liberación de micro vesículas. Estas alteraciones podrían inducir una respuesta de tipo inflamatoria actuando como patrones moleculares asociados al daño (DAMP) en los leucocitos remanentes. De esta manera, se ve un aumento de marcadores inflamatorios como IL-6, IL-8, TNF-alfa en unidades no leucorreducidas frente a unidades leucorreducidas (Shukla et al., 2015). En el mismo sentido, un reciente estudio de proteómica mostró diferencias en la composición de membrana de las micro vesículas liberadas entre los glóbulos rojos almacenados de unidades de SD leucorreducidas y los glóbulos

rojos de unidades no leucorreducidas, teniendo estas últimas un patrón proinflamatorio (Tzounakas et al., 2021).

Lesiones por almacenamiento

Como se mencionó anteriormente, la SD se obtiene a partir de donantes de sangre voluntarios a los que se les extrae un volumen de sangre total de 450 ± 50 ml y es mezclada en ese mismo procedimiento con 63 ml de solución anticoagulante compuesta por ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato de sodio monobásico y glucosa (dextrosa) (CPD). Luego de separados los glóbulos rojos del resto de los componentes de la sangre son mezclados con una solución conservadora que contiene NaCl, glucosa, manitol y adenina. La SD es almacenada a 4 ± 2 °C hasta 42 días, disponible para su uso terapéutico.

No obstante, durante la conservación, y pese a la adición de soluciones ricas en nutrientes, los glóbulos rojos sufren un progresivo deterioro que incluye alteraciones del metabolismo energético, alteraciones de la membrana celular y el citoesqueleto (en consecuencia, su deformabilidad), alteración de pH y transporte de iones, entre otras (D'Alessandro et al., 2015). A este conjunto de modificaciones se las denomina “lesiones por almacenamiento”. Estas lesiones se asocian con peores resultados terapéuticos, mayor morbilidad y mortalidad, riesgos de disfunción orgánica, infecciones, menor recuperación de eritrocitos post transfusión, entre otras complicaciones (Ng et al., 2015; Obrador et al., 2015).

Se ha reportado que durante el almacenamiento hay una disminución de la actividad glucolítica, con una consecuente disminución en las concentraciones de ATP. Esta privación de energía altera los mecanismos ATP dependientes, como el intercambio iónico que mantienen las concentraciones de calcio intracelular, así como la actividad de enzimas como la flipasa, encargada de mantener la distribución asimétrica de los lípidos de la membrana, principalmente el transporte transversal de la fosfatidilserina a la monocapa interna (Bennett-Guerrero et al., 2007).

Asimismo, hay una notoria depleción de la glucosa (70% aproximadamente, al día 42 de almacenamiento) en el medio de suspensión bien documentada en la literatura (D'Alessandro et al., 2015) y confirmada en el contexto de experimentos vinculados al presente proyecto (Figura S1), que podría contribuir a la disminución de la actividad glucolítica y limitar la generación de ATP.

El ácido cítrico presente en el anticoagulante junto con la producción de ácido láctico, contribuyen a una disminución del pH que afecta todo el metabolismo eritrocitario, por ejemplo,

disminuyendo la actividad de las enzimas glucolíticas y desfavoreciendo la producción de ATP. Sin embargo, la adición de la solución preservadora neutraliza esta acidificación al principio del almacenamiento.

A su vez se observan cambios en la composición del sobrenadante obtenido: hay aumento del potasio y hemoglobina libre, consecuencia de la hemólisis (Koch et al., 2019).

Hipótesis

El deterioro paulatino de los glóbulos rojos durante el almacenamiento en el banco de sangre se debe, en parte, a la inactivación por modificaciones oxidativas de enzimas que integran las vías claves para su subsistencia y que involucran el metabolismo de la glucosa y, en consecuencia, la generación de ATP y la reducción del NADP⁺. Estas alteraciones pueden prevenirse al menos parcialmente mediante la remoción de los glóbulos blancos de la bolsa de transfusión (leucorreducción).

Objetivos

General

Analizar la repercusión del almacenamiento sobre el metabolismo de glóbulos rojos, comparando preparados leucorreducidos y no leucorreducidos, y comparar con el efecto del oxidante peróxido de hidrógeno.

Específicos

1. Determinar la evolución de las concentraciones de ATP en unidades de SD leucorreducida y no leucorreducida, durante el almacenamiento en condiciones de banco de sangre.
2. Cuantificar NADPH y NADP⁺ en unidades de SD leucorreducida y no leucorreducida almacenadas en condiciones de banco de sangre.
3. Determinar la actividad de G6PDH en unidades de SD leucorreducida y no leucorreducida almacenadas en condiciones de banco de sangre.
4. Estudiar el efecto del peróxido de hidrógeno en el ATP de GR.

Materiales y métodos

Equipamiento y reactivos

Los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos en Applichen, GE Healthcare y Sigma Aldrich. Excepto que se indique lo contrario, todas las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary 50 (Agilent, Estados Unidos). Los equipos utilizados fueron: centrifuga refrigerada de sobremesa Sigma 2-16KL (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Alemania), filtros Spin UFC5101 Milipore® Amicon Ultra-0.5 10 kDa, HPLC Agilent Infinity 1260, y lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific, Finland).

Para la mayoría de los experimentos se utilizaron los amortiguadores *Hank's balanced salt solution* (HBSS) compuesto de CaCl_2 1.27 mM, KCl 5.36 mM, KH_2PO_4 0.44 mM, MgSO_4 0.81 mM, NaCl 136.89 mM, NaH_2PO_4 0.65 mM, glucosa 5.55 mM, NaHCO_3 4.17 mM; y *phosphate buffered saline* (PBS) compuesto de 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 1.8 mM, KH_2PO_4 pH 7.3. Para la preparación de las soluciones se usó agua ultrapura (mQ) obtenida con un equipo de ósmosis inversa Milli-Q Biocel (Millipore Corp.).

Obtención de las muestras

Las unidades de sangre se obtuvieron de donantes de sangre voluntarios de sexo masculino de entre 18 y 45 años de edad, del Hospital de Clínicas. Los donantes fueron oportunamente informados previo a la firma de un consentimiento. El protocolo de investigación del proyecto fue aprobado por el comité de ética del Hospital de Clínicas y se ajusta a los principios éticos de la Declaración de Helsinki (Association, 2001).

En el proyecto original se proponía el reclutamiento de al menos 10 donantes para realizar los experimentos. Esto se vio dificultado por diversos factores, principalmente la situación sanitaria mundial en el contexto de la pandemia por el COVID-19, limitando el número de donantes del Hospital de Clínicas.

El proceso de obtención de SD fue el estándar utilizado en Banco de Sangre, bajo las normas de bioseguridad correspondientes. La sangre total (ST) de los donantes se recolectó en una bolsa TERUMO (Terumo Corporation, Tokio, Japón) triple que contiene una solución anticoagulante de ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato de sodio monobásico y dextrosa (CPD) en agitación continua. Posteriormente se sometió a las unidades a una fuerza centrífuga utilizando una centrífuga Roto Silenta 630 RS (Hettich, Alemania) que separó las fracciones correspondientes al concentrado de glóbulos rojos o SD del plasma rico en plaquetas (PRP). Los glóbulos rojos se mezclaron con una solución aditiva preservadora que contiene NaCl, dextrosa, manitol y adenina, y se almacenaron a 4°C (Figura 18).

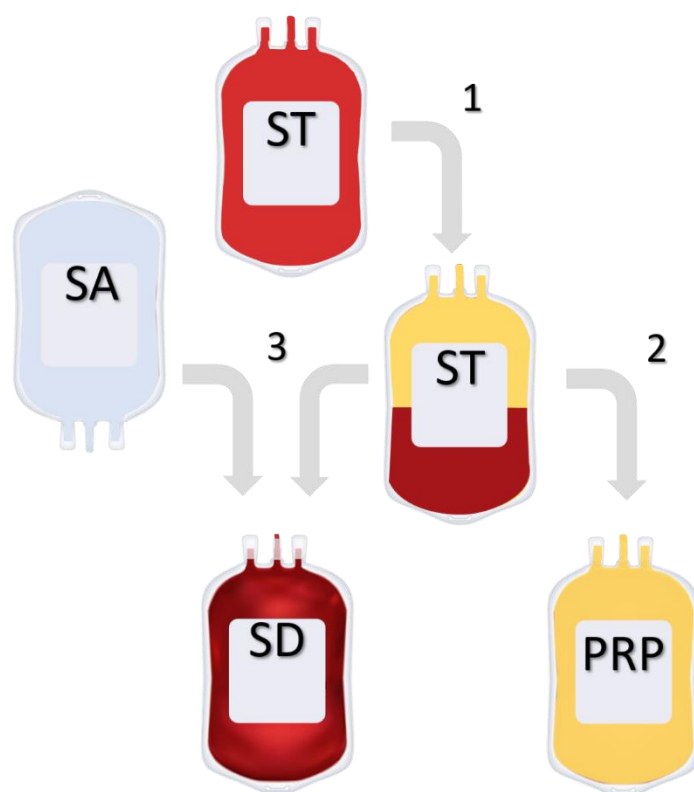


Figura 18. Fraccionamiento de la sangre total (ST) luego de la extracción al donante. La ST se sometió a una fuerza centrífuga de 2000 rpm durante 9 minutos a 20°C (1) que separó los componentes de la sangre según su densidad. Posteriormente se fraccionaron los dos principales elementos obtenidos en diferentes unidades: PRP (2), y SD (3). A esta última se le agregó la solución aditiva conservadora (SA), obteniendo el producto con el que trabajamos.

Una vez obtenidos los resultados negativos de serología para enfermedades infecciosas, se procesaron las unidades de SD según se muestra en el esquema (Figura 19) bajo estrictas condiciones de esterilidad utilizando cámara de flujo laminar, para obtener unidades no leucorreducidas (NLR) y leucorreducidas (LR), que fueron analizadas en los días 1, 7, 14, 21 y 42 de almacenamiento. El filtro leucorreductor utilizado fue IMUGARD III RC (Terumo Corporation, Tokio, Japón).

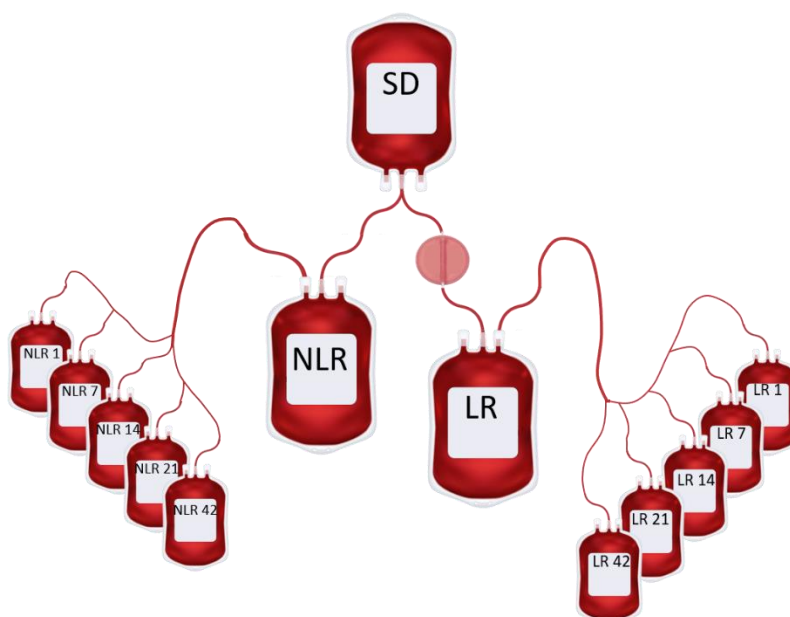


Figura 19. Procesamiento de las unidades de SD. Se fraccionaron inicialmente en dos muestras, una de ellas se pasó por filtros de leucorreducción (LR) y la otra permaneció sin filtrar (NLR). Cada una de estas unidades se fraccionó en bolsas pediátricas para ser conservadas a 4°C para su uso en los días 1, 7, 14, 21 y 42 de almacenamiento.

Al día correspondiente se extrajeron varias alícuotas de 2 mL de la bolsa y se centrifugaron a 900 g por 5 minutos para sedimentar las células. Se extrajo el sobrenadante para otros análisis y al pellet celular se lo suspendió en PBS y se lavó por centrifugación 3 veces. Finalmente, se agregaron inhibidores de proteasa, mezclando con cuidado y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

Para algunos ensayos se utilizó sangre fresca. Para ello se tomó una muestra de 3 ml por venoclisis de un donante voluntario y se mezcló en un tubo que contenía una solución anticoagulante EDTA. Se centrifugó 900 g por 5 minutos para separar los glóbulos rojos del plasma. Según el caso, se lavaron los GR con PBS y HBSS por resuspensión y centrifugación a 900 g por 5 minutos.

Análisis de metabolitos por HPLC

Para la determinación de ATP, ADP, NADPH, NADP⁺, NADH y NAD⁺ se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de acuerdo al método presentado por Stocchi y colaboradores (Stocchi et al., 1985). Se utilizó un HPLC Agilent Infinity 1260 equipado con bomba cuaternaria, detector de absorbancia con arreglo de diodos y detector de fluorescencia. Se utilizó una columna C-18 Ascentis de 10 cm, 4.6 mm, 3 µm. Las fases móviles de los amortiguadores empleados fueron: KH₂PO₄ 0.1 M pH 6.5 (fase móvil A) se ajustó el pH utilizando KOH 5 M, KH₂PO₄ 0.1 M pH 6.5 con 10% metanol v/v (fase móvil B). Ambas soluciones se filtraron para evitar obstrucciones en la columna por impurezas. Se puso a punto la técnica y se optó por utilizar los siguientes gradientes:

1. 4 minutos de 100% A, 5 minutos hasta 25% B, 4 minutos hasta 90% B, 2 minutos hasta 100% B, 4 minutos mantenido 100% B, 1 minuto hasta 0% B y mantenido por 4 minutos hasta el equilibrio del sistema. El flujo utilizado fue de 1 mL/min. (*Método HPLC 1*)
2. 5 minutos de 100% A, 3 minutos hasta 100% B, 1 manteniendo 100% B, 1 minuto hasta 0% B y mantenido por 5 minutos hasta el equilibrio del sistema. El flujo utilizado fue de 0.8 mL/min (este fue el método finalmente seleccionado). (*Método HPLC para metabolitos 2*)

Para el lavado de GR se utilizó HBSS y PBS. Se prepararon los estándares de ATP, NADPH, NADH y NAD⁺ a una concentración de 10 mM en agua mQ.

Se midió absorbancia a 254 y 340 nm y fluorescencia a 340/470 nm. Se inyectaron 10 µL de concentraciones conocidas de ATP, NADPH, NADH y NAD⁺ (200 µM, 100 µM, 500 µM y 500 µM, respectivamente).

Procesamiento de las muestras frescas y almacenadas para determinación de metabolitos por HPLC

Se ensayaron diferentes métodos para extraer los nucleótidos, incluyendo lavar los GR con NaCl 0.15 M, PBS o HBSS, y lisar los glóbulos rojos con agua destilada, NaOH o KOH. Se reportaron los resultados obtenidos con el método de extracción basado en el trabajo de Stocchi y col., detallado a continuación.

Se tomaron 400 µL concentrado de GR frescos previamente lavados con PBS y se le agregaron 400 µL KOH 0.5 M. Se mezcló la muestra con vórtex. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g por 5 minutos. Del sobrenadante se tomaron 200 µL y se mezclaron con 400 µL de H₂O ultrapura fría. Se tomaron 500 µL de la mezcla y se filtraron utilizando un filtro Spin X 10 kDa MWCO

mediante centrifugación a 14.000 g por 40 minutos a 4°C. Del filtrado obtenido se tomaron 200 µL y se mezclaron con 20 µL de KH_2PO_4 1 M pH 6.5. De la mezcla final obtenida se inyectaron 20 µL.

Para las muestras almacenadas, se procedió de manera muy similar. De cada muestra guardada a -80°C, correspondiente a diferentes días de almacenamiento (1, 7, 14, 21 y 42) y en cada una de las condiciones (NLR y LR) se tomaron 400 µL del pellet de glóbulos rojos (paquete globular), con un hematocrito (proporción del volumen total de la sangre correspondiente al volumen eritrocitario) aproximado de 100%, y se mezclaron con 400 µL de KOH 0.5 M frío. Todo el procesamiento desde este punto se realizó en frío y de igual manera que las muestras de GR frescos.

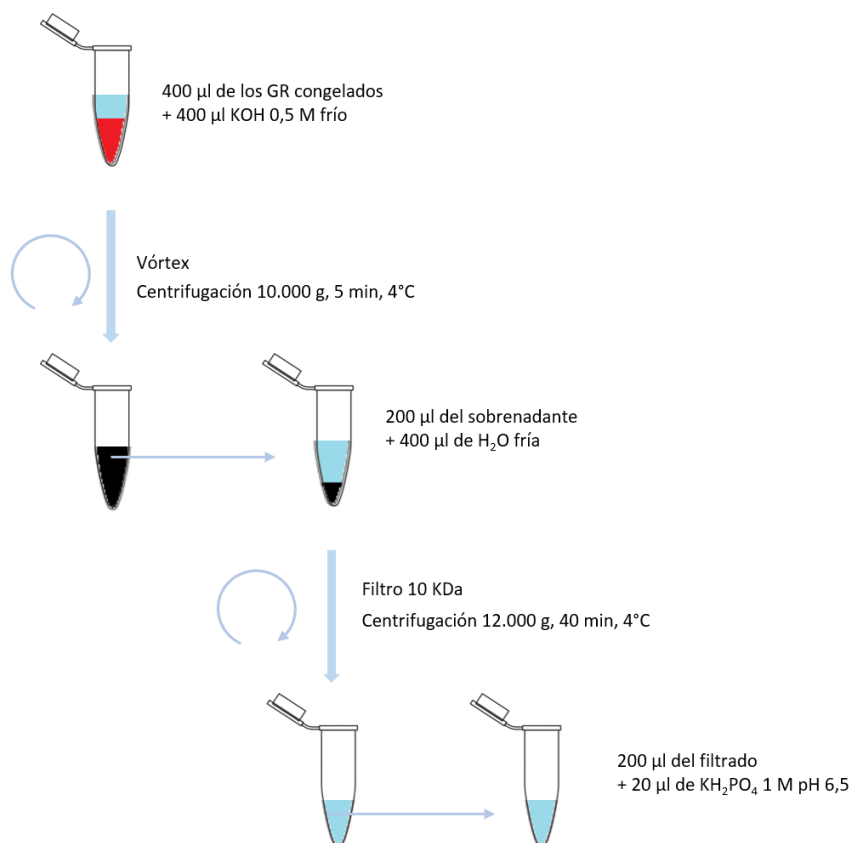


Figura 20. Procesamiento de la muestra de glóbulos rojos congelados para cuantificación de ATP por HPLC. Se lisaron las células con KOH, se filtraron y resuspendió el lisado en buffer KH₂PO₄ 1 M pH 6.5.

Cuantificación de ATP por HPLC

La cuantificación se realizó utilizando HPLC y el *método HPLC para metabolitos 2*.

De los cromatogramas obtenidos se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) en el tiempo de retención (TR) correspondiente al ATP y se realizaron los cálculos para obtener la concentración medida.

Ciclado enzimático – NADPH

En primer lugar, se intentó cuantificar con un kit comercial (Sigma-Aldrich MAK312), pero luego de una serie de pruebas se consumieron prácticamente todos los reactivos del kit. Teniendo en cuenta esto, se optimizó el método de ciclado enzimático *in house* basado en (Zerez et al., 1987) y (Nisselbaum & Green, 1969). Este método se basa en el seguimiento de una serie de reacciones enzimáticas de óxido-reducción como se muestra en la Figura 21. Si bien este método no distingue entre NADPH y NADP⁺, se puede diferenciar el nucleótido en estado reducido del total preincubando la muestra a 60°C durante 30 minutos y de esta manera hidrolizar NADP⁺. Por lo tanto, se cuantificará NADPH cuando la muestra es tratada con calor y NADPH + NADP⁺ (NADP total) cuando no es tratada.

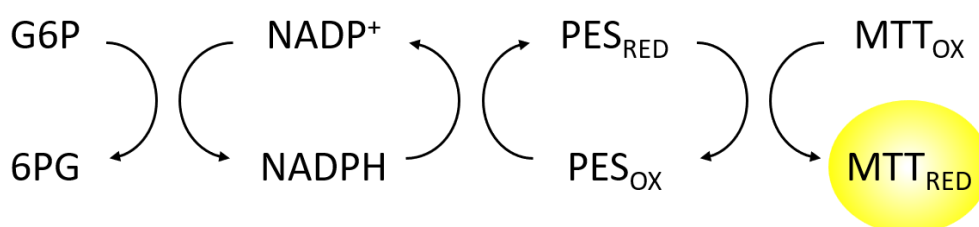


Figura 21. Esquema de reacción de ciclado enzimático. La glucosa 6 fosfato (G6P) se convierte en 6 fosfogluconato (6PG) por la acción de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y reduce el NADP⁺ a NADPH. El NADPH producido es nuevamente oxidado por el etosulfato de fenazina (PES) ox, y se forma PES red, que se utiliza para la reducción de azul de tiazolio (MTT), que genera un producto que absorbe luz a 570 nm (MTT red). La velocidad de formación del MTT reducido a tiempos iniciales es proporcional a la concentración de NADP⁺ y/o NADPH en la muestra.

Se utilizaron dos formas de realizar la extracción de NADPH y NADP⁺, referidos abajo como *Método de extracción de NADPH 1* y *Método de extracción de NADPH 2*.

Método de extracción de NADPH 1

Al momento de realizar las medidas se tomaron 40 µL del paquete globular (aprox. 100% de hematocrito) y se le agregaron 960 µL de buffer de extracción (BE) que contenía nicotinamida 10 mM, bicarbonato de sodio 20 mM y carbonato de sodio 100 mM. Se mezcló la muestra con vórtex. Posteriormente se congeló a -80°C durante 10 minutos, y se descongeló a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 10.000 g por 5 minutos, y del sobrenadante se filtraron 500 µL en un filtro Spin X 10 kDa MWCO (GE Healthcare) a una velocidad de centrifugación de 13.000 g por 15 minutos. A su vez, del anterior sobrenadante se tomaron 100 µL para preparar una dilución 1/10 para medir concentración de hemoglobina por absorbancia a 577 nm.

Del filtrado obtenido se tomaron 200 µL que se llevaron durante 30 minutos a 60°C para eliminar el NADP⁺ y se los rotuló como reducido ("RED"). El resto del filtrado se conservó a 0°C con el

rótulo “TOTAL”. De cada una de las muestras se separaron 100 µL a los que se les agregó 10 µL de HCl 1 M para neutralizar el pH alcalino del buffer de extracción (Figura 22).

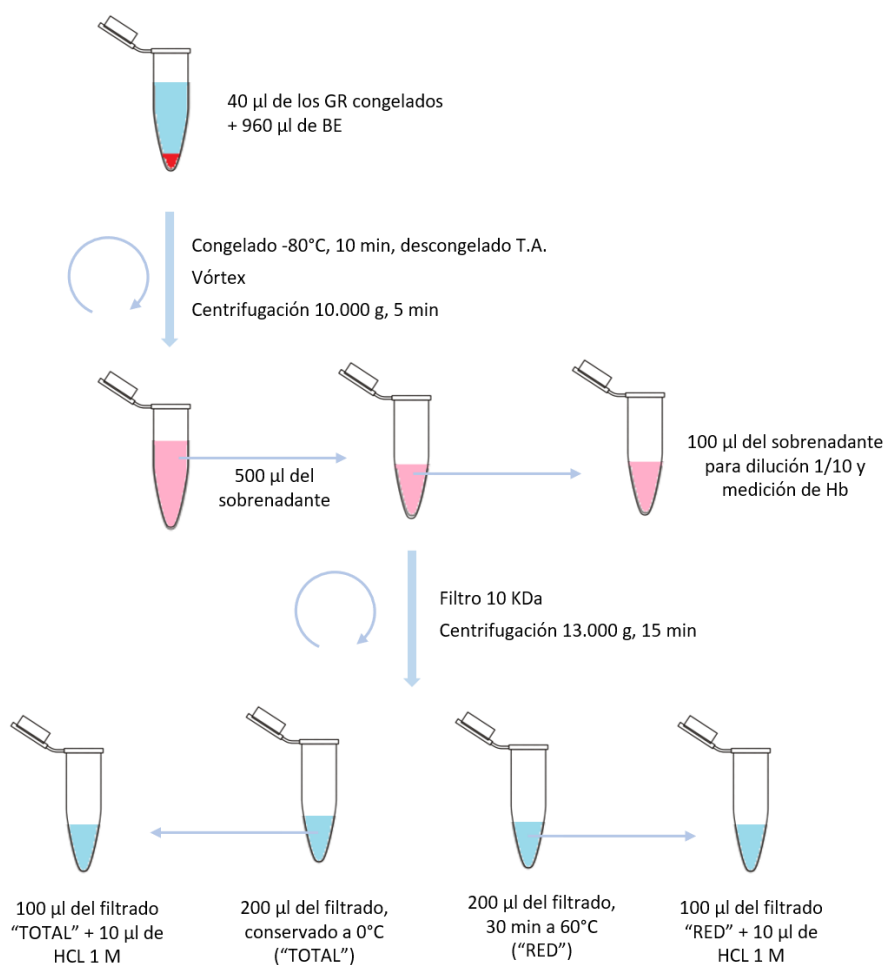


Figura 22. Procesamiento de la muestra de acuerdo al *Método de extracción de NADPH 1* para cuantificación de NADPH y NADP⁺.

Método de extracción de NADPH 2

Al momento de realizar las mediciones se tomaron 10 µL del paquete globular (aprox. 100% de hematocrito) y se le agregaron 1990 µL de buffer de extracción (BE) que contenía nicotinamida 10 mM, bicarbonato de sodio 20 mM y carbonato de sodio 100 mM. Se vortexeó la mezcla. Posteriormente se congeló a -80°C durante 10 minutos, y se descongeló a temperatura ambiente. Del sobrenadante se tomó una muestra y se realizó una dilución 1/200 para medir concentración de hemoglobina por absorbancia a 570 nm.

Del lisado obtenido se tomaron 200 µL que se llevaron durante 30 minutos a 60°C para eliminar el NADP⁺ (Zerez et al., 1987) y se los rotuló “c/tto”. El resto del filtrado se conservó a 0°C con el rótulo “s/tto” (Figura 23).

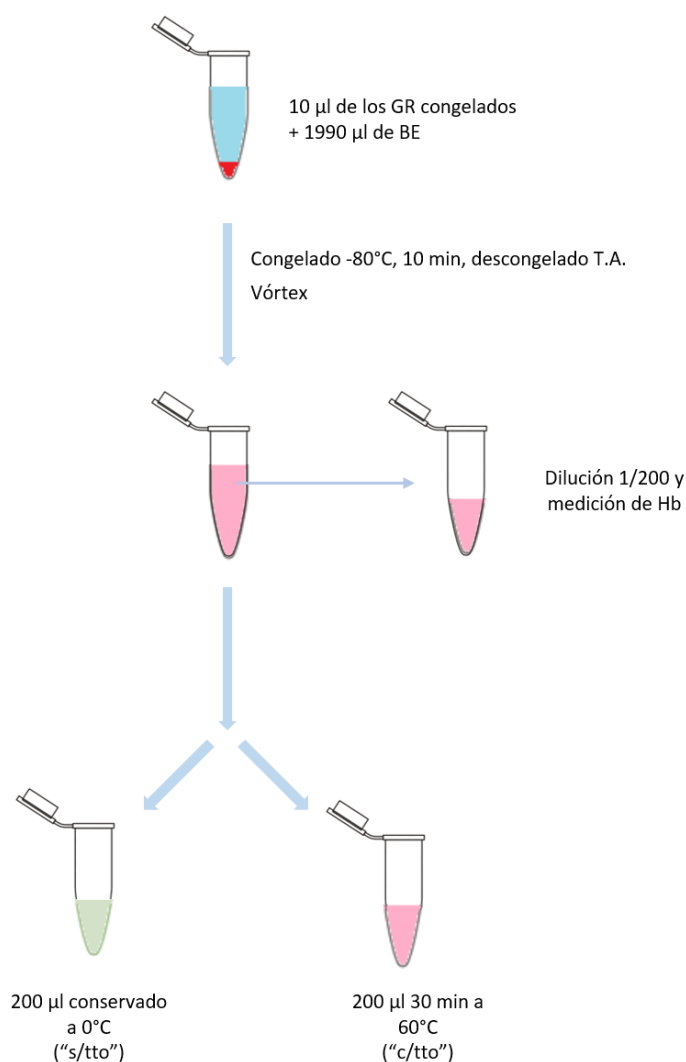


Figura 23. Procesamiento de la muestra de acuerdo al *Método de extracción de NADPH 2* para cuantificación de NADPH y NADP⁺.

Cuantificación de NADPH

La cuantificación se realizó en el lector de placas Varioskan Flash (Termo Scientific, Finland), utilizando una placa de 384 pocillos. Se utilizó una mezcla de reacción que contenía TRIS 100 mM pH 8, EDTA 5 µM, etosulfato de fenazina (PES) 2 mM, glucosa 6 fosfato (G6P) 1 mM, azul de tiazolio (MTT) 0.5 mM, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) 1.3 U/ml (durante la preparación, tanto el PES como el MTT y la mezcla final se mantuvieron protegidos de la luz). Se utilizó un stock de NADP⁺ 10 mM. Se dispensaron 7.5 µL de la muestra y luego 50 µL de la mezcla de reacción. Posterior a una agitación de 20 segundos se midió la cinética de reducción de MTT a 570 nm durante 15 minutos y medidas cada 30 segundos.

En cada ensayo se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de NADP⁺ y se utilizó para cuantificar las concentraciones de las muestras. Las curvas de calibración se realizaron a partir de una dilución de un stock de 10 mM de NADP⁺, y se prepararon

concentraciones conocidas entre 8 y 400 nM. Luego se ajustaron estos valores a la concentración real del NADP^+ obtenida a partir de una medida de absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro utilizando $\epsilon_{260} = 18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Cada punto se hizo por duplicado.

Se realizaron los gráficos de Abs_{570} vs tiempo correspondientes para cada concentración y se tomaron las velocidades iniciales (entre 200 y 600 s). Posteriormente se graficaron las velocidades iniciales vs $[\text{NADP}^+]$, y se ajustó el gráfico a una recta.

$$\text{Velocidad inicial} = \text{pendiente} \times [\text{NADP}^+] + 0.0$$

A partir de esta ecuación, obtuvimos las concentraciones de NADP^+ y NADPH en cada muestra.

Concentración de Oxihemoglobina

La concentración de OxiHb se obtuvo a partir de una dilución 1/10 de los 100 μl separados de la muestra (Figura 22 y 23) midiendo absorbancia a 577 nm y utilizando la ecuación de la Ley de Lambert-Beer: $\text{Abs} = \epsilon \cdot b \cdot C$, donde Abs : Absorbancia, ϵ = Coeficiente de extinción molar ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b = paso óptico (cm) y C = concentración (M).

$$\text{Abs}_{577} = \epsilon_{577} \cdot b \cdot [\text{OxiHb}]$$

$$[\text{OxiHb}] = \frac{\text{Abs}_{577}}{\epsilon_{577} \cdot b}$$

$$\text{siendo } \epsilon_{577} = 15.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}; b = 1 \text{ cm}$$

Conociendo la concentración de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ medida en la muestra, y la concentración de OxiHb en la misma muestra, asumiendo una concentración de 20 mM de hemoglobina en el glóbulo rojo (Steinberg et al., 2018) y ajustando por el factor de dilución, se calculó la concentración de NADP^+ y NADPH en la muestra por glóbulo rojo.

Medida de actividad enzimática de la G6PDH

Con el objetivo de determinar la actividad enzimática de la G6PDH en los extractos de glóbulos rojos almacenados nos basamos en los trabajos de (Langdon, 1966) y (Marks, 1966) para poner a punto el método de medida en el laboratorio.

Al momento de realizar las mediciones se tomaron 50 μL del paquete globular (aprox. 100% de hematocrito) de las muestras guardadas a -80°C y se le adicionaron 150 μL de PBS. Posterior a someterlo a abundante vórtex, se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos para eliminar los restos de membrana. Del sobrenadante obtenido se tomaron 50 μL y se suspendieron en 450 μL de Buffer TRIS 250 mM pH 7.5 (Figura 24).

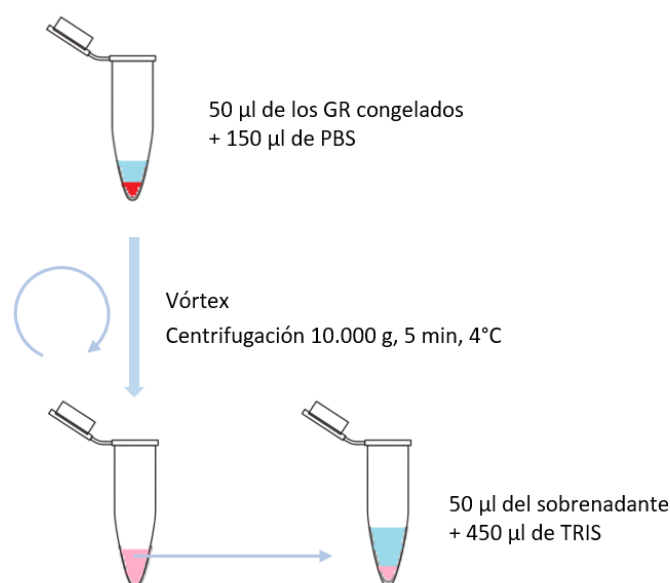


Figura 24. Esquema de procesamiento de la muestra para medida de la actividad de la G6PDH en lisados de GR.

Medida de la actividad enzimática de G6PDH

Las medidas se realizaron en el lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific, Finland), utilizando una placa de 96 pocillos UV-Star. Se preparó una mezcla de reacción que contenía 50 μL de glucosa 6 fosfato 10 mM, 10 μL de NADP^+ 2.5 mM, 50 μL de MgCl_2 100 mM, 50 μL de buffer TRIS 250 mM pH 7.5 y 90 μL de agua ultrapura. Se colocaron en el pocillo de reacción 250 μL de mezcla de reacción con 10 μL de la muestra. Posterior a una agitación de 5 segundos se realizó una medida de cinética observando los cambios en la absorbancia a 340 nm cada 30 segundos durante 15 minutos. Se tomaron las pendientes de 200 s a 400 s y se calcularon las velocidades iniciales de reacción de la siguiente manera:

$$\text{Pendiente} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t}$$

$$v = \frac{\Delta[NADPH]}{\Delta t}; Abs = \epsilon \cdot b \cdot [NADPH]$$

$$v = \frac{\text{pendiente}}{\epsilon \cdot b} * 60$$

La velocidad quedó expresada en M min⁻¹.

Se pasó la velocidad a unidades de actividad enzimática U (μmol min⁻¹) multiplicando *1 x 10⁶ (pasar de M a μM) * 0,00026 L (volumen de reacción). Para obtener la concentración de enzima ($U\ ml^{-1}$) se dividió la actividad entre el volumen dispensado del lisado (0,01 mL). Finalmente se ajustó la concentración teniendo en cuenta el factor de dilución (FD: 40).

Por otro lado, se midió la concentración de oxihemoglobina en cada uno de los pocillos:

$$[OxiHb] = \frac{Abs_{577}}{\epsilon_{577} \cdot b} * Factor\ Dilución$$

Se transformó la concentración de M a mg/mL utilizando el peso molecular de la hemoglobina (16000 g/mol). De esta manera se pudo calcular la actividad específica de la enzima ($U\ mg^{-1}$).

Medida de ATP por luminiscencia

Las medidas de ATP por luminiscencia se aprendieron en el marco de una pasantía en el Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas “Profesor Alejandro C. Paladini” (IQUIFIB) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA) en el Laboratorio del Dr. Pablo Schwarzbaum (colaborador en los proyectos del grupo de glóbulos rojos), y bajo la supervisión de la Dra. María Florencia Leal Denis. El grupo de investigación tiene amplia experiencia en el uso de este método utilizando luminómetros y realizando mediciones de ATP extracelular en glóbulos rojos (en el orden nanomolar) (Denis et al., 2019). Se puso a punto el mismo método, pero utilizando un lector de placa de 96 pocillos para cuantificar concentraciones de ATP intracelular en lisados de glóbulos rojos (orden milimolar).

Brevemente, el método se basa en usar la reacción catalizada por la luciferasa de luciérnaga (EC 1.13.12.7), la oxidoreductasa responsable de la bioluminiscencia de las luciérnagas (Lampyridae) que cataliza la reacción que tiene como sustrato la d-luciferina (molécula bioluminiscente) y como co-sustratos ATP, Mg^{2+} , O_2 y coenzima A (Figura 25). Esta reacción enzimática produce luz, pirofosfato, CO_2 y AMP.

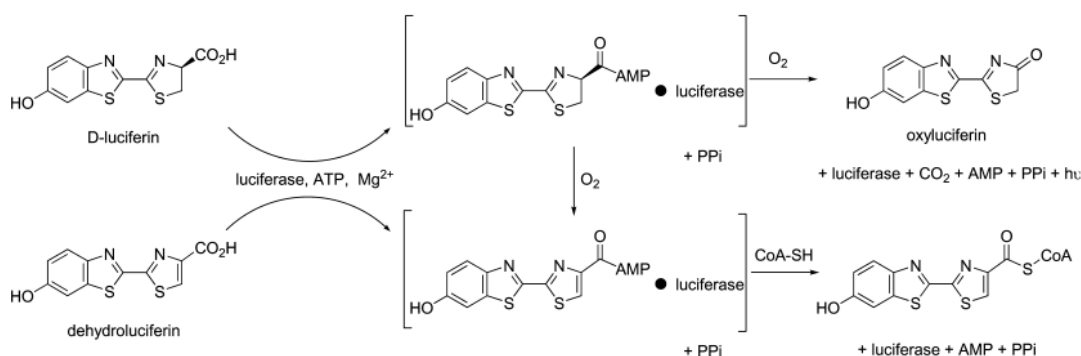


Figura 25. Reacciones implicadas en la detección quimioluminiscente de ATP. Extraído de (Nakamura et al., 2005).

Reactivos y equipamiento

Se utilizó un buffer “RBC-2” que contenía NaCl 155 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, Na_2HPO_4 2.5 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1 mM, glucosa 5 mM. Se ajustó a pH 7,4 con NaOH 5 M. Se ajustó osmolaridad 265 mOsm con NaCl 1 M. La mezcla de reacción estaba compuesta por dos soluciones: A (“*lasa*”) y B (“*lina*”) en una proporción de 1A:39B, que estaban compuestas de la siguiente manera: solución A “*lasa*” contenía 1 μ L de Luciferasa 47,8 μ M de Sigma (St. Louis, MO, USA), 10 μ L seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos (BSA) 10% de Sigma (St. Louis, MO, USA) y 89 μ L buffer RBC-2; mientras que la solución B “*lina*” contenía 1 μ L de Luciferina 100 mM

de Invitrogen/Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA), 1 μL de coenzima A (CoA) de un stock conteniendo 50 mg/mL, 50 μL BSA 10% y 448 μL RBC-2. Tanto la luciferina como la solución “lina” y el mix de reacción fueron protegidos de la luz con papel aluminio. Se utilizó ATP ultra puro 100 mM de Illustra TM Sigma (St. Louis, MO, USA).

Método de cuantificación de ATP por quimioluminiscencia

En todos los casos se utilizó sangre fresca.

El grupo de referencia tiene mucha experiencia en la medida de ATP extracelular, pero no en la medida de ATP intracelular. Por ello hubo que optimizar el procesamiento de la muestra para la mejor cuantificación de ATP intracelular.

Del concentrado de glóbulos rojos se tomaron 100 μL y se mezclaron con 100 μL de KOH 0,5 M frío, agitando vigorosamente. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 10.000 g por 5 minutos a 4°C. Del sobrenadante obtenido se tomaron 150 μL y se diluyeron en 300 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$ a 4°C, se mezcló con vórtex. De la mezcla obtenida, se tomaron 10 μL y se diluyeron en 990 del buffer RBC-2. Este procesamiento se esquematiza en la Figura 26.

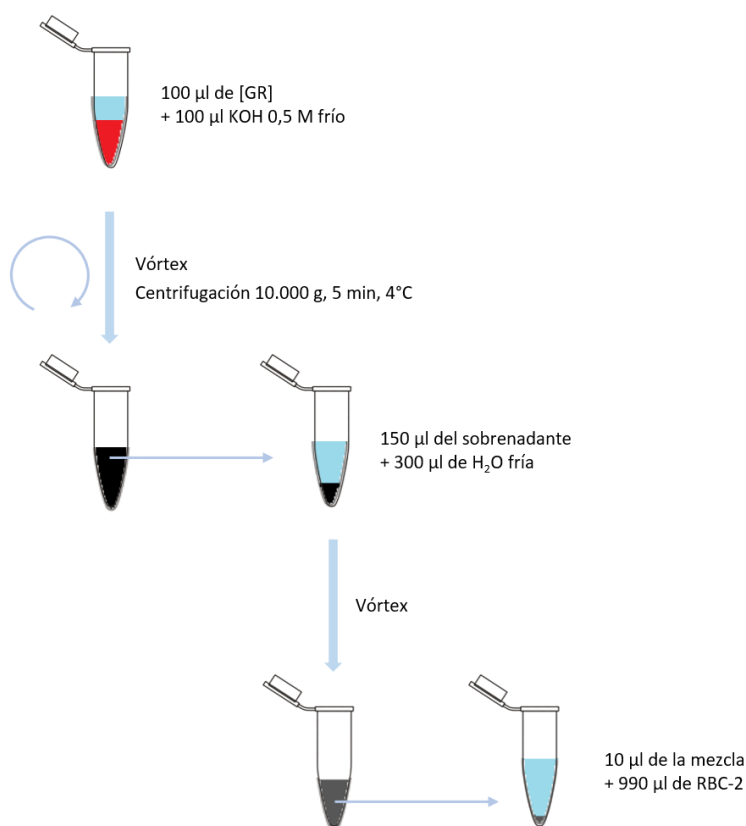


Figura 26. Esquema de procesamiento de la muestra para cuantificación de ATP por quimioluminiscencia.

A esta mezcla final se le controló el pH. También se preparó una suspensión de RBC-2 con ATP 1 mM. Finalmente, en diferentes pocillos de reacción se colocaron 10 μ L de la mezcla final del lisado de GR (el resto de la mezcla fue almacenada a -20°C como "lisado 1"), 10 μ L del buffer RBC-2 conteniendo 1 mM de ATP y 10 μ L de buffer RBC-2, y en los 3 pocillos se inició la reacción con 50 μ L de la mezcla de reacción. Se midió la señal de luz con ganancias de 150 y 200 y se realizaron curvas de calibración con concentraciones conocidas de ATP que iban de 1 a 32 μ M. Para las curvas de calibración se preparó un stock de 100 mM de ATP al que se ajustó la concentración midiendo absorbancia a 260 nm. La concentración final ajustada fue 148,2 mM.

Una vez definidos estos parámetros, se trabajó con lisados de glóbulos rojos, procesados como se menciona más arriba. En estos ensayos también se midió la emisión de luz del mix sin muestra, para no sobreestimar la señal de la muestra. Se realizaron medidas puntuales cada 1 minuto para valorar que la señal no cambiara en el tiempo, lo que se pudo confirmar. A partir de allí se comenzó a hacer medidas puntuales. La curva de calibración se hizo dispensando diferentes concentraciones en diferentes pocillos. Esto implicó una complicación que era las diferencias de señal intrínsecas de cada pocillo. Teniendo en cuenta esto es que se optó por realizar curvas de calibración independientes en cada pocillo, como se muestra en la Figura 25.

Además, se determinó que en las condiciones del ensayo la hemoglobina no interfiere en la cuantificación.

A su vez, se controló el pH final del procesamiento de la muestra y se encontró en el rango óptimo de reacción de la enzima (7-8). También se valoró la recuperación de ATP que tenemos posterior al tratamiento con KOH, y la estabilidad del ATP a temperatura ambiente sin procesar, y de sangre preservada a -20°C procesada para la extracción.

Según las curvas obtenidas tanto en las muestras con buffer como en las muestras con los lisados (Figura 27), podemos decir que pese a ser más laborioso, se obtienen mejores ajustes si las curvas de calibración son hechas en cada pocillo. A su vez, esto brinda la certeza de estar cuantificando cada concentración de manera independiente.

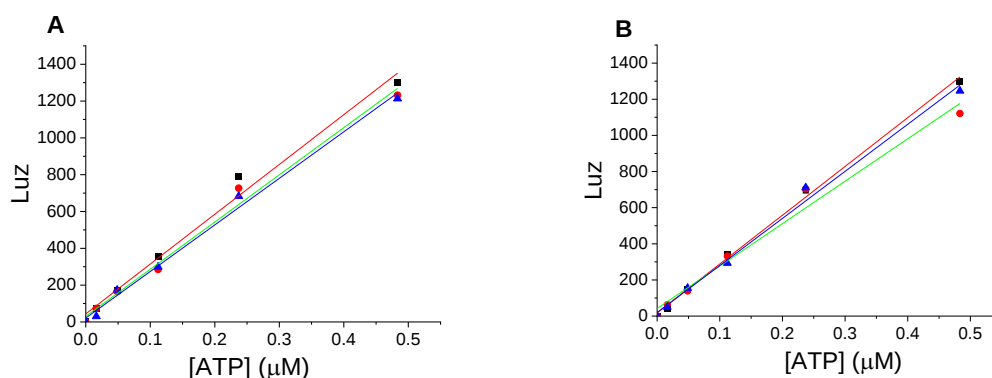


Figura 27. Curvas de calibración en cada pocillo independiente. La adición de ATP se realizó en buffer solo (A) y sobre el lisado de GR (B).

Tanto en la muestra almacenada a T.A. sin procesar como en la muestra almacenada a -20°C procesada se obtuvieron niveles de ATP significativamente más bajos que en la misma muestra fresca (por debajo del 50% en ambos casos).

La recuperación de ATP posterior al tratamiento de KOH fue buena, pudiéndose cuantificar el ATP agregado exógenamente (se recuperó el 90%, aprox.), atribuyendo las diferencias obtenidas a los errores aceptables del ensayo. También se puede destacar que las pendientes de las curvas de calibración no difirieron significativamente entre sí, lo que aporta confianza en relación a la actividad de la enzima.

Luego se determinó si la interacción con la hemoglobina afecta la cuantificación del ATP en las muestras almacenadas y se controló nuevamente la interacción del ATP con el KOH. Se comprobó que la hemoglobina no afecta la cuantificación, y se confirmó que el KOH tampoco lo hace.

La medida de quimioluminiscencia se realizó utilizando un lector de placas de 96 pocillos BioTek Synergy H1 (Agilent, BioTek, Santa Clara, EEUU), o un lector de placas de 96 pocillos Varioskan Flash, utilizando placas blancas de quimioluminiscencia. Se configuró el equipo para que realice medidas puntuales de luminiscencia con una ganancia de 150. Se obtuvieron dos señales en cada pocillo: una señal basal de la placa sin sembrar, y una señal con el mix de reacción y la muestra. Una vez obtenidas esas medidas se pasó a realizar las curvas de calibración en cada pocillo: colocando $1\ \mu\text{L}$ de concentraciones crecientes de ATP (de 2 a $32\ \mu\text{M}$). Al realizarlas en el mismo pocillo y de manera independiente, para la realización de las curvas tuvimos en cuenta las diluciones que se iban generando, así como también el ATP que se había agregado anteriormente. Se esquematiza esto en la Figura 28.

Tratamiento con H_2O_2

Una vez obtenidas, las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: del concentrado de glóbulos rojos se tomaron 100 μL y se mezclaron con 100 μL de una solución de buffer RBC-2 con concentración conocida de H_2O_2 (0-400 μM). Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 900 g por 3 minutos para descartar el sobrenadante. A partir de este punto, el procesamiento fue tal como se describe más arriba para la cuantificación de ATP de GR por quimioluminiscencia.

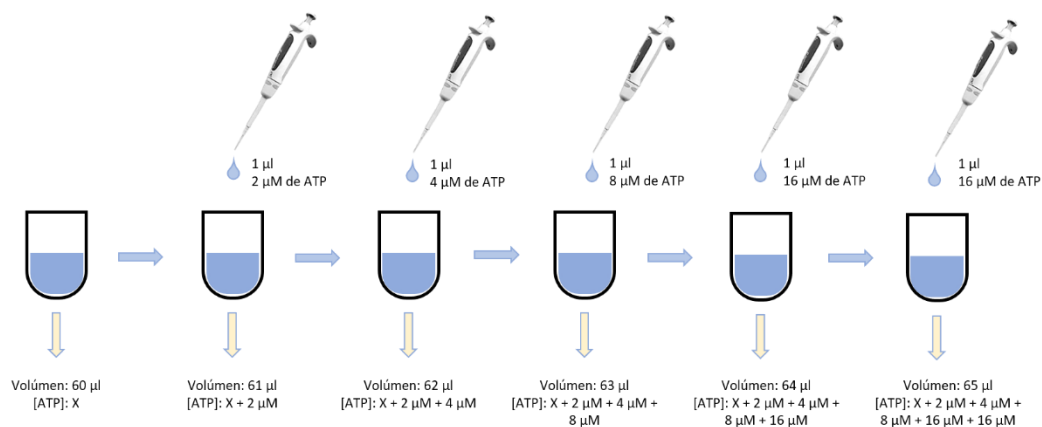


Figura 28. Esquema representativo de la realización de las curvas de calibración de manera independiente en cada pocillo para cada muestra.

Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como medias $\pm$ SD de al menos tres muestras obtenidas de donantes diferentes. La comparación estadística entre grupos se realizó mediante el test de ANOVA unidireccional o bidireccional, según correspondía, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron empleando Prism 6 (GraphPad Software Inc.). Las diferencias entre medias se consideraron significativas a * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Resultados y discusión

Separación y cuantificación de ATP y NADPH intracelulares por HPLC

En primer lugar, se buscó un método de HPLC que permitiera separar todos los metabolitos de interés: ATP, ADP, NADPH, NADP^+ , NADH y NAD^+ . Para ello nos basamos en el método de Stocchi (Stocchi et al., 1985), que utiliza una columna C18, amortiguador fosfato pH 6.5, y un gradiente de metanol y según sus autores permitía la separación y cuantificación de todos los metabolitos de interés. Se adaptó el método a la columna disponible en el laboratorio y se probaron diferentes gradientes para optimizar la separación y cuantificación de los metabolitos de interés. Uno de los desafíos más importantes era medir NADPH, que se encuentra en concentraciones micromolar en los GR.

Luego de varios ensayos, el *Método HPLC para metabolitos 2* se consideró el óptimo en cuanto a resolución y sensibilidad. Como se puede observar en la Figura 29, inyectando concentraciones conocidas de metabolitos, con este método se logra separar ATP, NADPH, NAD^+ y NADH con una adecuada resolución. A continuación, se realizaron las curvas de calibración para ATP, NADPH, NAD^+ y NADH (Figura 30). Como se puede observar la respuesta fue lineal. En la Tabla 1 se muestran las ecuaciones de la recta para cada metabolito y su R^2 .

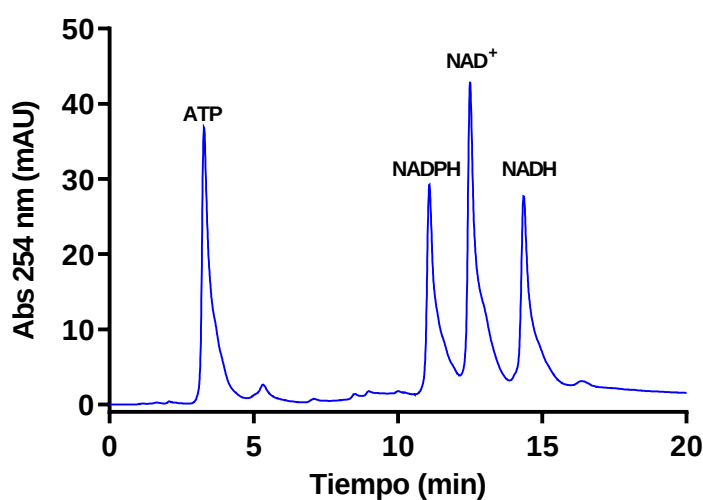


Figura 29. Cromatograma representativo del método HPLC para metabolitos 2. Columna C-18 Ascentis de 10 cm, fase móvil A: KH_2PO_4 0.1 M pH 6, fase móvil B: KH_2PO_4 0.1 M pH 6 que contenía 10% CH_3OH , gradiente: 5 min 100% A, 3 minutos hasta 100% B, 1 minuto 100% B, 1 minuto hasta 100% A, 5 minutos 100% A; flujo 1 ml/min. Se inyectaron 100 μL de 50 μM de cada metabolito.

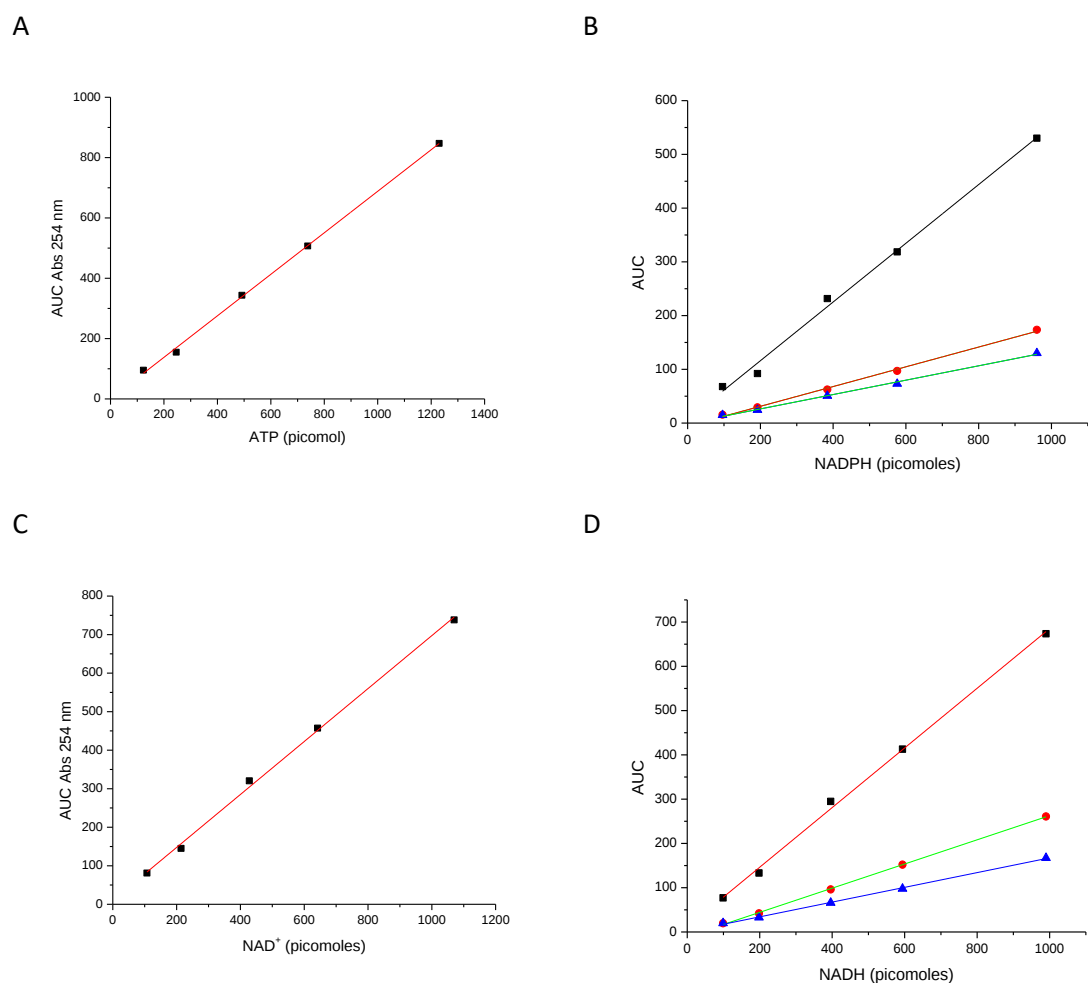


Figura 30. Curvas de calibración para ATP, NADPH, NAD⁺ y NADH. **A.** Curva de calibración para ATP en el rango de $0.123\text{--}1.23 \times 10^{-12}$ moles. El gráfico muestra las áreas bajo la curva (AUC) de los cromatogramas obtenidos a 254 nm en función de los moles de ATP inyectados. La recta representa el ajuste. **B.** Curva de calibración para el NADPH en el rango de $0,096\text{--}0,960 \times 10^{-12}$ moles. El gráfico muestra las AUC de los cromatogramas obtenidos a absorbancia de 254 nm (puntos negros), absorbancia de 340 nm (puntos rojos) y fluorescencia 340/470 (puntos azules). Las rectas representan el ajuste correspondiente. **C.** Curva de calibración para NAD⁺ en el rango de $0,107\text{--}1,070 \times 10^{-12}$ moles. El gráfico muestra las AUC de los cromatogramas obtenidos a 254 nm en función de los moles de NAD⁺ inyectados. La recta representa el ajuste. **D.** Curva de calibración para el NADH en el rango de $0,099\text{--}0,99 \times 10^{-12}$ moles. El gráfico muestra AUC de los cromatogramas obtenidos a absorbancia de 254 nm (puntos negros), absorbancia de 340 nm (puntos rojos) y fluorescencia 340/470 (puntos azules). Las rectas representan el ajuste correspondiente.

Tabla 1. Parámetros de las calibraciones con los nucleótidos de interés, donde se grafica el área bajo la curva (AUC) del cromatograma obtenido en función de la cantidad de analito inyectado, expresado en picomoles.

		Ajuste de la recta		R ²
		Pendiente	Intercepto	
ATP	Abs 254 nm	0.69	0.23	0.99
	Abs 254 nm	0.55	6.76	0.99
NADPH	Abs 340 nm	0.18	-5.59	0.99
	Fl 340/470	0.13	0.38	0.99
NAD ⁺	Abs 254 nm	0.69	10.13	0.99
	Abs 254 nm	0.67	11.52	0.99
NADH	Abs 340 nm	0.27	-10.23	0.99
	Fl 340/470	0.17	0.87	0.99

En todos los casos se observó una pendiente similar a 254 nm para todos los metabolitos. La respuesta a 340 nm es menor, pero a esta longitud de onda solo absorben NADPH y NADH, por lo que se gana en especificidad. Del mismo modo, la detección por fluorescencia es específica para NADPH y NADH. Se consideró que estábamos en el rango necesario para cuantificar NADPH en los GR, ya que 100 picomoles equivalen a inyectar 100 μ l de una solución 1 μ M de NADPH. Se consideraba que la concentración de NADPH en GR era de 50 μ M aproximadamente.

A continuación, se optimizó la extracción de metabolitos de GR almacenados. Se intentaron variaciones del método de extracción para lograr medir concentraciones de NADPH semejantes a las reportadas (ver materiales y métodos). En el *Método HPLC para metabolitos 2*, donde se aumentó el volumen inyectado (200 μ L) se obtiene el cromatograma mostrado en la Figura 31. El NADPH eluye a los 12 min. Según la calibración, se cuantificó 0,38 μ M de NADPH en GR. Este valor se consideró muy por debajo de lo reportado (50 μ M), y se realizaron varias modificaciones para mejorar el resultado (ver *Materiales y Métodos*).

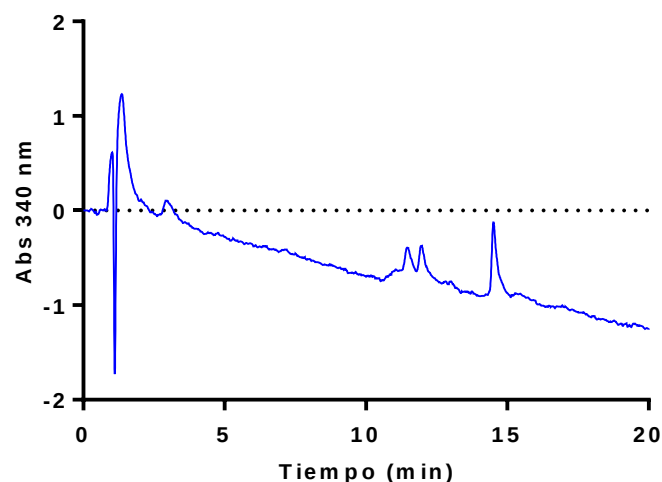


Figura 31. Cromatograma representativo del método HPLC para metabolitos 2. Columna C-18 Ascentis de 10 cm, fase móvil A: KH_2PO_4 0.1 M pH 6, fase móvil B: KH_2PO_4 0.1 M pH 6 que contenía 10% CH_3OH , gradiente: 5 min 100% A, 3 minutos hasta 100% B, 1 minuto 100% B, 1 minuto hasta 100% A, 5 minutos 100% A; flujo 1 mL/min. Se inyectaron 200 μL .

Finalmente, a pesar de mucho esfuerzo realizado para mejorar la determinación del NADPH, se concluyó que el método por HPLC no era adecuado para su cuantificación. Por lo tanto, se abandonó este método para la cuantificación de todos los metabolitos y se decidió utilizarlo únicamente para la cuantificación de ATP y ADP, como se describe más abajo.

Para cuantificar NADPH y NADP^+ con la sensibilidad adecuada se puso a punto un método de ciclado enzimático (*ver más adelante*).

Cuantificación de ATP por HPLC

Curva de calibración

Para cuantificar ATP en los GR, se utilizó el *método Cuantificación de ATP* con detección a 254 nm. En primer lugar, se realizó una curva de calibración en el rango $1-4 \times 10^{-9}$ moles (Figura 32 B) a partir de estándares de ATP entre 50 y 200 μ M realizados a partir de un stock de 10 mM.

El ATP eluyó a los 3.8 minutos y la respuesta del área bajo la curva (AUC) fue lineal con una ecuación de la recta: $AUC_{254} = 7,87 \times 10^{11} \text{ mol ATP} + 12,22$, $R^2 = 0.997$.

El ATP de los GR se extrajo de acuerdo al protocolo *Método HPLC para metabolitos 2*. En la Figura 32 C se observa un cromatograma del extracto de GR, que muestra un pico principal con el mismo tiempo de retención que el estándar de ATP, y a continuación un pico menor que se asigna al ADP (TR = 4.5 min). La concentración de ATP en la muestra está dentro de los valores esperados, por lo que confirmamos la validez de la técnica y podemos seguir usándola.

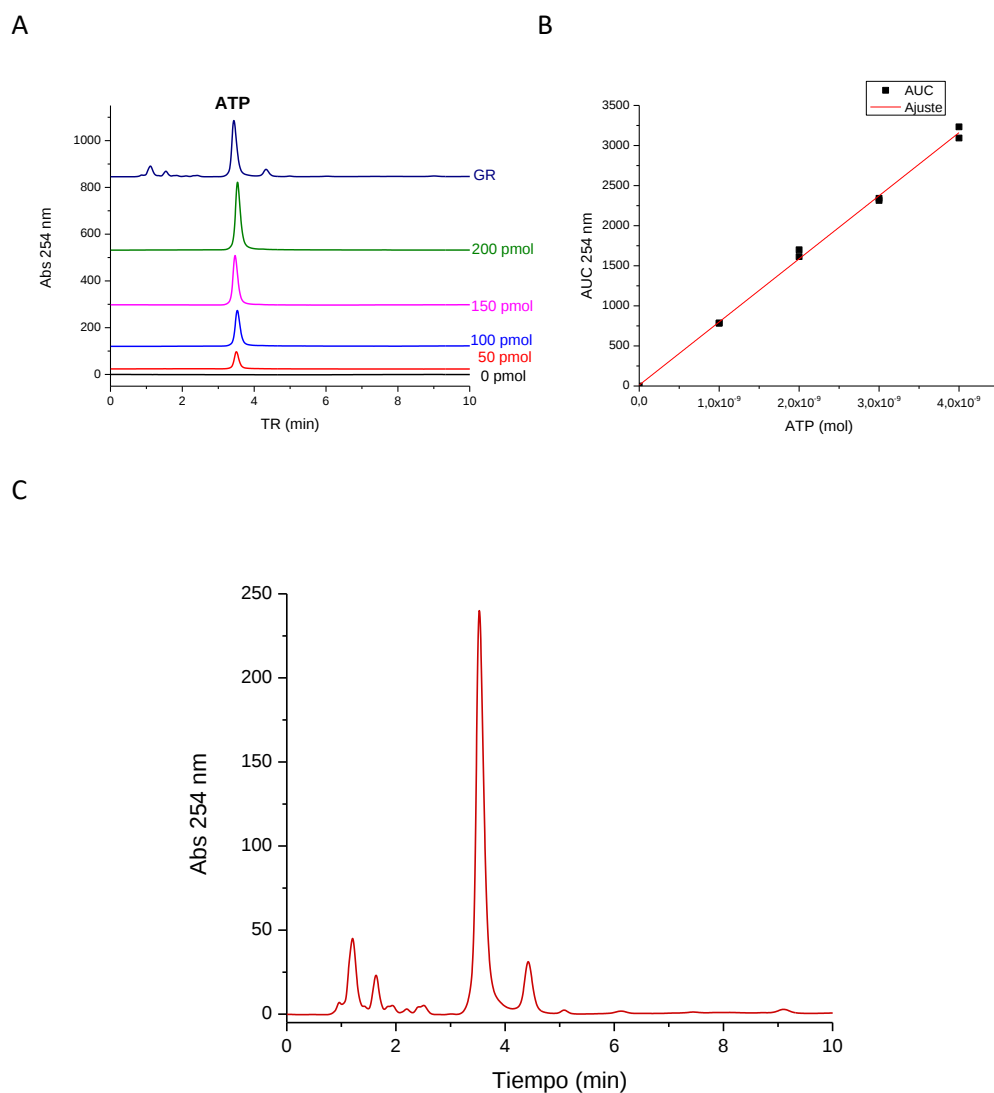


Figura 32. Calibración de la técnica de HPLC con ATP. **A.** Cromatogramas obtenidos al inyectar cantidades crecientes de ATP (50 – 200 pmol) y un extracto de glóbulos rojos frescos (GR, línea superior). **B.** Curva de calibración y el ajuste a la recta. **C.** Cromatograma obtenido de un extracto de GR fresco.

Como control adicional del método, se midió con por HPLC el porcentaje de recuperación de ATP luego del procesamiento de la muestra. Para ello, se midieron en paralelo muestras de GR control y muestras con un agregado de ATP exógeno de 0,78 mM.

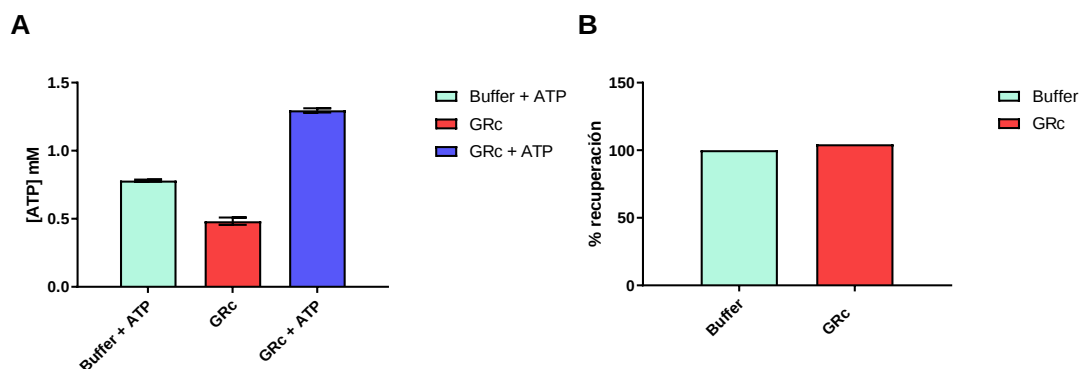


Figura 33. Control de recuperación de ATP luego del procesamiento de la muestra. A. Concentración de ATP en buffer fosfato con ATP adicionado exógenamente (Buffer + ATP), y en sangre congelada control y con ATP agregado (GRc, GRc + ATP, respectivamente). **B.** Porcentaje de recuperación de ATP en buffer fosfato y sangre congelada (GRc). Las mediciones se realizaron siguiendo el método descrito en *Cuantificación de ATP por HPLC*.

Se recuperó $104 \pm 10\%$ de ATP agregado exógenamente a la sangre congelada y $100 \pm 1\%$ del ATP agregado al buffer. Por lo tanto, se confirma que el método de extracción de ATP es eficiente, y para los experimentos posteriores se considera que la recuperación del ATP fue del 100%.

Glóbulos rojos frescos

Empleando los procedimientos descritos se procedió a determinar las concentraciones de ATP en glóbulos rojos frescos. El valor promedio de dos muestras procedentes de donantes diferentes fue de 1.13 ± 0.01 mM, coincidente con lo reportado en la literatura. Se hicieron controles de recuperación para evaluar la posible pérdida de ATP durante el proceso de extracción y no se observaron pérdidas.

Una vez que se verificó que el método permite cuantificar ATP de GR, se procedió a estudiar el efecto de la leucorreducción y el almacenamiento en el ATP de los GR. Para ello se utilizaron las muestras conservadas a -80°C obtenidas a diferentes días de almacenamiento.

Efecto de la leucorreducción y el almacenamiento en el ATP

Los cromatogramas obtenidos de los extractos de las muestras de concentrados de GR correspondientes a diferentes días de almacenamiento con o sin leucorreducción fueron similares a los de sangre fresca, y se pudo asignar el pico principal de ATP por coincidencia en el tiempo de retención y en el espectro de absorbancia. Se cuantificó el ATP de muestras de 3 donantes, correspondientes a diferentes tiempos de almacenamiento (Tablas S1-S3 en Anexo 1). En la Figura 34 se muestran los valores promedio de concentración de ATP para las muestras de los 3 donantes analizados. Se incluyó la cuantificación de una muestra fresca (SF) como

control de que la conservación de las muestras a -80°C no hubiera degradado el ATP. Se observa que la concentración de ATP se mantiene relativamente constante en aproximadamente 1 mM hasta el día 21. Se observó una caída del 60% al día 42.

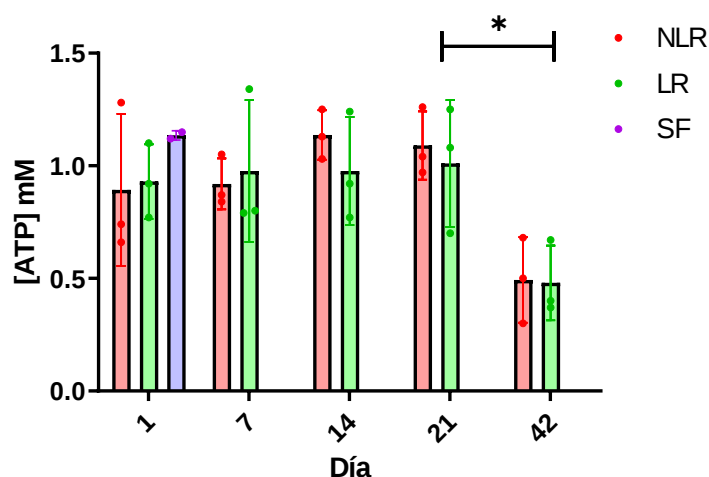


Figura 34. Concentraciones de ATP en lisados de glóbulos rojos de diferentes días de almacenamiento (1, 7, 14, 21, 42), de unidades de SD no leucorreducidas (NLR, barras rojas), unidades leucorreducidas (LR, barras verdes) y sangre fresca (SF, barra violeta), con muestras procesadas con el método *HPLC para metabolitos 2*. N=3. Los datos se compararon mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey. * $p<0.05$.

No se observan diferencias en la concentración de ATP entre las muestras leucorreducidas y no leucorreducidas, lo que sugiere, a priori, que no se ve afectada la vía glucolítica por la presencia de leucocitos remanentes en las unidades de SD.

Sin embargo, sí se observa un descenso en el ATP al día 42 respecto al día 21 tanto en unidades LR como NLR. Esta caída podría deberse a la depleción de la glucosa del medio de conservación (Figura S1 Anexo). Los niveles de glucosa en el medio de conservación al día 42 son, igualmente, superiores a los que se encuentran a nivel fisiológico, lo que habilita pensar que los niveles de ATP se encuentran disminuidos principalmente por inactivación de enzimas de la vía glucolítica. A su vez, el destino de la glucosa puede estar modificado, desviándose hacia otras rutas metabólicas ("reprogramación metabólica").

Cuantificación de NADPH por ensayo acoplado

Como se mencionó anteriormente, no se pudo determinar NADPH por el método de HPLC, por lo que se buscó una alternativa que se encontró en un ensayo de ciclado enzimático que utiliza NADPH y NADP^+ como cosustratos, detallado en *Materiales y Métodos*. Brevemente, la G6PDH reduce el NADP^+ a expensas de G6P, el NADPH reduce a la fenazina etosulfato y esta reduce al MTT, lo cual genera un producto que absorbe a 570 nm. En cada ciclo se regenera NADP^+ , y la velocidad de la reacción depende directamente de la concentración de NADP total (NADP^+ + NADPH). Se puede destruir el NADP^+ por calentamiento de la muestra a 60°C por 30 minutos, y medir solo NADPH (Zerez et al., 1987).

Efecto de la leuorreducción y el almacenamiento en NADPH y NADP total

A continuación, se utilizó este método para cuantificar NADPH y NADP total en las muestras de los 3 donantes estudiados. La extracción se realizó siguiendo el *Método de extracción de NADPH 1*, y se determinó la concentración de NADPH y NADP total con el método *cuantificación de NADPH*.

En la Figura 35 se muestra una curva de calibración de NADP^+ representativa. A mayores concentraciones de NADP^+ , mayor es la velocidad de reacción y mayor es la pendiente de Abs_{570} respecto al tiempo (Figura 35 A). Se graficaron los ajustes a las rectas descartando los primeros 200 s, y con las pendientes se construye la curva de calibración (Figura 35 B). Las curvas de calibración fueron hechas para cada grupo de muestras de manera independiente. Se puede destacar la alta sensibilidad de este método. Como se puede observar en la Figura 35B, se pueden detectar concentraciones nanoMolar de NADP^+ o NADPH, en el rango apropiado para estudiar estos nucleótidos en glóbulos rojos.

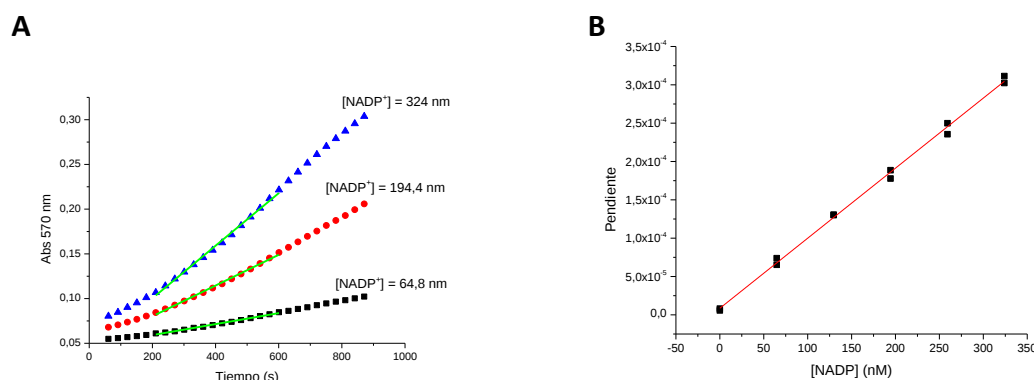


Figura 35. Curva de calibración de NADP^+ . **A.** Cinética de formación de MTT. La absorbancia a 570 nm en presencia del sistema enzimático se midió para diferentes concentraciones de NADP^+ : 324 nM (puntos azules), 194.4 nM (puntos rojos) y 64.8 nM (puntos negros). **B.** Gráfico de velocidades iniciales en función de la concentración de NADP^+ (puntos negros) y ajuste lineal (línea roja). $\text{Pendiente} = 9.14 \times 10^{-7}$ $\text{intercepto} = 8.58 \times 10^{-6}$ $R^2 = 0.99$.

A manera de confirmar que se podía discriminar NADPH y NADP⁺, se realizó un control de recuperación de NADPH y pérdida de NADP⁺ posterior al tratamiento de la muestra a 60°C durante 30 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 36.

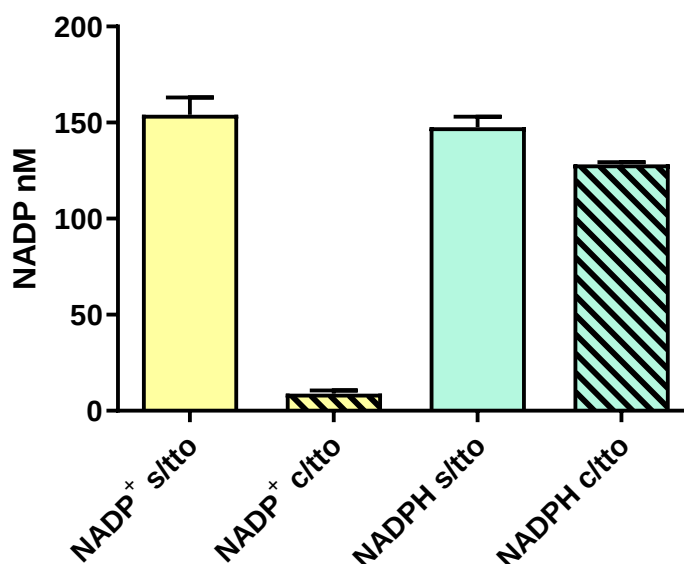


Figura 36. Control de recuperación de NADP⁺ (177 nM) y NADPH (135 nM). Las columnas amarillas representan el NADP⁺ y las columnas verdes el NADPH. Las columnas tachadas representan la muestra sometida a tratamiento a 60°C durante 30 minutos y mientras que las columnas lisas no fueron tratadas. Las muestras se realizaron por triplicado.

Se recuperó 109 ± 10 % de NADPH en buffer de extracción. Se considera que la recuperación de NADPH posterior al tratamiento fue del 100%. En contraste, solo se recuperó 9 % NADP⁺ posterior al tratamiento, confirmando que en estas condiciones el calor destruye selectivamente al NADP⁺.

A continuación, se procedió a medir NADPH y la suma de NADPH y NADP⁺ (total) en nuestras de sangre almacenadas para transfusión que fueron leucorreducidas o no (Figura 37), utilizando la extracción *Método de extracción de NADPH 1*, que incluye un paso de filtración para eliminar las proteínas.

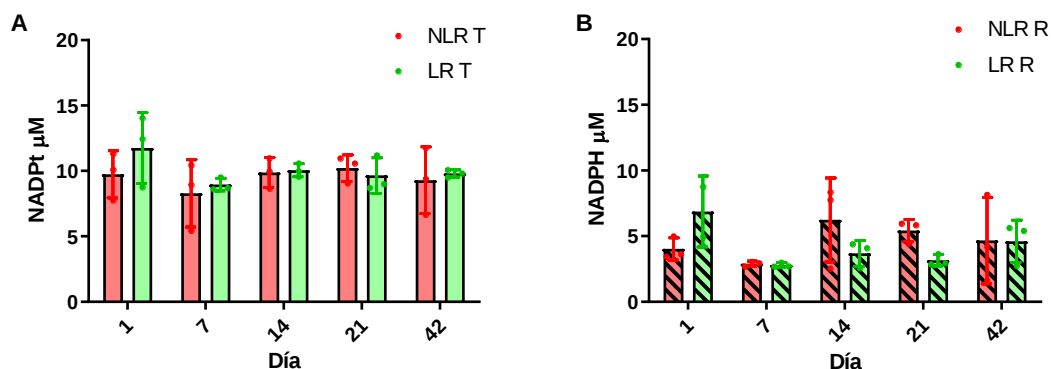


Figura 37. Concentraciones de NADP total (A) y NADPH (B) en lisados de glóbulos rojos en diferentes días de almacenamiento (1, 7, 14, 21, 42), de unidades de SD no leucorreducidas (barras rojas) y unidades leucorreducidas (barras verdes), con muestras procesadas con el *Método de extracción de NADPH 1*. N=3. Los datos se compararon mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey.

No se observaron diferencias significativas entre las muestras leucorreducidas y las no leucorreducidas, así como tampoco entre los diferentes días de almacenamiento. Tampoco se ve una tendencia clara de ascenso o descenso del nucleótido. A su vez, como se muestra en la Figura 37, los niveles de NADPH se encuentran en el orden de lo esperado (10^{-6} M). Sin embargo, estos fueron menores que los niveles de NADP total en todas las muestras. Esto llama la atención a priori ya que, como se observa en la Tabla 2, varios reportes muestran una muy baja concentración intracelular de NADP⁺ (nucleótido oxidado).

Tabla 2. Concentraciones de NADPH reportadas en glóbulos rojos.		
Referencia	[NADPH] μ M	[NADPH]/[NADP] _t
Zerez (Zerez et al., 1987)	39 $\pm$ 5	0.96 $\pm$ 0.02
Wagner and Scott (Wagner & Scott, 1994)	28 $\pm$ 5	1.4 $\pm$ 0.3
Al-Ali (Al-Ali, 2002)	43 $\pm$ 9	1.1 $\pm$ 0.1
Stocchi (Stocchi et al., 1985)	16 $\pm$ 4	-
Ogasawara (Ogasawara et al., 2009)	20 $\pm$ 4	0.96 $\pm$ 0.05
Micheli (Micheli et al., 1993)	22 $\pm$ 3	1 (calculado)
Klemm (Klemm et al., 1997)	18 $\pm$ 5	0.47 (calculado)
Kirkman (Kirkman et al., 1975) (black men)	35 $\pm$ 4	1.05 $\pm$ 0.08
Kirkman (Kirkman et al., 1975) (Mediterranean men)	30 $\pm$ 3	0.98 $\pm$ 0.04
Este trabajo	4.0 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.2*

*Resultados obtenidos con *Método de extracción de NADPH 1*.

Como se mencionó anteriormente, se realizaron controles de recuperación de NADPH posterior al tratamiento con calor, por lo que se descarta que este sea un factor. Una de las hipótesis manejadas es la posibilidad de que el NADPH se hubiese oxidado durante el almacenamiento a -80°C o durante la preparación de la muestra. Otro de los factores podría ser una pobre extracción de NADPH del lisado de glóbulos rojos, y que esto podía ser agravado por el paso de

filtrado de la muestra para eliminar proteínas, ya que se sabe que el NADPH se une a algunas proteínas del glóbulo rojo. Por lo tanto, se realizaron controles de recuperación en muestras biológicas omitiendo el paso de filtración de proteínas, observando resultados inesperados, que se muestran en la Figura 38.

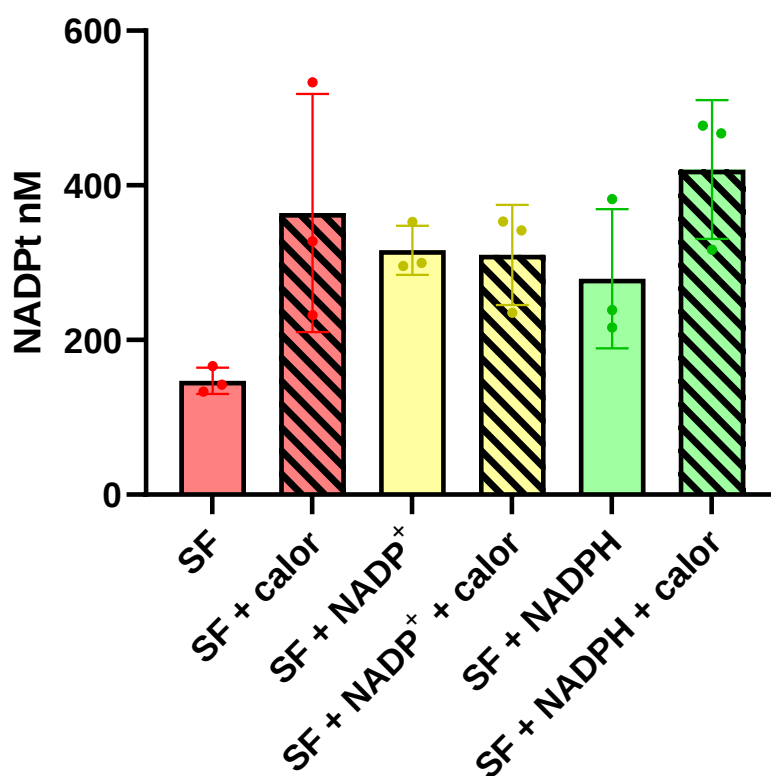


Figura 38. Control de recuperación de NADP⁺ (180 nM) y NADPH (107 nM). Se midió sangre fresca (SF) sin agregado exógeno (barras rojas), con NADP⁺ agregado (barras amarillas) y con NADPH agregado (barras verdes). Las muestras sin tratamiento se representan en las barras lisas, mientras que las muestras con tratamiento a 60°C durante 30 minutos, en las barras rayadas. Las muestras se procesaron siguiendo el *Método de extracción de NADPH 2*.

Tanto en la muestra de sangre fresca sin agregado de nucleótidos, como en la muestra que se adicionó NADPH, se ve un aumento de la concentración en las muestras tratadas a 60° durante 30 minutos. Esto se puede interpretar como un aumento de la concentración de NADPH luego del tratamiento en comparación con la concentración de NADP⁺ + NADPH previo al tratamiento. No se observaron cambios posteriores al tratamiento en la muestra que contenía NADP⁺ adicionado, en congruencia con el control del tratamiento.

Hay evidencia que parte del NADPH presente en las células se encuentra unido a proteínas (Kirkman & Gaetani, 1984), y creemos que puede haberse retenido durante el filtrado de las muestras para eliminar la hemoglobina. Basándonos en esto último decidimos reconsiderar el

método utilizado para la extracción de nucleótidos, y pasar a procesar las muestras con el *Método de extracción de NADPH 2* en el que se omitió la remoción de las proteínas de la muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 39, donde la concentración de NADP total y NADPH al día uno en las unidades NLR fue de 58.5 ± 3.2 y 94 ± 41 , y en las unidades LR fue de 44 ± 17 y 121 ± 18 , respectivamente.

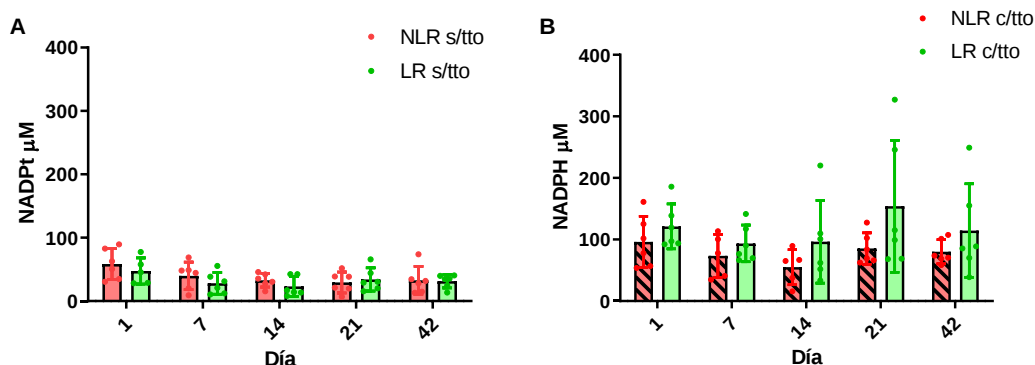


Figura 39. Concentraciones de NADP total sin tratamiento (A) y NADPH posterior al tratamiento a 60°C (B) en lisados de glóbulos rojos en diferentes días de almacenamiento (1, 7, 14, 21, 42), de unidades de SD no leucorreducidas (barras rojas) y unidades leucorreducidas (barras verdes), con muestras procesadas con el *Método de extracción de NADPH 2*. N=3. Los datos se compararon mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey.

De estos resultados se destaca una mejor recuperación de los nucleótidos, y principalmente una mayor cuantificación de NADPH posterior al tratamiento de las muestras a 60°C por 30 minutos (Figura 40). El análisis de estos resultados nos conduce a reforzar la hipótesis de NADPH unido a proteína, imponiendo una nueva línea de análisis que nos obliga a cuestionar la relación NADPH libre / NADPH unido a proteína, el mecanismo que subyace a este fenómeno, cuáles son las proteínas implicadas y el rol que cumple esta interacción. Kirkman y col. han trabajado en la estrecha unión entre la catalasa y el NADPH, y cómo este cumple una función protectora de la enzima (Gaetani et al., 2005; Kirkman et al., 1987), pero sería conveniente el estudio de esta interacción con otras proteínas, incluso de mayor abundancia que la catalasa, como la hemoglobina.

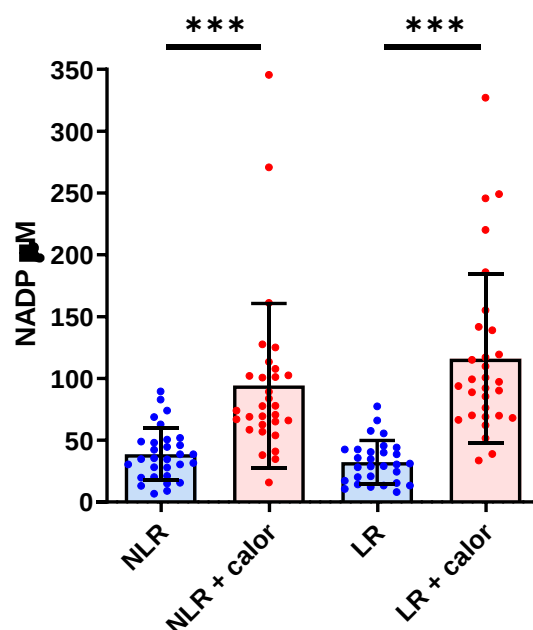


Figura 40. Cuantificación de NADPH por el Método de extracción de NADPH 2. Unidades de SD sin tratamiento (azul) y con tratamiento (rojo) durante 30 minutos a 60°C. Se consideraron los resultados de los 3 donantes, en los diferentes días de almacenamiento y en condiciones de LR y NLR, asumiendo que no había diferencias significativas entre ellos. Los datos se compararon mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Mann Whitney. ***p<0.001.

No se observan diferencias significativas en los niveles de NADPH durante el almacenamiento. Este es un punto que llama la atención dado que hay reportes (D'Alessandro et al., 2015) que afirman que la concentración de NADPH disminuye con el almacenamiento. También se ha observado en más ocasiones que las formas reducidas de la Prx2 y del glutatión disminuyen significativamente durante el almacenamiento (Allen et al., 2009; Bayer et al., 2015).

Con respecto al efecto de leucocitos remanentes en las unidades, no se observan diferencias significativas entre unidades LR frente a las NLR. Como se comentó ampliamente, los leucocitos remanentes son generadores de daño oxidativo y patrón proinflamatorio (Tzounakas et al., 2021), sin embargo, no se observó que esto genere efectos en los niveles de NADPH.

Sería conveniente en el futuro ajustar la cuantificación de NADPH, por ejemplo, con estudios de metabolómica, que brindarían información más amplia. El NADPH cumple un rol fundamental en el equilibrio redox del glóbulo rojo como dador de equivalentes reductores (Luzzatto & Arese, 2018), y por este motivo creemos pertinente la realización de diferentes experimentos afectando el equilibrio redox (exposición a diferentes agentes oxidantes, como H₂O₂) y observar los niveles de NADPH como respuesta a estos estímulos.

Cinética enzimática - G6PDH

Dado que la G6PDH es una enzima involucrada en la reducción de NADP^+ , clave para la homeostasis eritrocitaria, y dado que nuestros resultados no muestran cambios en la concentración intracelular de NADPH durante el almacenamiento, en conflicto con otros autores (Roch et al., 2019) decidimos evaluar la actividad de esta enzima en los SD almacenados.

Los ensayos se realizaron tal como se describieron en *Medida de actividad enzimática de G6PDH*.

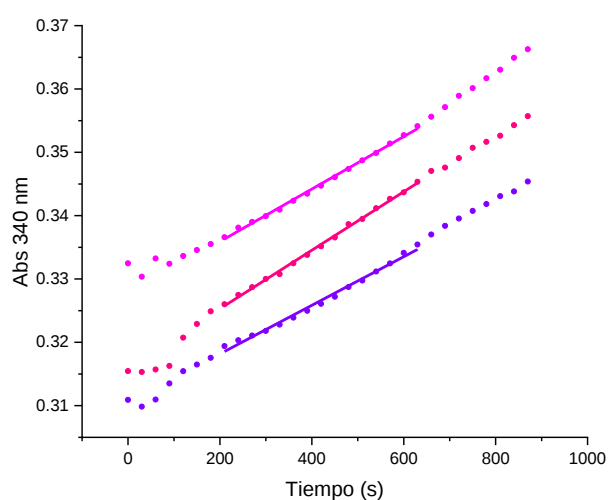


Figura 41. Curva de formación de NADPH en función del tiempo, midiendo absorbancia a 340 nm durante 15 minutos. Se consideró la recta de velocidad inicial comprendida entre los 200 s y 600 s. En cada color se muestran diferentes réplicas.

Efecto de la leucorreducción y el almacenamiento en la actividad de la G6PDH

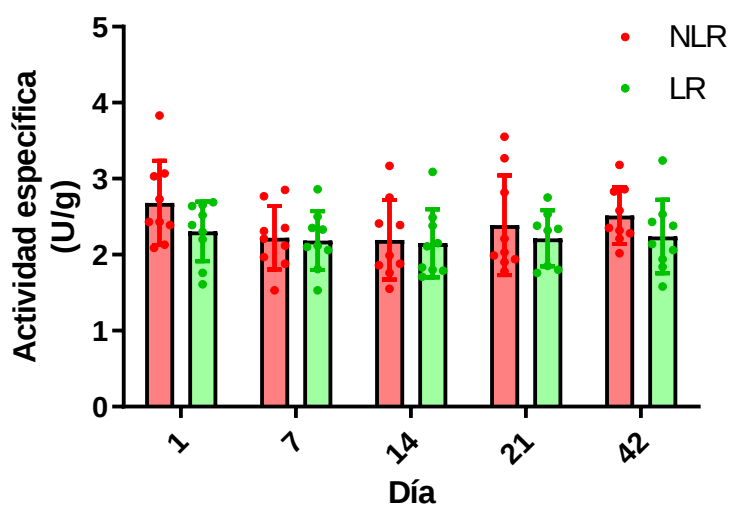


Figura 42. Efecto del almacenamiento sobre G6PDH. La actividad específica de la G6PDH en el glóbulo rojo almacenado para transfusión a distintos días de almacenamiento, en unidades no leucorreducidas (rojas) y leucorreducidas (verdes) se determinó en las muestras de tres donantes voluntarios, cada uno medido por triplicado. Empleando un test de ANOVA no se encontraron diferencias significativas inducidas por el almacenamiento.

La actividad específica de la G6PDH determinada en las muestras sin almacenar NLR fue de 2.7 ± 0.2 y en las LR de 2.3 ± 0.1 U/g. El rango de referencia para la actividad de G6PDH en las unidades de SD fue reportado como 5.3 - 8.0 U/g Hb (percentiles 2.5 – 97.5) por Francis y col. (Francis et al., 2013), en base al análisis de los GR de 301 donantes de Nueva York y 4.7 – 12.2 U/g Hb reportado por Roh (Roh et al., 2016) en base a 631 muestras provenientes de un estudio transversal realizado en el suroeste de Uganda. Nuestros valores están en el orden, pero por debajo de lo reportado. Esto podría deberse a pérdida parcial de actividad durante el congelamiento a -80°C .

Como se muestra en la Figura 42, no se observan cambios en la actividad de la G6PDH con el almacenamiento y tampoco con la leucorreducción.

La G6PDH es la llave metabólica para la generación de NADPH en el GR, por lo que de su actividad depende la respuesta antioxidante de la célula. Peters y col (Peters et al., 2016) reportan un descenso de la actividad de la enzima durante el almacenamiento, a diferencia de lo que observamos en nuestros donantes y lo observado por Francis y col. (Francis et al., 2013).

Efecto del H_2O_2 en el ATP

Como una de las hipótesis era que el estrés oxidativo modificaba el metabolismo de la glucosa, se estudió el efecto del H_2O_2 en la concentración de ATP intracelular por luminiscencia. La ventaja de la determinación de ATP por luminiscencia es la mayor sensibilidad y la posibilidad de procesar mayor cantidad de muestras a la vez, a diferencia del método con el HPLC en el que procesamos de a una muestra por vez, y cada corrida implica más de 10 minutos. De esta manera, optimizaríamos tiempos y reactivos. Este método se aprendió en una pasantía en el laboratorio del Dr. Pablo Shwarzbaum, con la tutoría de la Dra. María Florencia Leal Denis, en el Instituto Química y Físicoquímica Biológicas “Profesor Alejandro C. Paladini” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Las mediciones se realizaron siguiendo el método descrito en *Medida de ATP por luminiscencia*.

A continuación, se estudió el efecto del agregado de H_2O_2 en los niveles de ATP de GR medidos por luminiscencia. Se procesaron muestras de donantes voluntarios y se las incubó con H_2O_2 . Se realizaron curvas de calibración en cada pocillo (Figura 43) y se cuantificó el ATP en cada muestra tratada con H_2O_2 (Figura 44).

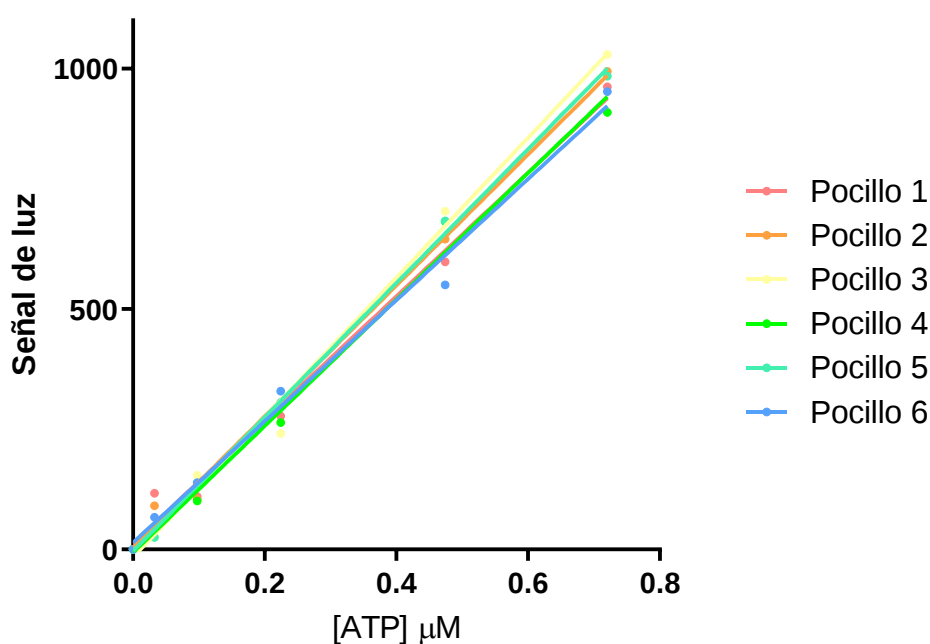


Figura 43. Curvas de calibración de ATP. Se dispensaron concentraciones conocidas de ATP (0.033 – 0.720 μM) realizadas en pocillos independientes. Cada curva se ajustó a una recta, todas con $R^2=0.99$.

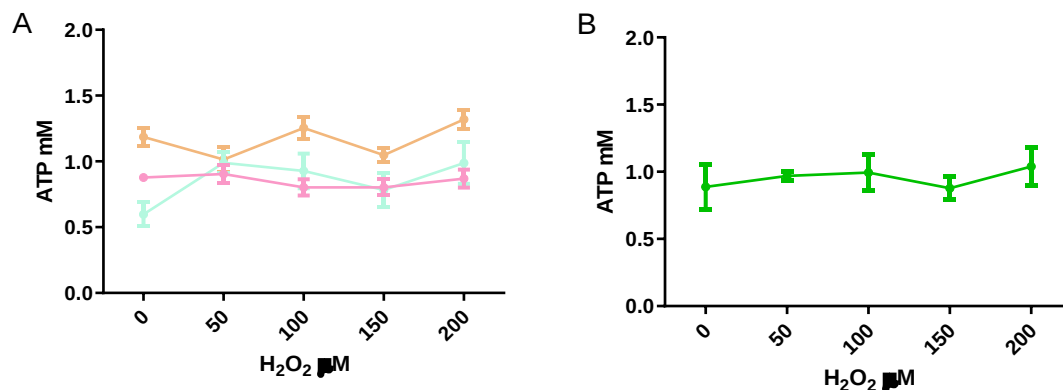


Figura 44. Efecto sobre la concentración intracelular de ATP en glóbulos rojos expuestos a H₂O₂. **A.** Suspensiones de glóbulos rojos (tres) de tres donantes independientes se expusieron a concentraciones crecientes de H₂O₂ durante 15 minutos en buffer RBC-2 a temperatura ambiente. La concentración intracelular de ATP se determinó con la técnica de luciferina/luciferasa. **B.** Valores promedios $\pm$ DE de las concentraciones de ATP de los 3 donantes en función de la concentración de H₂O₂.

Como se observa en la Figura 44, el agregado de H₂O₂ a glóbulos rojos frescos no tuvo efecto sobre los niveles de ATP. Por otro lado, en resultados experimentales de la Lic. Florencia Orrico en el marco de su tesis de Doctorado, donde utiliza las mismas concentraciones de H₂O₂, se observa una oxidación completa de Prx2 (Figura S2 Anexo), mostrando que el H₂O₂ efectivamente ingresa al glóbulo rojo y reacciona con esta enzima muy rápidamente ($k = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Manta et al., 2009). En base a estos resultados, se confirma la oxidación de blancos dentro del eritrocito, por lo que las enzimas glucolíticas podrían ser blanco de oxidación y ver alterada su actividad enzimática. El efecto nulo del H₂O₂ sobre el ATP sugiere que no hay ningún efecto en la vía de síntesis, e indica que el GR es robusto frente a este oxidante, suspendido en un medio que contiene glucosa, como el de almacenamiento para transfusión.

La vía glucolítica tiene muchos puntos de regulación, pero el estímulo oxidante producido por el H₂O₂ en determinadas concentraciones no sería suficiente para acelerar el deterioro celular, lo que se sustenta en la robustez de las defensas antioxidantes.

También se evaluó si el H₂O₂ tenía efecto sobre el ATP en GR almacenados para transfusión por 42 días, pensando en acumulación de daño que podría ser agravado por la exposición subsecuente a H₂O₂. Como se muestra en la Figura 45, tampoco se observó un efecto del H₂O₂ sobre los niveles de ATP en GR almacenados para transfusión por 42 días.

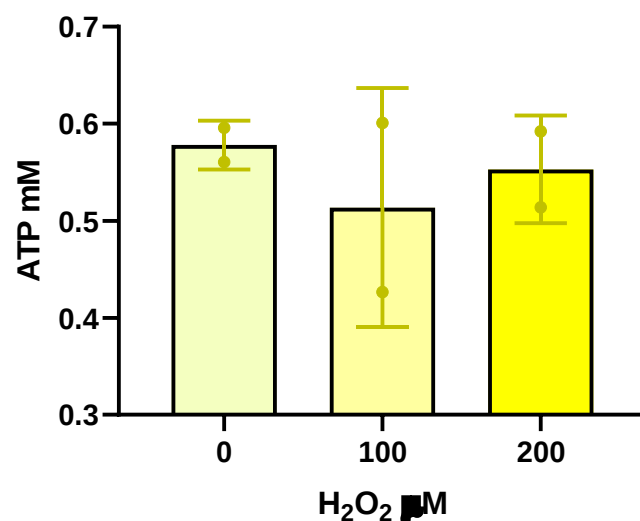


Figura 45. Efecto de H₂O₂ sobre la concentración de ATP en GR almacenados para transfusión. GR almacenados para transfusión por 42 días se expusieron a diferentes concentraciones (100 y 200 μM) de H₂O₂ durante 15 minutos a temperatura ambiente. La concentración de ATP se determinó mediante el método quimioluminiscente. N=2. No se observaron diferencias entre grupos empleando test de ANOVA de una vía.

Si bien no hay una relación directa descrita entre ATP y las defensas antioxidantes, como si la hay a nivel del NADPH, se ha discutido mucho en la literatura el efecto de oxidantes como el H₂O₂ en el metabolismo de la glucosa, por lo que era potencialmente posible que hubiese un efecto tal vez indirecto del H₂O₂. Nuestros resultados indican que tampoco hay una relación indirecta entre las defensas antioxidantes y los niveles de ATP.

Discusión general

La transfusión de concentrados de glóbulos rojos obtenidos de donantes voluntarios continúa siendo hoy en día la principal herramienta terapéutica en pacientes con un déficit de transporte de oxígeno debido a bajos niveles de hemoglobina. Profundizar las investigaciones en este sentido sigue siendo clave para las mejoras de políticas públicas y mayor efectividad en los tratamientos.

La leucorreducción de las unidades de SD ha demostrado a nivel clínico beneficios en la susceptibilidad a infecciones y períodos de internación, entre otros aspectos vinculados a una mayor sobrevida (Dzik & Szczepiorkowski, 2007; Matheis et al., 2001; Simancas-Racines et al., 2019), sumados a los ya conocidos como la reducción en reacciones febriles no hemolíticas, infecciones por CMV y aloinmunización anti-HLA (Bowden et al., 1995; Group, 1997; Sirchia et al., 1987). Sin embargo, la implementación de un sistema de leucorreducción universal implica mayores costos al sistema de salud. Por este motivo es pertinente el estudio de los cambios que ocurren en los glóbulos rojos almacenados para transfusión, sean estos metabólicos, bioquímicos y morfológicos; y cómo incide la presencia de leucocitos remanentes en ellos. Se viene investigando de manera paulatina las modificaciones que sufren los eritrocitos durante sus 42 días de almacenamiento, siendo el desequilibrio redox uno de los aspectos modificados durante la conservación. En este aspecto, la literatura internacional muestra modificaciones en el perfil metabólico y oxidativo. Luego de los primeros días de almacenamiento se comienza a consumir el fosfato, hay acumulación de ácido láctico que provoca disminución de pH (disminución a la que la solución amortiguadora ya no puede hacer frente), y redundando en una disminución tanto de ATP como de 2,3 DPG (Beutler & Wood, 1972). En este sentido, durante este trabajo pudimos confirmar cambios durante el almacenamiento, pero no así entre unidades LR y NLR, a diferencia de algunos trabajos publicados recientemente (Pertinhez et al., 2016). Cabe destacar que nuestra muestra de estudio no fue la esperada en un principio, a consecuencia de la dificultad que representó reclutar donantes de sangre voluntarios durante la crisis sanitaria por el COVID-19. A su vez, se suma la gran variabilidad que representan las muestras biológicas y, en este caso, las diferencias intrínsecas entre los donantes de sangre. Koch y col. introducen en su trabajo el concepto de “edad real” del glóbulo rojo durante el almacenamiento, no limitándolo a cambios genéricos y predecibles, sino también a las condiciones particulares de cada donante, como su alimentación y estilo de vida (Koch et al., 2019).

El almacenamiento influyó sobre los niveles de ATP, aunque recién a tiempos largos. Se observó una disminución en los niveles de ATP recién al día 42, pero al día 21 los niveles eran

esencialmente los mismos que el día 1, en línea con lo reportado en la literatura que ven descenso de ATP a partir del día 14 de almacenamiento (D'Alessandro et al., 2015; Pertinhez et al., 2014). La caída en el ATP al día 42 se puede deber a varios factores como la acidificación de la suspensión de GR, que ocurre debido a la acumulación de lactato (Bennett-Guerrero et al., 2007). El cambio de pH podría enlentecer las actividades enzimáticas de las enzimas de la vía glucolítica. La disminución de ATP afectará los sistemas dependientes de ATP, como las bombas de sodio/potasio, y la bomba de calcio, lo que puede llevar a la pérdida de los gradientes de cationes y alteraciones tanto a nivel de volumen de GR como de la exposición de fosfatidilserina. El efecto en el volumen se daría por entrada de agua por acumulación de iones intracelulares, mientras que la exposición de fosfatidilserina estaría promovida por la actividad de enzimas dependientes de calcio, como *calpaína* y *flipasa*. Sería posible, además, que este cambio en el ATP esté reflejando cambios en el metabolismo de la glucosa que afecte también al NADPH y los sistemas antioxidantes, incluyendo la generación de GSH.

Con respecto a la cuantificación per se de los niveles de ATP en los GR, y comparándolo con la literatura, estamos en el orden de lo reportado por otros autores, donde la mayoría cuantifica cercano a 1 mM (Tabla 3), lo que nos brinda confianza en el método.

Tabla 3. Concentraciones de ATP reportadas en GR.

Referencia	ATP mM
Stocchi (Stocchi et al., 1985)	1.49
Micheli (Micheli et al., 1993)	1.46 ± 0.15
Scholar (Scholar et al., 1973)	1.74 ± 0.16
Dean (Dean et al., 1978)	1.29 ± 13
Hess (Hess & Greenwalt, 2002)	1.30
Karger (Karger et al., 2012)	1.05 ± 0.12*
Zhensong (Xu et al., 2019)	3.50 ± 0.09
Card (Card et al., 1982)	0.95 ± 0.06*
Hess (Hess, 2014)	1.20 ± 0.30*
Chapmann (Chapman et al., 1977)	1.05 ± 0.17

* Calculado, asumiendo 20 mM de Hb (dato publicado en mol/gr Hb).

No se observaron cambios en los niveles de NADPH con el tiempo de almacenamiento (Figura 39). Algunos reportes anteriores han sugerido una disminución importante en el NADPH con el almacenamiento (Roch et al., 2019). A pesar de ellos, resultan interesantes los resultados obtenidos respecto a la interacción del NADPH con ciertas proteínas, y cómo esto podría estar incidiendo en los valores obtenidos. No obstante, es posible que el método que utilizamos aún necesite ajustes y mejoras, por lo que se prevé realizar experimentos adicionales para confirmar los resultados.

Tampoco se observaron cambios en la actividad de la G6PDH, la principal enzima en la ruta de las pentosas fosfato y responsable de la producción de NADPH (Figura 41). En otros trabajos se ha sugerido que la actividad de la ruta de las pentosas fosfato disminuye con el tiempo de almacenamiento y que esto lleva una disminución de los niveles de NADPH y a la menor actividad de las defensas antioxidantes del GR (Peters et al., 2016). Sin embargo, en este trabajo no se observó una caída en la actividad de la G6PDH, coincidente con otros reportes (Francis et al., 2013).

Los resultados de NADPH y G6PDH con el almacenamiento están en contra de un rol importante del estrés oxidativo en el deterioro de los GR conocido como lesiones por almacenamiento. Sin embargo, varios reportes indican la acumulación de Prx2 oxidada con el tiempo, incluso estudios de nuestro laboratorio (Figura S3 de Anexo). Como se mencionó antes, se harán controles adicionales a las medidas de NADPH para confirmar nuestros resultados. De todas maneras, se puede plantear que exista otro mecanismo, involucrando tal vez a la tiorredoxina, necesaria para la reducción del Prx2.

Como se puede apreciar, en la literatura internacional tampoco hay acuerdo en las observaciones y discusiones del efecto del almacenamiento sobre G6PDH y NADPH, lo que invita a continuar en esta línea de investigación, intentando dilucidar los mecanismos involucrados en el metabolismo redox de los GR almacenados.

Las defensas antioxidantes de los GR son muy robustas, principalmente por la Prx2 que es muy reactiva y muy abundante (Orrico et al., 2018). Lo interesante es que la Prx2 oxidada se ha identificado como una proteína capaz de oxidar otras proteínas blanco y de esta manera transducir señales. Consideramos al inicio de este proyecto que la adición de oxidante H_2O_2 , que oxida principalmente a la Prx2, produciría Prx2 oxidada que entonces podría interactuar con proteínas blanco, y provocar cambios en los glóbulos rojos, como en el metabolismo de la glucosa. Por ello también se hicieron experimentos de exposición de glóbulos rojos frescos al H_2O_2 y análisis de ATP, con el fin de valorar este mecanismo. No se observaron cambios en las concentraciones de ATP de los GR expuestos a diferentes concentraciones de H_2O_2 , pero valoramos estos resultados como preliminares con la intención de profundizar más en este mecanismo.

Una de las hipótesis planteadas en la literatura es que pudiese haber una “reprogramación metabólica” conduciendo a menores niveles de ATP porque la glucosa se destinaba a reducir $NADP^+$, y de esta manera mantener la Prx2 reducida, así como los niveles de GSH (Möller et al., 2022; Orrico et al., 2018), que como dijimos se ven afectados en el almacenamiento (Amen et

al., 2017; Bayer et al., 2015). Nuestros resultados van en la línea de la hipótesis de la reprogramación metabólica durante el almacenamiento porque se observó una disminución en los niveles de ATP en el día 42, mientras que no se observaron cambios en los niveles de NADPH, indicando que se destina más glucosa a la producción de NADPH que a la producción de ATP. No obstante, cuando se desafió a GR frescos con el oxidante H_2O_2 , no se observaron cambios en los niveles de NADPH. Por lo tanto, la reprogramación metabólica observada en el almacenamiento no se debería a modificaciones oxidativas, sino a otros factores (cambio de pH, concentración de iones, aumento de actividad de proteasas, etc.).

Tampoco se podría descartar la modificación oxidativa por oxidantes diferentes al H_2O_2 que presentasen otra reactividad y alterasen las actividades enzimáticas y el metabolismo de la glucosa.

Conclusiones

1. Se optimizaron dos métodos confiables para el procesamiento, extracción y cuantificación de ATP en glóbulos rojos de unidades de SD leucorreducidas y no leucorreducidas almacenada para transfusión.
2. Se optimizó un método que permite procesar, extraer y cuantificar el dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (NADP) en su estado reducido y oxidado.
3. Se determinó la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa de glóbulos rojos de unidades de SD leucorreducidas y no leucorreducidas almacenadas para transfusión.
4. Se cuantificaron las concentraciones de ATP, NADPH, NADP⁺ y actividad de la enzima G6PDH de donantes voluntarios de sangre que acudieron al Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina.
5. Se observó una disminución en los niveles de ATP al día 42 de almacenamiento, pero no de NADPH o de actividad de G6PDH.
6. El tratamiento de GR frescos o del día 42 con peróxido de hidrógeno no tuvo ningún efecto en las concentraciones de ATP.

Perspectivas

En este trabajo encontramos resultados que son disonantes con parte de la literatura internacional. Para terminar con este trabajo y llegar a publicar los resultados debemos verificar el correcto funcionamiento del método de cuantificación de NADPH.

Otro punto interesante a profundizar es la unión de NADPH a proteínas en el GR. Está bien documentada la unión fuerte de NADPH a catalasa, la cual está presente en una concentración de 11 μM en GR. Entonces, es posible que otras proteínas también unan al NADPH y actúen como reguladores adicionales del metabolismo redox. Sería interesante determinar cuáles proteínas del GR, cómo, y con qué finalidad unen NADPH.

También sería interesante hacer estudios de metabolómica. Cuando se hace metabolómica por resonancia magnética nuclear se pueden cuantificar los metabolitos más abundantes del GR, e identificar acumulación de intermediarios (Pertinhez et al., 2014). Si bien no puede cuantificar metabolitos de baja abundancia como NADPH, puede indicar el reparto de la glucosa entre glucólisis y ruta de las pentosas fosfato. Nos interesa en particular estudiar si hay algún efecto del oxidante H_2O_2 en el metabolismo de la glucosa, y esta aproximación nos permitiría cuantificar muchos metabolitos a la vez y potencialmente identificar enzimas que son inhibidas por el oxidante.

ANEXO

Cuantificación de ATP de GR de unidades almacenadas para transfusión por diferentes días, leucorreducidas y no leucorreducidas, de diferentes donantes.

Tabla S1. Datos obtenidos de la muestra 1 (N° 237).

DIA	NLR			LR		
	AUC	Moles	[ATP] mM	AUC	Moles	[ATP] mM
1	1775	2.24E-09	0.74	2636	3.33E-09	1.10
7	2527	3.20E-09	1.05	3213	4.07E-09	1.34
14	2989	3.78E-09	1.25	2215	2.80E-09	0.92
21	2338	2.96E-09	0.97	1680	2.12E-09	0.70
42	733	0.92E-09	0.30	968	1.21E-09	0.40

Tabla S2. Datos obtenidos de la muestra 2 (N° 1356).

DIA	NLR			LR		
	AUC	Moles	[ATP] mM	AUC	Moles	[ATP] mM
1	3071	3.89E-09	1.28	1852	2.34E-09	0.77
7	2097	2.65E-09	0.87	1901	2.40E-09	0.79
14	2715	3.44E-09	1.13	1843	2.33E-09	0.77
21	3013	3.81E-09	1.26	2599	3.29E-09	1.08
42	1635	2.06E-09	0.68	1623	2.05E-09	0.67

Tabla S3. Datos obtenidos de la muestra 3 (N° 1798).

DIA	NLR			LR		
	AUC	Moles	[ATP] mM	AUC	Moles	[ATP] mM
1	1590	2.00E-09	0.66	2197	2.78E-09	0.92
7	2024	2.56E-09	0.84	1931	2.44E-09	0.80
14	2473	3.13E-09	1.03	2962	3.75E-09	1.24
21	2484	3.14E-09	1.04	2987	3.78E-09	1.25
42	1209	1.52E-09	0.50	906	1.14E-09	0.37

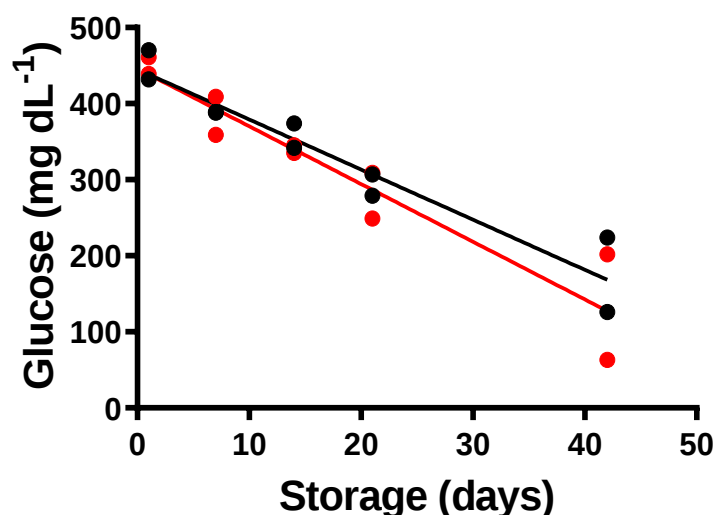


Figura S1. Concentración de la glucosa en el medio de conservación de los glóbulos rojos almacenados para transfusión en los días 1, 7, 14 21 y 42. Resultados obtenidos por la Dra. Cecilia Acosta en el marco de su tesis de maestría.

Oxidación de la Prx2 de GR expuestos a H_2O_2 .

Como se muestra en la Figura 2 Anexo, el H_2O_2 externo es capaz de oxidar la Prx2 intraeritrocitaria, y se puede calcular una concentración intracelular de 255 μM Prx2. Las relaciones de concentración de H_2O_2 y hematocrito utilizadas en los experimentos contemplan una oxidación parcial o completa de la Prx2. Resultados obtenidos por la Lic. Florencia Orrico en el marco de su tesis de doctorado.

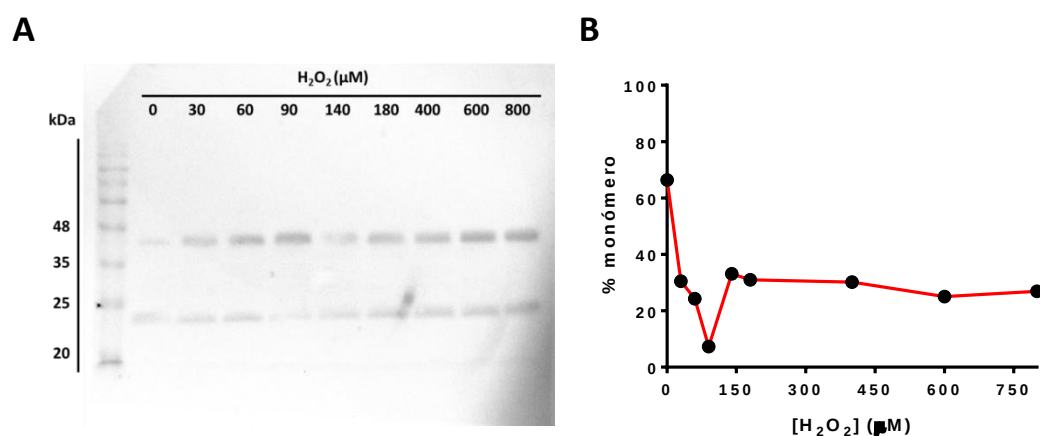


Figura S2. A. Western blot realizado con anticuerpo anti Prx2 y revelado con anticuerpo secundario anti ratón IRDye800. Se sembraron GR incubados con concentraciones crecientes de H_2O_2 . El hematocrito de la suspensión fue chequeado determinando la concentración de oxiHb (absorbancia a 577 nm), permitiendo estimar una concentración de 140 μM Prx2 en las muestras. Esto equivale a un aproximado de 255 μM Prx2 en el interior de los GR. **B.** Porcentaje de Prx2 monomérica del total de Prx2 en GR incubados con concentraciones crecientes de H_2O_2 en HBSS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se calculó a partir del análisis de intensidad de las bandas del western blot

mostrado en la figura A (ImageJ). El aumento de Prx2 monomérica con la concentración de H₂O₂ se debe a la sobreoxidación de la cisteína peroxidática de la Prx2, que le impide formar el disulfuro con la subunidad vecina.

Efecto del almacenamiento de GR para transfusión en los niveles basales de metabolitos y actividades enzimáticas.

Cambios en el estado de oxidación de la Prx2 con el almacenamiento

Como se aprecia en la Figura 3 Anexo, hay un aumento progresivo de la acumulación de Prx2 oxidada en los GR almacenados para transfusión, que llega hasta el 50% a los 42 días de almacenamiento, indicando que efectivamente los GR almacenados para transfusión sufren modificaciones oxidativas.

Lo que aún no podemos responder es a que se debe esta oxidación, si es a un aumento de los oxidantes o del metabolismo. Resultados obtenidos por la Lic. Florencia Orrico en el marco de su tesis de doctorado.

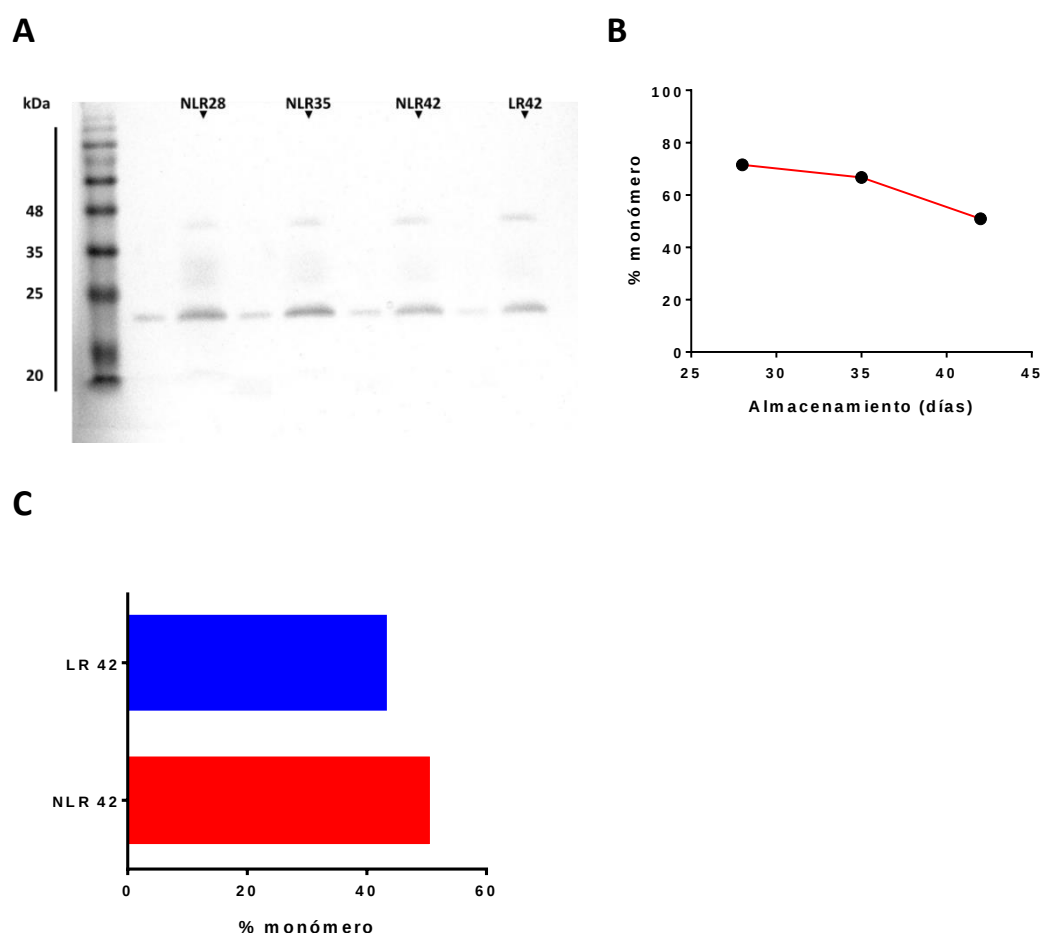


Figura S3. Oxidación de Prx2 en el almacenamiento de GR para transfusión. **A.** Western blot realizado con anticuerpo anti Prx2 y revelado con anticuerpo secundario anti ratón IRDye800. En los carriles marcados se muestra, de izquierda a derecha, GR no leucorreducidos almacenados por 28, 35 y 42 días, y GR leucorreducidos almacenados por 42 días. **B.** Porcentaje de Prx2 monomérica del total de Prx2 en

GR no leucorreducidos entre 28 y 42 días. Se calculó a partir del análisis de intensidad de las bandas del western blot mostrado en la figura 4A. **C.** Porcentaje de Prx2 monomérica del total de Prx2 en GR no leucorreducidos (rojo) y leucorreducidos (azul) entre 28 y 42 días. También obtenido del análisis de intensidad de las bandas de la figura 4A (ImageJ).

Resultados obtenidos de GR de unidades almacenadas para transfusión por diferentes días, leucorreducidas y no leucorreducidas, de diferentes donantes.

Tabla S4. Concentraciones de los metabolitos estudiados en este trabajo.									
Dia	n	[ATP] mM		[NADP] ^t μM		[NADPH] μM		G6PDH Ug ⁻¹	
		NLR	LR	NLR	LR	NLR	LR	NLR	LR
1	3	0.89 ± 0.34	0.93 ± 0.16	59 ± 3	44 ± 17	96 ± 41	121.3 ± 18.1	2.68 ± 0.36	2.31 ± 0.12
7	3	0.92 ± 0.11	0.98 ± 0.31	40 ± 23	28 ± 17	119 ± 95	93.6 ± 22.2	2.22 ± 0.27	2.18 ± 0.16
14	3	1.14 ± 0.11	0.98 ± 0.24	33 ± 10	23 ± 9	91 ± 71	96.4 ± 35.9	2.20 ± 0.17	2.15 ± 0.23
21	3	1.09 ± 0.15	1.01 ± 0.28	30 ± 14	34 ± 18	85 ± 15	154 ± 77.9	2.39 ± 0.19	2.20 ± 0.19
42	3	0.49 ± 0.19	0.48 ± 0.17	33 ± 18	31 ± 8	80 ± 12	115 ± 57	2.51 ± 0.06	2.23 ± 0.20

Referencias

- Al-Ali, A. K. (2002). Pyridine nucleotide redox potential in erythrocytes of Saudi subjects with sickle cell disease. *Acta haematologica*, 108(1), 19-22.
- Allen, B. W., Stamler, J. S., & Piantadosi, C. A. (2009). Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation. *Trends in molecular medicine*, 15(10), 452-460.
- Amen, F., Machin, A., Tourino, C., Rodriguez, I., Denicola, A., & Thomson, L. (2017). N-acetylcysteine improves the quality of red blood cells stored for transfusion. *Archives of biochemistry and biophysics*, 621, 31-37.
- Arbona Castaño, C., Bautista-Gili, A., Castellá Cahiz, M., Castrillo Fernández, A., Fernández Álvarez, C., Fernández Herrera, M., & Tena Aniés, J. (2015). Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos. In: SETS.
- Association, W. M. (2001). World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(4), 373.
- Bayer, S. B., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2015). Accumulation of oxidized peroxiredoxin 2 in red blood cells and its prevention. *Transfusion*, 55(8), 1909-1918.
- Bennett-Guerrero, E., Veldman, T. H., Doctor, A., Telen, M. J., Ortel, T. L., Reid, T. S., Mulherin, M. A., Zhu, H., Buck, R. D., & Califf, R. M. (2007). Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 17063-17068.
- Beutler, E., & Wood, L. A. (1972). Preservation of red cell 2, 3-DPG and viability in bicarbonate-containing medium: the effect of blood-bag permeability. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 80(5), 723-728.
- Bogdanova, A., Makhro, A., Wang, J., Lipp, P., & Kaestner, L. (2013). Calcium in red blood cells—a perilous balance. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9848-9872.
- Bowden, R. A., Slichter, S. J., Sayers, M., Weisdorf, D., Cays, M., Schoch, G., Banaji, M., Haake, R., Welk, K., & Fisher, L. (1995). A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant [see comments].
- Breton-Romero, R., & Lamas, S. (2014). Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox biology*, 2, 529-534.
- Brissot, P., Pietrangelo, A., Adams, P. C., De Graaff, B., McLaren, C. E., & Loréal, O. (2018). Haemochromatosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-15.
- Bryk, A. H., & Wiśniewski, J. R. (2017). Quantitative analysis of human red blood cell proteome. *Journal of proteome research*, 16(8), 2752-2761.
- Campanella, M. E., Chu, H., & Low, P. S. (2005). Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), 2402-2407.
- Cappellini, M. D., & Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The lancet*, 371(9606), 64-74.
- Card, R., Mohandas, N., Perkins, H., & Shohet, S. (1982). Deformability of stored red blood cells. Relationship to degree of packing. *Transfusion*, 22(2), 96-101.
- CH, L. (2008). Berndt C. Holmgren A. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta*, 1780, 1304-1317.
- Chapman, R., Rettberg, W., & Dougherty, S. (1977). Effect of initial storage at room temperature on human red blood cell ATP, 2, 3-DPG, and viability. *Transfusion*, 17(2), 147-150.
- Cheah, F. C., Peskin, A. V., Wong, F. L., Ithnin, A., Othman, A., & Winterbourn, C. C. (2014). Increased basal oxidation of peroxiredoxin 2 and limited peroxiredoxin recycling in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes from newborn infants. *The FASEB Journal*, 28(7), 3205-3210.

- Contreras, M. (2009). *ABC of Transfusion*. John Wiley & Sons.
- D'Alessandro, A., Kriebardis, A. G., Rinalducci, S., Antonelou, M. H., Hansen, K. C., Papassideri, I. S., & Zolla, L. (2015). An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion*, 55(1), 205-219.
- Daleke, D. L. (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Current opinion in hematology*, 15(3), 191-195.
- Daniels, G., & Bromilow, I. (2011). *Essential guide to blood groups*. John Wiley & Sons.
- Dean, B. M., Perrett, D., & Sensi, M. (1978). Changes in nucleotide concentrations in the erythrocytes of man, rabbit and rat during short-term storage. *Biochemical and biophysical research communications*, 80(1), 147-154.
- Decaro J, L. F., Magri M. (2010). *Historia de la Medicina Transfusional*.
- Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M., & Yan, N. (2014). Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*, 510(7503), 121-125.
- Denis, M. L., Lefevre, S., Alvarez, C. L., Lauri, N., Enrique, N., Rinaldi, D. E., Gonzalez-Lebrero, R., Vecchio, L., Espelt, M. V., & Stringa, P. (2019). Regulation of extracellular ATP of human erythrocytes treated with α -hemolysin. Effects of cell volume, morphology, rheology and hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1866(5), 896-915.
- Devlin, T. M. (2019). *Bioquímica con aplicaciones clínicas (Obra completa): Libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverté.
- Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a011601.
- Dzik, W. H., & Szczepiorkowski, Z. M. (2007). Leukocyte-Reduced Products. In *Blood Banking and Transfusion Medicine* (pp. 359-382). Elsevier.
- Ferrer-Sueta, G., & Radi, R. (2009). Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS chemical biology*, 4(3), 161-177.
- Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G., & Ursini, F. (2011). A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling*, 15(3), 763-780.
- Francis, R. O., Jhang, J., Hendrickson, J. E., Zimring, J. C., Hod, E. A., & Spitalnik, S. L. (2013). Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient red blood cell units in a metropolitan transfusion service. *Transfusion*, 53(3), 606-611.
- Gaetani, G. F., Ferraris, A. M., Sanna, P., & Kirkman, H. N. (2005). A novel NADPH:(bound) NADP⁺ reductase and NADH:(bound) NADP⁺ transhydrogenase function in bovine liver catalase. *Biochemical Journal*, 385(3), 763-768.
- Garratty, G., Dzik, W., Issitt, P., Lublin, D., Reid, M., & Zelinski, T. (2000). Terminology for blood group antigens and genes—historical origins and guidelines in the new millennium. *Transfusion*, 40(4), 477-489.
- Gleitzmann, J., Raab, A., Schulze, D., Wätzig, H., Feldmann, J., & Swart, C. (2016). Accurate and precise quantification of Cu, Zn-SOD in human red blood cells using species-specific double and triple IDMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(9), 1922-1928.
- Group, T. t. R. A. t. P. S. (1997). Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *New England Journal of Medicine*, 337(26), 1861-1870.
- Hess, J. (2014). Measures of stored red blood cell quality. *Vox sanguinis*, 107(1), 1-9.
- Hess, J. R., & Greenwalt, T. G. (2002). Storage of red blood cells: new approaches. *Transfusion medicine reviews*, 16(4), 283-295.
- Huisjes, R., Bogdanova, A., Van Solinge, W. W., Schiffelers, R. M., Kaestner, L., & Van Wijk, R. (2018). Squeezing for life—properties of red blood cell deformability. *Frontiers in physiology*, 9, 656.
- Inmunohematología, A. A. d. H. e. (2007). Recomendaciones para la leucorreducción de componentes celulares. *Asoc. Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología*, XXXIII, 277-283.

- ISBT. (2023). *Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology*.
<https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>
- Joshi, M. S., Ferguson Jr, T. B., Han, T. H., Hyduke, D. R., Liao, J. C., Rassaf, T., Bryan, N., Feelisch, M., & Lancaster Jr, J. R. (2002). Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10341-10346.
- Karger, R., Lukow, C., & Kretschmer, V. (2012). Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 39(4), 277-282.
- Keohane, E. M., Otto, C. N., & Walenga, J. M. (2019). *Rodak's hematology-e-book: clinical principles and applications*. Elsevier Health Sciences.
- Kirkman, H., Gaetani, G., Clemons, E., & Marenzi, C. (1975). Red cell NADP+ and NADPH in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 55(4), 875-878.
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (1984). Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(14), 4343-4347.
- Kirkman, H. N., Galiano, S., & Gaetani, G. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *Journal of Biological Chemistry*, 262(2), 660-666.
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., & Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH: kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13908-13914.
- Klein, H. G., Spahn, D. R., & Carson, J. L. (2007). Red blood cell transfusion in clinical practice. *The Lancet*, 370(9585), 415-426.
- Klemm, A., Steiner, T., Flötgen, U., Cumme, G. A., & Horn, A. (1997). [15] Determination, purification, and characterization of α -NADH and α -NADPH. In *Methods in enzymology* (Vol. 280, pp. 171-186). Elsevier.
- Koch, C. G., Duncan, A. I., Figueroa, P., Dai, L., Sessler, D. I., Frank, S. M., Ness, P. M., Mihaljevic, T., & Blackstone, E. H. (2019). Real age: red blood cell aging during storage. *The Annals of Thoracic Surgery*, 107(3), 973-980.
- Langdon, R. G. (1966). [24] Glucose 6-phosphate dehydrogenase from erythrocytes. In *Methods in enzymology* (Vol. 9, pp. 126-131). Elsevier.
- Lewis, I. A., Campanella, M. E., Markley, J. L., & Low, P. S. (2009). Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18515-18520.
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3143-3153.
- Lux IV, S. E. (2016). Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(2), 187-199.
- Luzzatto, L., & Arese, P. (2018). Favism and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *New England Journal of Medicine*, 378(1), 60-71.
- Mansouri, A., & Lurie, A. A. (1993). Methemoglobinemia. *American journal of hematology*, 42(1), 7-12.
- Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., & Denicola, A. (2009). The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Archives of biochemistry and biophysics*, 484(2), 146-154.
- Marks, P. A. (1966). [25] Glucose 6-phosphate dehydrogenase—Clinical aspects. In *Methods in enzymology* (Vol. 9, pp. 131-137). Elsevier.
- Matheis, G., Scholz, M., Simon, A., Dzembali, O., & Moritz, A. (2001). Leukocyte filtration in cardiac surgery: a review. *Perfusion*, 16(5), 361-370.
- Mbanefo, E. C., Ahmed, A. M., Titouna, A., Elmaraezy, A., Trang, N. T. H., Phuoc Long, N., Hoang Anh, N., Diem Nghi, T., The Hung, B., & Van Hieu, M. (2017). Association of

- glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 7(1), 45963.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- McMahon, T. J., Darrow, C. C., Hoehn, B. A., & Zhu, H. (2021). Generation and export of red blood cell ATP in health and disease. *Frontiers in physiology*, 12, 754638.
- Medicines, E. D. f. t. Q. o. (2020). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components: recommendation no. R (95) 15. (No Title).
- Micheli, V., Simmonds, H., Bari, M., & Pompucci, G. (1993). HPLC determination of oxidized and reduced pyridine coenzymes in human erythrocytes. *Clinica chimica acta*, 220(1), 1-17.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(10), 3939-3948.
- Möller, M. N., Cuevasanta, E., Orrico, F., Lopez, A. C., Thomson, L., & Denicola, A. (2019). Diffusion and transport of reactive species across cell membranes. *Bioactive lipids in health and disease*, 3-19.
- Möller, M. N., Orrico, F., Villar, S. F., López, A. C., Silva, N., Donzé, M., Thomson, L., & Denicola, A. (2022). Oxidants and antioxidants in the redox biochemistry of human red blood cells. *ACS omega*, 8(1), 147-168.
- Montel-Hagen, A., Kinet, S., Manel, N., Mongellaz, C., Prohaska, R., Battini, J.-L., Delaunay, J., Sitbon, M., & Taylor, N. (2008). Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. *Cell*, 132(6), 1039-1048.
- Mullen, L., Hanschmann, E.-M., Lillig, C. H., Herzenberg, L. A., & Ghezzi, P. (2015). Cysteine oxidation targets peroxiredoxins 1 and 2 for exosomal release through a novel mechanism of redox-dependent secretion. *Molecular Medicine*, 21, 98-108.
- Nakamura, M., Maki, S., Amano, Y., Ohkita, Y., Niwa, K., Hirano, T., Ohmiya, Y., & Niwa, H. (2005). Firefly luciferase exhibits bimodal action depending on the luciferin chirality. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(2), 471-475.
- Ng, M. S. Y., Ng, A. S. Y., Chan, J., Tung, J.-P., & Fraser, J. F. (2015). Effects of packed red blood cell storage duration on post-transfusion clinical outcomes: a meta-analysis and systematic review. *Intensive care medicine*, 41, 2087-2097.
- Niki, E. (1987). Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 498, 186-199.
- Nisselbaum, J., & Green, S. (1969). A simple ultramicro method for determination of pyridine nucleotides in tissues. *Analytical biochemistry*, 27(2), 212-217.
- Obrador, R., Musulin, S., & Hansen, B. (2015). Red blood cell storage lesion. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 25(2), 187-199.
- Ogasawara, Y., Funakoshi, M., & Ishii, K. (2009). Determination of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate concentration using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: ratio of the reduced form as a biomarker of oxidative stress. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(11), 1819-1823.
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81(11), 2844-2853. <https://doi.org/10.1182/blood.V81.11.2844.2844>
- Ogawa, M. (1994). Hematopoiesis. *Journal of allergy and clinical immunology*, 94(3), 645-650.
- Organization, W. H. (2015). *The selection and use of essential medicines. Twentieth report of the WHO Expert Committee 2015 (including 19th WHO Model List of Essential Medicines and 5th WHO Model List of Essential Medicines for Children)*. World Health Organization.
- Orrico, F., Lopez, A. C., Saliwonczyk, D., Acosta, C., Rodriguez-Grecco, I., Mouro-Chanteloup, I., Ostuni, M. A., Denicola, A., Thomson, L., & Möller, M. N. (2022). The permeability of human red blood cell membranes to hydrogen peroxide is independent of aquaporins. *Journal of Biological Chemistry*, 298(1).

- Orrico, F., Möller, M. N., Cassina, A., Denicola, A., & Thomson, L. (2018). Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H₂O₂ consumption by red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 121, 231-239.
- Padayatty, S. J., & Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral diseases*, 22(6), 463-493.
- Pertinhez, T. A., Casali, E., Baroni, F., Berni, P., Baricchi, R., & Spisni, A. (2016). A comparative study of the effect of leukoreduction and pre-storage leukodepletion on red blood cells during storage. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3, 13.
- Pertinhez, T. A., Casali, E., Lindner, L., Spisni, A., Baricchi, R., & Berni, P. (2014). Biochemical assessment of red blood cells during storage by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Identification of a biomarker of their level of protection against oxidative stress. *Blood Transfusion*, 12(4), 548.
- Peters, A. L., van Bruggen, R., de Korte, D., Van Noorden, C. J., & Vlaar, A. P. (2016). Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity decreases during storage of leukoreduced red blood cells. *Transfusion*, 56(2), 427-432.
- Puchulu-Campanella, E., Chu, H., Anstee, D. J., Galan, J. A., Tao, W. A., & Low, P. S. (2013). Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 848-858.
- Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), 5839-5848.
- Reid, M. E., Lomas-Francis, C., & Olsson, M. L. (2012). *The blood group antigen factsbook*. Academic press.
- Roch, A., Magon, N. J., Maire, J., Suarna, C., Ayer, A., Waldvogel, S., Imhof, B. A., Koury, M. J., Stocker, R., & Schapira, M. (2019). Transition to 37 C reveals importance of NADPH in mitigating oxidative stress in stored RBCs. *JCI insight*, 4(21).
- Roh, M. E., Oyet, C., Oriquiriza, P., Wade, M., Mwanga-Amumpaire, J., Yap Boum, I., Kiwanuka, G. N., & Parikh, S. (2016). Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency using three detection methods: a cross-sectional survey in southwestern Uganda. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95(5), 1094.
- Romero, N., Radi, R., Linares, E., Augusto, O., Detweiler, C. D., Mason, R. P., & Denicola, A. (2003). Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite: isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44049-44057.
- Rothman, J. E., & Lenard, J. (1977). Membrane Asymmetry: The nature of membrane asymmetry provides clues to the puzzle of how membranes are assembled. *Science*, 195(4280), 743-753.
- Reglamento Técnico Mercosur Medicina Transfusional, (2001).
- Sans-Sabrafen, J., Raebel, C. B., & Corrons, J. V. (2007). *Hematología clínica*. Elsevier.
- Scholar, E., Brown, P. R., Parks Jr, R., & Calabresi, P. (1973). Nucleotide profiles of the formed elements of human blood determined by high-pressure liquid chromatography. *Blood*, 41(6), 927-936.
- Shukla, R., Patel, T., & Gupte, S. (2015). Release of cytokines in stored whole blood and red cell concentrate: Effect of leukoreduction. *Asian journal of transfusion science*, 9(2), 145.
- Signorelli, S., Möller, M. N., Coitiño, E. L., & Denicola, A. (2011). Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 512(2), 190-196.
- Simancas-Racines, D., Arevalo-Rodriguez, I., Urrutia, G., Buitrago-Garcia, D., Núñez-González, S., Martínez-Zapata, M. J., Madrid, E., Bonfill, X., & Hidalgo-Ottolenghi, R. (2019). Leukodepleted packed red blood cells transfusion in patients undergoing major cardiovascular surgical procedure: systematic review and meta-analysis. *Cardiology Research and Practice*, 2019.

- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Sirchia, G., Rebutta, P., Parravicini, A., Carnelli, V., Gianotti, G., & Bertolini, F. (1987). Leukocyte depletion of red cell units at the bedside by transfusion through a new filter. *Transfusion*, 27(5), 402-405.
- Stefanovic, M., Puchulu-Campanella, E., Kodippili, G., & Low, P. S. (2013). Oxygen regulates the band 3–ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. *Biochemical Journal*, 449(1), 143-150.
- Steinberg, M. H., Benz Jr, E. J., Adewoye, A. H., & Ebert, B. L. (2018). Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. *Hematology*, 447-457.
- Steiner, L. A., & Gallagher, P. G. (2007). Erythrocyte disorders in the perinatal period. *Seminars in perinatology*,
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., & Tauqeer Alam, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927-963.
- Stocchi, V., Cucchiari, L., Magnani, M., Chiarantini, L., Palma, P., & Crescentini, G. (1985). Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Analytical biochemistry*, 146(1), 118-124.
- Stuehr, D. J., & Haque, M. M. (2019). Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *British journal of pharmacology*, 176(2), 177-188.
- Svetina, S. (2020). Theoretical bases for the role of red blood cell shape in the regulation of its volume. *Frontiers in physiology*, 11, 544.
- Terada, T., Oshida, T., Nishimura, M., Maeda, H., Hara, T., Hosomi, S., Mizoguchi, T., & Nishihara, T. (1992). Study on human erythrocyte thioltransferase: comparative characterization with bovine enzyme and its physiological role under oxidative stress. *The Journal of Biochemistry*, 111(5), 688-692.
- Toyoshima, C., Kanai, R., & Cornelius, F. (2011). First crystal structures of Na⁺, K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Structure*, 19(12), 1732-1738.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 4-15.
- Tzounakas, V. L., Georgatzakou, H. T., Kriebardis, A. G., Papageorgiou, E. G., Stamoulis, K. E., Foudoulaki-Papazizos, L. E., Antonelou, M. H., & Papassideri, I. S. (2015). Uric acid variation among regular blood donors is indicative of red blood cell susceptibility to storage lesion markers: a new hypothesis tested. *Transfusion*, 55(11), 2659-2671.
- Tzounakas, V. L., Stamoulis, K. E., Anastasiadi, A. T., Papassideri, I. S., Kriebardis, A. G., Rinalducci, S., & Antonelou, M. H. (2021). Leukoreduction makes a difference: A pair proteomics study of extracellular vesicles in red blood cell units. *Transfusion and Apheresis Science*, 60(3), 103166.
- Umbreit, J. (2007). Methemoglobin—it's not just blue: a concise review. *American journal of hematology*, 82(2), 134-144.
- Van Wijk, R., & Van Solinge, W. W. (2005). The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*, 106(13), 4034-4042.
- Van Zwieten, R., Verhoeven, A. J., & Roos, D. (2014). Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, 377-386.
- Vega-Rodríguez, J., Franke-Fayard, B., Dinglasan, R. R., Janse, C. J., Pastrana-Mena, R., Waters, A. P., Coppens, I., Rodríguez-Orengo, J. F., Jacobs-Lorena, M., & Serrano, A. E. (2009). The glutathione biosynthetic pathway of Plasmodium is essential for mosquito transmission. *PLoS pathogens*, 5(2), e1000302.

- VMNIS, O. (2007). Sistema de Información Nutricional sobre Vitaminas y Minerales. *Ginebra: OMS*.
- Wagner, T. C., & Scott, M. D. (1994). Single extraction method for the spectrophotometric quantification of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes. *Analytical biochemistry*, 222(2), 417-426.
- Wang, J., & Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemical Journal*, 434(3), 365-381.
- Wang, X. T., Au, S. W., Lam, V. M., & Engel, P. C. (2002). Recombinant human glucose-6-phosphate dehydrogenase: Evidence for a rapid-equilibrium random-order mechanism. *European journal of biochemistry*, 269(14), 3417-3424.
- Wayner, D., Burton, G., Ingold, K., Barclay, L., & Locke, S. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 924(3), 408-419.
- Worthington, D. J., & Rosemeyer, M. A. (1976). Glutathione reductase from human erythrocytes: catalytic properties and aggregation. *European journal of biochemistry*, 67(1), 231-238.
- Xiong, Y., Xiong, Y., Wang, Y., Wang, Z., Zhang, A., Zhao, N., Zhao, D., Yu, Z., Wang, Z., & Yi, J. (2018). Inhibition of glutathione synthesis via decreased glucose metabolism in stored RBCs. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(5), 2172-2184.
- Xu, Z., Dou, W., Wang, C., & Sun, Y. (2019). Stiffness and ATP recovery of stored red blood cells in serum. *Microsystems & Nanoengineering*, 5(1), 51.
- Yawata, Y. (2006). *Cell membrane: the red blood cell as a model*. John Wiley & Sons.
- Zerez, C. R., Lee, S. J., & Tanaka, K. R. (1987). Spectrophotometric determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes using a single extraction procedure. *Analytical biochemistry*, 164(2), 367-373.
- Zhong, L., Arnér, E. S., & Holmgren, A. (2000). Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 5854-5859.
- Zwaal, R. F. A., & Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood*, 89(4), 1121-1132.
<https://doi.org/10.1182/blood.V89.4.1121>