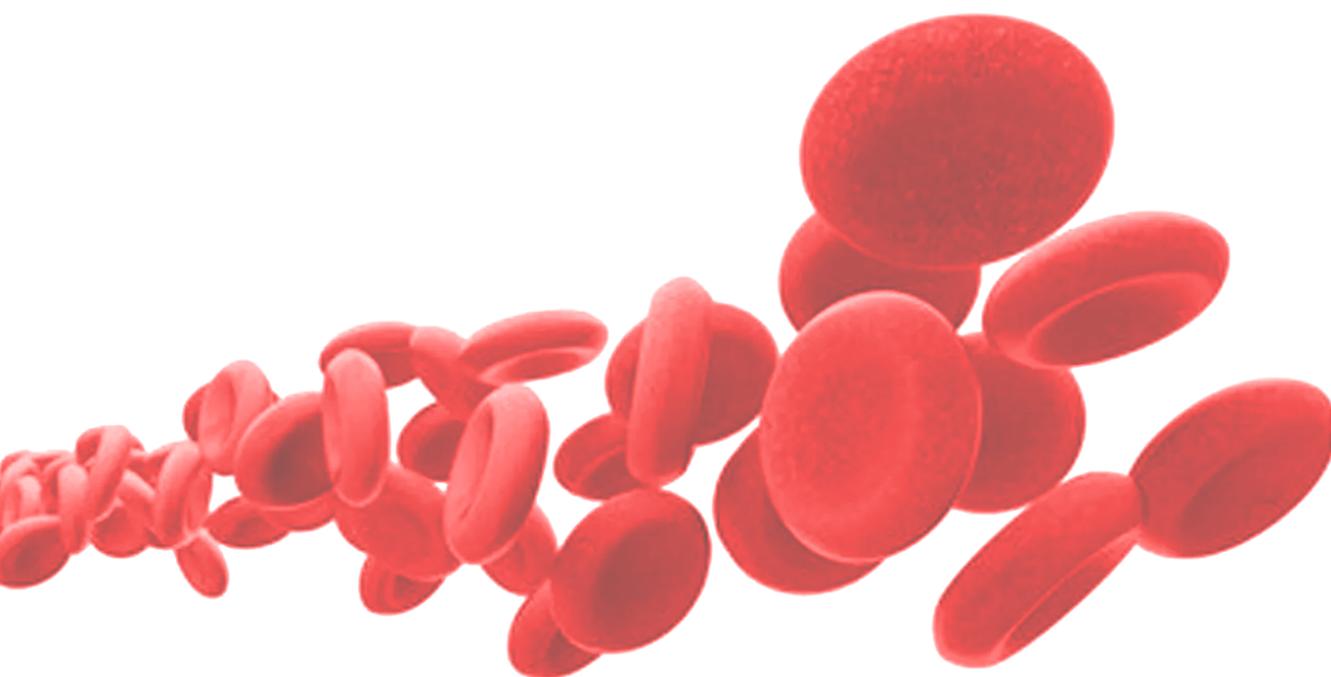


# Efectos del peróxido de hidrógeno en el metabolismo de glóbulos rojos humanos y análisis de variantes de hemoglobina

*Tesina de Grado - Licenciatura en Bioquímica*



**Marcel Donzé**

**Orientador: Matías Möller**

**Co-orientadora: Florencia Orrico**

*Laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica*

*Montevideo, 2023*

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi familia por el aguante de siempre, pero en especial a mis dos amores más grandes, mamá y abu, por enseñarme a creer en mí y mostrarme que existen otros caminos en la vida. La forma en que nutrieron mi curiosidad desde la niñez con tanto amor y paciencia fueron indispensables para romper las limitaciones de un entorno hostil, ustedes son mi faro.

A Mati y Flor por acompañarme en mis primeros pasos académicos con tanta disposición. Además de la excelencia académica con la que me instruyeron, los caracteriza una calidez humana invaluable. Fue, es y será un placer seguir aprendiendo de ustedes.

A todos los compañeros y compañeras de los Laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica por abrirme las puertas y hacer tan amena la actividad científica, contribuyendo a fortalecer mi convicción y amor por la ciencia. Day, Gerardo, Martina, Ana Clara, Belén, Bruno, Janina, Nico, Tincho, Ana, Bea, Ernesto, Leonor, Lu y Seba; estar rodeado de ustedes es una inspiración que me impulsa a seguir aprendiendo constantemente.

A Pau y toda su familia por acompañarme y permitirme ser uno más.

A mis facuamigos que me hicieron adoptar los pasillos de la facu como una segunda casa. Especialmente quienes me acompañaron tantas horas de clases, laboratorios y ping-pongs. Lu, Maby, Romi, Martu, Nicos, Facu, Juan, Giu, Belu, Isa, Cami, Joaco, Sancho y Santi, el título más importante que obtuve en la facu es el de amigo de ustedes.

A Silvia, Aurora y Ana por la mano gigantesca que me tendieron.

A la querida Facultad de Ciencias por los años de formación académica y humana.

A CSIC por financiar el proyecto en el cual se enmarca esta tesina.

# ÍNDICE

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>GENERALIDADES DE LOS GLÓBULOS ROJOS</b>	<b>6</b>
Características biológicas	6
Eritropoyesis	7
Funciones	8
<b>PROTEÍNAS PRINCIPALES</b>	<b>9</b>
Anhidrasa carbónica	9
Banda 3	10
Hemoglobina	12
<b>HEMOGLOBINOPATÍAS</b>	<b>14</b>
Variantes estructurales de hemoglobina	14
Anemia falciforme	14
Fisiopatología	15
Epidemiología	16
<b>ESTRÉS OXIDATIVO EN GLÓBULOS ROJOS</b>	<b>18</b>
Oxidantes y GR	18
<b>PROTEÍNAS Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES</b>	<b>20</b>
Glutatión	20
Superóxido dismutasa	21
Catalasa	22
Glutatión peroxidasas	22
Glutatión reductasa	23
Glutarredoxinas	24
Tiorredoxina	25
Tiorredoxina reductasa	26
Peroxirredoxinas	26
<b>METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN GLÓBULOS ROJOS</b>	<b>28</b>
Glucólisis anaerobia	28
Biosíntesis y funciones del NADPH: Vía de las pentosas fosfato	28
Banda 3 (AE1) como regulador del metabolismo de GR	29
<b>LESIONES POR ALMACENAMIENTO</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
Objetivos generales	33
Objetivos específicos	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
Reactivos y equipos	34
Obtención de las muestras	34
Puesta a punto de método enzimático para cuantificación de lactato	35
Cuantificación de lactato en glóbulos rojos y efectos del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35
Optimización de método de ciclado enzimático para cuantificar NADP <sup>+</sup> y NADPH	36
Procesamiento de muestras para análisis de variantes de hemoglobina	37
Análisis de variantes de hemoglobina por HPLC	38
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
Cuantificación de lactato por ensayo enzimático	39
Optimización de método de ciclado enzimático para cuantificar NADP <sup>+</sup> y NADPH	45
Análisis de variantes de hemoglobina por HPLC	46
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>GR</b>	Glóbulo rojo
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbO<sub>2</sub></b>	Oxihemoglobina
<b>MetHb</b>	Metahemoglobina
<b>Ferril-Hb</b>	Ferrilhemoglobina
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>HIF-1</b>	Factor inducible por hipoxia 1
<b>BFU-E</b>	Unidades formadoras de eritroides en ráfagas
<b>CFU-E</b>	Unidades formadoras de colonias eritroides
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Ácido carbónico
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Bicarbonato
<b>AE-1</b>	Intercambiador aniónico 1
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloruro
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b>HO<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>RO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Radical peroxilo
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Radical hidroperoxilo
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HCIO</b>	Ácido hipocloroso
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozono
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>GSH</b>	Glutati3n reducido
<b>GSSG</b>	Glutati3n oxidado
<b>Gpx</b>	Glutati3n peroxidasa
<b>FAD</b>	Flavín adenina dinucleótido
<b>Grx</b>	Glutarredoxina
<b>PFK</b>	Fosfofructoquinasa
<b>Trx</b>	Tiorredoxina
<b>TR</b>	Tiorredoxina reductasa
<b>Prx</b>	Peroxirredoxina
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>PPP</b>	Vía de las pentosas fosfato
<b>G6PDH</b>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>CPD</b>	Citrato, fosfato, dextrosa
<b>NO<sup>•</sup></b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organizaci3n Mundial de la Salud
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Performance
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>PES</b>	Fenazina etosulfato
<b>MTT</b>	Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo

## RESUMEN

---

Los glóbulos rojos cumplen una función indispensable en el transporte de oxígeno a los tejidos gracias a las altas concentraciones de hemoglobina que contienen. Estas células se hallan expuestas en circulación a especies reactivas derivadas del oxígeno y nitrógeno, por lo que cuentan con robustos sistemas antioxidantes que los protegen. Dichos sistemas dependen de distintos cofactores, siendo el NADPH uno de los más relevantes. Esta molécula es sintetizada en glóbulos rojos únicamente por la vía de las pentosas fosfato, ruta metabólica que compite con la glucólisis en la metabolización de la glucosa. Estudios recientes señalan que el flujo de glucosa destinado a la vía de las pentosas fosfato aumenta con el transcurso de los días en glóbulos rojos almacenados para transfusión, en detrimento del destinado a la glucólisis. Mediante esta reprogramación metabólica, los glóbulos rojos podrían aumentar la producción de NADPH en pos de suministrar poder reductor a los sistemas antioxidantes y así enfrentar la acumulación de especies oxidantes durante el almacenamiento.

En el presente trabajo se estudiaron los efectos del peróxido de hidrógeno en la producción de lactato en glóbulos rojos humanos, bajo la hipótesis de que podría ocurrir una reprogramación metabólica similar a la reportada en glóbulos rojos almacenados. No se encontraron diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con peróxido de hidrógeno.

Además, se optimizó un método de ciclado enzimático para cuantificar NADP<sup>+</sup> y NADPH satisfactoriamente, siendo el mismo empleado por compañeros del laboratorio en sus líneas de investigación.

Por otro lado, se analizaron muestras de sangre enviadas por la Intendencia de Montevideo en búsqueda de portadores de la variante hemoglobina S, responsable de la anemia falciforme. Se empleó un método de cromatografía de intercambio catiónico en HPLC que permitió determinar que ninguna de las muestras brindadas poseía la variante responsable de la enfermedad.

# INTRODUCCIÓN

---

## GENERALIDADES DE LOS GLÓBULOS ROJOS

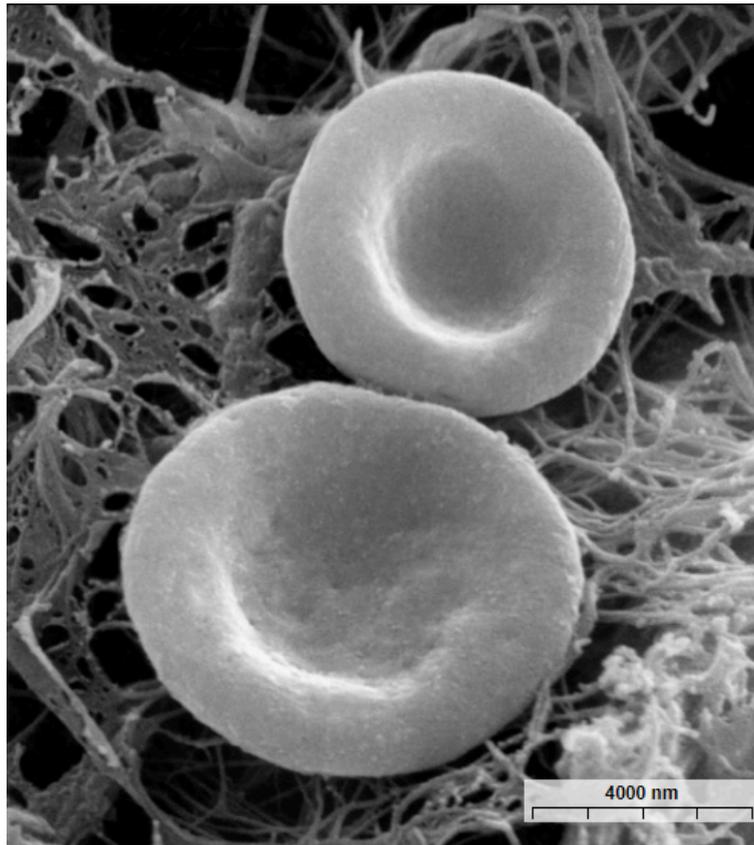
### Características biológicas

La sangre cumple un rol fundamental en la vida de los seres vivos vertebrados, siendo un tipo de tejido conectivo líquido especializado cuyas funciones biológicas se atribuyen a las diversas células y moléculas que circulan en ella. Se estima que en promedio un humano adulto posee 5 litros de sangre [1], a través de los que circulan nutrientes y desechos metabólicos. La sangre posee funciones de transporte, regulación y protección, siendo el transporte de oxígeno ( $O_2$ ) una de las principales funciones de este particular tejido. A través de la sangre los glóbulos rojos (GR) suministran  $O_2$  a las células del organismo circulando por un sistema de vasos sanguíneos que irrigan los tejidos y órganos.

En humanos, los GR (o eritrocitos) son células presentes en la sangre que poseen una vida media en circulación de aproximadamente 120 días. Representan usualmente entre un 40% a 45% del volumen total de la sangre [2], dependiendo de la edad y sexo de la persona, siendo las células más abundantes en el organismo. Transcurridos los 120 días de vida, los GR experimentan cambios en la composición de la membrana plasmática, siendo uno de ellos la exposición de fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana, promovido por la enzima escramblasa [3]. Este fosfolípido es reconocido por los macrófagos en circulación que identifican al glóbulo rojo que lo expone como célula a fagocitar.

Los GR son un excelente ejemplo de la estrecha relación estructura-función en sistemas biológicos, donde las funciones que cumplen están sumamente relacionadas a la estructura y morfología que presentan. Se trata de células cuyo diámetro usual se encuentra entre 7.5 y 8.7  $\mu m$  [4] y que durante su proceso de formación denominado eritropoyesis pierden sus organelos, incluido el núcleo y mitocondrias, permitiendo espacio extra para albergar grandes cantidades de hemoglobina (Hb) y evitando el consumo del  $O_2$  que transportan.

Durante la maduración de los GR, además de la pérdida de sus organelos, ocurre un cambio de morfología que implica la adopción de una forma de disco bicóncavo (Figura 1). Esto les permite maximizar la superficie de contacto y por ende alcanzar un intercambio de gases más eficiente con el medio. Sumado a su pequeño tamaño, poseen un citoesqueleto anclado a la membrana compuesto por espectrina, actina, banda 3, proteína 4.1 y anquirina, componentes que brindan integridad estructural y deformabilidad [5]. Todas las alteraciones experimentadas en el proceso de maduración le otorgan además versatilidad para sufrir cambios drásticos de volumen, pudiendo pasar de 90 fL a 150 fL, o atravesar estrechos capilares cuyo diámetro es menor al de los propios GR [6].

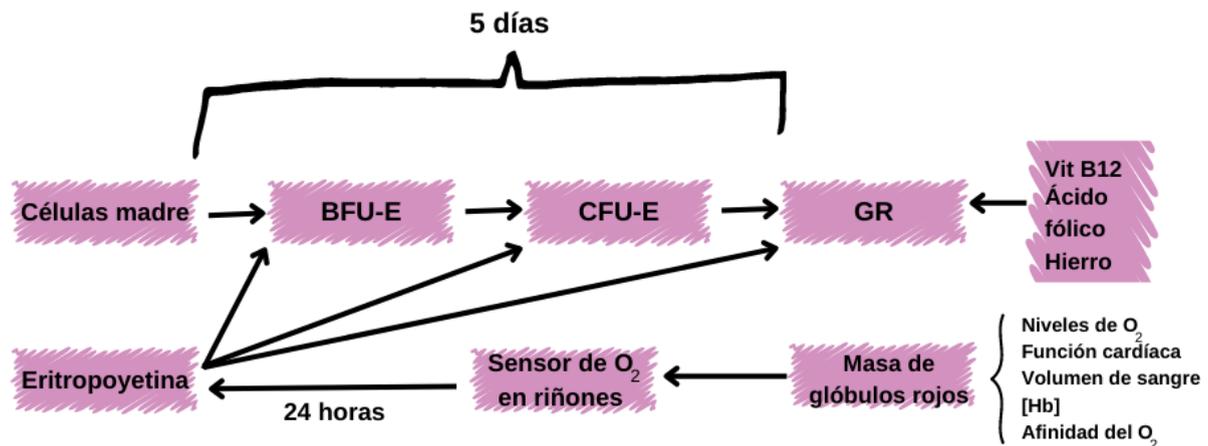


**Figura 1.** Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido de GR humanos. Se observa la forma característica de disco bicóncavo, con un diámetro aproximado de 8  $\mu\text{m}$ . Extraída de [7].

## Eritropoyesis

El proceso de formación de los GR tiene lugar en la médula ósea y se conoce como eritropoyesis. Se trata de un proceso finamente regulado que tiene como objetivo final mantener un suministro adecuado de  $\text{O}_2$  a los tejidos. En el riñón, las células intersticiales peritubulares sensan los niveles de oxigenación tisular y regulan la eritropoyesis produciendo eritropoyetina (EPO) cuando los niveles de oxigenación no son óptimos. La eritropoyetina es la principal hormona encargada de regular la eritropoyesis y su transcripción es mediada por el factor inducible por hipoxia HIF-1 (por sus siglas en inglés, Hypoxia Inducible Factor-1). La interacción de la EPO con células hematopoyéticas localizadas en la médula ósea promueve la proliferación de la población de precursores eritroides, al mismo tiempo que inhibe la apoptosis de los progenitores eritroides [8]. Cuando los sensores en el riñón detectan un suministro insuficiente de  $\text{O}_2$  sintetizan la hormona eritropoyetina, que actuará sobre Unidades Formadoras de Eritroides en Ráfagas (BFU-E, por sus siglas en inglés), el primer precursor de GR que deriva de las células madre de la médula ósea y que posee una gran capacidad proliferativa. Posteriormente, se dará el pasaje a Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU-E, por sus siglas en inglés), precursor menos proliferativo y más diferenciado. Por último, las CFU-E se

diferenciarán a GR a través de una serie de etapas donde el desarrollo morfológico es definido (proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos y reticulocitos) (Figura 2). El número de receptores para EPO en estos estadios aumenta hasta alcanzar un pico en la fase CFU-E, luego disminuye conforme el glóbulo va madurando [9]. Cabe destacar que para un correcto desarrollo del proceso de eritropoyesis, se necesita la presencia de hierro, vitamina B-12 y ácido fólico. La deficiencia de cualquiera de estos nutrientes puede terminar en anemia [10–12].



**Figura 2.** Regulación de la eritropoyesis. La hipoxia es detectada por sensores presentes en los riñones, que sintetizan EPO en respuesta a la disminución de O<sub>2</sub>. EPO actúa a nivel de los distintos estadios celulares de los progenitores eritroides, estimulando la proliferación y diferenciación, a la vez que inhibe la apoptosis. Adaptada de [13].

## Funciones

La función principal de los eritrocitos es transportar el O<sub>2</sub> que los tejidos requieren para la óptima respiración celular. Las adaptaciones morfológicas durante el proceso de maduración de los eritrocitos le han conferido a lo largo de la evolución la idoneidad para encargarse de esta función, dadas las siguientes características:

- No poseen núcleo ni otros organelos, por lo que disponen de un mayor volumen para albergar altas concentraciones de Hb que une el O<sub>2</sub> [14].
- Su forma de disco bicóncavo le otorga una mayor superficie de contacto, que optimiza el intercambio gaseoso con el medio [15].
- Su citoesqueleto anclado a la membrana y el exceso de superficie le brinda una gran deformabilidad para atravesar los diminutos capilares por los que tiene que transitar [4].
- Al carecer de mitocondrias obtienen energía exclusivamente por glucólisis anaerobia, por lo que no consumen el O<sub>2</sub> que transportan [16].

Además de suministrar el O<sub>2</sub> a los tejidos que lo requieren, los GR cumplen una función imprescindible contribuyendo a mantener el pH sanguíneo estable mediante dos sistemas de amortiguadores. Por un lado la Hb puede unir una alta cantidad de

protones, dada su elevada concentración en los GR, en torno a 20 mM de monómeros [17], y la presencia de 38 residuos de histidina por tetrámero. Por otro lado, los eritrocitos poseen anhidrasa carbónica, una metaloenzima que cataliza la reacción del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que fuera exportado hacia el espacio extracelular por las células metabólicamente activas, a ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que se desprotona en medio acuoso para formar bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). En la circulación extrapulmonar, la proteína integral de membrana banda 3 importa cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y exporta el  $\text{HCO}_3^-$  formado hacia el espacio extracelular, donde se establece el equilibrio químico que conduce al sistema buffer  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ . Este sistema es el principal amortiguador del líquido extracelular, manteniendo el pH en torno a valores de 7,4 [18] [19].

## PROTEÍNAS PRINCIPALES

Los GR poseen, según lo reportado hasta la fecha, más de 2250 proteínas [20]. Las proteínas más relevantes para la función de los GR, el transporte de los gases respiratorios, son también las más abundantes del GR. Estas son la hemoglobina, la anhidrasa carbónica y la proteína de membrana banda 3. Mutaciones en la hemoglobina dan lugar a varias hemoglobinopatías, como la anemia falciforme.

### Anhidrasa carbónica

La anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1) es una metaloenzima que posee un átomo de zinc en el sitio activo coordinado con los anillos de imidazol de tres residuos de histidina (Figura 3).

En el ser humano se han identificado 16 isoformas, de las cuales las isoformas I y II se encuentran en GR [21]. Esta familia de enzimas presenta actividad liasa, es decir, catalizan reacciones de eliminación por mecanismos distintos a la hidrólisis u oxidación. Su función es catalizar de forma reversible la reacción de  $\text{CO}_2$  con  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , reacción que se produce de manera espontánea en ausencia de enzima, pero a velocidades muy lentas. La catálisis de la anhidrasa carbónica acelera la reacción  $10^7$  veces, produciendo un protón y un anión  $\text{HCO}_3^-$ , constituyendo un sistema amortiguador de suma relevancia para la regulación del pH del plasma [22].

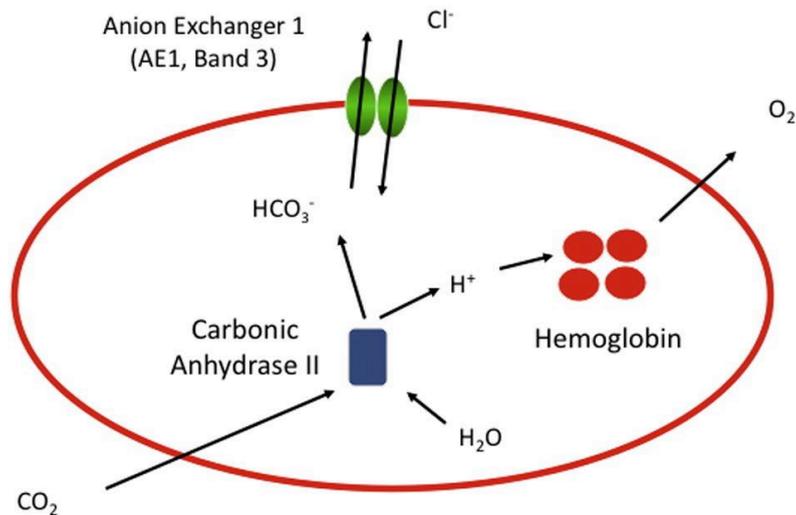


**Figura 3.** Estructura tridimensional de la anhidrasa carbónica 1 humana. Se observa en el sitio activo de la proteína el átomo de zinc interactuando con el anión bicarbonato. Estructura obtenida de [\[23\]](#) (código PDB 1HCB).

La anhidrasa carbónica puede unirse de forma reversible a la proteína de membrana banda 3 a través del extremo carboxilo terminal de esta última [\[24\]](#), formando un complejo enzimático que facilita el transporte y eliminación del  $\text{CO}_2$  hacia los pulmones, potenciando la tasa de eliminación de  $\text{HCO}_3^-$ .

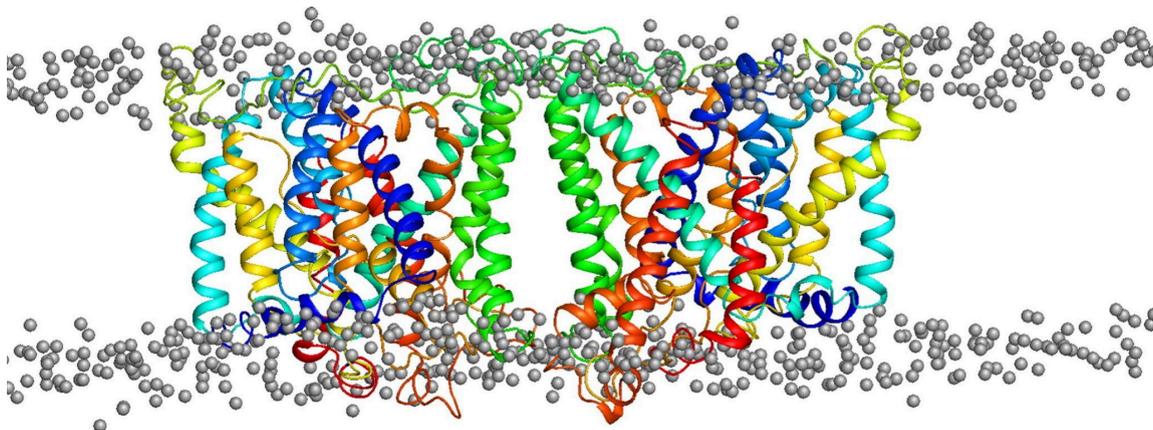
### **Banda 3**

La proteína banda 3 o intercambiador aniónico AE1 (anion exchanger 1), es la glicoproteína más abundante en la membrana de los GR y su principal función radica en intercambiar  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  a través de la membrana. En los tejidos, el  $\text{CO}_2$  difunde hacia el interior de los GR, donde reacciona con la anhidrasa carbónica para producir  $\text{HCO}_3^-$ , que es intercambiado por  $\text{Cl}^-$  del exterior celular. Adicionalmente, producto de la acción de la anhidrasa carbónica se produce un protón que es tamponado por la Hb, cuya protonación conduce a una menor afinidad por el  $\text{O}_2$ , liberándolo a los tejidos. En los pulmones ocurre el proceso inverso, el  $\text{HCO}_3^-$  ingresa a la célula intercambiado por  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{HCO}_3^-$  y un protón son convertidos a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por la anhidrasa carbónica. El  $\text{CO}_2$  difunde fuera de la célula y es exhalado por los pulmones ([Figura 4](#)).



**Figura 4.** Esquema del rol principal de la banda 3 en el glóbulo rojo en conjunto con la anhidrasa carbónica y la Hb. Extraída de [25].

Estructuralmente se halla mayoritariamente en forma dimérica o tetramérica, compuesta por 911 residuos aminoacídicos. Banda 3 se divide en dos dominios: un dominio N-terminal citosólico y un dominio C-terminal de membrana, siendo este último encargado del transporte de aniones a través de la membrana. El dominio C-terminal es capaz de ejercer su función incluso en ausencia del dominio N-terminal. La proteína posee 14 segmentos transmembrana, compuestos mayoritariamente por hélices alfa. La estructura de la banda 3 inserta en una bicapa lipídica fue modelada por estudios *in silico* de dinámica molecular [25] (Figura 5).



**Figura 5.** Simulación *in silico* de la banda 3 en su forma dimérica en una bicapa lipídica de fosfatidilcolina por dinámica molecular. Extraída de [25].

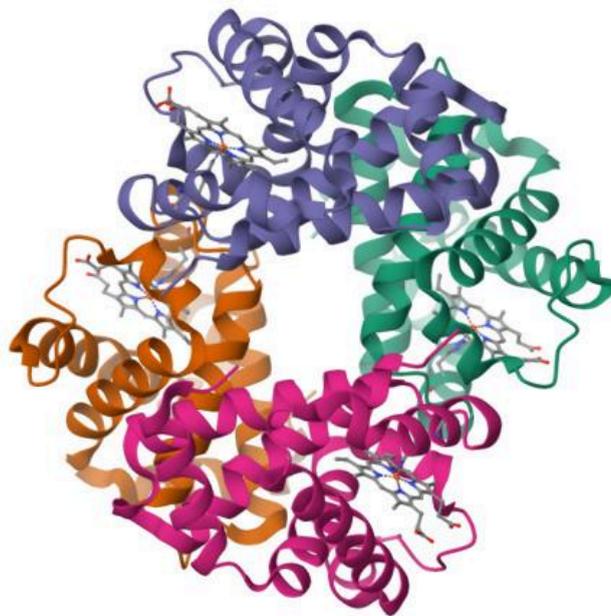
A través del dominio citosólico banda 3 es capaz de anclar proteínas del citoesqueleto como anquirina, actina y espectrina a través del dominio citoplasmático, actuando como centro de organización en la formación de complejos macromoleculares que permiten la asociación del citoesqueleto a la membrana

celular [25–27]. Adicionalmente, banda 3 puede unir distintas proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa, por lo que se le adjudica un rol regulador “secuestrando” enzimas glucolíticas, aspecto que se discute en la sección “[Banda 3 \(AE1\) como regulador del metabolismo en GR](#)”.

## Hemoglobina

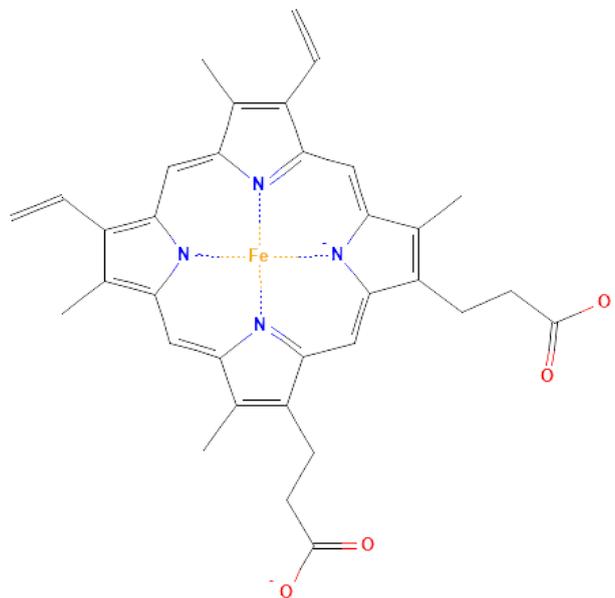
La Hb es una proteína clave en los GR, que se encarga de la principal función de estos: el transporte de  $O_2$  y  $CO_2$ . Es una proteína modelo en investigación, y fue la primera proteína cristalizada con una función biológica asignada, en el año 1849 [28]. Su estudio también permitió comprender la estrecha relación entre las alteraciones a nivel genético, la expresión de la proteína alterada y las manifestaciones clínicas que se producen. Al estudiar la anemia falciforme se estableció que el cambio en uno solo de los aminoácidos que componen a la Hb (sustitución de un glutamato en lugar de una valina), produce una enfermedad donde los GR ven alterada su morfología, con las severas implicancias que esto acarrea para el organismo [29].

Estructuralmente, la Hb humana es una proteína globular de 64.5 kDa de peso molecular y 572 residuos aminoacídicos. Se halla en forma tetramérica, siendo constituida por dos cadenas  $\alpha$  idénticas entre sí y dos cadenas  $\beta$  también idénticas entre sí ([Figura 6](#)). La estructura cuaternaria de la Hb se halla estabilizada únicamente por interacciones débiles.



**Figura 6.** Estructura cristalográfica de la Hb humana en su forma tetramérica. Nótese que cada monómero posee un grupo hemo, responsable de la unión a  $O_2$ . Estructura obtenida de [30] (código PDB: 2HHE).

Cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas contiene un grupo prostético hemo, compuesto por un átomo de hierro en estado de oxidación  $\text{Fe}^{2+}$  en el centro de un heterociclo denominado porfirina. En el caso de la Hb, la porfirina que contiene al hierro es la protoporfirina IX, y el hierro se halla en una especie de bolsillo hidrofóbico ([Figura 7](#)). Esta porfirina contiene en su estructura dos grupos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales del anillo. El hierro es capaz de formar cinco o seis enlaces de coordinación, dependiendo de la unión del  $\text{O}_2$  (u otro ligando). Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina, uno con el nitrógeno de la cadena lateral de una histidina (imidazol), mientras que el último se produce entre el átomo de hierro y el  $\text{O}_2$ , que además puede estar coordinado por un nitrógeno de otra histidina [\[28\]](#). Dado que cada una de las cuatro subunidades que forman a la Hb posee un grupo hemo, cada molécula de Hb es capaz de transportar cuatro moléculas de  $\text{O}_2$  simultáneamente. Dada la concentración de hemoglobina en sangre los GR logran solubilizar 40 veces más  $\text{O}_2$  que un volumen equivalente de agua.



**Figura 7.** Estructura del grupo hemo presente en la Hb y mioglobina. El hierro se halla en estado ferroso, formando enlaces de coordinación con cuatro átomos de nitrógeno del anillo de protoporfirina IX. Obtenida de [\[31\]](#).

La afinidad que posee la Hb por el  $\text{O}_2$  depende de una serie de variables, incluyendo el pH, la concentración de 2,3-difosfoglicerato, la concentración de  $\text{CO}_2$  y la temperatura. Además, la Hb es un claro ejemplo del fenómeno de cooperatividad positiva, por el cual la unión del ligando ( $\text{O}_2$ ) a una de las subunidades de la proteína incrementa la afinidad del resto de subunidades por el  $\text{O}_2$  [\[32\]](#).

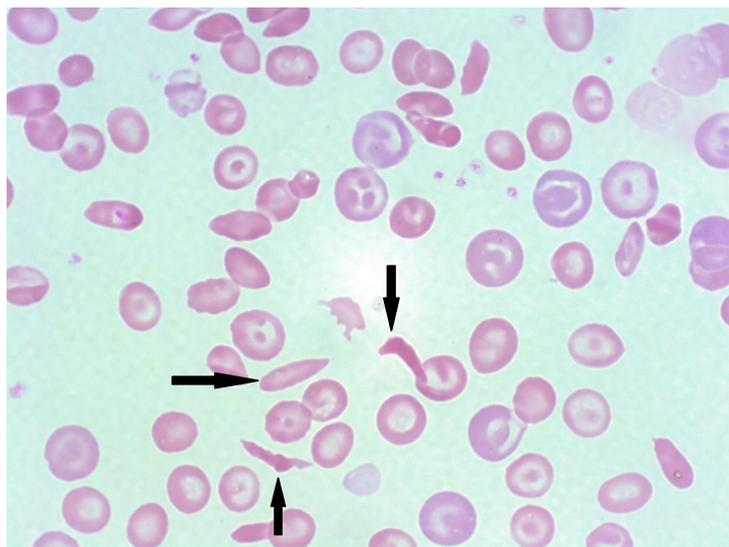
# HEMOGLOBINOPATÍAS

## Variantes estructurales de hemoglobina

Existen diversas mutaciones que pueden afectar tanto la expresión de la Hb (talasemias) como su estructura (variantes de Hb). Estas tienen una incidencia relativamente alta, afectando a un 7% de la población mundial [33] [34]. Las distintas variantes de Hb suelen producirse por mutaciones con cambio de sentido que producen el cambio de un aminoácido, y menos frecuentemente por deleciones, sustitución de múltiples aminoácidos, mutaciones antiterminación, entre otras [35]. Los cambios estructurales producen una gama de anomalías en la función bioquímica de la Hb, siendo las variantes patogénicas más estudiadas la HbE, HbC y HbS.

## Anemia falciforme

Las enfermedades de células falciformes refieren a un conjunto de genotipos patogénicos donde la anemia falciforme es la que posee mayor prevalencia [36]. La anemia falciforme es producida por homocigosis del alelo mutante en el gen  $\beta$ -globina, que presenta la sustitución de una timina por adenina en el nucleótido número 17. A nivel de la cadena polipeptídica esto se traduce en un cambio del sexto aminoácido, expresándose valina en lugar de glutamato [37]. Este cambio aminoacídico supone la formación de un motivo hidrofóbico en el tetrámero desoxigenado, que produce la unión de dos cadenas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  de dos moléculas de Hb. La polimerización se expande a través de toda la célula, resultando en una disrupción de la morfología y flexibilidad de la misma (Figura 8), conduciendo a la deshidratación [38].



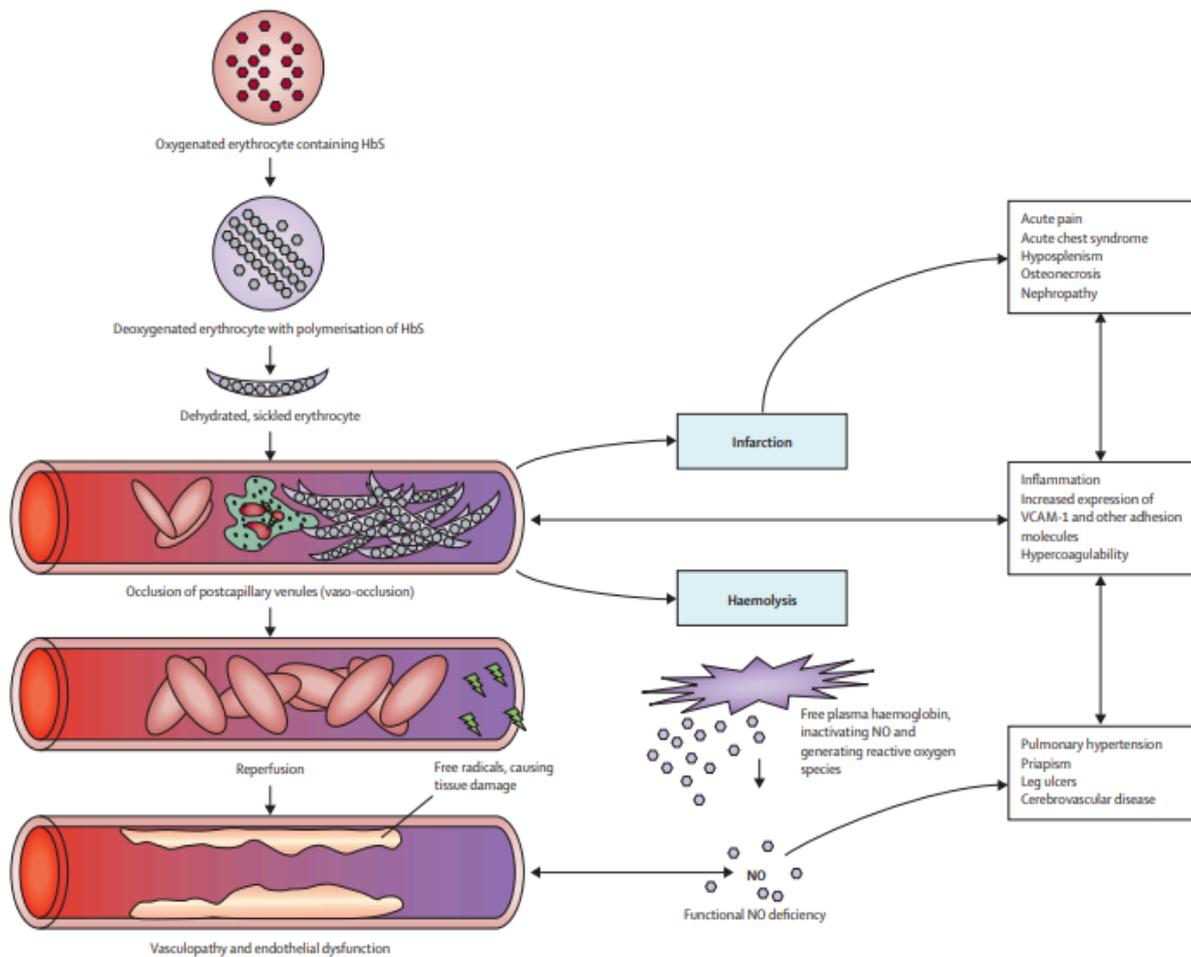
**Figura 8.** Micrografía óptica 100x de un paciente con anemia falciforme. Las flechas señalan los GR que poseen una morfología falciforme típica de la enfermedad. Se observan también GR de morfología normal. Extraída de [39].

## Fisiopatología

La polimerización de la HbS es la causa principal de las dos manifestaciones fisiopatológicas de la enfermedad: la vasooclusión y la anemia hemolítica [36].

Los GR rígidos y deformados obstruyen los capilares en la microcirculación principalmente en un contexto inflamatorio, donde se sobreexpresan moléculas de adhesión endotelial, ocasionando isquemia (flujo insuficiente de O<sub>2</sub> a los tejidos). Posteriormente, se restablece el flujo de sangre por reperfusión, lo que promueve el daño de los tejidos. Así, sucesivos ciclos de isquemia y reperfusión promueven el estrés oxidativo, la activación de oxidasas vasculares y estrés inflamatorio. Además, la anemia hemolítica que sufren estas células hace que los pacientes de anemia falciforme sean propensos a desarrollar diversas vasculopatías con el paso del tiempo, caracterizadas por hipertensión sistémica y pulmonar, disfunción endotelial, deterioro progresivo del músculo liso y de la íntima de los vasos sanguíneos [35] [40–43].

La liberación de Hb al torrente sanguíneo genera especies reactivas del oxígeno como el HO· y O<sub>2</sub><sup>-</sup> [44], potente scavenger de óxido nítrico (NO·) [45]. El NO· es producido por el endotelio y actúa regulando la vasodilatación, inhibiendo la activación de las plaquetas y la expresión transcripcional del factor nuclear κB (regula la expresión de varios genes involucrados en respuestas inflamatorias, apoptosis, y otras funciones celulares) [46] [47]. La Hb liberada al plasma durante la hemólisis puede resultar en la inhibición de las vías de señalización de NO·, llevando a una disfunción de las células endoteliales y resistencia al NO· [45]. En la [Figura 9](#) se resume en un esquema los mecanismos implicados en la fisiopatología de la anemia falciforme.

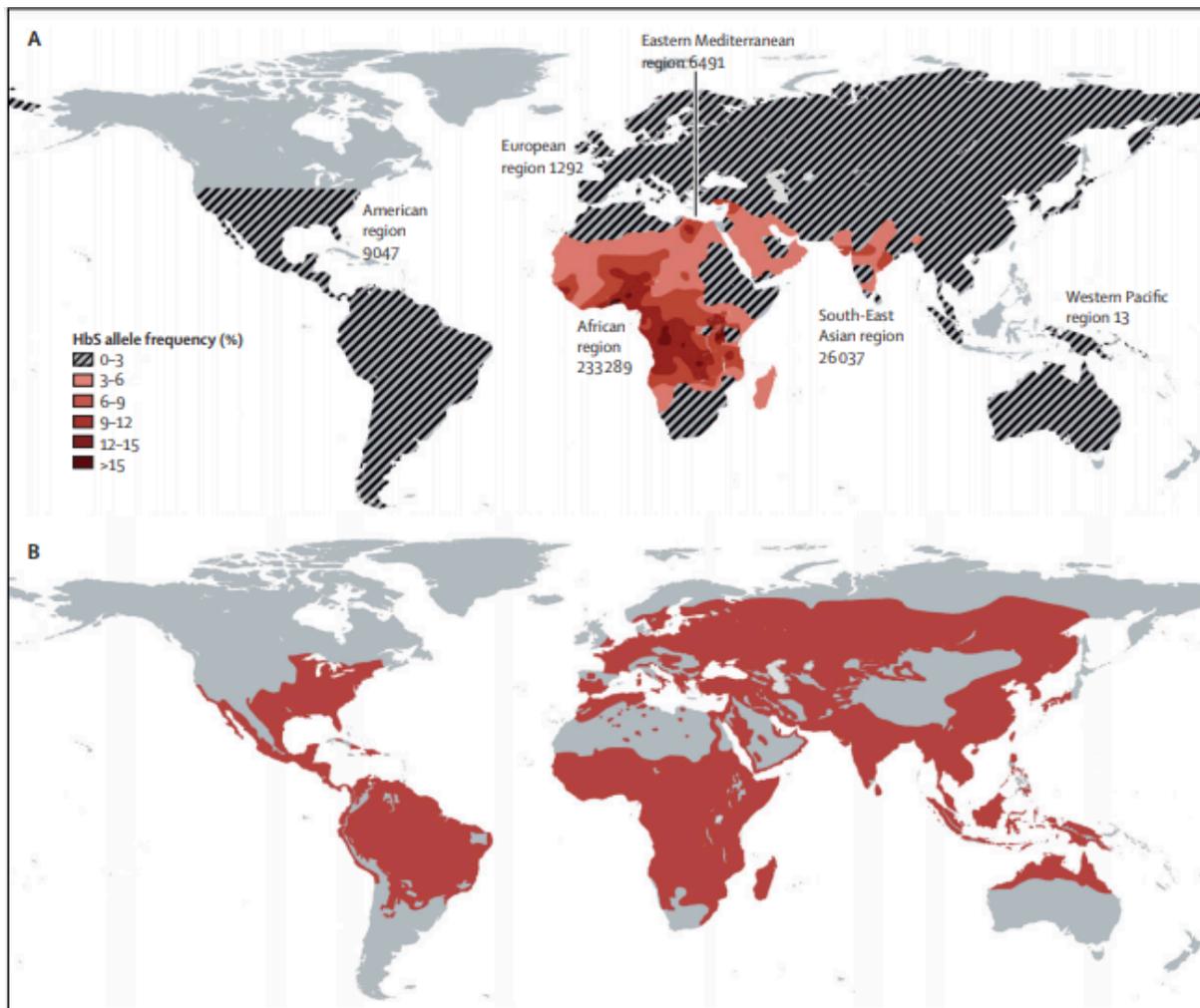


**Figura 9.** Principales mecanismos fisiopatológicos en la anemia falciforme. La polimerización de la HbS cuando se halla desoxigenada desencadena la obstrucción de vasos sanguíneos y la hemólisis de los GR. Los ciclos de vaso-obstrucción y reperfusión frecuentes promueven el estrés oxidativo e inflamatorio y la activación de oxidasas vasculares. Además, la hemólisis libera Hb al plasma, siendo responsable de la generación de especies reactivas que inactivan al NO<sup>•</sup>, molécula señalizadora cuya funcionalidad se ve afectada. Extraída de [36].

## Epidemiología

La distribución global del alelo HbS se explica por dos factores: (1) la selección de aquellas personas portadoras de una sola copia del alelo, que representa una ventaja en cuanto a la supervivencia en regiones donde la malaria es endémica, y (2) las migraciones subsecuentes. Se han reportado 4 haplotipos africanos (los haplotipos Senegal, Benin, Bantu y Camerún) y un haplotipo asiático (el haplotipo árabe-indio), evidenciando al menos dos focos donde se pudo haber originado la mutación que posteriormente se amplifica [48]. Existe mucha evidencia que respalda el hecho de que la amplificación del alelo pueda haber sido impulsada por la resistencia a la malaria que otorga el mismo en heterocigosis [49] [50], fuertemente apoyada por la correlación geográfica entre la distribución del gen HbS y zonas con incidencia histórica de la malaria [48] (Figura 10). El mecanismo por el cual el alelo

HbS otorga protección a la malaria no está del todo claro, pero se cree que se hallan involucrados mecanismos innatos e inmuno-mediados [51].



**Figura 10.** Distribución global del gen HbS (A) y de la malaria (B) antes de las intervenciones para controlarla. Se observa una correlación entre las zonas de mayor frecuencia del alelo HbS y las zonas más afectadas por la malaria, especialmente visible en África. Estos datos respaldan la evidencia existente sobre la protección que poseen los portadores del gen HbS ante la infección por malaria. Extraída de [36].

La zona de África sub-sahariana posee la mayor prevalencia de anemia falciforme, con un estimado de más de 230.000 niños que nacen con la afección cada año, representando un 80% del total global [52]. La anemia falciforme se atribuye como causa de muerte infantil a cada vez más fallecimientos en África [36], por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) y las Naciones Unidas la han declarado como un problema de salud prioritario, introduciéndose análisis tempranos en niños de diversos países africanos para detectarla [53], y formándose la Global Sickle Cell Disease Network.

Generalmente, en los laboratorios clínicos se separan y cuantifican los niveles de las distintas variantes de Hb en sangre, principalmente las Hbs glicosiladas y variantes de secuencia de la Hb [54] [55]. Los niveles de Hb glicosilada en pacientes

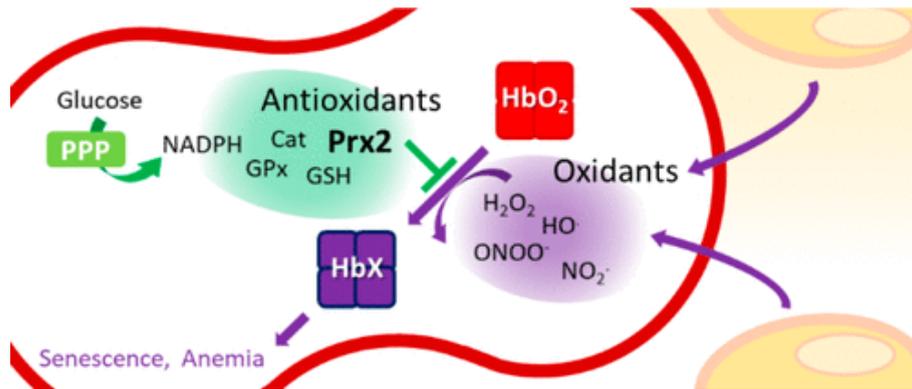
diabéticos son importantes ya que sirven como indicador de los niveles de glucosa en sangre promedio. Por otro lado, el estudio de las distintas variantes de secuencia de la Hb permite identificar y diagnosticar diversas hemoglobinopatías, como la anemia falciforme, la enfermedad de la HbC o la enfermedad de Bart.

En Uruguay, el Laboratorio de Pesquisa Neonatal realizó un estudio en 2017 en el que se analizaron muestras de recién nacidos entre los años 2013 y 2014. En él, se analizaron 103.476 muestras provenientes de todo el país, encontrándose una incidencia de 1/26.000 para casos patológicos y 1/180 para portadores de alguna variante, siendo la más común la HbS [56].

## **ESTRÉS OXIDATIVO EN GLÓBULOS ROJOS**

### **Oxidantes y GR**

Especies reactivas del oxígeno (ROS) es un término que hace referencia tanto a especies radicalarias como el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), peróxido ( $RO_2^{\cdot}$ ) e hidropéroxido ( $HO_2^{\cdot}$ ) como a no radicalarias como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HClO) y ozono ( $O_3$ ), que por lo general son oxidantes por uno o dos electrones y dan lugar a modificaciones moleculares. Las ROS pueden ser formadas mediante reacciones enzimáticas como las catalizadas por NADPH oxidasas y xantina oxidasa, y en el transporte de electrones mitocondrial. Tienen funciones fisiológicas que incluyen afectar la expresión génica y participar como agentes citotóxicos en la acción de neutrófilos y macrófagos ante una infección [57]. Los GR en circulación se hallan expuestos a diversas ROS, tanto exógenas como endógenas (Figura 11). En el sistema vascular, los GR son blanco de ROS liberadas por macrófagos, neutrófilos y células endoteliales. Por otro lado, la oxihemoglobina ( $HbO_2$ ) es la principal fuente endógena de oxidantes, ya que experimenta una auto-oxidación lenta y constante que conduce a la formación de metahemoglobina (MetHb), incapaz de transportar  $O_2$  [58], y de  $O_2^{\cdot-}$ , que es convertido rápidamente a  $H_2O_2$ .



**Figura 11.** Esquema de las especies oxidantes principales a las que se exponen los GR y los sistemas de antioxidantes que participan en su detoxificación. Cabe resaltar el rol fundamental que tiene el NADPH para abastecer a los sistemas enzimáticos de poder reductor, necesario para su correcto funcionamiento. Extraída de [17].

Alternativamente, el  $O_2^-$  puede reaccionar con hierro férrico libre para dar hierro ferroso. El hierro ferroso puede reaccionar con el  $H_2O_2$  mediante reacción de Fenton para producir  $HO\cdot$ . Además, el  $H_2O_2$  puede reaccionar con la  $HbO_2$  produciendo ferril-Hb, que junto al  $HO\cdot$  son capaces de oxidar proteínas y lípidos, afectando a la membrana celular, enzimas metabólicas, proteínas estructurales, etc. [59].

Las especies oxidantes exógenas y endógenas son neutralizadas en los GR por la acción de varios sistemas antioxidantes. Sin embargo, se ha propuesto que la capacidad de estos sistemas antioxidantes decrece a medida que los GR se mueven por la microcirculación y la Hb se desoxigena parcialmente. La oxigenación parcial de la Hb conduce a un incremento en la afinidad de la Hb por la membrana celular y a un aumento en la tasa de auto-oxidación de la misma [60]. De esta forma, la actividad de los sistemas antioxidantes, que son mayoritariamente citosólicos, se ve limitada para neutralizar los oxidantes formados a nivel de la membrana. Esto ocasiona daño a la membrana de los GR, comprometiendo su funcionalidad [61].

El  $H_2O_2$  es la especie oxidante de interés en este trabajo, en el cual se estudiarán sus efectos a nivel metabólico en los GR. Se trata de una molécula que no es meramente un oxidante al que se exponen los GR, sino que también se le atribuyen funciones señalizadoras a nivel vascular [62].

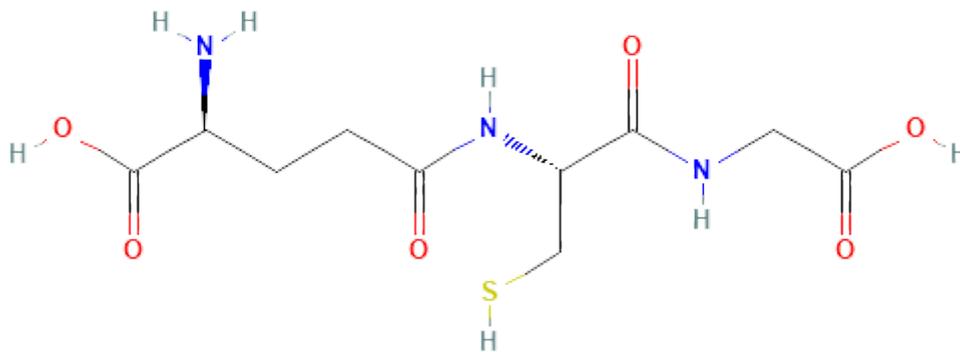
Se ha reportado que la concentración en plasma oscila entre 1 y 5  $\mu M$ , alcanzando una concentración de hasta 50  $\mu M$  en un contexto inflamatorio [63]. Los GR se han propuesto como el principal sumidero de  $H_2O_2$  dada su alta proporción en sangre, su alta permeabilidad y sus robustos sistemas antioxidantes capaces de reaccionar rápidamente con esta molécula, siendo los más destacados peroxirredoxina 2, glutatión peroxidasa y catalasa [64]. Estudios recientes sugieren que el  $H_2O_2$  ingresa a los GR difundiendo a través de la fracción lipídica de la membrana plasmática, de forma independiente de las acuaporinas, a diferencia de lo que se hipotetizaba hasta el momento [62].

## PROTEÍNAS Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Como se mencionó anteriormente, el metabolismo aerobio de los seres vivos trae consigo la aparición de una serie de moléculas potencialmente dañinas para los sistemas biológicos, las ROS. Para mantener sus concentraciones en niveles inocuos, las células poseen diversas proteínas que actúan detoxificando estas especies químicas. A continuación se describen las más relevantes en GR.

### Glutión

El glutión es un tripéptido formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina ([Figura 12](#)), siendo la concentración en GR relativamente alta (0.4 a 3 mM) [\[17\]](#).



**Figura 12.** Representación de la molécula de glutión. Nótese el enlace peptídico atípico entre el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato y el grupo amino de la cisteína. Adaptada de [\[65\]](#)

Su función principal yace en combatir el estrés oxidativo reaccionando con electrófilos. El enlace que une al glutamato con la cisteína no es un típico enlace peptídico, siendo el carboxilo de la cadena lateral del glutamato el que reacciona con el grupo amino de la cisteína. Esta característica le confiere resistencia ante peptidasas que podrían degradarlo en las células. Esta molécula puede hallarse de forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG), siendo la glutatión reductasa la enzima responsable de reducir la forma oxidada. Los GR son capaces de sintetizar glutatión tal como el resto de las células, a través de dos reacciones enzimáticas. La primera de ellas es catalizada por la cisteína-glutamato ligasa y la segunda por la glutatión sintetasa, que incorpora a la glicina. Ambas reacciones ocurren acopladas al consumo de ATP [\[66\]](#).

Existen diversas enzimas que utilizan glutatión como sustrato, ya sea conjugándolo a otras moléculas, utilizándolo como intermediario redox o regenerando su forma reducida.

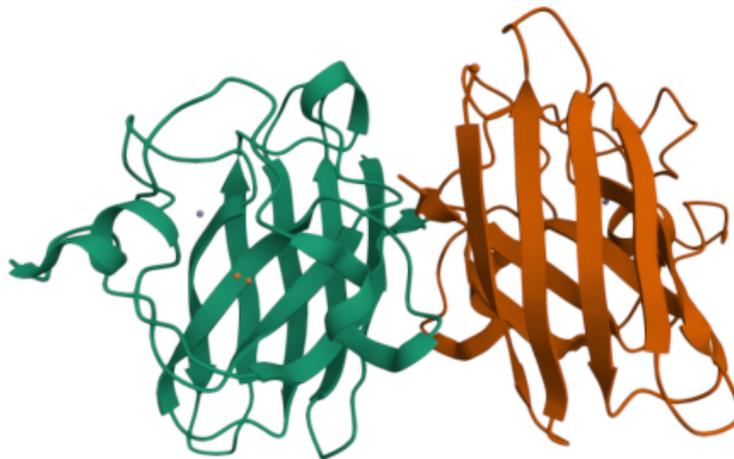
## Superóxido dismutasa

Las superóxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1) son un grupo de metaloenzimas presentes tanto en plantas como en animales, que cumplen un rol crucial en la defensa ante el radical  $O_2^{\cdot -}$  ([Ecuación 1](#)).



Se han identificado SODs con cuatro centros metálicos distintos: cobre/zinc (Cu/Zn-SOD), manganeso (Mn-SOD), níquel (Ni-SOD) y hierro (Fe-SOD). Además, pueden clasificarse de acuerdo a su localización, existiendo distintas isoformas a nivel extracelular, celular o en organelos celulares. Al ser el  $O_2^{\cdot -}$  poco permeable a las membranas biológicas, se cree que las SODs han evolucionado para detoxificarlo rápidamente en los distintos lugares de formación.

La SOD1 es del tipo Cu/Zn-SOD y se halla en forma de homodímero en el citoplasma. ([Figura 13](#)).



**Figura 13.** Estructura tridimensional del homodímero de SOD1. Cada monómero posee en su estructura 2 átomos de cobre (II) y 2 átomos de zinc. Estructura obtenida de [\[67\]](#) (código PDB: 2C9V).

Esta isoforma se halla presente en GR en una concentración aproximada de 4  $\mu M$  [\[68\]](#) [\[69\]](#). SOD3 en tanto, es una isoforma también con Cu/Zn como centro metálico, pero que se encuentra como homotetrámero en el espacio extracelular. Las isoformas con centros metálicos de hierro o manganeso son típicamente homodímeros u homotetrámeros que posiblemente han evolucionado de un predecesor común. Las Mn-SODs se encuentran principalmente en procariotas y en

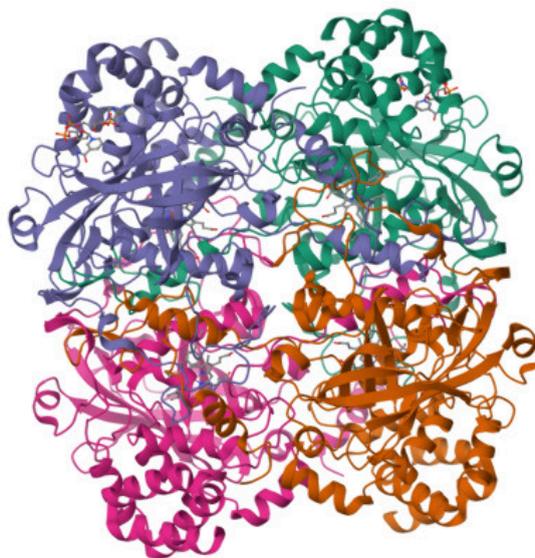
las mitocondrias de células eucariotas, siendo indispensables para la vida, dada la alta producción de  $O_2^-$  en este organelo, mientras que las Fe-SODs se encuentran en procariontas. Por último, Ni-SODs se han reportado únicamente en cianobacterias y bacterias del género *Streptomyces* [70].

## Catalasa

Las catalasas (EC 1.11.1.6) son una familia de enzimas distribuidas de forma ubicua, responsables de la descomposición del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$  (Ecuación 2).



Existen cuatro tipos principales de catalasas, siendo las de tipo monofuncionales las que se encuentran en GR, en una concentración de 11 a 12  $\mu M$  (en subunidades) [17]. Se trata de una enzima tetramérica que presenta 4 subunidades idénticas entre sí con un peso molecular de 59.7 kDa, conteniendo cada subunidad un grupo hemo y una molécula de NADPH unida (Figura 14).



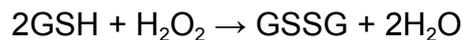
**Figura 14.** Estructura tridimensional de la catalasa de GR humanos en su forma tetramérica. Cada subunidad posee NADPH y un grupo hemo unido. Estructura obtenida de [71] (código PDB:1DGB).

Si bien la presencia de NADPH no es necesaria para la actividad catalítica, este contribuiría a evitar la inactivación de la enzima por el  $H_2O_2$  [72].

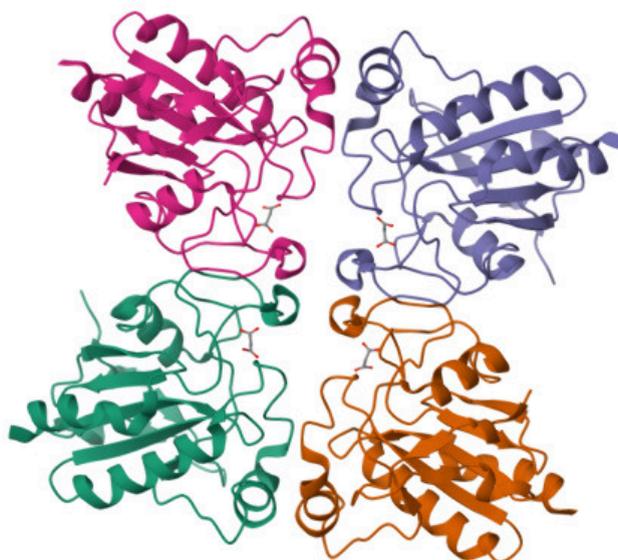
## Glutación peroxidasas

Las glutatión peroxidasas (Gpx) son una familia de enzimas que catalizan la reducción de hidroperóxidos utilizando glutatión como donante de electrones (Ecuación 3).

### Ecuación 3



En GR, la isoforma predominante es la Gpx1, con una concentración aproximada de 1.5  $\mu\text{M}$  [17]. Esta enzima se halla en forma de homotetramero y posee un residuo de selenocisteína en cada subunidad (Figura 15), responsable de la actividad catalítica [73].



**Figura 15.** Estructura tridimensional de la Gpx1 tetramérica humana. Cada monómero posee un residuo de selenocisteína. Estructura obtenida de [74] (código PDB: 2F8A).

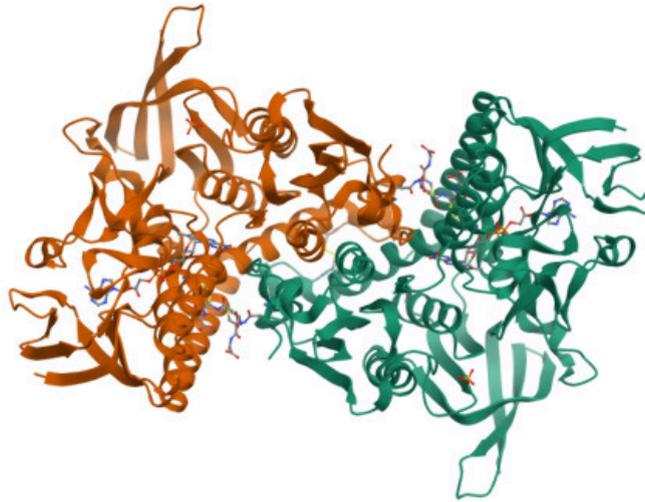
Gpx1 es capaz de reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroperóxidos lipídicos y otros hidroperóxidos, siendo el glutatión el único donante de electrones empleado por esta enzima, a diferencia de otras Gpxs que pueden utilizar otros tioles como donantes.

En GR se ha propuesto que su función más importante radica en proteger a la membrana del estrés oxidativo reduciendo hidroperóxidos lipídicos. Es la primera enzima en unirse a la membrana en respuesta a concentraciones crecientes de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , permitiéndole reaccionar con los hidroperóxidos lipídicos más eficientemente [75].

### Glutatión reductasa

La glutatión reductasa es una flavoenzima homodimérica cuya función es catalizar la reducción dependiente de NADPH del GSSG a GSH [76]. Estructuralmente se trata de una enzima que posee un sitio de unión para FAD, uno para NADPH y otro para GSSG en cada una de sus subunidades (Figura 16). Estas subunidades se conectan entre sí a través de puentes disulfuro, de forma que ambas subunidades

son partícipes de ambos sitios activos, dependiendo la actividad catalítica de que la enzima se encuentre como dímero [77].



**Figura 16.** Estructura tridimensional de la glutatión reductasa homodimérica humana. Cada monómero posee unida una molécula de glutatión, FAD y NADPH. Estructura obtenida de [78] (código PDB: 1GRE).

## Glutarredoxinas

Las glutarredoxinas (Grx) son pequeñas enzimas ampliamente distribuidas, que contienen un grupo tiol en su estructura (Figura 17).



**Figura 17.** Estructura tridimensional de la Grx1 unida a glutatión. Estructura obtenida de [79] (código PDB: 1B4Q).

Estas enzimas se hallan involucradas en la señalización y regulación de procesos redox, homeostasis del hierro y en la biosíntesis de clusters Fe-S. Las mismas se

diferencian en función del número de grupos tiol presentes en el sitio activo de la molécula, existiendo las formas mono-tiol y di-tiol. Son oxidadas por distintos sustratos y reducidas de forma no enzimática por glutatión, siendo la glutatión reductasa responsable de la disponibilidad de GSH [80].

Los GR maduros poseen dos isoformas, Grx1 y Grx 3. La primera se trata de una forma di-tiol, capaz de catalizar la deglutationización de la Hb (se cree que protege a la Hb contra la sobre-oxidación), la reducción de la fosfofructoquinasa (PFK, enzima clave en el control metabólico) y la reducción de disulfuros de bajo peso molecular. Por ello, esta enzima parece tener un importante papel no solo en la protección contra especies reactivas, sino también en la regulación metabólica de los GR [81] [82].

Grx3, en tanto, es una enzima citosólica en forma de mono-tiol, con un dominio tiorredoxina seguido por dos dominios Grx. Se postula que esta enzima tiene un rol central en las etapas de desarrollo de los precursores de GR, ya que se demostró que cumple un papel central en la homeostasis del hierro y en la formación de proteínas con centros Fe-S [83].

## Tiorredoxina

La tiorredoxina (Trx) es una proteína monomérica de 12 kDa, ampliamente distribuida en procariontas y eucariotas. Posee un plegamiento tridimensional característico, conocido como plegamiento tiorredoxina, que consiste en un núcleo central compuesto por cinco hojas beta, rodeadas por cuatro alfa hélices y la secuencia correspondiente al sitio activo (Figura 18).



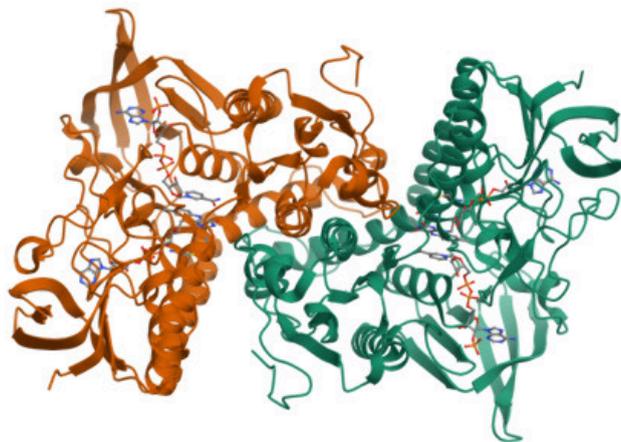
**Figura 18.** Estructura tridimensional de la Trx humana. Se observa el típico plegamiento tridimensional de estas proteínas, con 5 hojas beta centrales rodeadas por 4 hélices alfa. Estructura obtenida de [84] (código PDB: 1TRU).

En conjunto con glutatión y glutarredoxina, se encarga de mantener a los tioles del interior celular en estado reducido, utilizando tiorredoxina reductasa y NADPH.

Los GR poseen Trx1, enzima que posee tres cisteínas adicionales en su secuencia que participan en la regulación redox. Actúan como defensas antioxidantes, brindando electrones a varias enzimas como la peroxirredoxina y la metionina sulfóxido reductasa [85].

## Tiorredoxina reductasa

La tiorredoxina reductasa (TR) es una flavoproteína homodimérica, perteneciente a la familia de las piridín nucleótido disulfuro oxidorreductasa. En humanos se da la expresión de tres tipos de TR, siendo la TR1 la que se encuentra en GR. Esta enzima contiene un sitio de unión a FAD y a NADPH por subunidad (Figura 19).



**Figura 19.** Estructura tridimensional de la TR1 humana. Se trata de un homodímero con un sitio de unión a FAD y a NADPH por subunidad. Estructura obtenida de [86] (código PDB:2ZZC).

La actividad catalítica está dada por un residuo de selenocisteína, y sus sustratos pueden ser Trx, proteína disulfuro isomerasa, Grx y ácido lipoico [87]. Se ha descubierto además que los sistemas Trx/TR y GSH/GR se hallan conectados, pudiendo regenerar sus estados reducidos de forma “cruzada” [88].

## Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (Prx) son enzimas muy conservadas con actividad peroxidasa, distribuidas ubicuamente en distintas células, cuya actividad catalítica es dependiente de residuos de cisteína. Los GR poseen un set de diferentes Prx, entre las que destacan la Prx 2, 1 y 6. Prx2 es la tercera proteína de mayor concentración en los GR (240-410  $\mu\text{M}$ ), siendo una importante defensa contra el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el peroxinitrito e hidroperóxidos [20] [89].

Prx2 es una peroxirredoxina típica de 2 cisteínas. Su forma activa básica consta de un homodímero que durante el ciclo catalítico alterna entre la forma dimérica y una forma decamérica en forma de “dona” (Figura 20). El homodímero oxidado es reducido por reacción con la Trx1. Dada la alta reactividad de la Prx2 (10 veces más rápida que los pasos correspondientes en la reacción con catalasa y el sistema

GPx) y su gran abundancia, es la principal enzima encargada de detoxificar  $H_2O_2$  en los GR [64].



**Figura 20.** Estructura tridimensional del decámero de Prx2 formado por cinco homodímeros en forma de "dona". Estructura obtenida de [90] (código PDB:7KIZ).

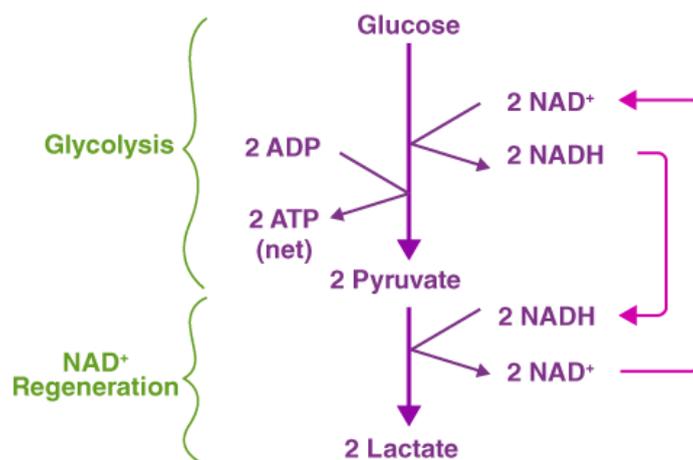
Prx2 posee un rol fundamental en las etapas iniciales del proceso de maduración de un eritrocito. Esta es sintetizada incluso antes que la Hb, probablemente para neutralizar oxidantes que puedan ser producidos como resultado de la alta concentración de hemo y hierro presentes en los precursores de GR [91]. En ratones modificados genéticamente para que no se exprese Prx2 se observa anemia y GR muy susceptibles al estrés oxidativo [92]. En sangre, Prx2 puede utilizarse como un indicador de los efectos causados por el estrés oxidativo. Adicionalmente, la asociación de Prx2 a la membrana celular y a otras proteínas, así como cambios en su estado oligomérico, han sido propuestos como marcadores del estrés sufrido por GR en condiciones de almacenamiento [93].

La Prx2 se considera una de las principales enzimas antioxidantes del GR, por reaccionar y detoxificar rápidamente a uno de los oxidantes más abundantes en medios biológicos, el  $H_2O_2$ . Para mantenerse en estado activo, la Prx2 oxidada es reducida por la Trx1, que a su vez se reduce por la TR a expensas de NADPH. Por ello, una de las hipótesis de este trabajo es que el estrés oxidativo podría modificar el metabolismo de la glucosa en GR.

# METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN GLÓBULOS ROJOS

## Glucólisis anaerobia

En GR el ATP es necesario para mantener la homeostasis iónica y estructural dependiente de energía, en pos de adaptarse a las fluctuaciones mecánicas y químicas a las que se exponen en circulación [94]. Además, el ATP puede ser exportado hacia el exterior celular donde cumple un rol fundamental para garantizar el correcto flujo sanguíneo, favoreciendo la vasodilatación en condiciones hipóxicas, inhibiendo la adhesión celular y la permeabilidad indeseada en capilares [95] [96]. La síntesis de ATP en GR se debe exclusivamente a la glucólisis anaerobia, dada la ausencia de mitocondrias y por ende del pool de enzimas que permiten la glucólisis aerobia. Este proceso es 16 veces menos efectivo en la producción de ATP que la fosforilación oxidativa [97] y se da en tejidos privados de  $O_2$  o células carentes de mitocondrias, como los GR. A partir de una molécula de glucosa se generan dos de piruvato, que al no poder entrar al ciclo de Krebs es utilizado como sustrato por la lactato deshidrogenasa en el citoplasma, produciendo lactato y regenerando  $NAD^+$  [16] (Figura 21).



**Figura 21.** Esquema de los productos obtenidos a través de la glucólisis anaerobia. Esta vía metabólica produce 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, en contraste con las 32 moléculas de ATP producidas por fosforilación oxidativa. Extraída de [98].

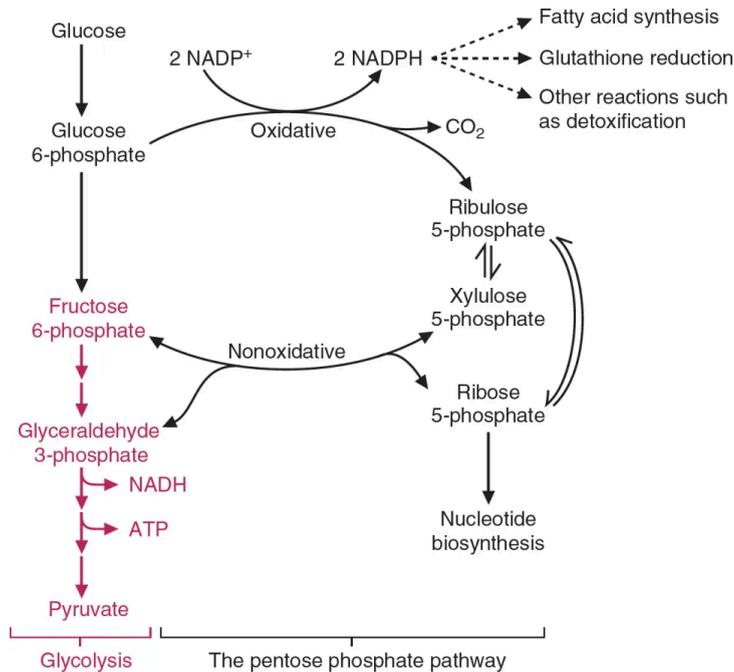
## Biosíntesis y funciones del NADPH: Vía de las pentosas fosfato

Parte de la glucosa en los GR es metabolizada por la vía de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés). Esta ruta metabólica genera poder reductor como NADPH tras la catálisis realizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la fosfogluconato deshidrogenasa (Figura 22).

El NADPH es una molécula crucial en el metabolismo redox del GR. Esta actúa usualmente como coenzima, distribuida de forma ubicua con una concentración reportada en GR que oscila entre 16 y 44.9  $\mu M$  [99–104]. En GR el NADPH es

sustrato de la glutatión reductasa y la TR. La glutatión reductasa recicla el disulfuro de glutatión a su forma reducida, que es usada por la GPx y Grx, mientras que la TR mantiene a la Trx en su forma reducida. La PPP es la única fuente de NADPH en los GR, por lo que su regulación es de suma importancia para mantener la homeostasis redox de estas células [17].

La deficiencia en G6PDH es una de las enzimopatías más comunes y conduce a GR que se hemolizan fácilmente al ser expuestos a oxidantes o fármacos prooxidantes, y es la causa principal de la anemia inducida por fármacos [105].

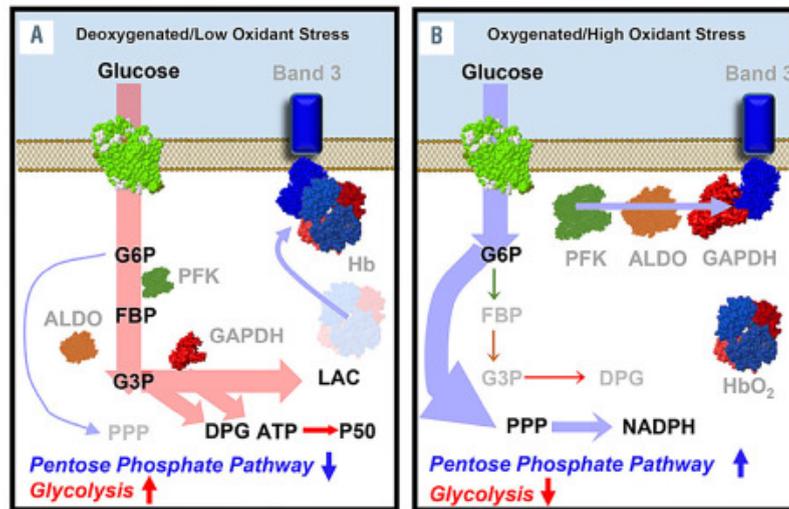


**Figura 22.** Esquema de los dos destinos posibles de la glucosa en GR. La glucosa 6-fosfato puede ser sustrato tanto de la glucosa 6-fosfato isomerasa y seguir la vía glucolítica o de la G6PDH ingresando a la PPP. Esta vía metabólica es la única fuente de NADPH en GR y algunos de sus productos pueden ingresar a la vía glucolítica. Extraída de [106].

### Banda 3 (AE1) como regulador del metabolismo de GR

La banda 3 es la proteína de membrana más abundante en los GR y su principal función es el intercambio de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Además de esta función, la banda 3 es capaz de interactuar con una gran variedad de proteínas estructurales y metabólicas [25]. Una de las interacciones más estudiadas es la que se produce entre la banda 3 y la desoxiHb, cuya unión se da con mucha mayor afinidad que con la  $\text{HbO}_2$  [107]. Dada esta interacción es que se ha propuesto a la Hb como una molécula que no solo transporta el  $\text{O}_2$ , sino que también podría actuar como un “sensor de  $\text{O}_2$ ” que media la regulación del metabolismo por su interacción con la banda 3. Se ha planteado que la banda 3 es capaz de unir, y por ende inhibir, a la enzima glucolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) [108] cuando no está unida a la desoxiHb. De esta forma, la célula sería capaz de desviar a la glucosa hacia la PPP en condiciones de altas concentraciones de  $\text{O}_2$  y mayor estrés oxidativo, donde la

HbO<sub>2</sub> (de baja afinidad por banda 3) no se halla unida y por ende GAPDH es capaz de interactuar con banda 3, disminuyendo la actividad glucolítica ([Figura 23](#)).



**Figura 23.** Esquema de la interacción entre el dominio citoplasmático de banda 3 y la Hb en condiciones de: A) bajo estrés oxidativo y B) alto estrés oxidativo. Cuando el estrés oxidativo es bajo, la Hb se halla desoxigenada, siendo capaz de unirse con alta afinidad a la banda 3 impidiendo la unión de algunas enzimas glucolíticas. En condiciones de alto O<sub>2</sub> y mayor estrés oxidativo, la Hb se halla oxigenada y su afinidad por banda 3 decrece drásticamente, permitiendo la unión de las enzimas glucolíticas y por ende inhibiéndolas, favoreciendo de esta forma la PPP. Extraída de [\[109\]](#).

Esta desviación hacia la PPP genera NADPH, el cual abastece a las enzimas antioxidantes de poder reductor para enfrentar el contexto oxidativo.

Además, se ha reportado la capacidad de las enzimas glucolíticas aldolasa y fosfofructoquinasa [\[110\]](#) [\[111\]](#) de unirse a la banda 3, formando complejos multiméricos que posiblemente se regulan por los niveles de oxigenación [\[112\]](#).

Este fenómeno podría ser de suma relevancia en un contexto de almacenamiento de GR para transfusiones, ya que se ha reportado que la banda 3 se fragmenta por el estrés oxidativo [\[113\]](#) y que progresivamente los GR pierden capacidad de activar la PPP [\[114\]](#).

## LESIONES POR ALMACENAMIENTO

Los GR extraídos para transfusión son considerados uno de los medicamentos esenciales por la OMS. Se estima que cada año se utilizan unas 118.5 millones de unidades de sangre [115], pudiendo ser necesarias en caso de accidentes, enfermedades que provocan anemia, etc. En los bancos de extracción de sangre, los glóbulos son resuspendidos en un hematocrito aproximado del 60%, en una disolución aditiva en condiciones hipotérmicas (1 a 6 °C) en las que se almacenan por hasta 42 días [59] (Figura 24). El límite temporal está dado por una pérdida progresiva de la integridad y funcionalidad de los GR, producida por las denominadas lesiones por almacenamiento.



**Figura 24.** Bolsas de transfusión donde se almacenan los concentrados de GR. La sangre extraída se mezcla con una solución CPD (citrato, fosfato, dextrosa) para evitar la coagulación, se separa del plasma rico en plaquetas por centrifugación y al empaquetado globular se le agrega una solución que contiene cloruro de sodio, adenina, glucosa y manitol (SAGM) y se almacena en condiciones hipotérmicas. Imagen obtenida de [116].

Durante el almacenamiento para transfusión, se producen reacciones químicas (aunque a un ritmo ralentizado) [117] en un contexto distinto al fisiológico, produciéndose cambios a nivel bioquímico y morfológico de los GR, alterando su fisiología y funcionalidad. Algunos de estos cambios alteran el transporte de O<sub>2</sub>, el transporte catiónico, el metabolismo energético y la homeostasis redox [118]. Además, los GR almacenados se hallan exentos de los mecanismos de protección que los sustraen de la circulación cuando es necesario, como en el caso de GR senescentes que son endocitados por macrófagos.

Los motivos que conducen a la aparición de estas lesiones pueden adjudicarse a diversos procesos inherentes a las condiciones de almacenamiento, para las cuales los GR no se hallan evolutivamente preparados para lidiar. Durante el almacenamiento, los GR están expuestos al plástico de las bolsas, además de que el metabolismo de las células produce una acumulación de especies químicas que acidifican el medio (ej. lactato). Por otro lado, el estrés mecánico y oxidativo al que

se enfrentan los glóbulos en bolsas de almacenamiento es muy distinto al que enfrentan en un contexto fisiológico.

Se ha propuesto que uno de los mecanismos responsables de provocar las lesiones por almacenamiento sería la acumulación de daño ocasionado por especies oxidantes en los GR almacenados. La principal fuente de oxidantes estaría dada por la autooxidación de la  $\text{HbO}_2$ , que también produce MetHb. En un contexto fisiológico, la MetHb es reducida por reductasas que, en condiciones hipotérmicas, poseen menor actividad. La MetHb se desnaturaliza a bajas temperaturas dando lugar a globina y hemina o hemo libre [59]. A su vez, los leucocitos podrían contribuir a la formación de oxidantes cuando la sangre extraída no es sometida a un proceso de leucorreducción, como ocurre en Uruguay.

Un estudio del 2016 sobre los efectos en el metabolismo generados por las lesiones por almacenamiento, determinó que en el transcurso de los días los GR almacenados cada vez metabolizan más glucosa por medio de la PPP, produciendo NADPH para suministrar poder reductor a las proteínas antioxidantes que lo emplean [119].

Estudiar los fenómenos relacionados a las lesiones por almacenamiento podría aportar valiosos datos que conduzcan a la optimización de las condiciones de almacenamiento, en pos de alargar y mejorar las condiciones de vida de los GR a ser transfundidos.

## OBJETIVOS

---

### Objetivos generales

El objetivo del presente trabajo es determinar si la exposición de GR a  $H_2O_2$  es capaz de inducir una reprogramación metabólica similar a la que se propone es promovida por el almacenamiento, en donde el estrés oxidativo conduce a los GR a metabolizar más glucosa por medio de la PPP para poder suministrar NADPH a las proteínas antioxidantes.

Por otro lado, se tuvo como objetivo analizar las variantes de Hb presentes en muestras de sangre brindadas por la Intendencia de Montevideo, con especial énfasis en la búsqueda de la variante responsable de la anemia falciforme HbS, en personas afro Uruguayas residentes en Montevideo.

### Objetivos específicos

- Realizar la puesta a punto de un método enzimático que permita cuantificar lactato en GR, basado en el estudio de la cinética de producción de NADH por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH) por medidas espectrofotométricas.
- Estudiar posibles alteraciones en la metabolización de la glucosa en GR ante la exposición a distintas concentraciones de  $H_2O_2$  midiendo la producción de lactato empleando el método enzimático puesto a punto.
- Optimizar un método de ciclado enzimático que permita cuantificar NADPH y  $NADP^+$ .
- Poner a punto un método consistente en cromatografía de intercambio catiónico en HPLC que permita la separación y detección de las distintas variantes de Hb.
- Analizar las muestras brindadas por la Intendencia de Montevideo para determinar las variantes de Hb que presentan.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Reactivos y equipos

Los reactivos empleados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Missouri, EEUU), Applichem (Darmstadt, Alemania), Merck (Darmstadt, Alemania), Biopack (Buenos Aires, Argentina) y J.T Baker (New Jersey, EEUU).

Las medidas de absorbancia para estudiar cinéticas de reacción se llevaron a cabo en un lector de placas Varioskan™ FLASH (ThermoFisher, Massachusetts, EEUU), mientras que las medidas de absorbancia para determinar espectros de la Hb se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent, California, EEUU). Las centrifugaciones se realizaron en una microcentrífuga Eppendorf 5427R (Hamburgo, Alemania).

La columna cromatográfica empleada para estudiar las variantes de Hb fue una ProPac™ SCX-10 4 x 250 mm, Lot No. 01623105, con precolumna ProPac™ SCX-10G 4 x 50 mm, Lot No. 01623105 (ThermoFisher, Massachusetts, EEUU), y las cromatografías se realizaron en un HPLC 1260 (Agilent, California, EEUU) equipado con bomba cuaternaria con desgaseador, detector de absorbancia con arreglo de diodos e inyección manual.

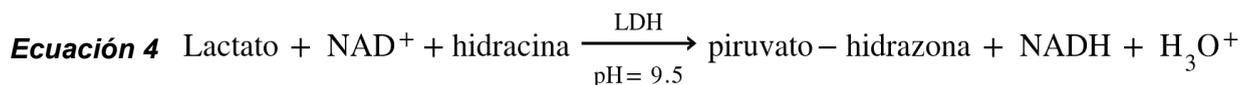
### Obtención de las muestras

Los concentrados de GR empleados para los estudios a nivel del metabolismo fueron obtenidos del Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas de la Universidad de la República, con el consentimiento previo de los donantes. El protocolo de extracción fue aprobado por el Comité de Ética del mismo hospital. La sangre extraída del donante se mezcló en el momento con una solución CPD (105 mM citrato, 16 mM fosfato, 129 mM dextrosa, Terumo Corporation, Tokio, Japón) para evitar la coagulación. Posteriormente las bolsas se centrifugaron a 2200 rpm en una centrifuga de bolsas de transfusión Roto Silenta 63RS (Hettich, Alemania) a 20 °C, para separar el plasma y las plaquetas de los GR, los cuales fueron almacenados a una densidad de 8.77 g/L en solución SAGM (NaCl 8.8 g/L, glucosa 8.2 g/L, manitol 5.2 g/L y adenina 0.3 g/L; OPTISOL, Terumo Corporation, Tokio, Japón). El procedimiento fue llevado a cabo por personal del Hospital de Clínicas.

Por otro lado, las muestras de sangre destinadas al análisis de variantes de Hb fueron brindadas por la Intendencia de Montevideo en el marco de una colaboración con el Laboratorio de Físicoquímica Biológica. Las mismas fueron extraídas en la explanada de la Intendencia en una jornada de concientización sobre la anemia falciforme. Las muestras se encontraban en tubos BD Vacutainer con EDTA como anticoagulante. Por decantación, los GR y otros componentes celulares sedimentaron y se hallaban separados del plasma. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis.

## Puesta a punto de método enzimático para cuantificación de lactato

La determinación de la concentración de lactato se realizó siguiendo el método propuesto por Hohorst en 1965 [120]. Este se basa en seguir espectrofotométricamente la producción de NADH a partir de lactato a una longitud de onda de 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La formación de NADH por acción de la LDH es directamente proporcional a la concentración de lactato en las muestras (Ecuación 4).



La reacción catalizada por la LDH es reversible, por lo que la mezcla de reacción contiene buffer hidracina-glicina (0.18 M hidracina, 0.45 M glicina, 2.25 mM EDTA) a un pH 9.5, de modo de remover los productos de reacción que podrían desplazar el equilibrio hacia la formación de reactivos. Por un lado, los protones se consumen por el pH al que se realiza el ensayo, mientras que la hidracina reacciona con el piruvato para dar piruvato-hidrazona.

El ensayo se realizó en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción está compuesta por buffer hidracina-glicina, 2.5 mM  $\text{NAD}^+$ , LDH 3.5 U/mL y 20  $\mu\text{L}$  de muestra (soluciones de concentración conocida de lactato para la puesta a punto; sobrenadantes de GR para la cuantificación).

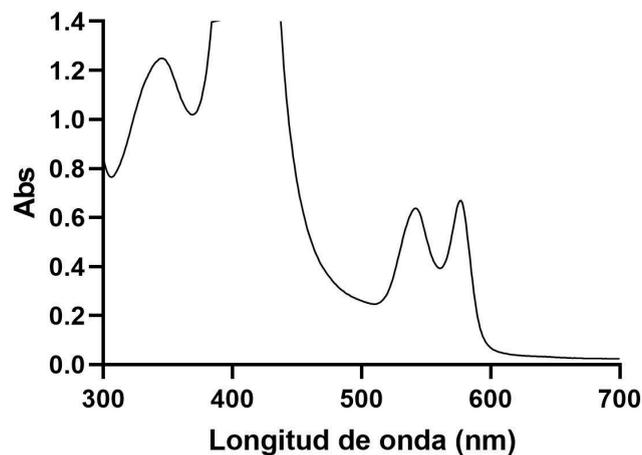
Para verificar la relación lineal entre la absorbancia final y la concentración de lactato, se siguió la cinética de la reacción a diferentes concentraciones de lactato (0 a 100  $\mu\text{M}$ ) durante 20 minutos, midiendo absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Cada condición se midió por duplicado. A partir de la absorbancia final (transcurridos 20 minutos de reacción) para cada condición, se graficó en función de la concentración de lactato. Se realizaron curvas de calibración control con NADH, el producto de la reacción.

## Cuantificación de lactato en glóbulos rojos y efectos del $\text{H}_2\text{O}_2$

Se partió de un concentrado de GR y se realizaron cuatro lavados con igual volumen de buffer HBSS ( $\text{CaCl}_2$  1.26 mM, KCl 5.37 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.44 mM,  $\text{MgSO}_4$  0.81 mM, NaCl 137 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.65 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4.17 mM, glucosa 5.55 mM) para quitar leucocitos e interferencias que pudieran existir en el plasma. Luego de los lavados, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de GR y se mezclaron en tres tubos eppendorf distintos con: 200  $\mu\text{L}$  buffer HBSS, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM (concentración final 1 mM) en buffer HBSS y 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  (concentración final 50  $\mu\text{M}$ ) en buffer HBSS. El hematocrito final en cada condición fue de aproximadamente 25%, y las condiciones se realizaron por triplicado. Posteriormente, los GR expuestos a las diferentes condiciones fueron incubados a 37 °C por 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos, se centrifugaron por 4 minutos a 900 g y se tomaron 20  $\mu\text{L}$  del

sobrenadante para medir la concentración de lactato empleando el método enzimático descrito anteriormente. Se optó por realizar las curvas de calibración graficando absorbancia en función de la concentración de NADH, empleando concentraciones entre 0 y 150  $\mu\text{M}$ , siendo que el NADH es el producto de la reacción de la LDH cuya absorbancia es medida. Se realizaron distintos controles, midiendo la absorbancia del sobrenadante de cada condición en agua y del mix de reacción. Además se midió la concentración de lactato inicial (a tiempo de incubación cero) en GR en HBSS.

Dado que la concentración de lactato obtenida para cada día de experimentación varía directamente con el número de GR, se realizaron espectros de Hb en cada jornada experimental. De este modo, se corrigieron los resultados obtenidos por la concentración de Hb. Para esto, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de GR de la suspensión de hematocrito 25% y se mezclaron con 990  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Los espectros de Hb se realizaron midiendo absorbancia entre 300 y 700 nm ([Figura 25](#)).



**Figura 25.** Espectro de absorción de la Hb entre 300 y 700 nm. Son de interés para cuantificar Hb los picos a 577 y 630 nm. Cerca de 400 nm se encuentra la banda de Soret, de alta absorptividad.

Para cuantificar  $\text{HbO}_2$  a partir de su espectro de absorción se empleó la ecuación empírica:

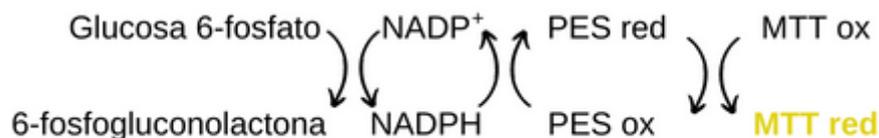
$$\text{Ecuación 5} \quad [\text{HbO}_2] (\mu\text{M}) = 66. \text{Abs}_{577 \text{ nm}} - 80. \text{Abs}_{630 \text{ nm}}$$

Esta ecuación se obtiene a partir de los coeficientes de extinción milimolar de  $\text{HbO}_2$  y MetHb a distintas longitudes de onda [\[121\]](#).

## Optimización de método de ciclado enzimático para cuantificar $\text{NADP}^+$ y NADPH

El método optimizado para la cuantificación de  $\text{NADP}^+$  y NADPH es el propuesto por Zerez, Lee y Tanaka en 1987 [\[101\]](#). Se trata de un método de ciclado enzimático en

el que se emplea la G6PDH y un exceso de glucosa 6-fosfato, de forma de catalizar la reducción de  $\text{NADP}^+$  a NADPH. El NADPH entonces reduce un intermediario redox, la fenazina etosulfato (PES), que a su vez reduce el bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT) ([Figura 26](#)). Tanto el  $\text{NADP}^+$  como el PES oxidado son regenerados en cada ciclo. La cuantificación de  $\text{NADP}^+$  y/o NADPH se basa entonces en seguir por medidas espectrofotométricas la velocidad de generación de MTT reducido, que posee un máximo de absorción a  $\lambda = 570 \text{ nm}$ . La velocidad de producción de MTT reducido es directamente proporcional a la concentración de  $\text{NADP}^+$  y/o NADPH, por lo que realizando una curva de calibración es posible determinar la concentración de  $\text{NADP}^+$  y/o NADPH en muestras problema.



**Figura 26.** Esquema de las reacciones que conducen a la formación de MTT reducido, producto coloreado cuya absorción es medida a  $\lambda = 570 \text{ nm}$ .

Si bien el ensayo no distingue entre  $\text{NADP}^+$  y NADPH, el  $\text{NADP}^+$  puede ser selectivamente destruido al tratar la muestra en un medio alcalino a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos [\[101\]](#).

Durante la puesta a punto del método se constató que algunos de los reactivos empleados, fenazina etosulfato (PES) y/o MTT, son fotosensibles. En base a ello, el ensayo se realizó en oscuridad, evitando reacciones de óxido-reducción promovidas por la luz.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de  $200 \mu\text{L}$ , compuestos de  $20 \mu\text{L}$  de muestra y  $180 \mu\text{L}$  del mix de reacción. El mix de reacción contenía buffer Tris-HCl  $100 \text{ mM}$  pH 8, PES  $2 \text{ mM}$ , MTT  $0.5 \text{ mM}$ , EDTA  $5 \text{ mM}$ , G6PDH  $1.3 \text{ U/mL}$  y glucosa 6-fosfato  $1 \text{ mM}$ .

Para poner a punto el método, las muestras consistieron en soluciones de diferente concentración de  $\text{NADP}^+$ , comprendidas entre 0 y  $400 \text{ nM}$ . Se midió la absorbancia a  $570 \text{ nm}$  cada  $0.5$  minutos a temperatura ambiente. Se determinaron las pendientes  $\Delta\text{Abs}(570)/\Delta t(\text{min})$  y estas se graficaron en función de la concentración de  $\text{NADP}^+$ .

## Procesamiento de muestras para análisis de variantes de hemoglobina

El día del análisis se descongelaron las muestras de sangre y se extrajeron  $100 \mu\text{L}$  de la fracción que contenía los GR, que se mezcló con  $600 \mu\text{L}$  de agua ultrapura mQ. Los mismos se agitaron con un vortex a máxima velocidad por 1 minuto para garantizar la lisis de los GR. Posteriormente se centrifugaron a  $10.000 \text{ g}$  por 5 minutos. Del sobrenadante obtenido se extrajeron  $4 \mu\text{L}$  y se mezclaron con  $400 \mu\text{L}$

de fase móvil "A" (véase sección "[Análisis de variantes de hemoglobina por HPLC](#)"). Por último, se mezcló en vortex por 1 minuto y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de inyectar.

## **Análisis de variantes de hemoglobina por HPLC**

La técnica empleada para estudiar las variantes de Hb fue la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) empleando una columna de intercambio catiónico. La misma es una técnica que permite la purificación de proteínas mediante la interacción de la muestra a separar con una resina cargada negativamente en el interior de la columna cromatográfica (sulfonato en este caso). Se prepararon las fases móviles necesarias con agua ultrapura miliQ y se filtraron en filtros de 0.2 µm. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

La composición de las fases móviles utilizadas fue:

- A. Fase móvil A: 50 mM fosfato sódico y 2 mM cianuro de potasio ajustado a pH 6.0 con ácido fosfórico.
- B. Fase móvil B: 50 mM fosfato sódico, 2 mM cianuro de potasio y 1 M cloruro de sodio ajustado a pH 6.0 con ácido fosfórico.

El gradiente empleado fue el siguiente: 0 min (0% B), 30 min (25% B), 30.5 min (0% B), 40 min (0% B).

Para cerciorar la aptitud de la columna cromatográfica en la separación de proteínas, se realizó un control como se reportaba en la ficha de validación del lote del fabricante, empleando citocromo c y ribonucleasa A como proteínas a separar.

La composición de las fases móviles utilizadas para estos controles fue:

- A. Fase móvil A: 15 mM fosfato sódico ajustado a pH 6.0 con ácido fosfórico.
- B. Fase móvil B: 15 mM fosfato sódico, 1 M cloruro de sodio ajustado a pH 6.0 con ácido fosfórico.

El gradiente empleado fue el siguiente: 0 min (0% B), 13.5 min (32% B), 15.6 min (0% B), 25.5 min (0% B).

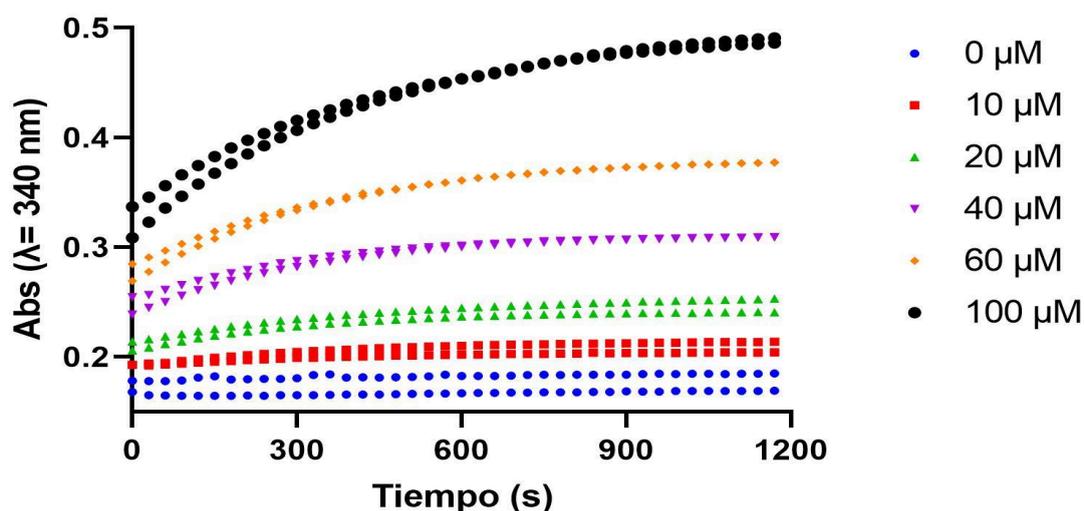
Se inyectaron 10 µL de citocromo c y ribonucleasa A, y la detección se hizo por medidas de absorbancia a 254 nm.

Una vez confirmada la integridad y aptitud de la columna, se procedió al análisis de las muestras provistas por la IM. Para ello, se inyectaron 5 µL de las muestras previamente preparadas como se indica en la sección "[Procesamiento de muestras para análisis de variantes de hemoglobina](#)", y la detección se realizó por medidas de absorbancia a 420 nm, longitud de onda a la que absorbe el grupo hemo de la Hb (banda de Soret).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

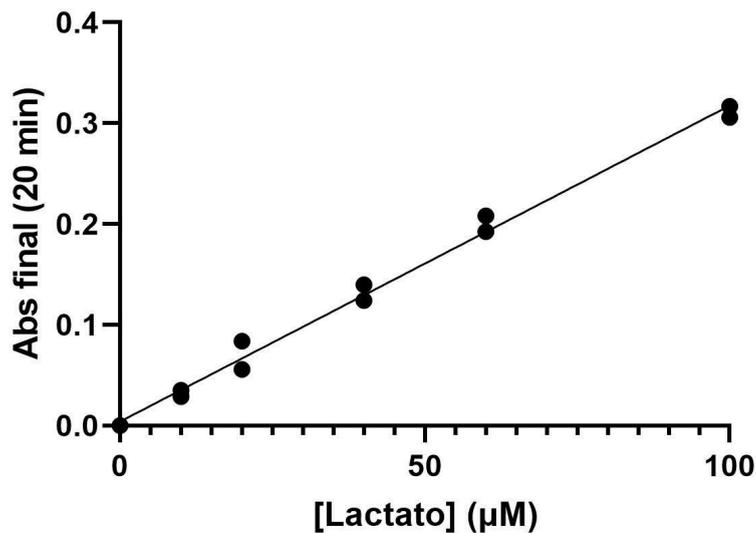
### Cuantificación de lactato por ensayo enzimático

El lactato es un indicador de la cantidad de glucosa metabolizada por glucólisis y por la PPP en GR, ya que carecen de mitocondrias. Por cada mol de glucosa se obtienen dos moles de lactato. Además, es un metabolito de fácil cuantificación en GR ya que es exportado al medio extracelular, permaneciendo en el sobrenadante. Para cuantificar lactato, en primer lugar, se puso a punto un método enzimático. Se estudió la cinética de formación de NADH a partir de lactato por acción de la LDH, en un rango de concentraciones de 0 a 100  $\mu\text{M}$  midiendo cada punto por duplicado ([Figura 27](#)).



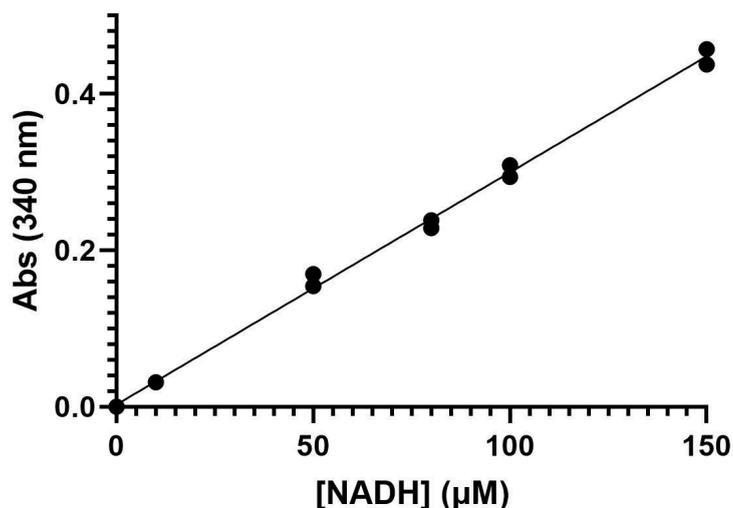
**Figura 27.** Cinética de formación de NADH por la reacción catalizada por la LDH a diferentes concentraciones de lactato medidas por duplicado. Se mide la absorbancia a 340 nm durante 20 minutos, hasta alcanzar un estado estacionario.

Se observó que la reacción llegaba a completitud a los 20 minutos o antes. Se realizó una curva de calibración graficando la absorbancia final ( $t = 20$  minutos) en función de la concentración de lactato, corrigiendo los valores de absorbancia por el blanco ( $[\text{Lactato} = 0]$ ), y se observó un comportamiento lineal en el rango de concentraciones empleado ([Figura 28](#)).



**Figura 28.** Curva de calibración obtenida a partir de graficar la absorbancia final medida en la cinética de producción de NADH en función de la concentración de lactato. Se observa un comportamiento lineal en el rango de concentraciones empleado con la siguiente ecuación de la recta:  $y = 0,003135x + 0,004079$  y un  $R^2 = 0.9925$ .

A modo de control, también se realizó la curva de calibración utilizando soluciones de NADH con concentraciones comprendidas entre 0 y 150  $\mu\text{M}$ , por duplicado ([Figura 29](#)). Nuevamente se observó un comportamiento lineal, con parámetros de la recta prácticamente idénticos (0,003135 y 0,002969  $\text{UA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ , respectivamente) a los obtenidos siguiendo la reacción de la LDH en el rango de concentraciones utilizado. Esto indica que la reacción enzimática empleada en la detección de lactato ocurrió a completitud y que se puede realizar curvas de calibración utilizando directamente NADH, con la finalidad de ahorrar tiempo y reactivos. Además, la pendiente de las Figuras [28](#) y [29](#) debería corresponder a la absortividad del NADH por el paso óptico. El paso óptico de 200  $\mu\text{L}$  en un pocillo de placa de 96 corresponde a 0.51 cm, dando 6.2-5.8  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  de absortividad, en muy buena concordancia con el valor esperado de 6.22  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Por todo esto, se decidió continuar los ensayos utilizando curvas de calibración construidas con NADH para cuantificar lactato en GR.



**Figura 29.** Curva de calibración obtenida midiendo la absorbancia a  $\lambda = 340 \text{ nm}$  en función de la concentración de NADH. Se observa un comportamiento lineal en el rango de concentraciones empleado con la siguiente ecuación de la recta:  $y = 0,002969x + 0,003001$  y un  $R^2 = 0.9971$ .

Con el objetivo de estudiar si la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede provocar una reprogramación del metabolismo de la glucosa en GR, se estudió la formación de lactato en los mismos al cabo de media hora de tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Las medidas de lactato en GR fueron realizadas luego de incubarlos 30 minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  con 0, 0.05 o 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esto se hizo en tres días distintos y midiendo cada condición por triplicado. Además, se realizaron varios controles para cada condición consistiendo en la medida de absorbancia del sobrenadante en agua (sin mix de reacción), controles de concentración de lactato inicial y control de la absorbancia del mix de reacción sin enzima.

Los resultados obtenidos para la cinética de formación de NADH el día 1 se muestran en la [Figura 30](#).

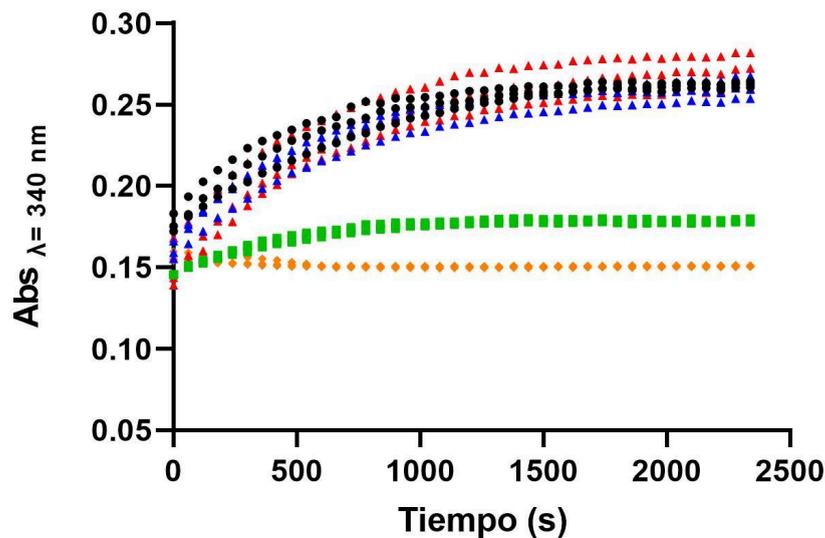
Los valores de absorbancia final obtenidos se sustituyeron en la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración y se corrigieron por el factor de dilución. A continuación, se detalla el procedimiento seguido para obtener los valores de lactato en el día uno, siguiéndose el mismo procedimiento para los otros dos días.

Primero se obtuvieron los valores de absorbancia corregidos ( $\Delta\text{Abs}$ ) por el respectivo control (absorbancia del sobrenadante) para cada condición:

$$\Delta\text{Abs control} = \text{Abs control} - \text{Abs control sobrenadante}$$

Luego se corrige por la absorbancia del mix de reacción. La absorbancia final para cada condición se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Abs final control} = \Delta\text{Abs control} - \text{Abs mix s/enz}$$



**Figura 30.** Cinética de la formación de NADH en GR control (●), expuestos a  $H_2O_2$  50  $\mu M$  (▲) y  $H_2O_2$  1 mM (▲) en HBSS (día 1) para cuantificación de lactato. Se estudia la reacción catalizada por la LDH midiendo absorbancia a  $\lambda = 340$  nm. Las curvas fueron corregidas por los valores de absorbancia del sobrenadante para cada condición. Además, se realizaron controles a tiempo cero para cuantificar lactato inicial (■) y absorbancia del mix de reacción (◆).

Se realizó este procedimiento para cada uno de los triplicados, obteniendo tres valores de absorbancia final de lactato por condición:

$$Abs \text{ final (día 1)} = \Delta Abs \text{ control} - Abs \text{ mix s/enz} = 0.264 - 0.151 = 0.113 \text{ UA}$$

La concentración de lactato se calculó sustituyendo la absorbancia final corregida en la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración Abs vs [NADH] (Figura 29):

$$[Lactato]_1(\text{Condición control}) = \frac{0.113 - 0.003}{0.002969} \times (\text{factor de dilución} = 10) = 370.5 \mu M$$

Para determinar la cantidad de lactato que efectivamente fue producida en esos 30 minutos, se calculó la concentración de lactato a  $t=0$ ,

$$[Lactato]_{t=0} = \frac{(\Delta Abs_{t=0} - Abs \text{ mix s/enz}) - 0.003}{0.002969} = 81.3 \mu M$$

El promedio de los resultados de los triplicados para  $t=0$  se le sustrajo al obtenido para la condición previamente calculada, determinando la concentración de lactato producida al cabo de media hora.

$$[Lactato]_{\text{control } t=30} = 370.5 \mu M - 84 \mu M = 286.5 \mu M$$

La velocidad de producción de lactato es:

$$\Delta[\text{Lactato}] / \Delta t = 286.5 \mu\text{M} / 30 \text{ min} = 9.55 \mu\text{M min}^{-1}$$

El procedimiento se repitió para cada réplica y para cada condición, obteniéndose tres valores de concentración de lactato para la condición control, y para los expuestos a  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \mu\text{M}$  y a  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1 \text{ mM}$ .

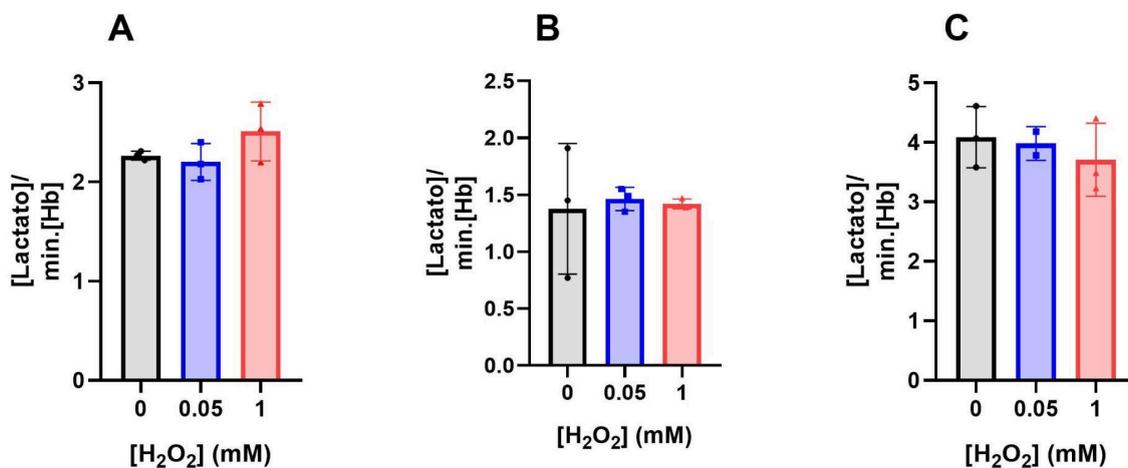
Además, dado que la concentración de lactato producida por los GR varía con el hematocrito, se cuantificó  $\text{HbO}_2$  para cada día a partir de los espectros de absorción de la hemoglobina.

Para calcular la concentración de  $\text{HbO}_2$  se empleó la ecuación:

$$[\text{HbO}_2] = 66. \text{Abs}_{577 \text{ nm}} - 80. \text{Abs}_{630 \text{ nm}} = 66 \times 0.67 - 80 \times 0.035 = 41.4 \mu\text{M}$$

Que se corrige por la dilución de 100 veces que se utilizó para determinar el espectro de absorbancia, dando  $4.14 \text{ mM}$  de  $\text{HbO}_2$ .

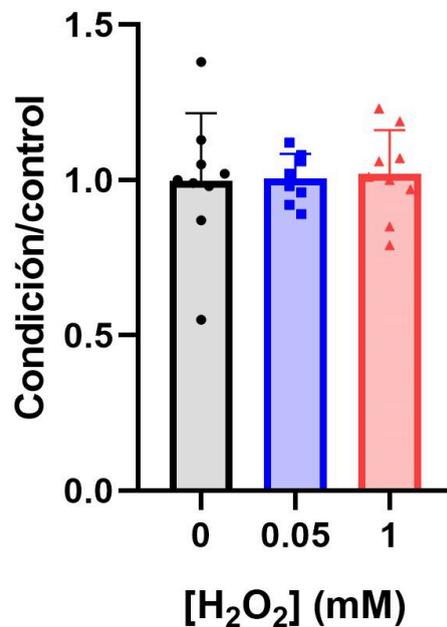
Se realiza el mismo procedimiento para cada día, y se expresan los resultados como:  $\frac{[\text{Lactato}]}{\text{min.}[\text{Hb}]}$  ( $\mu\text{M lactato min}^{-1} \text{ mM}^{-1} \text{ HbO}_2$ ) (Figura 31), sin observarse diferencias significativas entre las condiciones control y los GR expuestos a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 31.** Cuantificación de producción de lactato y efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en tres muestras independientes (A), (B) y (C). Se graficó la concentración de lactato producida por minuto y ponderada por la concentración de Hb de las muestras ( $\mu\text{M lactato min}^{-1} \text{ mM}^{-1} \text{ HbO}_2$ ).

Una vez obtenidos los valores de velocidad de producción de lactato (normalizada por  $\text{HbO}_2$ ) para cada condición en cada una de las tres muestras, se recopilaron todos los datos en un único gráfico de barras. En él, se graficó cada condición en relación al control (condición/control) para independizarse de las fluctuaciones producidas por trabajar con muestras de distintas bolsas de transfusión y en distintos días bajo condiciones de trabajo que pueden haber variado. Se dividió cada

valor de velocidad de producción de lactato (normalizada por  $\text{HbO}_2$ ) por el promedio de los tres valores de la condición control en cada día (Figura 32). Se aplicó el test de análisis de varianza de una vía (ANOVA) empleando el software de procesamiento de datos GraphPad Prism 8.0.1, sin encontrarse diferencias significativas entre el control y los GR tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 32.** Velocidad de producción de lactato expresada como condición/control. Se recopilaron los datos de los tres días de experimentación y se normalizaron por la condición control de cada día. Se realizó un análisis estadístico one-way ANOVA, sin observarse diferencias significativas entre el control y los GR tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Los resultados obtenidos sugieren que la exposición de GR a concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 50  $\mu\text{M}$  y 1 mM no alteran la velocidad de producción de lactato respecto al control. Dado que el lactato producido es directamente proporcional a la glucosa metabolizada tanto por glucólisis como por la PPP, los resultados parecen indicar que el metabolismo de la glucosa no se modifica en las condiciones ensayadas. Esto difiere a lo que se esperaba observar en caso de que el estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  provocase una reprogramación en el metabolismo de la glucosa en pos de producir NADPH para enfrentar el contexto oxidativo. De ser así, hubiéramos esperado observar un aumento en la velocidad de producción de lactato ante la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Un resultado esperado era que al exponer los GR al  $\text{H}_2\text{O}_2$  provocara la oxidación de la Prx2, que lleva a la depleción del NADPH endógeno, y que esto aumentara el uso de glucosa 6-fosfato por la PPP, incrementando la velocidad de producción de lactato. Otro resultado podría haber sido una disminución en la velocidad de producción de lactato por oxidación e inhibición de enzimas claves de la vía glucolítica o de la PPP.

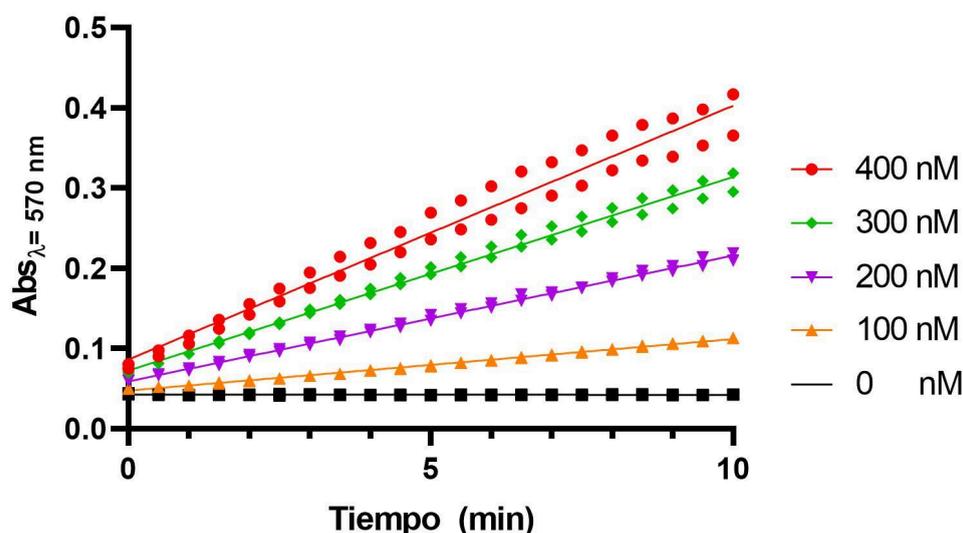
De todas formas, aunque no se hayan observado cambios en la velocidad de producción de lactato, no podemos confirmar que la reprogramación no esté ocurriendo. Podría suceder que exista una compensación entre el aumento del flujo a través de la PPP y la disminución de este por medio de la vía glucolítica. De este modo, podría darse una reprogramación metabólica que favorezca la PPP que no puede detectarse midiendo la producción de lactato, aunque es poco probable.

## Optimización de método de ciclado enzimático para cuantificar NADP<sup>+</sup> y NADPH

Como se detalla en materiales y métodos, la cuantificación de NADP<sup>+</sup> y/o NADPH se basa en un método de ciclado enzimático que usa estos nucleótidos como sustrato limitante. De esta manera, la velocidad de reducción del aceptor final de electrones, el MTT, depende directamente de la concentración inicial de NADP<sup>+</sup> o NADPH.

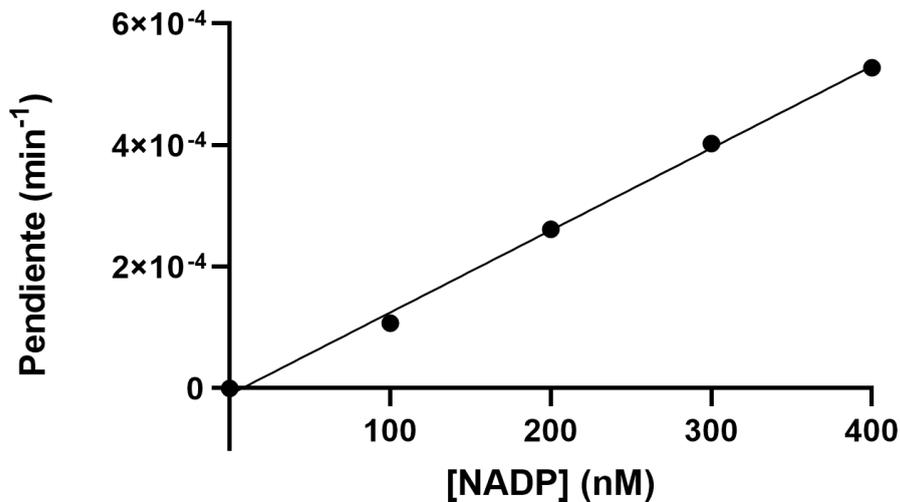
La puesta a punto incluyó el ensayo de diferentes rangos de concentraciones de NADP<sup>+</sup> y enfrentarse a la alta fotosensibilidad de los reactivos PES y MTT que frustró los primeros intentos de cuantificarlo.

En la [Figura 33](#) se muestra un ejemplo de la medida de la producción de MTT reducido midiendo absorbancia a 570 nm durante 10 minutos a distintas concentraciones de NADP<sup>+</sup> realizadas por duplicado, comprendidas entre 0 y 400 nM.



**Figura 33.** Absorbancia a 570 nm en función del tiempo a diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup>. Se observa una tendencia lineal en el rango de concentraciones empleado.

A partir de las curvas obtenidas, se realizó una curva de calibración graficando la pendiente  $\Delta\text{Abs}(570)/\Delta t(\text{min})$  en función de la concentración de NADP<sup>+</sup> ([Figura 34](#)). Se observa una relación lineal en el rango de concentraciones utilizado.



**Figura 34.** Curva de calibración obtenida al graficar las pendientes de las curvas Abs (570 nm) en función del tiempo ( $\Delta\text{Abs}(570)/\Delta t(\text{min})$ ) para cada concentración de NADP<sup>+</sup>. Se observa un comportamiento lineal en el rango de concentraciones entre 0 y 400 nM con la siguiente ecuación de la recta:  $y = 1,352 \times 10^{-6}x - 1,070 \times 10^{-5}$ .

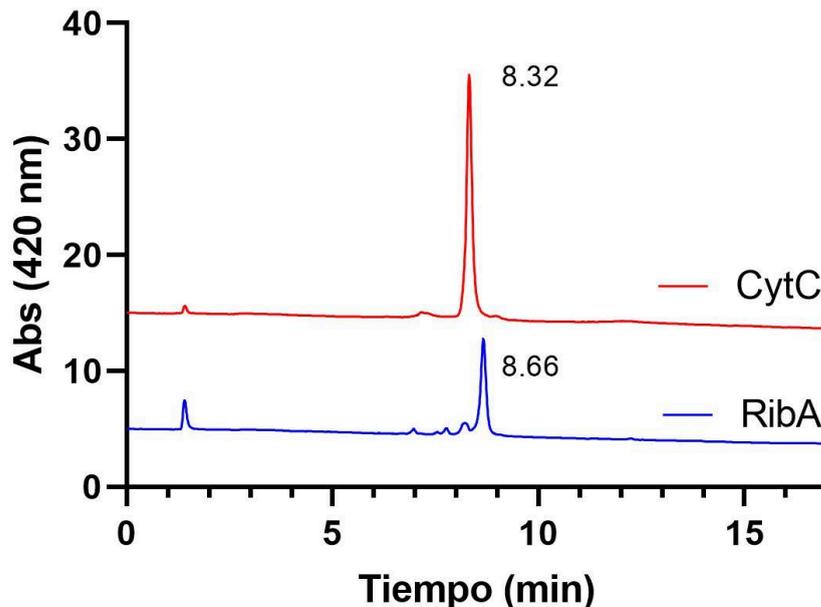
Aunque el método fue optimizado y se constató su alta sensibilidad para cuantificar NADP<sup>+</sup> (y NADPH) a concentraciones de hasta 400 nM, no fue posible realizar medidas en GR. Esto se debió a que durante la puesta a punto del método se agotó la G6PDH, y la reposición demoró considerablemente, por lo que se optó por seguir adelante con otros experimentos. Empleando este método se pretendía cuantificar NADPH a intervalos de tiempo regulares ante la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, realizando un seguimiento del consumo del mismo y su posterior regeneración. Se esperaba observar una disminución de NADPH dependiente de la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la oxidación de la Prx2 y su consumo del NADPH celular, con una lenta recuperación. De todas formas, la optimización del método resultó valiosa para nuestros compañeros de laboratorio, quienes pudieron realizar mediciones en GR almacenados a distintos tiempos, tomando en cuenta consideraciones importantes como las concentraciones óptimas del mix de reacción, la fotosensibilidad de los reactivos y el rango de concentraciones alcanzable.

## **Análisis de variantes de hemoglobina por HPLC**

La determinación de variantes de hemoglobina fue accidentada porque teóricamente se nos habían entregado muestras de pacientes con HbS, que sin embargo no mostraban diferencias en el tiempo de retención respecto a las otras muestras que corresponderían a la hemoglobina normal, HbA. Se consideró la posible falla de la columna cromatográfica, por lo que se realizaron controles con proteínas de referencia.

Para ello, se analizaron los tiempos de retención de citocromo c y ribonucleasa A para evaluar el buen estado de la columna para separar proteínas, como se

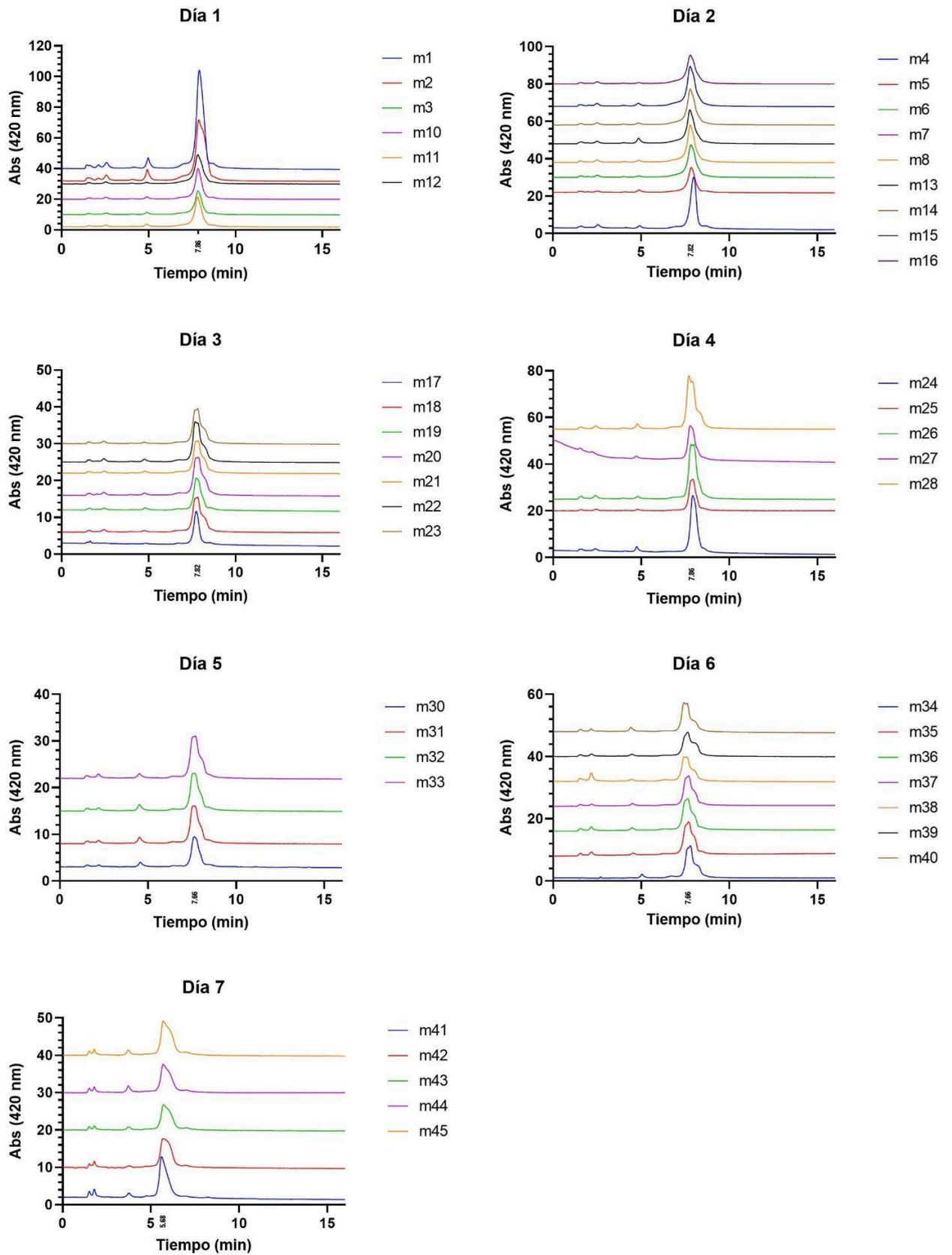
indicaba en la ficha de validación de la columna ([Figura 35](#)). Las proteínas fueron resueltas exitosamente, con tiempos de retención 8.32 y 8.66 para el citocromo c y la ribonucleasa A respectivamente, similares a los reportados por el fabricante. Como referencia, el punto isoeléctrico del citocromo c es 9.44 y el de la ribonucleasa A es 9.6. Al pH de la cromatografía (6.0), ambas proteínas tienen carga positiva, pero citocromo c presenta menor densidad de carga positiva, por lo que se retiene menos.



**Figura 35.** Validación de la columna cromatográfica de intercambio catiónico. Se inyectó citocromo c y ribonucleasa A realizándose la detección por absorbancia a 280 nm. Se observan dos picos con tiempos de retención de 8.32 y 8.66 para el citocromo c y la ribonucleasa A respectivamente, concordante con lo reportado por el fabricante.

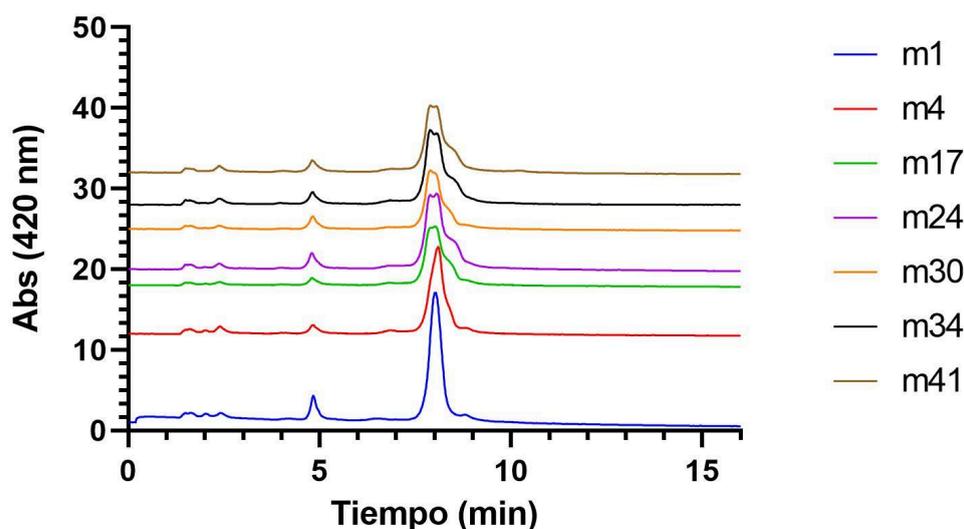
Una vez confirmada la aptitud de la columna, se analizaron las muestras enviadas por la IM almacenadas y procesadas como se indicó en la sección "[Procesamiento de muestras de GR para análisis de variantes de Hb](#)" en 7 días distintos, siguiendo el protocolo descrito en el apartado "[Análisis de variantes de Hb por HPLC](#)" ([Figura 36](#)).

La detección de Hb se realizó midiendo absorbancia a 420 nm. Durante el análisis se observaron cromatogramas muy similares, aunque varió el tiempo de retención entre los distintos días para el pico principal que corresponde a la forma normal de Hb (HbA). El tiempo de retención del pico principal fue cercano a 7.8 minutos, excepto un día que fue 5.6 minutos. Además de los picos más intensos también se identificaron pequeños picos con tiempos de retención menores, los cuales probablemente corresponden a formas de Hb glicosilada. La glicosilación de la Hb ocurre en los residuos de lisina, por lo que se reduce la densidad de carga positiva y disminuye la interacción con la columna cargada negativamente, lo que explicaría los bajos tiempos de retención que presentan.



**Figura 36.** Cromatogramas obtenidos a partir del análisis por HPLC de las muestras enviadas por la IM, donde se analizaron las variantes de Hb. Se realizó la detección por medidas de absorbancia a  $\lambda = 420 \text{ nm}$ .

Debido a que se observan diferencias entre los tiempos de retención en los distintos días, se realizó un control interdía para asegurar el origen estocástico de las diferencias. El control consistió en analizar una muestra representativa de cada día en un mismo experimento (Figura 37). Se observa un pico de elución principal en todas las muestras, aproximadamente a los 8 minutos. Los resultados indican que todas las muestras poseen únicamente un tipo de Hb, HbA. Nuevamente se observan picos más pequeños con tiempos de retención de aproximadamente 5 minutos, que podrían corresponder a formas de Hb glicosilada [122].

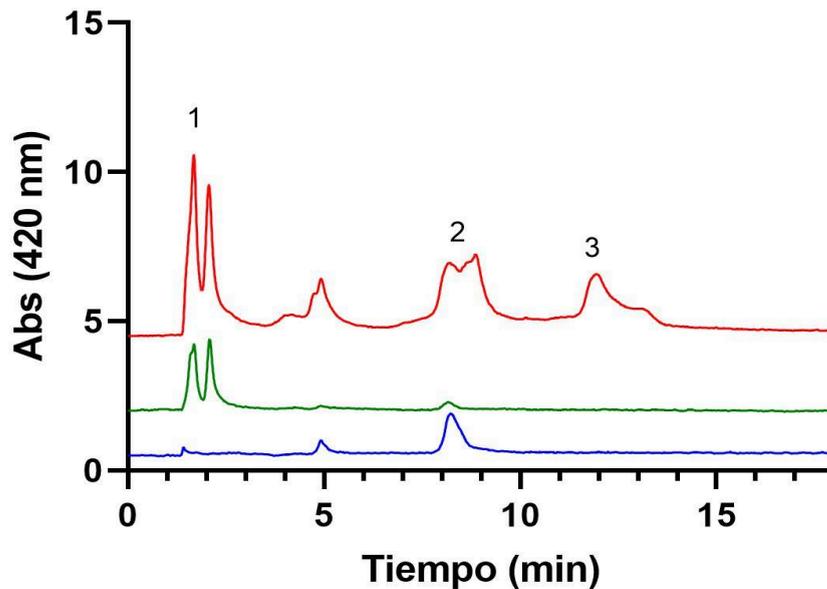


**Figura 37.** Control interdía de las muestras enviadas por la IM. Se analizó por HPLC en un mismo experimento una muestra representativa de cada día para confirmar que las diferencias observadas en los tiempos de retención eran debido a factores estocásticos. Se realizó la detección por medidas de absorbancia a  $\lambda=420$  nm.

Por último, para confirmar que los picos obtenidos en las muestras analizadas correspondían a HbA, se llevó a cabo un control en el que se analizaron tres muestras distintas: una muestra contenía una mezcla de HbF, HbA y HbS (cromatograma rojo), una contenía HbF (cromatograma verde) y por último una de las muestras proporcionadas por la IM escogida al azar (cromatograma azul) (Figura 38). Se observó en la muestra 1 (m1) un pico de elución con un tiempo de retención de 8.2 min (pico 2) correspondiente a la HbA. En los controles se apreció la presencia de HbF en forma de pico doble (pico 1) que eluye a 1.6 y 2.2 minutos y de HbS (pico 3) que eluyó a tiempos de retención mayores, a los 12 minutos, tal como reporta el fabricante. La variación en los tiempos de elución de la HbF y la HbS respecto a la HbA radica en las diferencias en cuanto a la estructura primaria de dichas proteínas. Por un lado, HbF posee dos subunidades  $\gamma$ , que presentan homología con las subunidades  $\beta$  de la HbA. Las subunidades  $\gamma$  poseen menos residuos de aminoácidos cargados positivamente que las subunidades  $\beta$ , lo que

conduce a que HbF experimente menos interacciones de atracción con la resina, eluyendo antes.

Por otro lado, HbS posee una valina en lugar de un glutamato en su subunidad  $\beta$ . Esto resulta en que HbS experimenta menos interacciones de repulsión electrostática, lo que lleva a su elución a tiempos de retención mayores que HbA. Los puntos isoeléctricos de HbF, HbA y HbS son: 6.98, 6.87 y 7.09 respectivamente [123].



**Figura 38.** Controles de tiempos de retención para distintas variantes de Hb. Se analizaron muestras que contenían: una mezcla de hemoglobinas HbF, HbA y HbS (cromatograma rojo); HbF (cromatograma verde) y una muestra representativa de las proporcionadas por la IM seleccionada al azar (cromatograma azul). Se realizó la detección por medidas de absorbancia a 420 nm.

Con los resultados obtenidos se concluyó que todas las muestras provistas por la IM analizadas contienen la variante de Hb normal (HbA) y presuntamente variantes de Hb glicosilada, sin observarse en ningún caso la presencia de HbS, variante responsable de la anemia falciforme.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

Se realizó la puesta a punto de un método enzimático para cuantificar lactato de forma exitosa. Mediante el mismo, se pudo medir la producción de lactato en GR control y expuestos a  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$  y 1 mM. Los resultados obtenidos sugieren que la producción de lactato en las condiciones probadas no se ve alterada, lo cual podría explicarse porque: 1) el estrés oxidativo generado por la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  no induce una reprogramación metabólica que promueva la producción de NADPH o 2) la cuantificación de lactato no brinda información suficiente respecto al flujo metabólico entre la glucólisis y la PPP, dado que podría darse una compensación entre ambas vías siendo que el lactato es producto final de ambas.

Para profundizar en el estudio de esta posible reprogramación metabólica, podrían realizarse análisis de flujos metabólicos cuantificando isotopólogos de lactato  $^{13}\text{C}_3$  (producto de la glucólisis) y  $^{13}\text{C}_2$  (producto de la PPP) por espectrometría de masa tal como lo hicieron en [119]. De esta forma, podría determinarse si existen diferencias entre los productos mencionados ante la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Además, se optimizó satisfactoriamente un método de ciclado enzimático que permite cuantificar NADPH y  $\text{NADP}^+$  en un rango de concentraciones de entre 0 y 400 nM. El método resultó útil para compañeros del laboratorio que pudieron cuantificar NADPH y  $\text{NADP}^+$  a distintos tiempos de almacenamiento, y el mismo método podría emplearse para realizar un seguimiento del consumo de NADPH ante la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la regeneración del mismo post-exposición, como se había ideado inicialmente.

Por otro lado, se llevó a cabo la optimización de un método basado en cromatografía de intercambio catiónico en HPLC que permitió la separación y detección de las variantes de Hb presentes en muestras de sangre brindadas por la Intendencia de Montevideo. A partir de los resultados obtenidos se concluyó que sólo se hallaba la variante de Hb normal HbA, y ninguna de las muestras analizadas correspondía a personas portadoras de la variante HbS, responsable de la anemia falciforme. Este método proporciona una interesante y poderosa herramienta en el diagnóstico de portadores de la HbS. El mismo destaca por su simplicidad, alta sensibilidad y la capacidad de analizar múltiples muestras en un solo montaje experimental. Con la posibilidad de optimizar el protocolo, el análisis de una muestra podría realizarse en 20 minutos, lo que permitiría aumentar considerablemente el número de muestras analizadas en un día.

## BIBLIOGRAFÍA

1. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Anatomy | SEER Training [Internet]. Anatomy. 2023 [citado 16 de junio de 2023]. Disponible en: <https://training.seer.cancer.gov/leukemia/anatomy/>
2. Hematology Glossary [Internet]. [citado 17 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.hematology.org/education/patients/blood-basics>
3. Lang K, Lang P, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber S, Lang F. Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem*. 1 de junio de 2005;15(5):195-202.
4. Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim CT, Suresh S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull Mater Res Soc*. mayo de 2010;35(5):382-8.
5. Barbalato L, Pillarisetty LS. Histology, Red Blood Cell. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 17 de junio de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539702/>
6. Ingley E, Klinken SP. ERYTHROCYTES. En: Laurent GJ, Shapiro SD, editores. *Encyclopedia of Respiratory Medicine* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2006 [citado 16 de junio de 2023]. p. 142-6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123708796001411>
7. Red Blood Cells (SEM) | Peripheral Blood [Internet]. [citado 29 de julio de 2023]. Disponible en: <http://histologyguide.com/EM-view/EM-206-red-blood-cells/07-photo-1.html?f=1>
8. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* Maywood NJ. enero de 2003;228(1):1-14.
9. Beckman B, Silberstein P, Aldoss I. Erythropoiesis. En: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2011. p. 1-4.
10. Pasricha SR, Tye-Din J, Muckenthaler MU, Swinkels DW. Iron deficiency. *The Lancet*. 16 de enero de 2021;397(10270):233-48.
11. Sally P. Stabler. Vitamin B12 deficiency. *NEJM*. 10 de enero de 2013;368:149-60.
12. Koury MJ, Horne DW. Apoptosis mediates and thymidine prevents erythroblast destruction in folate deficiency anemia. *Proc Natl Acad Sci*. 26 de abril de 1994;91(9):4067-71.
13. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 4 de enero de 2013;3(4):a011601.
14. Surgenor D. *The Red Blood Cell*. Elsevier; 2012. 629 p.
15. Viallat A, Abkarian M. Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(3):237-43.
16. Melkonian EA, Schury MP. Biochemistry, Anaerobic Glycolysis. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 27 de julio de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546695/>
17. Möller MN, Orrico F, Villar SF, López AC, Silva N, Donzé M, Thomson L, Denicola A. Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. *ACS Omega*. 10 de enero de 2023;8(1):147-68.
18. Eritrocitos y leucocitos. En: *Harper Bioquímica Ilustrada*. 29 edición. p. 660-76.
19. 2.2 Buffering [Internet]. [citado 17 de junio de 2023]. Disponible en: [http://www.anaesthesiamcq.com/AcidBaseBook/ab2\\_2.php](http://www.anaesthesiamcq.com/AcidBaseBook/ab2_2.php)
20. Bryk AH, Wiśniewski JR. Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. *J Proteome Res*. 4 de agosto de 2017;16(8):2752-61.
21. Rickli EE, Ghazanfar SAS, Gibbons BH, Edsall JT. Carbonic Anhydrases from Human Erythrocytes. *J Biol Chem*. abril de 1964;239(4):1065-78.
22. Monroy LE, Vargas MPS. Anhidrasa carbónica, nuevas perspectivas. *Neumol Cir Torax*. 2010;69(4).
23. Bank RPD. RCSB PDB - 1HCB: ENZYME-SUBSTRATE INTERACTIONS:

- STRUCTURE OF HUMAN CARBONIC ANHYDRASE I COMPLEXED WITH BICARBONATE [Internet]. [citado 29 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/1HCB>
24. Vince JW, Reithmeier RAF. Carbonic Anhydrase II Binds to the Carboxyl Terminus of Human Band 3, the Erythrocyte Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Exchanger \*. *J Biol Chem.* 23 de octubre de 1998;273(43):28430-7.
  25. Reithmeier RAF, Casey JR, Kalli AC, Sansom MSP, Alguel Y, Iwata S. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1 de julio de 2016;1858(7, Part A):1507-32.
  26. Jennings ML. Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1. *Am J Physiol-Cell Physiol.* diciembre de 2021;321(6):C1028-59.
  27. Lux SE IV. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood.* 14 de enero de 2016;127(2):187-99.
  28. Peñuela OA. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colomb Médica.* septiembre de 2005;36(3):215-25.
  29. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature.* 13 de octubre de 1956;178(4537):792-4.
  30. Bank RPD. RCSB PDB - 2HHE: OXYGEN AFFINITY MODULATION BY THE N-TERMINI OF THE BETA CHAINS IN HUMAN AND BOVINE HEMOGLOBIN [Internet]. [citado 17 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/2HHE>
  31. PubChem. Heme b [Internet]. [citado 17 de junio de 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/53356674>
  32. Kilmartin JV. INTERACTION OF HAEMOGLOBIN WITH PROTONS, CO<sub>2</sub> AND 2,3-DIPHOSPHOGLYCERATE. *Br Med Bull.* septiembre de 1976;32(3):209-12.
  33. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;
  34. Kohne E. Hemoglobinopathies. *Dtsch Arztebl Int.* agosto de 2011;108(31-32):532-40.
  35. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 de marzo de 2013;3(3):a011858-a011858.
  36. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *The Lancet.* 11 de diciembre de 2010;376(9757):2018-31.
  37. Bunn HF. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 11 de septiembre de 1997;337(11):762-9.
  38. Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S Polymerization: Primary Determinant of the Hemolytic and Clinical Severity of the Sickling Syndromes. *Blood.* 1 de enero de 1985;65(1):183-9.
  39. Kwon G, To M. Sickle Cell - 6 [Internet]. ERA. 2018 [citado 29 de julio de 2023]. Disponible en: <https://era.library.ualberta.ca/items/455e7cca-1a65-41af-b84e-24fba0fdfe8>
  40. Pegelow M Charles H, Colangelo M Linda, Steinberg M Martin, Wright P Elizabeth C, Smith M Jeanne, Phillips M George, Vichinsky M Elliott. Natural History of Blood Pressure in Sickle Cell Disease: Risks for Stroke and Death Associated with Relative Hypertension in Sickle Cell Anemia. *Am J Med.* 1 de febrero de 1997;102(2):171-7.
  41. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moehr JW, Wethers DL, Pegelow CH, Gill FM, Sickle Cell Disease the CS of. *Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors.* *Blood.* 1 de enero de 1998;91(1):288-94.
  42. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP. Pulmonary Hypertension as a Risk Factor for Death in Patients with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 26 de febrero de

- 2004;350(9):886-95.
43. American Journal of Hematology | Blood Research Journal | Wiley Online Library [Internet]. [citado 29 de julio de 2023]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajh.20642>
  44. Repka T, Hebbel R. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood*. 15 de noviembre de 1991;78(10):2753-8.
  45. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*. diciembre de 2002;8(12):1383-9.
  46. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. junio de 1988;333(6174):664-6.
  47. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. julio de 1995;96(1):60-8.
  48. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. 1 The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillière's Clin Haematol*. 1 de marzo de 1998;11(1):1-51.
  49. Williams TN, Mwangi TW, Roberts DJ, Alexander ND, Weatherall DJ, Wambua S, Kortok M, Snow RW, Marsh K. An Immune Basis for Malaria Protection by the Sickle Cell Trait. *PLoS Med*. mayo de 2005;2(5):e128.
  50. May J, Evans JA, Timmann C, Ehmen C, Busch W, Thye T, Agbenyega T, Horstmann RD. Hemoglobin Variants and Disease Manifestations in Severe Falciparum Malaria. *JAMA*. 23 de mayo de 2007;297(20):2220-6.
  51. Wellems TE, Hayton K, Fairhurst RM. The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities. *J Clin Invest*. 1 de septiembre de 2009;119(9):2496-505.
  52. Modell B. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*. 1 de junio de 2008;2008(6):480-7.
  53. Bain BJ. Neonatal/newborn haemoglobinopathy screening in Europe and Africa. *J Clin Pathol*. enero de 2009;62(1):53-6.
  54. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The Clinical Information Value of the Glycosylated Hemoglobin Assay. *N Engl J Med*. 9 de febrero de 1984;310(6):341-6.
  55. Frantzen F. Chromatographic and electrophoretic methods for modified hemoglobins. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 10 de octubre de 1997;699(1):269-86.
  56. Audicio P, Segobia B, Queijo C, Queiruga G. Primeros resultados del Plan Piloto de Pesquisa Neonatal de Hemoglobinopatías en Uruguay: first results in Uruguay. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam*. junio de 2017;51(2):243-8.
  57. Bayr H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*. diciembre de 2005;33(12):S498.
  58. Abugo OO, Rifkind JM. Oxidation of hemoglobin and the enhancement produced by nitroblue tetrazolium. *J Biol Chem*. 7 de octubre de 1994;269(40):24845-53.
  59. Yoshida T, Prudent M, D'Alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus*. enero de 2019;17(1):27-52.
  60. Cao Z, Bell JB, Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Nitrite enhances RBC hypoxic ATP synthesis and the release of ATP into the vasculature: a new mechanism for nitrite-induced vasodilation. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. octubre de 2009;297(4):H1494-503.
  61. Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol*. 2014;5:84.
  62. Orrico F, Lopez AC, Saliwonczyk D, Acosta C, Rodriguez-Grecco I, Mouro-Chanteloup I, Ostuni MA, Denicola A, Thomson L, Möller MN. The permeability of human red blood cell membranes to hydrogen peroxide is independent of aquaporins. *J Biol Chem [Internet]*. 1 de enero de 2022 [citado 26 de julio de 2023];298(1). Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(21\)01313-2/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(21)01313-2/abstract)
  63. Forman HJ, Bernardo A, Davies KJA. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch Biochem Biophys*. 1 de agosto de 2016;603:48-53.

64. Orrico F, Möller MN, Cassina A, Denicola A, Thomson L. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption by red blood cells. *Free Radic Biol Med.* 1 de junio de 2018;121:231-9.
65. PubChem. Glutathione [Internet]. [citado 30 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886>
66. Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH. Glutathione. *Arab Book.* febrero de 2011;2011(9):1-32.
67. Bank RPD. RCSB PDB - 2C9V: Atomic resolution structure of Cu-Zn Human Superoxide dismutase [Internet]. [citado 29 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/2C9V>
68. Gleitzmann J, Raab A, Schulze D, Wätzig H, Feldmann J, Swart C. Accurate and precise quantification of Cu,Zn-SOD in human red blood cells using species-specific double and triple IDMS. *J Anal At Spectrom.* 2016;31(9):1922-8.
69. Gärtner A, Weser U. Erythrocyte Cu,Zn superoxide dismutase is the major copper protein of the red blood cell. *FEBS Lett.* 2 de mayo de 1983;155(1):15-8.
70. Islam MN, Rauf A, Fahad FI, Emran TB, Mitra S, Olatunde A, Shariati MA, Rebezov M, Rengasamy KRR, Mubarak MS. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 12 de septiembre de 2022;62(26):7282-300.
71. Bank RPD. RCSB PDB - 1DGB: HUMAN ERYTHROCYTE CATALASE [Internet]. [citado 30 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/1DGB>
72. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of Protection of Catalase by NADPH: KINETICS AND STOICHIOMETRY \*. *J Biol Chem.* 14 de mayo de 1999;274(20):13908-14.
73. Handy DE, Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic Biol Med.* 1 de agosto de 2022;188:146-61.
74. Bank RPD. RCSB PDB - 2F8A: Crystal structure of the selenocysteine to glycine mutant of human glutathione peroxidase 1 [Internet]. [citado 30 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/2F8A>
75. Rocha S, Gomes D, Lima M, Bronze-da-Rocha E, Santos-Silva A. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. *Free Radic Res.* 3 de agosto de 2015;49(8):990-1003.
76. Carlberg I, Mannervik B. [59] Glutathione reductase. En: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1985 [citado 24 de julio de 2023]. p. 484-90. (Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds; vol. 113). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687985130624>
77. Thieme R, Pai EF, Schirmer RH, Schulz GE. Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution. *J Mol Biol.* 15 de noviembre de 1981;152(4):763-82.
78. Bank RPD. RCSB PDB - 1GRE: SUBSTRATE BINDING AND CATALYSIS BY GLUTATHIONE REDUCTASE AS DERIVED FROM REFINED ENZYME: SUBSTRATE CRYSTAL STRUCTURES AT 2 ANGSTROMS RESOLUTION [Internet]. [citado 1 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/1GRE>
79. Yang Y, Jao S chuan, Nanduri S, Starke DW, Mieyal JJ, Qin J. Reactivity of the Human Thioltransferase (Glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S Mutant and NMR Solution Structure of Its Glutathionyl Mixed Disulfide Intermediate Reflect Catalytic Specificity,. *Biochemistry.* 1 de diciembre de 1998;37(49):17145-56.
80. Couturier J, Jacquot JP, Rouhier N. Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell Mol Life Sci.* 1 de agosto de 2009;66(15):2539-57.
81. Terada T, Oshida T, Nishimura M, Maeda H, Hara T, Hosomi S, Mizoguchi T, Nishihara T. Study on Human Erythrocyte Thioltransferase: Comparative Characterization with Bovine Enzyme and Its Physiological Role under Oxidative Stress. *J Biochem (Tokyo).* 1 de mayo de 1992;111(5):688-92.
82. Mieyal JJ, Starke DW, Gravina SA, Doherty C, Chung JS. Thioltransferase in human

- red blood cells: purification and properties. *Biochemistry*. 25 de junio de 1991;30(25):6088-97.
83. Haunhorst P, Hanschmann EM, Bräutigam L, Stehling O, Hoffmann B, Mühlenhoff U, Lill R, Berndt C, Lillig CH. Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. *Mol Biol Cell*. 15 de junio de 2013;24(12):1895-903.
  84. Qin J, Clore GM, Gronenborn AM. The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. *Structure*. 1 de junio de 1994;2(6):503-22.
  85. Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*. 1985;54(1):237-71.
  86. Lo YC, Ko TP, Su WC, Su TL, Wang AHJ. Terpyridine–platinum(II) complexes are effective inhibitors of mammalian topoisomerases and human thioredoxin reductase 1. *J Inorg Biochem*. 1 de julio de 2009;103(7):1082-92.
  87. Zhong L, Arnér ES, Holmgren A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de mayo de 2000;97(11):5854-9.
  88. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. 8 de enero de 2014;66:75-87.
  89. Low FM, Hampton MB, Peskin AV, Winterbourn CC. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood*. 15 de marzo de 2007;109(6):2611-7.
  90. Peskin AV, Meotti FC, Kean KM, Göbl C, Peixoto AS, Pace PE, Horne CR, Heath SG, Crowther JM, Dobson RCJ, Karplus PA, Winterbourn CC. Modifying the resolving cysteine affects the structure and hydrogen peroxide reactivity of peroxiredoxin 2. *J Biol Chem [Internet]*. 1 de enero de 2021 [citado 4 de agosto de 2023];296. Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(21\)00269-6/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(21)00269-6/abstract)
  91. Rabilloud T, Berthier R, Vinçon M, Ferbus D, Goubin G, Lawrence JJ. Early events in erythroid differentiation: accumulation of the acidic peroxidoxin (PRP/TSA/NKEF-B). *Biochem J*. 15 de diciembre de 1995;312(3):699-705.
  92. Lee TH, Kim SU, Yu SL, Kim SH, Park DS, Moon HB, Dho SH, Kwon KS, Kwon HJ, Han YH, Jeong S, Kang SW, Shin HS, Lee KK, Rhee SG, Yu DY. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood*. 15 de junio de 2003;101(12):5033-8.
  93. Rinalducci S, D'Amici GM, Blasi B, Vaglio S, Grazzini G, Zolla L. Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. *Transfusion (Paris)*. 2011;51(7):1439-49.
  94. McMahon TJ. Red Blood Cell Deformability, Vasoactive Mediators, and Adhesion. *Front Physiol*. 15 de noviembre de 2019;10:1417.
  95. Zhu H, Zennadi R, Xu BX, Eu JP, Torok JA, Telen MJ, McMahon TJ. Impaired adenosine-5'-triphosphate release from red blood cells promotes their adhesion to endothelial cells: a mechanism of hypoxemia after transfusion. *Crit Care Med*. noviembre de 2011;39(11):2478-86.
  96. Kirby BS, Sparks MA, Lazarowski ER, Lopez Domowicz DA, Zhu H, McMahon TJ. Pannexin 1 channels control the hemodynamic response to hypoxia by regulating O<sub>2</sub>-sensitive extracellular ATP in blood. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. marzo de 2021;320(3):H1055-65.
  97. Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem*. 2010;17(7):672-97.
  98. Energetics of Anaerobic Glycolysis: Glycolysis, Anaerobic Glycolysis, Energetics of Anaerobic Glycolysis and FAQs [Internet]. BYJUS. [citado 5 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://byjus.com/neet/energetics-of-anaerobic-glycolysis/>
  99. Micheli V, Simmonds HA, Bari M, Pompucci G. HPLC determination of oxidized and reduced pyridine coenzymes in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*. 29 de octubre de 1993;220(1):1-17.

100. Wagner TC, Scott MD. Single Extraction Method for the Spectrophotometric Quantification of Oxidized and Reduced Pyridine Nucleotides in Erythrocytes. *Anal Biochem.* 1 de noviembre de 1994;222(2):417-26.
101. Zerez CR, Lee SJ, Tanaka KR. Spectrophotometric determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes using a single extraction procedure. *Anal Biochem.* 1 de agosto de 1987;164(2):367-73.
102. Al-Ali AK. Pyridine nucleotide redox potential in erythrocytes of saudi subjects with sickle cell disease. *Acta Haematol.* 2002;108(1):19-22.
103. Stocchi V, Cucchiaroni L, Magnani M, Chiarantini L, Palma P, Crescentini G. Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem.* abril de 1985;146(1):118-24.
104. Ogasawara Y, Funakoshi M, Ishii K. 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. *Biol Pharm Bull.* noviembre de 2009;32(11):1819-23.
105. Burka ER, Weaver Z, Marks PA. Clinical Spectrum of Hemolytic Anemia Associated with Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Ann Intern Med.* abril de 1966;64(4):817-25.
106. Themes UFO. Pentose Phosphate Pathway and the Synthesis of Glycosides, Lactose, Glycoproteins, and Glycolipids [Internet]. *Basicmedical Key.* 2022 [citado 5 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://basicmedicalkey.com/pentose-phosphate-pathway-and-the-synthesis-of-glycosides-lactose-glycoproteins-and-glycolipids/>
107. Chu H, Breite A, Ciraolo P, Franco RS, Low PS. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties. *Blood.* 15 de enero de 2008;111(2):932-8.
108. Tsai IH, Murthy SN, Steck TL. Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem.* febrero de 1982;257(3):1438-42.
109. Satchwell TJ, Toye AM. Band 3, an essential red blood cell hub of activity. *Haematologica.* 1 de noviembre de 2021;106(11):2792-3.
110. Murthy SN, Liu T, Kaul RK, Köhler H, Steck TL. The aldolase-binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH<sub>2</sub> terminus of band 3. *J Biol Chem.* noviembre de 1981;256(21):11203-8.
111. Higashi T, Richards CS, Uyeda K. The interaction of phosphofructokinase with erythrocyte membranes. *J Biol Chem.* 1979;254(19):9542-50.
112. Campanella ME, Chu H, Low PS. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci.* 15 de febrero de 2005;102(7):2402-7.
113. Rinalducci S, Ferru E, Blasi B, Turrini F, Zolla L. Oxidative stress and caspase-mediated fragmentation of cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 during blood storage. *Blood Transfus.* mayo de 2012;10(Suppl 2):s55-62.
114. Messana I, Ferroni L, Misiti F, Girelli G, Pupella S, Castagnola M, Zappacosta B, Giardina B. Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation. *Transfusion (Paris).* 2000;40(3):353-60.
115. Facts in pictures: Blood transfusion [Internet]. [citado 27 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/blood-transfusion>
116. Sangre almacenada para transfusiones es práctica post cirugía cardíaca [Internet]. *Labmedica.es.* 2015 [citado 5 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.labmedica.es/hematologia/articulos/294761455/sangre-almacenada-para-tranfusiones-es-practica-post-cirurgia-cardiaca.html>
117. Yurkovich JT, Zielinski DC, Yang L, Paglia G, Rolfsson O, Sigurjónsson ÓE, Broddrick JT, Bordbar A, Wichuk K, Brynjólfsson S, Pálsson S, Gudmundsson S, Pálsson BO. Quantitative time-course metabolomics in human red blood cells reveal the

- temperature dependence of human metabolic networks. *J Biol Chem.* 1 de diciembre de 2017;292(48):19556-64.
118. D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, Antonelou MH, Hansen KC, Papassideri IS, Zolla L. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion (Paris).* 2015;55(1):205-19.
  119. Reisz JA, Wither MJ, Dzieciatkowska M, Nemkov T, Issaian A, Yoshida T, Dunham AJ, Hill RC, Hansen KC, D'Alessandro A. Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells. *Blood.* 22 de septiembre de 2016;128(12):e32-42.
  120. Hohorst HJ. L-(+)-Lactate: Determination with Lactic Dehydrogenase and DPN. En: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis* [Internet]. Academic Press; 1965 [citado 1 de agosto de 2023]. p. 266-77. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012395630950058X>
  121. Winterbourn CC. [26] Oxidative reactions of hemoglobin. En: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1990 [citado 29 de agosto de 2023]. p. 265-72. (Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants; vol. 186). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799086118F>
  122. Trivelli LA, Ranney HM, Lai HT. Hemoglobin Components in Patients with Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 18 de febrero de 1971;284(7):353-7.
  123. White JC, Beaven GH. A Review of the Varieties of Human Haemoglobin in Health and Disease. *J Clin Pathol.* agosto de 1954;7(3):175-200.