

Tesis de Maestría
PROINBIO

“Efecto de la leucorreducción sobre las lesiones por almacenamiento en concentrados de glóbulos rojos almacenados para transfusión”

Autor: Cecilia Acosta

Tutores:

Dra. Leonor Thomson, Facultad de Ciencias,
Universidad de la República

Dr. Ismael Rodríguez, Facultad de Medicina,
Hospital de Clínicas, Universidad de la
República

INDICE

TABLA DE CONTENIDO

Resumen:	3
Fundamentación y antecedentes.....	6
Características estructurales y funcionales de los globulos rojos.....	6
Metabolismo de los eritrocitos:	9
La membrana plasmática y el citoesqueleto de los GR	12
La transfusión sanguínea	17
Importancia del tema y situación actual en Uruguay	17
Lesiones por almacenamiento de GR	18
Cambios estructurales.....	19
Liberación de vesículas extracelulares	22
Inflamación y trombosis.....	24
Controles de calidad de sangre desplasmaticada.	28
Leucorreducción.....	29
Hipótesis	35
Objetivo general	36
Objetivos específicos	36
Materiales y métodos	37
Productos químicos.....	37
Obtención de sangre desplasmaticada.....	37
Aislamiento de microvesículas.....	39
Caracterización hematológica de las muestras.....	39
Determinación de metabolitos en el sobrenadante.	39
Determinación de hemoglobina en el sobrenadante.....	40
evaluacion de IL-1 β por Western Blot.....	40
Cultivo de Células THP-1	41
Análisis de activación de NF κ B.....	42
Análisis de la gelificación del plasma.	43
Análisis estadísticos.....	43
Resultados	45
Evolución de los parámetros hematológicos durante el almacenamiento.....	45
.....	45
Discusion de resultados	48

Evolución de los parámetros metabólicos durante el almacenamiento.....	48
Discusión de resultados	49
Evaluación del daño celular durante el almacenamiento	50
Lisis eritrocitaria	50
Discusión de resultados	51
Lisis leucocitaria.....	52
Discusión de resultados	54
Efecto proinflamatorio del sobrenadante de las bolsas de transfusión.....	54
Producción de IL-1 β	54
Discusión de resultados	56
Activación de NF κ B inducida por el sobrenadante	56
Discusión de resultados	58
Actividad procoagulante del sobrenadante de los cGR.....	60
Discusión integrativa de resultados.....	66
Conclusiones	70
Perspectivas.....	72
Referencias	73

RESUMEN:

Las reacciones adversas a la transfusión de hemocomponentes son una complicación potencial en los pacientes transfundidos. Estos efectos deletéreos se deben a cambios metabólicos y estructurales que afectan a los glóbulos rojos (GR) durante el almacenamiento, denominadas “lesiones por almacenamiento”. La instauración de técnicas de leucorreducción ha disminuido la frecuencia de algunas reacciones desfavorables en las cuales los propios leucocitos o sus mediadores solubles están involucrados. Sin embargo, su impacto sobre la activación inflamatoria y procoagulante asociada al almacenamiento de concentrados de GR no se encuentra completamente caracterizado. Según el último reporte del Servicio Nacional de Sangre emitido en el 2021, en nuestro país se realizaron 107.705 transfusiones de hemocomponentes celulares al año (sangre desplasmatazada y concentrados plaquetarios) y solo 16.488 fueron preparados leucorreducidos (LR). En este contexto, la pregunta biológica de este trabajo fue determinar si la leucorreducción modifica la activación inflamatoria y procoagulante asociada al almacenamiento de concentrados de glóbulos rojos. Se planteó como hipótesis que la leucorreducción disminuye tanto la activación inflamatoria como el potencial procoagulante mediado por factores solubles presentes en el sobrenadante de los concentrados almacenados.

El objetivo de esta investigación ha sido investigar el efecto de la LR sobre diferentes parámetros relevantes de los GR almacenados en las mismas condiciones que en el banco de sangre. En el estudio se evaluó la integridad de los GR, el potencial de los factores solubles presentes en el sobrenadante de las bolsas de transfusión de desencadenar la activación de células del sistema inmune celular actuando sobre monocitos/macrófagos, y la capacidad del sobrenadante de activar la cascada de la coagulación. En los concentrados de GR (cGR) LR observamos una disminución de la hemólisis de los GR respecto a los no leucorreducidos (NLR), lo que sugiere una mejor preservación de la integridad celular. Al mismo tiempo, el sobrenadante de los cGR LR presentaron una presencia menor de la fracción activada de IL-1 β y una menor capacidad de inducir la activación del factor nuclear NF κ B en células THP-1 en cultivo, evidenciando una disminución de la actividad

proinflamatoria. Los sobrenadantes de los cGR almacenados durante 42 días fueron capaces de activar la formación del coágulo de fibrina al agregarlos sobre plasma humano, independientemente de la presencia de leucocitos en la bolsa. No obstante, este proceso fue más precoz y mostró una mayor velocidad en presencia del sobrenadante de las bolsas NLR, lo que sugiere un mayor potencial procoagulante en ausencia de leucorreducción. La fracción de microvesículas fue la principal responsable del efecto procoagulante del sobrenadante de las bolsas de transfusión.

En conjunto, los resultados obtenidos confirman parcialmente la hipótesis planteada, ya que la leucorreducción reduce la activación inflamatoria y mejora la integridad de los glóbulos rojos, aunque no elimina completamente el potencial procoagulante asociado al almacenamiento. Estos hallazgos refuerzan los beneficios de la leucorreducción y aportan nueva evidencia sobre los mecanismos involucrados en las lesiones por almacenamiento.

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre común
ALDO	Aldolasa
AC	Anhidrasa carbónica
AE1	Intercambiador de aniones 1 o banda 3
ATP	Adenosín trifosfato
BPG	Bifosfoglicerato
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
EMP	Vía de Embden-Meyerhof-Parnas (via glucolítica)
GEC	Complejo enzimático glucolítico (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfofructoquinasa, deshidrogenasa láctica, piruvato quinasa, aldolasa y enolasa);
GR	Glóbulos rojos
cGR	Concentrados de GR
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
Glut1	Transportador de glucosa 1
G3P	Glucosa-3-fosfato
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GPI	Glucosa fosfato isomerasa
FBP	Fructosa 1,6-bifosfatasa
FBPasa	Fructosa-1,6-bifosfatasa
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
Glut1	Transportador de glucosa 1

G6P	Glucosa-6-fosfato
GPA	Glicoforina A
GPB	Glicoforina B
GPC/D	Glicoforinas C y D
Gpx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HK	Hexoquinasa
LAC	Lactato
LW	Landsteiner-wiener
MCT	Transportador de mono carboxilatos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
O ₂ Hb	Hemoglobina oxigenada
PFK	Fosfofructoquinasa
PMN	Polimorfonucleares
PPP	Vía de las pentosas fosfato
Prx	Peroxiredoxina
PS	Fosfatidilserina
RA	Reacciones adversas transfusionales
RDW	Ancho de distribución eritrocitaria
RFNHT	Reacción febril no hemolítica transfusional
RHAG	Glucoproteína asociada a Rh
SVE	Sobrenadante de VE
ST	Sangre total
TRALI	Lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión
TEV	Tromboembolia venosa
VCM	Volumen corpuscular medio
VE	Vesículas extracelulares

FUNDAMENTACIÓN Y ANTECEDENTES

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LOS GLOBULOS ROJOS

La principal función de los glóbulos rojos (GR) en la circulación es el transporte de oxígeno desde los pulmones a los tejidos periféricos, donde se empleará por la cadena de transporte de electrones mitocondrial, acoplada a la síntesis de adenosina trifosfato (ATP). Adicionalmente, los GR aportan la anhidrasa carbónica que cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono, facilitando su transporte plasmático y eliminación pulmonar, colaborando en la homeostasis de

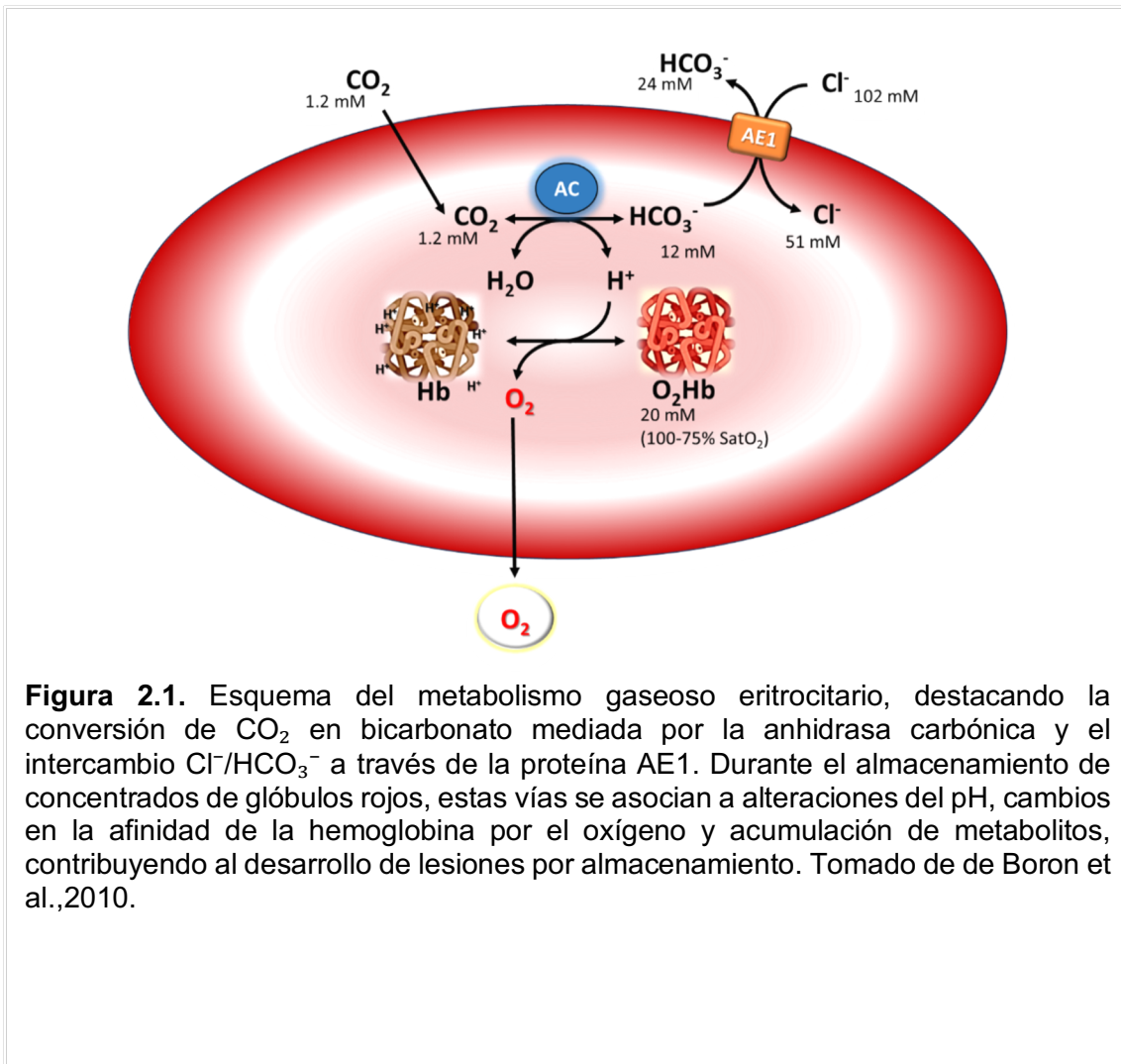


Figura 2.1. Esquema del metabolismo gaseoso eritrocitario, destacando la conversión de CO_2 en bicarbonato mediada por la anhidrasa carbónica y el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ a través de la proteína AE1. Durante el almacenamiento de concentrados de glóbulos rojos, estas vías se asocian a alteraciones del pH, cambios en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y acumulación de metabolitos, contribuyendo al desarrollo de lesiones por almacenamiento. Tomado de de Boron et al.,2010.

protones [1] (Figura 2.1). A su vez, la disminución del pH intra eritrocitario a nivel periférico disminuye la afinidad de la hemoglobina (Hb) por el O₂ (efecto Bohr).

El GR carece de núcleo, mitocondrias, complejo de Golgi, retículo endoplásmico. Esta característica contribuye también a maximizar la capacidad de carga. Su forma y composición únicas permiten que estas células especializadas lleven a cabo sus funciones esenciales. El GR maduro tiene una forma discoide y bicóncava, con un diámetro de solo 6-8 μm y una altura de menos de 3 μm en la periferia y menos de 1 μm en el centro (Figura 2.2) [2,3].

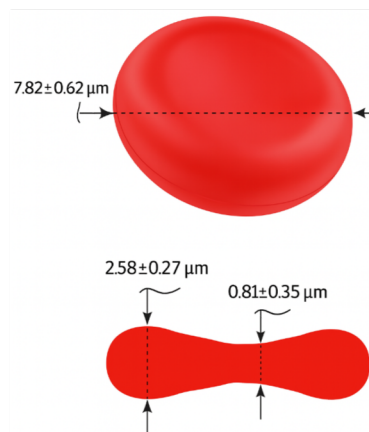


Figura 2.2. Forma y tamaño de los glóbulos rojos (GR). Tomado de Faghih et al., 2019.

Esta forma y tamaño le permite la flexibilidad necesaria para trasladarse por el sistema cardiovascular y presentar una mayor superficie para el intercambio, aumentando la relación superficie/volumen [4], lo que facilita la entrega de oxígeno a los tejidos.

La hemoglobina ubicada en el citosol, es la proteína más abundante, presenta una estructura tetramérica (~20 mM monómero) (Figura 2.3) y es la encargada de

facilitar el transporte de oxígeno hacia los tejidos [4]. La hemoglobina comprende el 98% del contenido de proteína del GR, y el 2% restante abarca a más de mil proteínas distintas las cuales contribuyen al funcionamiento celular [5]. La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, está determinada en gran medida por su estructura que muestra cooperatividad positiva por su sustrato y se encuentra modulada además por una variedad de factores dentro de la vasculatura, entre ellos la temperatura, el pH, la concentración de CO_2 , de 2,3-difosfoglicerato (2,3-BPG), de fosfatos orgánicos, e iones cloruro (Cl^-) [6], lo que optimiza la captación a nivel

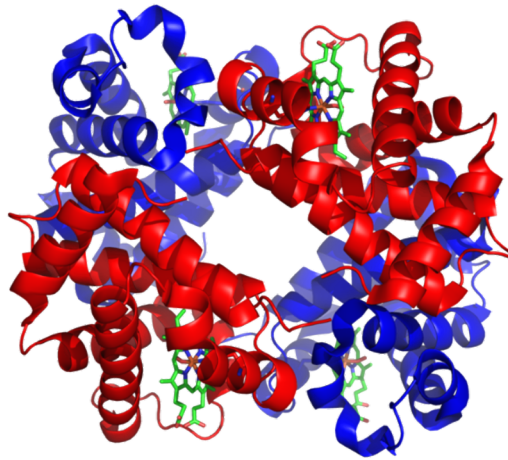


Figura 2.3. Estructura de la hemoglobina. Estructura de la hemoglobina humana. Las subunidades de globina α y β están en rojo y azul, respectivamente, y los grupos hemo con hierro, en verde. De *PDB: 1GZX. Proteopedia Hemoglobina*.

pulmonar y la entrega de O_2 a nivel periférico.

METABOLISMO DE LOS ERITROCITOS:

El metabolismo del eritrocito está orientado a sostener tres funciones fundamentales: (i) la producción de energía para el mantenimiento de la integridad y deformabilidad celular, (ii) la regulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, y (iii) la protección frente al estrés oxidativo. Estas funciones dependen principalmente de la glucólisis o vía de Embden-Meyerhof (EMP) y de la vía de las pentosas fosfato [7].

Los eritrocitos en mamíferos dependen exclusivamente de la glucólisis anaeróbica para la generación de ATP. A través de esta vía se producen ATP, NADH y 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) (Figura 2.4), moléculas esenciales para su función.

El ATP es requerido para el funcionamiento de las bombas de membrana que mantienen el equilibrio osmótico y la forma celular; el 2,3-BPG modula la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno favoreciendo su liberación en los tejidos; y el NADH participa en la reducción de la metahemoglobina a hemoglobina funcional [7].

Por otra parte, la vía de las pentosas fosfato se ramifica desde la glucosa-6-fosfato mediante la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), y cumple un rol central en la defensa antioxidante del eritrocito. Esta vía consta de una fase oxidativa, responsable de la producción de NADPH, y una fase no oxidativa que

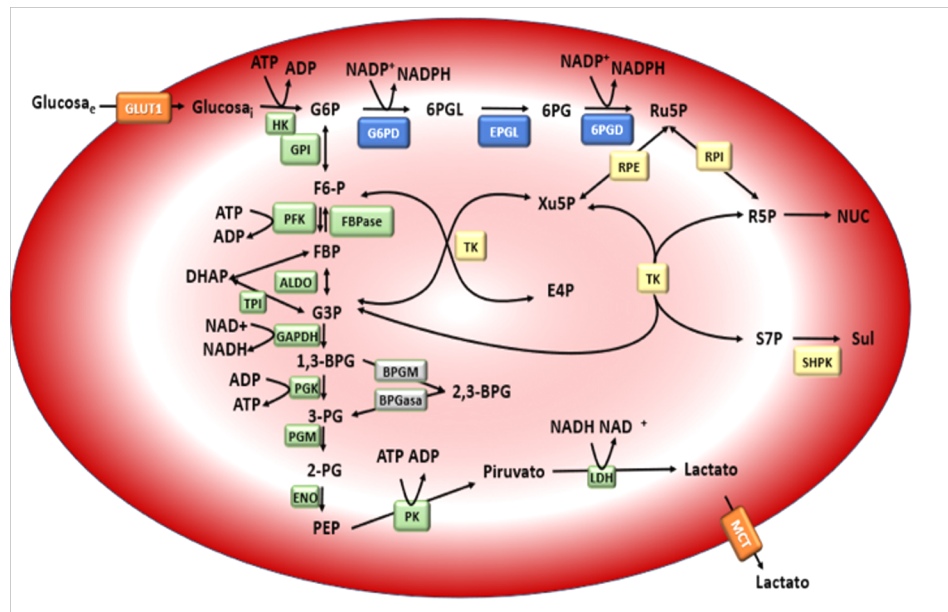


Figura 2.4. Vía glucolítica y ciclo de las pentosas en GR. La imagen representa las múltiples interrelaciones entre la vía glucolítica y el ciclo de las pentosas. Las abreviaturas se encuentran en la tabla del inicio de la tesis. Las enzimas de la vía glucolítica (vía de Embden Meyerhof) se enmarcaron en verde, las de la derivación de Rapoport-Luebering (síntesis de 2,3-BPG) en gris, las de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas en azul, y la fase no oxidativa en amarillo.

genera ribosa-5-fosfato. El NADPH es esencial para mantener la homeostasis

redox celular, permitiendo la regeneración de sistemas antioxidantes como el glutatión reducido. La deficiencia de G6PD compromete esta vía, disminuyendo la capacidad de los eritrocitos para neutralizar especies oxidantes y favoreciendo el daño celular [7].

Los eritrocitos desempeñan un rol clave en el manejo de especies reactivas de oxígeno, actuando como un “sumidero plasmático” de oxidantes debido a su elevada capacidad antioxidante [8]. Las principales fuentes intracelulares de especies reactivas del oxígeno incluyen la autooxidación de la hemoglobina, que genera el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), así como la actividad de enzimas como las NADPH oxidasas y la liberación de hierro, que favorece reacciones de tipo Fenton y la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [9,10].

El anión superóxido es rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno por acción de la superóxido dismutasa (SOD) [11]. El H_2O_2 es posteriormente detoxificado mediante múltiples sistemas enzimáticos. La peroxiredoxina 2 (Prx2), una de las proteínas más abundantes del eritrocito, reduce H_2O_2 con alta eficiencia [12]. La catalasa también contribuye a la degradación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, sin requerir NADPH [13]. Por su parte, la glutatión peroxidasa (GPx) reduce hidroperóxidos utilizando glutatión reducido, cuya regeneración depende del NADPH generado en la vía de las pentosas fosfato [14]. La isoforma GPx1 es la más abundante en eritrocitos, mientras que GPx4 participa principalmente en la reducción de hidroperóxidos lipídicos de membrana [15]. Además de las especies reactivas derivadas del oxígeno, el eritrocito participa en el metabolismo de otras moléculas redox como el óxido nítrico (NO) y el sulfuro de

hidrógeno (H_2S), que interactúan con la hemoglobina y modulan su afinidad por el oxígeno, contribuyendo a la regulación del tono vascular y la oxigenación tisular [16].

LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y EL CITOESQUELETO DE LOS GR

Los glóbulos rojos (GR) presentan una organización estructural especializada que les permite cumplir funciones esenciales en la circulación, destacándose: (i) la deformabilidad y flexibilidad necesarias para atravesar capilares de pequeño calibre, (ii) la resistencia mecánica frente a fuerzas de cizallamiento, (iii) el transporte de gases y solutos, y (iv) la regulación de su volumen y homeostasis iónica. Estas propiedades emergen de la interacción dinámica entre la membrana plasmática y el citoesqueleto subyacente.

Los GR se caracterizan por la interacción entre la membrana y el citoesqueleto, que en conjunto determinan sus propiedades elásticas. La bicapa lipídica proporciona rigidez de flexión y resistencia a los cambios locales de área, mientras que el citoesqueleto, una red de espectrina conectada a complejos de unión basados en actina, proporciona resistencia al cizallamiento [7,8]. La interacción entre ambos sistemas es fundamental para mantener la forma bicóncava característica y la integridad celular durante la circulación. La membrana celular está compuesta por una bicapa lipídica, con proteínas insertas en ambas caras. Las proteínas de membrana cumplen funciones clave tanto estructurales como funcionales. Las proteínas presentes en la membrana celular proporcionan a los GR sus propiedades antigénicas (es decir, su capacidad de ser reconocidos por el sistema inmunitario)

y también actúan como transportadoras y poros selectivos de iones. Entre estas últimas es de destacar la banda 3 o intercambiador de aniones 1 (AE1), que es la proteína de membrana más abundante de los GR y es la encargada del intercambio $\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{CO}_3^-$, contribuyendo de forma central al transporte plasmático de CO_2 (Figura 2.1).

En el GR las proteínas del citoesqueleto, como espectrina, actina, proteína 4.1 y anquirina, interactúan con proteínas de membrana, como la AE1, la proteína transportadora de glucosa tipo 1 (Glut1), y la glicoforina A (GPA); entre otras (Figura 2.5) [4,9].

Estas interacciones entre las proteínas de membrana y del citoesqueleto aseguran la integridad estructural y aportan la flexibilidad característica de los GR, que les permite soportar cambios en el flujo sanguíneos y atravesar lechos vasculares estrechos [10], permitiéndoles tolerar deformaciones repetidas sin comprometer su integridad.

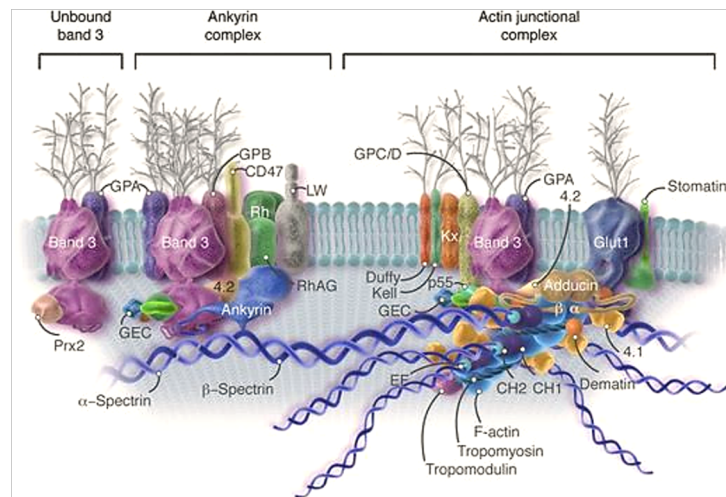


FIGURA 2.5. Modelo de la membrana de GR. Aproximadamente el 40% de las moléculas de la banda 3 (AE1) son tetrámeros en un complejo con anquirina y otras proteínas integrales cerca del sitio de autoasociación de espectrina (complejo de anquirina). Una fracción aproximadamente similar de las moléculas de la AE1, probablemente dímeros, se encuentran cerca de la unión de espectrina-actina y se unen a la espectrina a través de la proteína 4.1R (4.1), la proteína 4.2 (4.2) y la aducina (complejo de unión de actina). Los dímeros de AE1 restantes flotan sin asociaciones dentro de la bicapa lipídica (AE1 no unida). El protofilamento de actina se encuentra paralelo a la membrana. Los complejos de proteínas asociados con la AE1 no son constantes; es decir, algunas proteínas están presentes en números mucho más pequeños que otras. Tomado de Lux et al 2016.

El control de la forma del eritrocito además de depender de la interacción del citoesqueleto con la membrana plasmática está regulada por la concentración de

iones, y en particular del Ca^{2+} . La mayor parte del Ca^{2+} intracelular está unido y una concentración baja de Ca^{2+} ionizado se mantiene mediante una combinación de baja permeabilidad de membrana y una potente bomba de Ca^{2+} dependiente de

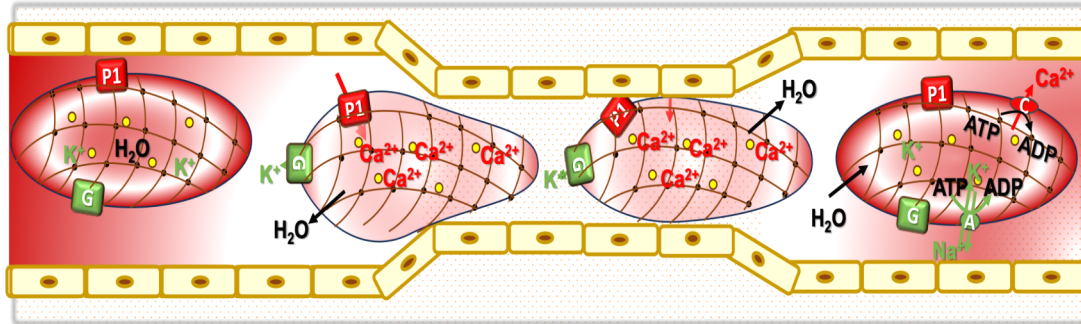


Figura 2.6. Mecanismo de señalización en GR al atravesar los capilares. A medida que el GR entra en una constricción, el contacto mecánico con la pared del vaso activa la Piezo1 (P1), permitiendo que el Ca^{2+} entre en la célula. Esto activa el canal Gardos y se forma el complejo de calmodulina de calcio (círculos amarillos). La activación del canal Gardos (G) lleva a la pérdida de iones K^+ , que se acompañan por iones Cl^- y agua, llevando a contracción celular. El complejo Ca^{2+} -calmodulina desestabiliza el complejo de actina-adesina-banda 4.1 y la red de espectrinas reticuladas se vuelve más flexible (entramado de líneas oscuras intracelulares). Ambos procesos facilitan el paso del GR a través de la constricción. Finalmente, la ATPasa de Na^+/K^+ y la bomba de Ca^{2+} restaurarán las concentraciones de iones originales y el volumen de los GR volverá a su tamaño original. Modificado de Danielczok et al, 2017.

ATP. Esta bomba Ca^{2+} -ATPasa es regulada por calmodulina, una proteína de bajo peso molecular que se une a Ca^{2+} con avidéz y activa varias enzimas [11]. La deformación de los GR que atraviesan los capilares activa brevemente los canales mecano sensibles piezo1, lo que permite la afluencia de Ca^{2+} a favor de su gradiente de concentración, superando transitoriamente la bomba de calcio (Figura 2.6).

Este aumento intracelular de Ca^{2+} activa los canales Gardos, induciendo la pérdida de KCl y la deshidratación celular, que lleva a que la célula se encoja. Al emerger del vaso estrecho el GR retorna al equilibrio original (Figura 2.6) [10,12].

Además de su rol estructural, la AE1 participa en la regulación metabólica del eritrocito actuando como un “interruptor molecular” que modula el destino de la

glucosa en función del estado de oxigenación. La interacción entre la AE1 y la desoxihemoglobina de forma ávida y reversible funciona como un 'interruptor molecular' que regula el estado metabólico de los eritrocitos [13–15] (Figura 2.7).

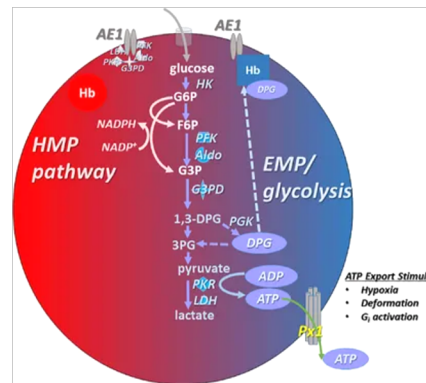


Figura 2.7. Regulación del metabolismo eritrocitario mediada por AE1. En condiciones de hipoxia, la unión de la desoxihemoglobina a AE1 libera enzimas glucolíticas, favoreciendo la glucólisis (EMP) y la producción de ATP. En condiciones de oxigenación, las enzimas glucolíticas se asocian a AE1, desviando el metabolismo hacia la vía de las pentosas fosfato (HMP) y la generación de NADPH, contribuyendo a la defensa antioxidante. La liberación de ATP se incrementa con la hipoxia y la deformación celular a través de pannexina 1 (Px1). Tomado de McMahon et al, 2021.

La unión de enzimas glucolíticas a la AE1 varía con la oxigenación, desviando el metabolismo de la glucosa hacia la glucólisis en hipoxia y hacia la vía de las pentosas fosfato en presencia de oxígeno, protegiendo así al eritrocito del estrés oxidativo [16]. Este mecanismo permite adaptar el metabolismo eritrocitario a las demandas fisiológicas: en hipoxia, favorece la producción de ATP, mientras que en condiciones oxigenadas promueve la generación de NADPH, contribuyendo a las defensas antioxidantes. Además, la oxigenación fortalece las interacciones AE1-anquirina, estabilizando la membrana durante el flujo turbulento, mientras que la hipoxia promueve la liberación de ATP para facilitar la vasodilatación y limitar la adhesividad de los GR a las células endoteliales. [14,17–19]. La pannexina 1 (Px1)

parece ser necesaria para la exportación de ATP sensible al O₂ y a la deformación desde los GR (Figura 2.7).

LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA

IMPORTANCIA DEL TEMA Y SITUACIÓN ACTUAL EN URUGUAY

La transfusión de sangre desplasmatazada es una herramienta terapéutica imprescindible en el tratamiento de las condiciones clínicas que cursan con anemia severa. En nuestro país se emplean ~70.000 volúmenes de cGR al año. Estos proporcionan 300 – 350 mL de GR a los cuales se les ha removido la mayor parte del plasma. La provisión de hemocomponentes depende de donantes voluntarios y de la preservación de estos productos, la cual sigue reglas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Ministerio de Salud Pública (Decreto N.º 118/024), tendientes a asegurar la inocuidad y eficacia terapéutica de los hemocomponentes [20,21]. En nuestro país, el medio de preservación más utilizado, compuesto por adenina, glucosa y manitol en solución salina, asegura una conservación adecuada de los cGR por 42 días.

Los GR almacenados aun por corto tiempo sufren cambios estructurales y bioquímicos que tienen repercusiones clínicas nominadas reacciones adversas a la transfusión. Estas pueden clasificarse en agudas o tardías, y a su vez en inmunológicas y no inmunológicas [30]. Dentro de las reacciones agudas inmunológicas, la reacción febril no hemolítica constituye una de las más frecuentes y se asocia principalmente a la liberación de citoquinas y otros mediadores solubles

durante el almacenamiento de los hemocomponentes. En este contexto, y considerando los mecanismos involucrados en las lesiones por almacenamiento, el presente trabajo se centra en el estudio de estos procesos inflamatorios.

Según la OMS, datos mundiales registran que 12,2 de cada 100.000 unidades de componentes sanguíneos causan reacciones adversas transfusionales [22]. En particular, en los pacientes sometidos a cirugía cardíaca, la transfusión de cGR almacenados más de dos semanas se asocia a un riesgo mayor de complicaciones postoperatorias y a una reducción de la sobrevida del paciente. [23]. Estas complicaciones se han relacionado con la aparición rápida de signos típicos de envejecimiento en los GR almacenados [24].

En la circulación sanguínea los GR humanos normales tienen una sobrevida de ~120 días, tras lo cual son eliminados. Este es un proceso extremadamente eficiente, ya que los macrófagos fagocitan unos 5 millones de eritrocitos cada segundo sin liberación significativa de hemoglobina en la circulación [25]. En el almacenamiento para transfusión, los GR alterados permanecen en la bolsa ya que no cuentan con sistemas de remoción.

LESIONES POR ALMACENAMIENTO DE GR

La carencia de sistemas efectivos de remoción de los GR alterados en los preparados para transfusión lleva a la acumulación progresiva células portadoras de alteraciones estructurales y funcionales, conocidas globalmente como “lesiones por almacenamiento”. Las principales causas de la lesión por almacenamiento de los GR incluyen una combinación de estrés oxidativo y disfunción metabólica [26]. Estos cambios, pueden comprometer la viabilidad y funcionalidad de los eritrocitos

transfundidos, e incluyen alteraciones metabólicas, con menor generación de ATP y pérdida progresiva de antioxidantes. También se han descrito cambios significativos en los lípidos y proteínas de la membrana plasmática, que llevan a la formación y liberación de vesículas extracelulares (VE) [27–29].

Alteraciones metabólicas

Entre las alteraciones metabólicas de las lesiones por almacenamiento se incluyen la disminución de la concentración intracelular de ATP y 2,3-DPG, y a nivel extracelular aumentan las concentraciones de potasio, Hb libre y lactato [30,31]. Los desequilibrios de potasio y otros iones son el resultado de la inactivación de las bombas de membrana durante el almacenamiento en frío. A medida que los eritrocitos envejecen en almacenamiento, metabolizan la glucosa y generan lactato y protones como productos finales, disminuyendo progresivamente el pH del hemocomponente [30,32]. Si bien estos niveles se normalizan después de la transfusión, se tarda hasta una semana para una recuperación completa.

Adicionalmente, la capacidad de los GR de consumir el peróxido de hidrógeno adicionado al medio extracelular disminuye progresivamente durante el almacenamiento [33]. La pérdida de actividad y la acumulación de la Prx2 oxidada en el almacenamiento podría estar en la base de esta alteración [27,34].

CAMBIOS ESTRUCTURALES

Durante el almacenamiento, las proteínas estructurales de los eritrocitos, los lípidos y los carbohidratos sufren cambios oxidativos que afectan la estructura de la membrana plasmática. La reducción dependiente del tiempo de la actividad Gpx resulta en una oxidación lipídica progresiva. La oxidación de los ácidos grasos da

como resultado el aumento de los niveles de malondialhído, que tiene efectos citotóxicos. A nivel proteico, la formación del complejo espectrina-actina-proteína 4.1 disminuye durante el almacenamiento. La AE1, se agrega en grandes oligómeros que pueden resultar en la pérdida de la asociación a fosfolípidos [35]. El resultado acumulativo de estos cambios es que los eritrocitos envejecidos pierden su forma clásica de disco biconcavo, cambiando posteriormente a equinocitos y esferocitos (Figura 2.8), con pérdida de deformabilidad [36]. La fosfatidilserina (PS), normalmente en el lado intracelular de la membrana plasmática, se externaliza. Estos cambios de membrana y el aumento de la fragilidad contribuyen al aumento de la acidosis y la hemólisis, así como a la disminución de la supervivencia de los eritrocitos después de la transfusión [35].

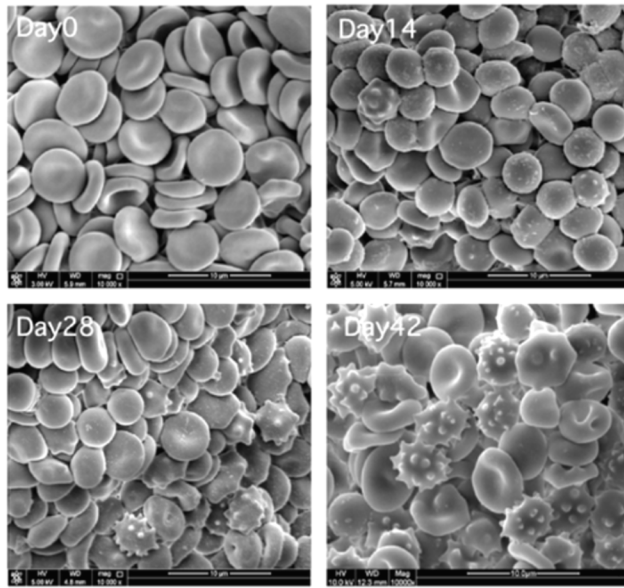


Figura 2.8. Efecto del almacenamiento sobre la morfología de los GR. Micrografía electrónica de barrido de eritrocitos almacenados en bolsas de sangre con SAGM (10000x), que representa los cambios en la morfología de los GR en los días 0, 14, 28 y 42. Tomado de Mustafa et al, 2016.

Los análisis reportan que del 6 al 9 % de los GR presentan cambios morfológicos irreversibles ya a los 7 días de almacenamiento y estos alcanzan a más del 39% de los GR en las bolsas almacenadas durante 42 días [37]. Además, el estado metabólico de estos puede haber agotado su capacidad para manejar el estrés oxidativo durante el almacenamiento lo que explica la pérdida promedio de funcionalidad de 17,6% [31]. Adicionalmente, las anafilatoxinas del complemento C3a y C5a, así como el complejo de ataque de membrana, también se encuentran en las membranas de los GR almacenados y aumentan en función del tiempo [35].

LIBERACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Los cambios a nivel de membrana llevan a la a la liberación de VE. Las VE son partículas de membrana generadas por diferentes tipos celulares que participan en la comunicación intercelular y el transporte de macromoléculas entre células [38].

Actualmente, se desaconseja su clasificación estricta en exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos basada en su biogénesis, debido a la superposición de tamaños y a la dificultad de establecer su origen con certeza. En su lugar, la *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) recomienda clasificarlas según criterios operativos, como el tamaño (VE pequeñas <200 nm y VE medianas/grandes >200 nm), la densidad, la composición molecular o el origen celular [39].

Las VE generadas por los GR que formarían parte de un proceso homeostático para eliminar los componentes celulares alterados, como la hemoglobina y los componentes de la membrana oxidados, prolongando así la vida útil del GR [40]. La formación de estas VE se desencadena por el desprendimiento de la membrana celular causado por varios factores, como el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , la activación de la proteína quinasa C (PKC), la interrupción de la unión del citoesqueleto a la membrana, el estrés oxidativo asociado al

envejecimiento, el agotamiento de ATP, el almacenamiento y ciertas enfermedades (Figura 2.9) [41–43].

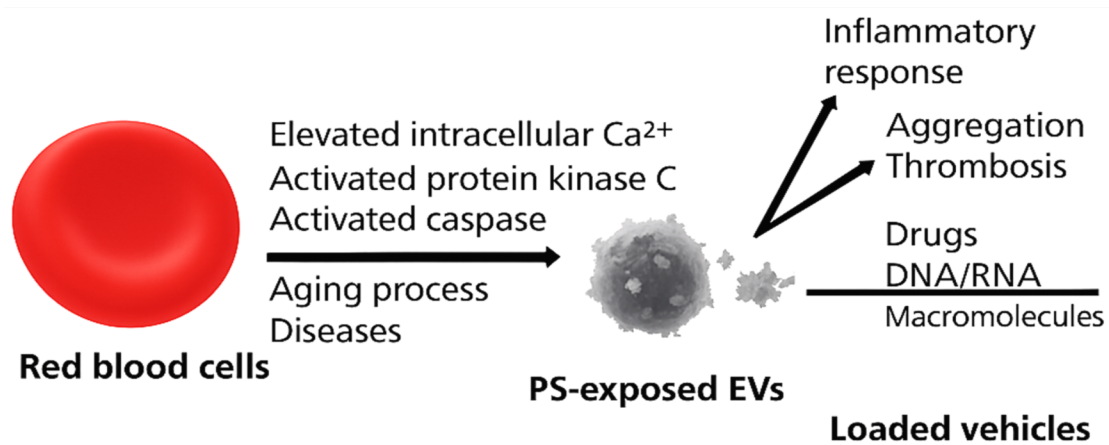


Figura 2.9. Producción de vesículas extracelulares. Los GR producen MV en respuesta al aumento de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺, la activación de PKC y caspasas, entre otros factores. Las MV son capaces de desencadenar respuestas inflamatorias y/o tromboembólicas que pueden llevar a agravar la patología del paciente transfundido. Extraído de Nguyen et al, 2022.

En los GR almacenados cambios en la organización proteína- lípido son un desencadenante de la generación de VE [44].

La vesiculación, en general, se asocia a cambios en la organización de los fosfolípidos, y la mayoría de las VE exponen PS. Durante el almacenamiento, la fracción de VE positivas para PS aumenta de aproximadamente el 70 % en la primera semana a casi el 100 % entre las semanas tres y cinco. En la formación de VE está involucrado también el daño de las proteínas de membrana. La vesiculación comienza con cambios en la conformación de la AE1, con disminución de la unión al citoesqueleto [43].

La vesiculación perjudica la función y la supervivencia de los GR después de la transfusión, y contribuye a las reacciones transfusionales. La presencia del factor tisular y la exposición de PS en la superficie de las VE se consideran procoagulantes dado que son capaces de promover y soportar el ensamblaje de los complejos de la coagulación [45].

Múltiples estudios retrospectivos han reportado una asociación entre la transfusión de GR y la trombosis, sobre todo en contexto de transfusión masiva [46,47]. Los resultados sugieren que las VE derivadas de GR generadas durante el almacenamiento activan la coagulación a través de múltiples vías. Además de promover el ensamblaje del complejo protrombinasa y activar la vía intrínseca, las VE activan directamente el factor XII y la precalicreína (Figura 2.10). Calicreína promueve la activación del factor IX (FIX), incluso en ausencia de FXII o FXI [45].

INFLAMACIÓN Y TROMBOSIS.

La mayoría de los pacientes que presentan reacciones adversas debidas a la transfusión sanguínea manifiestan alergia o reacciones febriles de transfusión no hemolítica (FNHTR), ambas son condiciones claramente inflamatorias. Se atribuye este efecto a los leucocitos transferidos con la sangre.

La respuesta inflamatoria inducida por los hemocomponentes transfundidos involucra la activación de vías intracelulares clave en células del sistema inmune innato del receptor, particularmente en monocitos y macrófagos. Entre estas vías, el inflammasoma representa un complejo multiproteico central en la detección de señales de daño (DAMPs) y en la generación de respuestas inflamatorias. Su

activación conduce al procesamiento de pro-IL-1 β a su forma activa mediante la acción de la caspasa-1.

Estos mecanismos son particularmente relevantes en el contexto de las lesiones por almacenamiento, ya que el sobrenadante de los concentrados puede contener mediadores capaces de inducir activación inflamatoria en células del sistema inmune del receptor, contribuyendo al desarrollo de reacciones adversas transfusionales [48].

En este contexto, la respuesta del receptor constituye un factor determinante en la magnitud del efecto inflamatorio inducido por la transfusión. Individuos cursando estados patológicos graves suelen presentar un estado inflamatorio en el que el endotelio y el sistema de coagulación ya están activados antes de la transfusión [49] y se ha demostrado que la presencia de un estado inflamatorio en el receptor es un factor de riesgo para el desarrollo de la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (TRALI) [50].

Anticuerpos, citocinas, interleucinas, interferones, factores estimuladores de colonias y VE presentes en el cGR promueven la activación de células del sistema inmune en el receptor, desencadenando el síndrome pulmonar (Figura 2.11) [51,52].

Asimismo, en pacientes con un estado inflamatorio, pero que no presentan un TRALI completamente desarrollado, la transfusión de GR puede exacerbar la inflamación de la patología de base, provocando reacciones adversas transfusionales que ponen en riesgo la evolución y sobrevida del paciente [53–56]. Se ha observado que la transfusión de cGR se asocia con aumento en los niveles

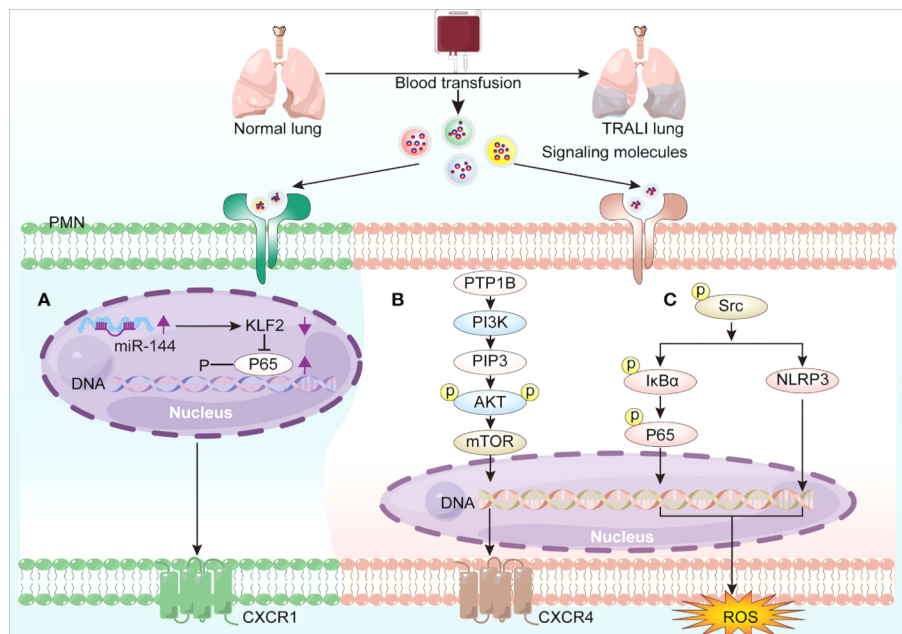


Figura 2.11. Mecanismos moleculares que impulsan la activación de PMN en la patogénesis de TRALI. La transfusión sanguínea induce la activación de PMN mediante la generación de moléculas de señalización que activan sus receptores, lo que agrava el TRALI. (A) La sobreexpresión de miR-144 promueve la activación de PMN mediante la activación de la vía de señalización NF-κB/CXCR1 y la supresión de KLF2. (B) PTP1B activa el PMN mediante la señalización CXCR4 dependiente de PI3Kγ/AKT/mTOR. (C) HLA-A2 induce la producción de ROS derivadas de PMN mediante la activación del inflammasoma NF-κB/NLRP3 mediante la activación de Src. Yu et al, 2023.

de biomarcadores de activación de células endoteliales en los receptores [57,58]. La activación de células endoteliales puede provocar un aumento de la permeabilidad endotelial con extravasación de neutrófilos y edema, lo que resulta

en lesión orgánica [59]. La activación del endotelio también activa el sistema de la coagulación, lo que resulta en la formación de microtrombos [60,61].

Un metaanálisis, que incluyó a 15 estudios con 1.880.990 pacientes, mostró que la transfusión de cGR perioperatoria aumenta el riesgo de tromboembolia venosa (TEV) posoperatoria (Figura 2.12) [46].

Es más, la transfusión en pacientes gravemente enfermos se asocia con un aumento en los niveles circulantes del factor de von Willebrand (vWF), lo que sugiere un aumento adicional en la activación del endotelio [62].

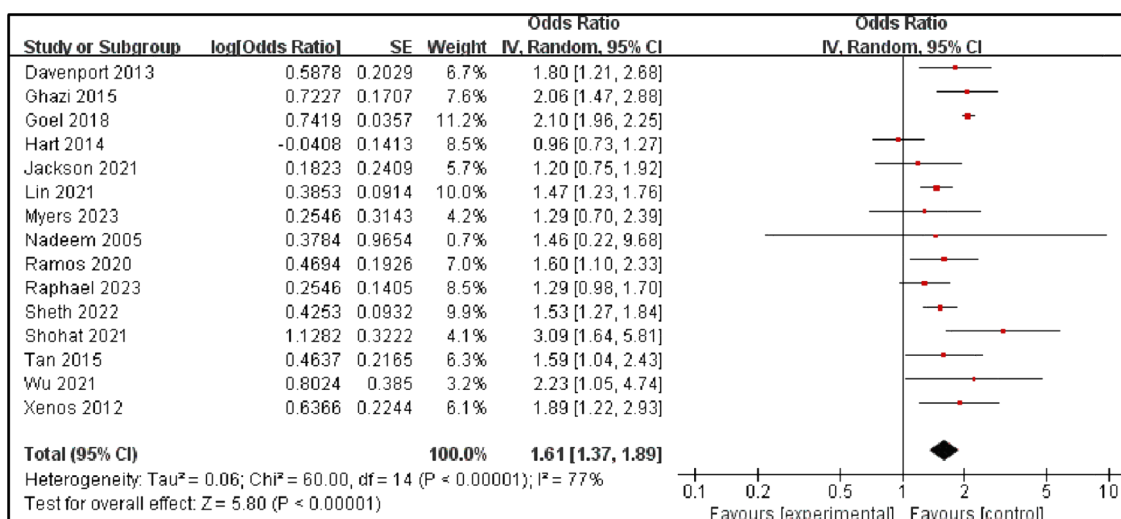


Figura 2.12. Diagrama de Forest del metaanálisis para la asociación entre las transfusiones de GR perioperatorias y TEV posoperatorio. Los resultados muestran que la transfusión de cGR perioperatoria aumenta el riesgo de TVE [OR = 1.61, 95%CI (1.37, 1.89), P < 0.001]. Tomado de Mo et al, 2024.

Si bien los mecanismos de la inmunomodulación relacionada a la transfusión (TRIM) de los cGR aún no están completamente caracterizada, se han identificado numerosos mediadores potenciales. Estos incluyen mediadores derivados de los glóbulos blancos, componentes hemolíticos (hemo, liberación de hierro), factores

derivados de las plaquetas y de VE. Sus concentraciones se ven influenciadas por el proceso de preparación de los componentes sanguíneos y las condiciones de almacenamiento [63]. Mediadores lipídicos, citocinas y quimiocinas, están abundantemente presentes en diversos concentrados transfusionales y actúan como modificadores de la respuesta [64]. En una variedad de modelos preclínicos, se ha encontrado que la exposición a productos de GR resulta en efectos inflamatorios que incluyen el cebado de glóbulos blancos, quimiotaxis de neutrófilos, la activación de monocitos/macrófagos y la liberación de citocinas inflamatorias [65–67]. Se han observado también efectos inmunosupresores de la transfusión de cGR [68–70]. Si bien la evidencia que respalda los efectos proinflamatorios e inmunosupresores de la transfusión de cGR puede parecer contradictoria, dada la naturaleza compleja de los productos sanguíneos transfundidos y la multiplicidad de mediadores potencialmente inmunomoduladores que contienen, los efectos mixtos no son sorprendentes dada las variables inherentes a esta terapia, que se complejizan aún más por la patología de base del receptor.

CONTROLES DE CALIDAD DE SANGRE DESPLASMATIZADA.

En vista de los cambios ciertos y potenciales de los cGR durante el almacenamiento se sugieren la realización de una serie de controles de calidad. Estos estudios son fundamentales en los servicios de hemoterapia para garantizar que los componentes sanguíneos transfundidos cumplan con los estándares internacionales de seguridad, eficacia y uniformidad. En el caso particular de los cGR, la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) ha establecido en sus *Standards For Blood Banks And Transfusion Services* parámetros de control que

permiten verificar que el producto final conserve sus propiedades funcionales, tenga un volumen y contenido celular adecuados, y que no haya sufrido alteraciones importantes durante el procesamiento y almacenamiento [71].

Día	ATP ($\mu\text{mol/g}$ Hb)	2,3-DPG ($\mu\text{mol/g}$ Hb)	pH	K ⁺ (mmol/L)	Hemólisis (%)	Hb libre (mg/dL)	Lactato (mmol/L)	Na ⁺ (mmol/L)	Glucosa (mg/dL)	Fosfato (mmol/L)
0	6,5	14	7,2	4	0,1	30	2	150	400	1,2
7	5,8	6	7	12	0,2	50	5	140	350	1,5
14	5	3	6,8	24	0,3	70	8	130	300	1,8
21	4	1,5	6,6	35	0,4	90	11	120	250	2,2
28	3	0,5	6,5	45	0,5	120	13	110	200	2,5
35	2	0,2	6,4	55	0,6	150	15	100	150	2,8
42	1,5	0,1	6,3	65	0,8	180	17	90	100	3

Figura 2.13. Control de calidad. Valores de referencia para ATP, 2,3-DPG, hemólisis, potasio, pH, entre otros, en diferentes tiempos de almacenamiento. Se menciona la disminución progresiva de ATP y 2,3-DPG, el aumento de K⁺ extracelular, y el descenso del pH (storage lesion) de los GR.

La tabla de control de calidad propuesta por la Association for the Advancement of Blood & Biotherapies (AABB) (figura 2.13) ofrece una guía práctica y estandarizada que incluye parámetros críticos que permiten evaluar la calidad del producto en distintos momentos del almacenamiento [72]. Además, permite identificar desviaciones que puedan implicar riesgos clínicos para el receptor, lo cual subraya la necesidad de monitorear y mejorar continuamente los procedimientos de procesamiento y conservación de hemocomponentes.

LEUCORREDUCCIÓN

La leucorreducción se define como una etapa de procesamiento de la sangre para disminuir el contenido de leucocitos a menos de 5×10^6 (1×10^6 en Europa) leucocitos residuales por unidad de componente, con lo que se logra la eliminación de >99.9% de los leucocitos [73]. Una unidad de sangre total o una de cGR tiene 5×10^9 leucocitos, por lo que las técnicas de leucorreducción disminuyen el número

de glóbulos blancos en más de 1000 veces. En todo el mundo se utilizan tres métodos de leucorreducción (LR): filtración, eliminación de la capa leucocitaria y una combinación de los dos métodos anteriores (Figura 2.14) [74].

En la filtración, el mecanismo principal de eliminación se basa en la adhesión mediada por fuerzas de Vander Waals y electrostáticas, que promueven la asociación de las cargas negativas de los leucocitos al material del filtro [75].

Hay 2 estrategias de leucorreducción con filtros, antes del almacenamiento (banco o en línea) y después del almacenamiento (al lado de la cama).

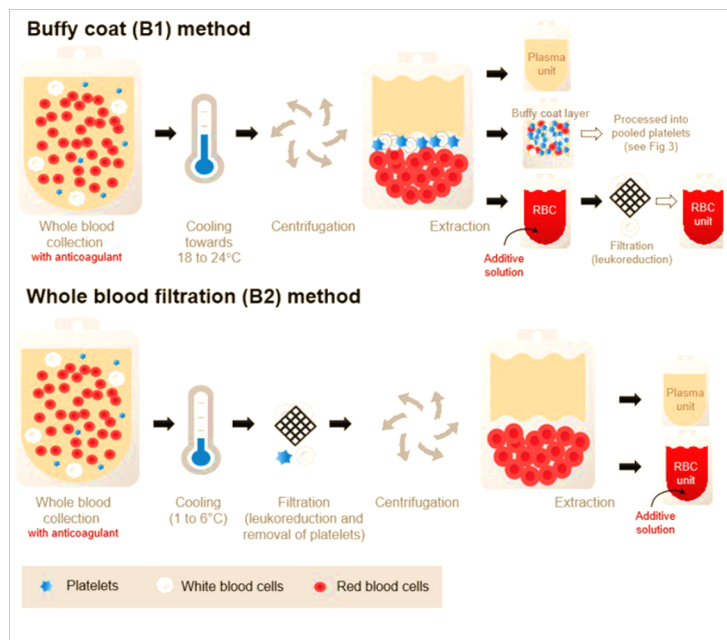


Figura 2.14. Procesamientos de leucorreducción. La sangre completa recolectada con anticoagulante CPD se procesa mediante alguno de los dos métodos esquematizados. En el método de eliminación de la capa leucocitaria (B1), la sangre completa se centrifuga para separar los GR de las plaquetas y el plasma. Posteriormente, los GR se leucorreducen (LR) mediante filtración. En el método de filtración (B2), la sangre completa se filtra directamente para eliminar las plaquetas y leucocitos y se centrifuga para separar los GR. En ambos métodos, los GR se mezclan con la solución aditiva de solución salina-adenina-glucosa-manitol (SAGM). Tomado de <https://anesthguide.com/topic/blood-components/>

La filtración antes del almacenamiento se realiza en el laboratorio del servicio de hemoterapia dentro de las primeras 48 horas después de la recolección de la unidad de sangre completa. La filtración al lado de la cama (bed side) se usa durante la transfusión. En Uruguay el último abordaje es el que se emplea y solo en situaciones particulares.

Entre los beneficios clínicos de la reducción de leucocitos en hemocomponentes celulares se describe una disminución en la frecuencia y severidad de la reacción febril no hemolítica transfusional (RFNHT); un menor riesgo de transmisión de citomegalovirus; una reducción del riesgo de aloinmunización HLA, y refractariedad plaquetaria, y menor mortalidad y disfunción orgánica en pacientes con cirugía cardiovascular [76,77]. La reducción de leucocitos previo al almacenamiento elimina el potencial perjuicio ocasionado por citocinas proinflamatorias y lípidos bioactivos (prostaglandinas y tromboxanos), generados por leucocitos y plaquetas presentes en el preparado [78,79].

En un estudio donde se cuantificaron biomarcadores inflamatorios antes y después de la transfusión de GR y plaquetas, los pacientes que presentaron RFNHT mostraron un aumento significativo en la IL-6 circulante a pesar de haber sido transfundidos con preparados LR [80]. Por su parte, en pacientes que desarrollaron RFNHT luego de la transfusión con cGR NLR se observó un aumento en los niveles de IL-8 en el receptor [75]. Tanto IL-6 como IL-8 habrían sido generados por el receptor, dado que los niveles de citocinas presentes en la bolsa de transfusión fueron muy bajos durante todo el almacenamiento [80]. En cambio, otros autores reportaron diferencias significativas en los niveles iniciales y en la evolución durante

el almacenamiento de las citocinas IL-6, IL-8, TNF- α y RANTES entre preparados LR y NLR [81,82].

En un estudio de Antonelou y colaboradores [83], en el que se compararon unidades LR y NLR, a los que se les aplicó leuorreducción previa al almacenamiento, se encontraron resultados a favor de la leuorreducción mediante la medición de diferentes parámetros. Por ejemplo, la hemólisis y la liberación de potasio el día de la donación se encontró aumentada en las unidades LR, pero posteriormente y hasta el final del período de almacenamiento, ambos parámetros fueron significativamente mayores en las unidades NLR. Después de un almacenamiento prolongado, el índice RDW (ancho de distribución eritrocitaria) de los GR NLR también fue sustancialmente mayor en comparación con los GR LR. En este estudio adjudican que la hemólisis inicial en unidades LR podría deberse a la susceptibilidad individual de los GR de algunos donantes al proceso de filtrado. El aumento del RDW en unidades NLR se podría relacionar con esferocitosis y fragmentación celular [83].

La comparación de distintos leucofiltros revela diferencias significativas en los parámetros eritrocitarios. Específicamente, se observaron concentraciones de hemoglobina post-leuorreducción estadísticamente más bajas en todas las unidades, un efecto atribuido a la retención de volumen sanguíneo dentro de los leucofiltros. Esta reducción en la concentración de hemoglobina fue más marcada en unidades con menor volumen inicial (350 mL). En relación con otros parámetros, todos los índices de GR experimentaron cambios estadísticamente significativos

después de la leucorreducción, con la excepción del volumen corpuscular medio (VCM), que mostró un aumento [84].

Adicionalmente, algunos estudios demuestran que la leucorreducción atenúa la formación y las propiedades proinflamatorias de la VE, asociando esto a cambios en las propiedades bioquímicas, como la composición lipídica o la presencia de mediadores inflamatorios que es menor en los productos LR [85]. Sin embargo, hay poca información sobre el efecto de la leucorreducción en la formación de VE en unidades de GR almacenadas.

Si bien se ha alcanzado un consenso a nivel internacional respecto a los beneficios de la leucorreducción y su uso se ha implementado en múltiples sistemas de salud, el procedimiento implica un costo elevado y su aplicación no es universal. En Uruguay, la leucorreducción se reserva para situaciones específicas y, en muchos casos, se emplean concentrados de glóbulos rojos no leucorreducidos (NLR) almacenados por períodos cortos como estrategia alternativa para garantizar su inocuidad.

En este contexto, persiste una incertidumbre respecto al impacto real de la leucorreducción sobre los cambios inducidos por el almacenamiento, particularmente en relación con la generación de mediadores proinflamatorios y procoagulantes.

Esta falta de evidencia local y de comprensión de los mecanismos fisiopatológicos involucrados, dificulta la toma de decisiones respecto a la eventual universalización de la técnica en nuestro medio.

En base a lo descrito, y con el objetivo de aportar evidencia en este sentido, se decidió comparar el efecto del almacenamiento sobre preparados de cGR

leucorreducidos (LR) y no leucorreducidos (NLR), analizando parámetros bioquímicos de los eritrocitos, así como sus propiedades proinflamatorias y procoagulantes.

HIPÓTESIS

La leucorreducción de concentrados de glóbulos rojos disminuye la acumulación de cambios estructurales y bioquímicos, además de los mediadores inflamatorios y microvesículas durante el almacenamiento, reduciendo así su capacidad de inducir respuestas inflamatorias y procoagulantes in vitro.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la leucorreducción sobre integridad de la membrana, la actividad proinflamatoria y procoagulante de los preparados de glóbulos rojos almacenados para transfusión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la hemólisis y otros indicadores de envejecimiento eritrocitario entre cGR leucorreducidos y no leucorreducidos durante el almacenamiento.
2. Cuantificar la expresión de IL-1 β en sobrenadantes de cGR durante el almacenamiento.
3. Evaluar la capacidad del sobrenadante de cGR LR vs NLR de activar el inflammasoma en monocitos/macrófagos en cultivo.
4. Evaluar la capacidad de los sobrenadantes (totales y fracciones purificadas) de inducir la formación de coágulo de fibrina en plasma humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

PRODUCTOS QUÍMICOS.

Los reactivos se adquirieron de Sigma, Applichem y Acros Organics.

OBTENCIÓN DE SANGRE DESPLASMATIZADA.

Las unidades de sangre se obtuvieron de donantes voluntarios varones, no fumadores de entre 18 y 45 años del Hospital de Clínicas. Los donantes fueron debidamente informados antes de firmar un formulario de consentimiento. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas y cumple con los principios éticos de la Declaración de Helsinki [86]. El proceso de obtención de sangre total (ST) se realizó según el estándar utilizado en el Banco de Sangre, como se describió anteriormente [33,87], de acuerdo con las normas de bioseguridad correspondientes. La ST de los donantes se recolectó en una bolsa triple TERUMO (Terumo Corporation, Tokio, Japón) que contenía una solución anticoagulante de ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato monosódico y dextrosa (CPD) bajo agitación continua. Las unidades fueron posteriormente sometidas a fuerza centrífuga utilizando una centrífuga de bolsas Roto Silenta 630 RS (Hettich, Alemania), a 3000 g durante 10 minutos, lo que permitió la separación de las fracciones correspondientes al concentrado de glóbulos rojos y el plasma rico en plaquetas. Los GR se mezclaron con una solución aditiva conservante que contenía NaCl, dextrosa, manitol y adenina (SAGM), y se almacenaron a 4 °C. Una vez obtenidos los resultados serológicos negativos para enfermedades infecciosas, las unidades de GR se procesaron bajo estrictas condiciones de esterilidad utilizando una cámara de flujo laminar, para obtener unidades no leucorreducidas

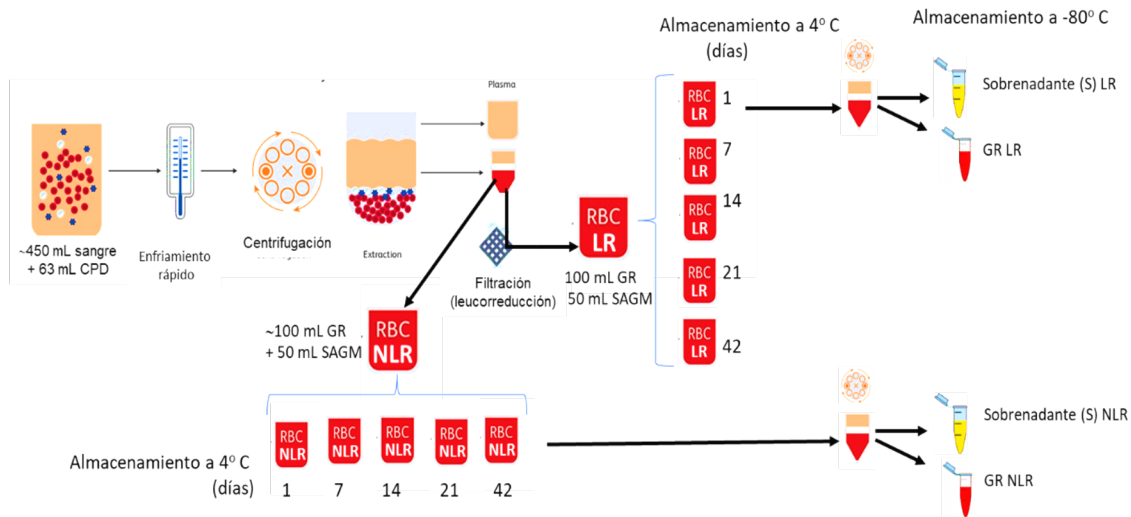


Figura 6.1. Representación esquemática del proceso de separación de las fracciones LR y NLR y de las condiciones de almacenamiento de las muestras de cGR.

(NLR) y leucorreducidas (LR). Cada una de estas unidades se fraccionaron en 5 bolsas pediátricas que se almacenaron en las condiciones del banco de sangre (estática, a 4° C) para ser analizadas en los días 1, 7, 14, 21 y 42 de almacenamiento. El filtro de leucorreducción utilizado fue IMUGARD III RC (Terumo Corporation, Tokio, Japón). En el día correspondiente, se retiraron varias alícuotas de 2 mL de la bolsa y se centrifugaron a 900 g durante 5 minutos para sedimentar las células. Se retiró el sobrenadante para su posterior análisis y el sedimento celular se suspendió en un buffer que contenía NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂O₄ 1.8 mM (PBS) y se lavó por centrifugación tres veces. Finalmente, se añadieron inhibidores de proteasa, mezclando cuidadosamente, y los sobrenadantes y las fracciones celulares se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. El plasma rico en plaquetas, obtenido como se describió anteriormente y conservado a -20 °C, se utilizó para analizar la formación de gel plasmático.

AISLAMIENTO DE VESICULAS EXTRACELULARES.

Se colocó aproximadamente 1 mL del sobrenadante de la bolsa en tubos de centrifuga, los cuales se llenaron hasta 3 mm del borde (~4,2 mL) con TBS pH 7,4. Los tubos se centrifugaron a 14000 g, 40 min, 4°C. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 100.000 g durante 90 min a 4 °C, sin freno, en tubos de 4,4 mL, rotor TH-660, utilizando una ultracentrífuga Sorvall WX-80 (Thermo Scientific). Se recogió el sobrenadante libre de VE (SVE) y el pellet que contenía las VE se suspendió en 100 µL de TBS y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. La concentración de proteínas de ambas muestras se evaluó utilizando el NanoDrop Lite (Thermo Scientific) utilizando 1 (mg/mL)^{-1} como coeficiente de extinción a 280 nm. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su uso.

CARACTERIZACIÓN HEMATOLÓGICA DE LAS MUESTRAS.

Los análisis hematológicos se realizaron con el analizador hematológico CELL-DYN Ruby (Abbott Laboratories) en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Clínicas. Estas determinaciones se realizaron en los días 1, 7, 14, 21 y 42 de almacenamiento.

DETERMINACIÓN DE METABOLITOS EN EL SOBRENADANTE.

La glucosa, la lactato deshidrogenasa y los iones Na^+ , K^+ y Cl^- se determinaron utilizando el C501 y el módulo ISE integrado del Cobas 6000 (Roche), midiendo la reducción de NADP^+ a 340 nm con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la reducción de NAD^+ a 340 nm y electrodos selectivos de iones,

respectivamente. Estas determinaciones se realizaron en los días 1, 7, 14, 21 y 42 de almacenamiento.

DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA EN EL SOBRENADANTE.

Se realizaron espectros de los sobrenadantes y se empleó la absorbancia a 630 y 577 nm para calcular la concentración de hemoglobina en el compartimento extracelular de las muestras NLR y LR, como se describió en [88].

Estas determinaciones se realizaron en los días 1, 7, 14, 21 y 42 de almacenamiento.

EVALUACION DE IL-1 β POR WESTERN BLOT

Se realizaron separaciones electroforéticas de las proteínas del sobrenadante de las muestras almacenadas leucorreducidas (LR) y no leucorreducidas (NLR) en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia del detergente aniónico SDS (0,1%), según el método descrito previamente [89].

De cada muestra se cargaron 25 μ g de proteínas en una solución amortiguadora compuesta por: Tris-HCl (pH 6,8) 50 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 1% y azul de bromofenol 0,02%, en geles de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se realizó a 25 mA en una solución amortiguadora compuesta por Tris (pH 8,3) 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%. Se utilizó un marcador de peso molecular Novex® (Thermo Fisher™).

La inmunodetección de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot, incluyendo la transferencia electroforética a membrana de acuerdo con los métodos descritos por Towbin et al. y Renart et al.[90,91].

Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Thermo Fisher™) utilizando una solución de transferencia compuesta por Tris (pH 8,3) 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, aplicando 100 V durante 1 h.

Las membranas se bloquearon en una solución compuesta por Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, NaCl 75 mM, Tween-20 0,1% (TBS-T) y leche descremada al 5%, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-IL-1 β de conejo (Abcam™), diluido 1:1000 en solución de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente.

Luego de tres lavados de 5 min con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario IRDye® 680LT anti-IgG de conejo (LI-COR Biosciences™), diluido 1:10000 en solución de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente. La señal fluorescente fue registrada en un equipo G-Box (Syngene™), con tiempos de exposición entre 30 s y 5 min. El análisis densitométrico de las señales obtenidas se realizó utilizando el software ImageJ (U.S. NIH).

Estos ensayos se realizaron en los días 1,7, 14, 21 y 42 de almacenamiento.

CULTIVO DE CÉLULAS THP-1

La línea de celular de monocitos humanos THP-1 (ATCC-TIB-202) se mantuvo, no más de 8 pasajes luego de descongeladas, en estufa a 37°C con CO₂ 5% en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) con alto contenido de glucosa (4.5 g/L), glutamina (4 mM) y piruvato de sodio (110 mg/L) (Gibco™). El RPMI se suplementó con penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 mg/L) y 10 % de suero

bovino fetal inactivado por calor. Los ensayos se realizaron siempre con las células en semi-confluencia, diferenciadas a células tipo macrófago con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 200 nM) por 48 h.

ACTIVACIÓN DE NF κ B

Las células THP-1 (0.5×10^6) se sembraron en placas de 24 pocillos en RPMI completo y se activaron incubándolas con 200 nM PMA por 48 hs. Posteriormente las células se lavaron y se incubaron 24 h en las siguientes condiciones: solo con el medio (control negativo), sobrenadante de bolsas de transfusión almacenadas por 42 días diluido 1:1 en RPMI y RPMI con LPS (1 μ g/mL) más INF γ (400 U/mL) (control positivo de activación). Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS-BSA 5% y una vez más con PBS, luego se fijaron con paraformaldehído 2.5% en solución amortiguadora compuesta de PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM y MgCl₂ 2 mM, pH 7.2 (PHEM), a 4°C durante 10 minutos, seguido de un paso de permeabilización con PHEM que contiene TX100 0.1% durante 10 minutos. A continuación, los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (Ana Spec, CA) y con el anticuerpo monoclonal p65-NF κ B-Alexa594nm (Santa Cruz Biotechnology) y las células se lavaron con PHEM dos veces. Las células se observaron empleando un microscopio Zoe Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) usando un filtro rojo para el anticuerpo fluorescente y uno azul para el Hoechst. La prueba de colocalización se realizó con el software ImageJ (NIH), mediante análisis de todo el campo (sin definir Region Of Interest o Mask). Se evaluó la colocalización del canal azul vs rojo utilizando el desarrollo de Costes (smoothed noise), reportándose el coeficiente de correlación (R) de Pearson [92].

Este ensayo se realizó exclusivamente sobre muestras correspondientes al día 42 de almacenamiento utilizando sobrenadante LR y NLR.

ANÁLISIS DE LA GELIFICACIÓN DEL PLASMA.

Los ensayos de coagulación se realizaron en placas UV de 96 pocillos (Greiner). Se diluyeron 9,5 mg de proteína/mL de plasma humano en TBS (Tris 50 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) y se equilibró a 37 °C durante 15 min. La polimerización, tanto en ausencia como en presencia de 10 µL del sobrenadante de la bolsa, se inició mediante la adición de CaCl₂ 2 mM. La gelificación se monitorizó siguiendo el aumento de absorbancia a 350 nm utilizando un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific, Finlandia), a 37 °C. El aumento de la absorbancia en ausencia de calcio se restó de la condición con calcio, y la polimerización se ajustó a una función logística de cuatro parámetros (Ec. 1).

$$Absorbance_{350nm} = Bottom + \frac{Top-Bottom}{1 + e^{-V_0(t-t_{1/2})}} \quad Ec. 1$$

La pendiente (V_0), $t_{1/2}$ y la amplitud (top-bottom) obtenidas en presencia de sobrenadantes se compararon con los mismos parámetros obtenidos para la polimerización de plasma sin sobrenadante, considerada como 100 %.

Este ensayo se realizó con muestras correspondientes al día 1 y 42 de almacenamiento utilizando sobrenadante LR y NLR.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los datos cuantitativos se expresaron como media ± SD de 8 donantes diferentes.

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido

por análisis de Turkey para comparar dentro de cada grupo el efecto del almacenamiento (día 1 vs cada otro día) y de Sidak para comparar los dos tipos de almacenamiento dentro del mismo tiempo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los valores con $p < 0,05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO.

Con el objetivo de evaluar el impacto de la leucorreducción sobre las características basales de los concentrados de glóbulos rojos, se analizaron los parámetros hematológicos de las unidades leucorreducidas (LR) y no leucorreducidas (NLR) al inicio del período de almacenamiento. En la tabla 7.1 se presentan las características hematológicas de los cGR obtenidos a partir de ocho donantes, cuyas unidades fueron divididas en dos fracciones: una sin leucorreducir (NLR) y otra leucorreducida (LR)

Tabla 7.1. Características hematológicas de las muestras analizadas día 1.

PARAMETRO	NLR	LR	p
Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5.6 ± 0.3	5.7 ± 0.4	ND
Hemoglobina (g/dL)	16.9 ± 0.9	17.0 ± 1.1	ND
Hematocrito (%)	50.7 ± 2.5	51.2 ± 2.6	ND
VMC (fL)	90.1 ± 5.0	89.8 ± 4.9	ND
HCM (pg)	30.0 ± 0.7	29.8 ± 0.8	ND
CHCM (%)	33.4 ± 1.6	33.2 ± 1.2	ND
ADE (%)	11.5 ± 1.4	11.5 ± 1.5	ND
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	89.8 ± 34.5	4.0 ± 2.7	<0.001
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7.2 ± 1.6	0.013 ± 0.005	<0.0001

- El hemograma se realizó empleando Cell-Dyn Ruby (Abbott).
- Las diferencias se analizaron mediante multiple t test (difference $p < 0.05$)
- ND, sin diferencia

Las características hematológicas se analizaron en colaboración con el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Clínicas. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en los parámetros eritrocitarios clásicos (recuento de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina

corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media y ancho de distribución eritrocitaria), lo que indica que el procedimiento de leucorreducción no altera estas variables. En contraste, los recuentos de leucocitos y sus subpoblaciones mostraron una eliminación prácticamente completa en los cGR LR, confirmando la eficacia del procedimiento (reducción leucocitaria significativa $p < 0.0001$). Asimismo, el recuento plaquetario fue significativamente menor en los productos LR en comparación con los NLR ($p < 0,001$), evidenciando que la leucorreducción también reduce otros elementos celulares residuales.

Con el objetivo de evaluar el efecto del almacenamiento sobre los concentrados de glóbulos rojos, se analizaron los parámetros hematológicos en los días 1 y 42 en unidades leucorreducidas (LR) y no leucorreducidas (NLR).

Tabla 7.2. Comparación de parámetros hematológicos determinados en cGR LR y NLR entre el día 1 y 42 de almacenamiento.

	NLR			LR		
	Día 1	Día 42	p	Día 1	Día 42	p
Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5.6 \pm 0.3	6.0 \pm 0.5	ND	5.7 \pm 0.4	6 \pm 0.3	ND
Hemoglobina (g/dL)	16.9 \pm 0.9	17 \pm 1	ND	17.0 \pm 1.1	17.3 \pm 0.5	ND
Hematocrito (%)	50.7 \pm 2.5	54 \pm 5	ND	51.2 \pm 2.6	55 \pm 3	ND
VCM (fL)	90.1 \pm 5.0	91 \pm 2	ND	89.8 \pm 4.9	90.6 \pm 0.7	ND
HCM (pg)	30.0 \pm 0.7	29 \pm 1	ND	29.8 \pm 0.8	28.8 \pm 0.5	ND
CHCM (g/dL)	33.4 \pm 1.6	32 \pm 2	ND	33.2 \pm 1.2	31.8 \pm 0.7	ND
ADE	11.5 \pm 1.4	12 \pm 1	ND	11.5 \pm 1.5	11.8 \pm 0.4	ND
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	89.8 \pm 34.5	58 \pm 17	ND	4.0 \pm 2.7	27 \pm 8	<0.05
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7.2 \pm 1.6	0.5 \pm 0.4	<0.0001	0.013 \pm 0.005	0.02 \pm 0.02	ND

- Los valores obtenidos al día 1 se compararon con los obtenidos a los 42 días de almacenamiento mediante ANOVA de dos vías, seguido por el análisis de comparaciones múltiples de Sidak's.
- ND, sin diferencia.

En la **Tabla 7.2** se presenta la comparación de los parámetros eritrocitarios y leucocitarios entre ambos tiempos de almacenamiento. Los parámetros eritrocitarios, incluyendo el recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito, se mantuvieron relativamente estables a lo largo del período de almacenamiento, sin diferencias significativas entre las condiciones LR y NLR. Esto sugiere que el almacenamiento, en las condiciones evaluadas, no afecta de manera relevante la masa eritrocitaria.

En contraste, los leucocitos mostraron una marcada diferencia entre ambas condiciones. En las unidades LR, los niveles de leucocitos se mantuvieron prácticamente nulos tanto al inicio como al final del almacenamiento, mientras que

en las unidades NLR se observó una disminución progresiva significativa a lo largo del tiempo.

DISCUSION DE RESULTADOS

Estos resultados demuestran que la leucorreducción permite una eliminación eficaz de leucocitos acorde a los estándares internacionales de leucorreducción ($<5 \times 10^6$ leucocitos/unidad).

Que el proceso de leucorreducción no compromete la masa eritrocitaria, lo que resulta relevante para disminuir potenciales fuentes de mediadores inflamatorios sin afectar la calidad del hemocomponente.

Estos resultados también indican que, en ausencia de leucorreducción, los leucocitos residuales presentes en los concentrados de glóbulos rojos sufren lisis durante el almacenamiento, lo que podría contribuir a la liberación de mediadores proinflamatorios en el sobrenadante. En contraste, la leucorreducción previene este fenómeno al eliminar estas células desde el inicio del proceso.

EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS METABOLICOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO.

Con el objetivo de evaluar las alteraciones metabólicas asociadas al almacenamiento de los concentrados de glóbulos rojos, se analizaron los niveles de

sodio (Na^+), potasio (K^+), cloro (Cl^-) y glucosa en el sobrenadante a lo largo del período de almacenamiento (**Figura 7.1**).

Se observó una disminución progresiva de sodio y cloro extracelular, junto con un aumento sostenido de potasio durante el almacenamiento. Asimismo, los niveles de glucosa disminuyeron de manera continua a lo largo del tiempo. Estos cambios presentaron un comportamiento similar en las muestras leucorreducidas (LR) y no leucorreducidas (NLR), sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones.

DISCUSION DE RESULTADOS

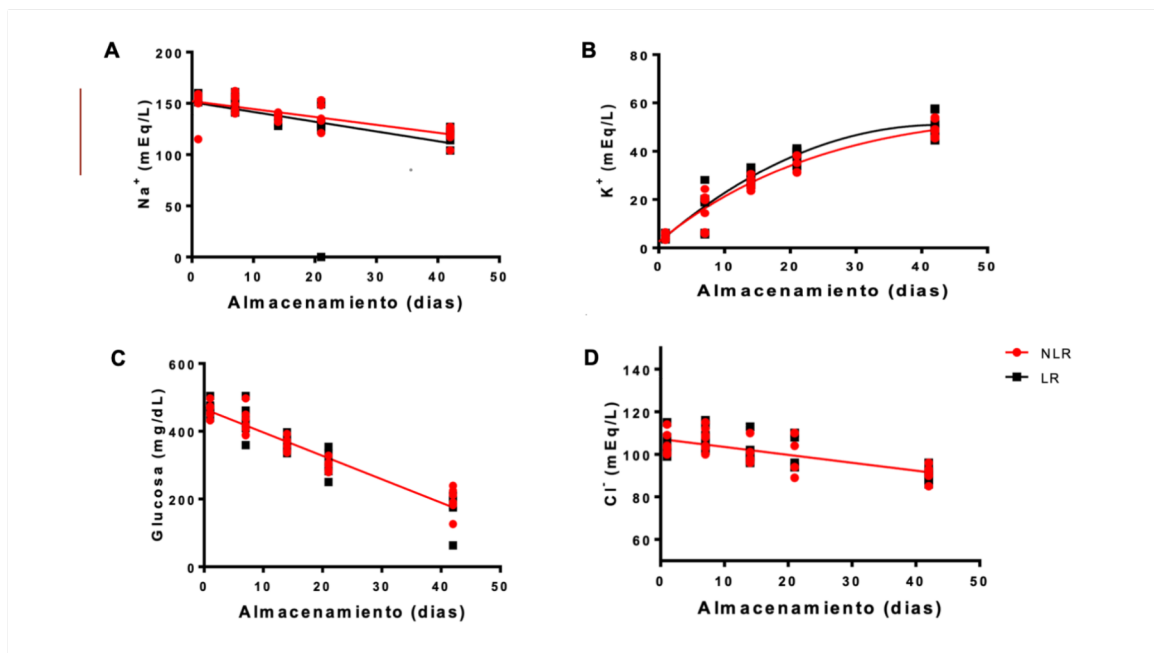


Figura 7.1. Evolución de los parámetros bioquímicos del sobrenadante en cGR LR y NLR. Sodio (A), potasio (B), glucosa (C), cloruro (D). Se evaluaron en el sobrenadante al comienzo del almacenamiento y luego de 7, 14, 21 and 42 días.

Estos resultados evidencian los cambios metabólicos clásicos asociados a las lesiones por almacenamiento de los glóbulos rojos. Son consistentes con

alteraciones en el metabolismo eritrocitario, particularmente con la disminución de la disponibilidad de glucosa y la consecuente reducción en la producción de ATP, lo que impacta sobre la actividad de bombas dependientes de ATP, como la Na^+/K^+ -ATPasa. Esto genera un desequilibrio iónico caracterizado por la salida de K^+ y la disminución de Na^+ y Cl^- en el medio extracelular.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones leucorreducidas (LR) y no leucorreducidas (NLR), lo que indica que la leucorreducción no modifica de manera relevante el metabolismo eritrocitario durante el almacenamiento.

Es de destacar que, a pesar de estas modificaciones, los valores observados al día 42 se mantuvieron dentro de los rangos considerados aceptables para la transfusión, de acuerdo con estándares internacionales (Asociación Americana de Bancos de Sangre).

EVALUACIÓN DEL DAÑO CELULAR DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Con el objetivo de evaluar el daño celular asociado al almacenamiento de los concentrados de glóbulos rojos, se analizaron dos marcadores de lisis: por un lado, la lisis eritrocitaria, evaluada mediante la cuantificación de hemoglobina extracorpúscular en el sobrenadante; y por otro, la lisis leucocitaria, evaluada a través del recuento de leucocitos y la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

LISIS ERITROCITARIA

Como indicador de la integridad de los glóbulos rojos, se evaluó la concentración de hemoglobina extracorpúscular en el sobrenadante de las bolsas de transfusión mediante espectrofotometría UV/Vis (**Figura 7.2**).

Se observó un aumento significativo de la hemoglobina extracorpúscular a partir de los 21 días de almacenamiento en ambas condiciones (LR y NLR). Al día 42, este incremento fue significativamente mayor en las muestras NLR, indicando un mayor grado de hemólisis en ausencia de leucorreducción. Estos resultados muestran que el almacenamiento no solo afecta la viabilidad de los leucocitos, sino también la integridad de los glóbulos rojos, siendo este efecto más pronunciado en las unidades NLR.

Cabe destacar que, a pesar de este incremento, los niveles de hemólisis son leves en relación con la concentración de hemoglobina intracelular (~20 mM) y se mantienen dentro de los rangos considerados seguros para la transfusión (<1%).

DISCUSION DE RESULTADOS

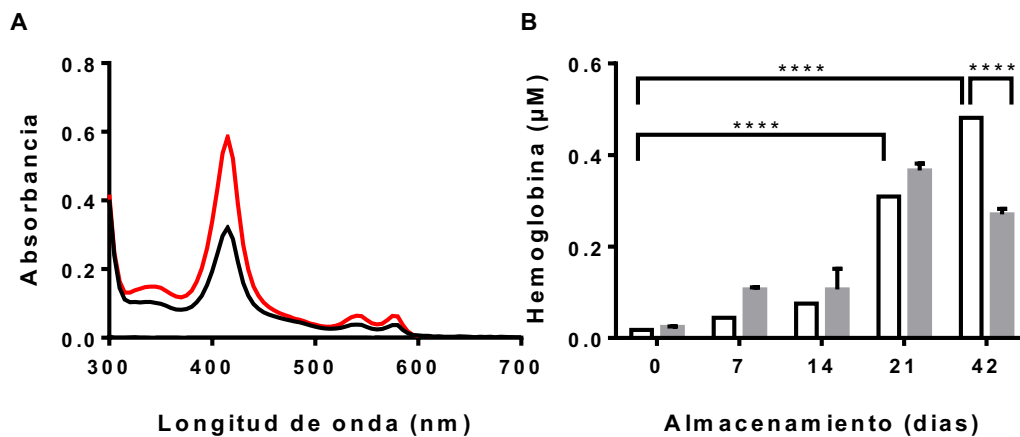


Figura 7.2. Hemoglobina extra corpúscular. **A.** La concentración de hemoglobina en el sobrenadante de las bolsas de transfusión almacenadas en ausencia (azul) y presencia (rojo) de leucocitos se evaluó mediante absorbancia. **B.** La absorbancia a 630 y 577 nm se utilizó para calcular la concentración de hemoglobina extracelular en las muestras NLR (barras blancas) y LR (barras grises). Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido por el análisis de Tukey para comparaciones múltiples (**** $p < 0.0001$).

Estos resultados evidencian que el almacenamiento afecta la estabilidad de la membrana eritrocitaria, promoviendo hemólisis progresiva. La mayor hemólisis observada en las muestras NLR sugiere que la presencia de leucocitos podría contribuir indirectamente al daño eritrocitario, posiblemente a través de la liberación de mediadores que alteran la integridad de la membrana.

Asimismo, el incremento más marcado de la hemólisis hacia etapas tardías del almacenamiento podría explicarse por la pérdida progresiva de los mecanismos de defensa del eritrocito. En condiciones iniciales, los glóbulos rojos conservan su capacidad metabólica, su equilibrio redox y la integridad de su membrana, lo que les permite contrarrestar el estrés generado por el entorno extracelular. Sin embargo, a medida que avanza el almacenamiento, la disminución de la disponibilidad de ATP y de los sistemas antioxidantes compromete estas funciones, favoreciendo el daño estructural y la lisis celular.

Este fenómeno es consistente con las características propias del eritrocito maduro, que carece de núcleo y ribosomas, y por lo tanto no puede sintetizar nuevas proteínas ni reparar eficazmente los daños acumulados durante el almacenamiento.

LISIS LEUCOCITARIA

En paralelo, se evaluó la evolución del recuento leucocitario residual y los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante durante el almacenamiento (Figura 7.3).

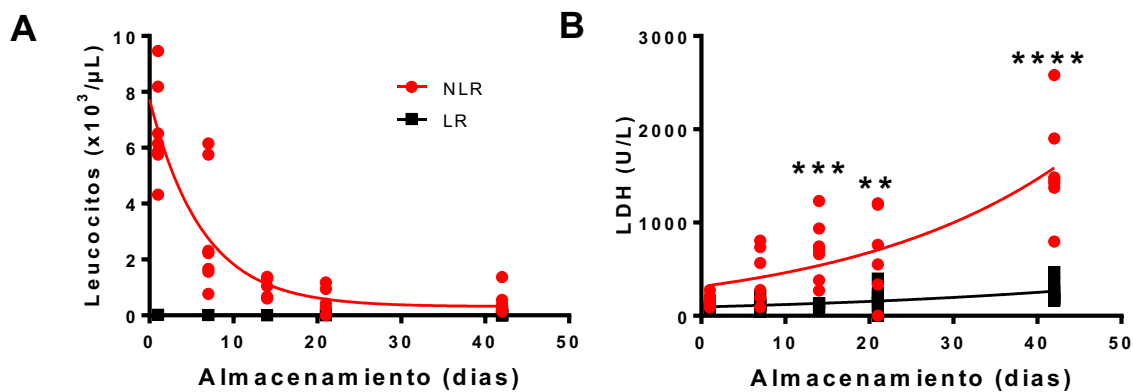


Figura 7.3. Evolución del recuento leucocitario y niveles de LDH en el sobrenadante de cGR LR y NLR durante el almacenamiento. Se observa una disminución exponencial de leucocitos en NLR ($t_{1/2} \approx 4$ días) (A) y un aumento progresivo de LDH (B), consistente con lisis leucocitaria. Datos expresados como media \pm SD ($n = 8$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, seguido por el análisis de Tukey.

Como se observó previamente, la leucorreducción produjo una disminución altamente significativa en el número de leucocitos, alcanzando niveles prácticamente nulos en las unidades LR.

En contraste, las unidades no leucorreducidas (NLR) presentaron un recuento inicial elevado de leucocitos, que disminuyó de forma exponencial durante el almacenamiento, con una vida media aproximada de 4 días ($R^2 = 0,8$) (Figura 7.3).

La mayor reducción se observó en los primeros días, indicando que la mayor parte de los leucocitos se pierde en una fase temprana del almacenamiento.

En paralelo, se evidenció un aumento progresivo de los niveles de LDH en el sobrenadante de las unidades NLR, con un patrón no lineal. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas a partir del día 14 de almacenamiento. Dado que ambas condiciones contienen glóbulos rojos, pero solo las unidades NLR presentan leucocitos residuales, y considerando que la hemólisis eritrocitaria observada fue

mínima, estos resultados sugieren que el aumento de LDH proviene principalmente de la lisis de los leucocitos.

DISCUSION DE RESULTADOS

Estos resultados indican que la presencia de leucocitos en las unidades NLR conduce a su posterior lisis durante el almacenamiento, contribuyendo al aumento de LDH libre en el sobrenadante. Este proceso ocurre de manera temprana y progresiva, lo que sugiere que la lisis leucocitaria constituye un evento inicial dentro de las lesiones por almacenamiento.

La liberación de contenido intracelular asociada a esta lisis, incluyendo enzimas, proteínas y otros mediadores, podría actuar como un amplificador del eje inflamatorio y procoagulante mediante la generación de señales de daño (DAMPs), contribuyendo así al potencial efecto biológico del sobrenadante sobre células del sistema inmune del receptor.

EFFECTO PROINFLAMATORIO DEL SOBRENADANTE DE LAS BOLSAS DE TRANSFUSIÓN

A continuación, evaluamos el potencial proinflamatorio del sobrenadante de las bolsas de concentrados de glóbulos rojos almacenadas en presencia (NLR) y ausencia (LR) de leucocitos.

ACTIVACIÓN DE IL-1 β

Como marcador de activación inflamatoria, analizamos los niveles de IL-1 β mediante Western blot (Figura 7.3).

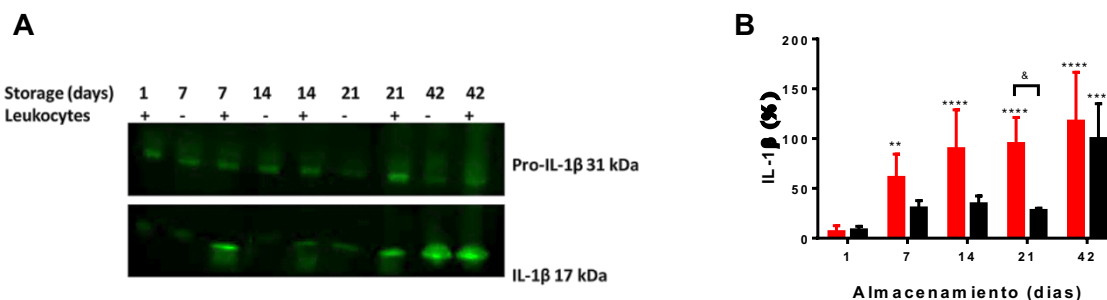


Figura 7.3. Análisis de IL1β en el sobrenadante de preparados almacenados en las condiciones del banco de sangre. **A.** La sangre desplasmática se almacenó a 4° C en muestras no leucorreducidas (NLR) (+) y leucorreducidas (-) por los días especificados y las proteínas presentes en el sobrenadante de las bolsas se sometieron a SDS-PAGE 12%. Se evidenció la presencia de IL-1β mediante un anticuerpo policlonal. Se muestran las bandas a 31 kDa de pro-IL1β y la banda de 17 kDa que corresponde a la forma activa de la IL1β. **B.** El análisis densitométrico de las bandas se realizó empleando el software ImageJ 1.5 (NIH, USA). Los valores se expresan como el porcentaje de área bajo la curva respecto al promedio de áreas de las muestras NLR al día 42 de almacenamiento, considerada como el día de máxima liberación de IL-1β activa (100%). Se analizaron muestras LR y NLR de tres donantes diferentes. Se empleó ANOVA de dos vías seguido por análisis de Turkey para comparar dentro de cada grupo el efecto del almacenamiento (día 1 vs cada otro día) (**, $p < 0.01$, ****, $p < 0.0001$) y de Sidak para comparar los dos tipos de almacenamiento dentro del mismo tiempo (&, $p < 0.05$).

Se detectó la presencia tanto de la forma precursora (pro-IL-1β, 31 kDa) como de la forma activa (IL-1β, 17 kDa) en el sobrenadante de las unidades almacenadas.

Se observó un aumento en la señal correspondiente a la forma activa de IL-1β a partir del día 7 de almacenamiento, particularmente en las muestras NLR, lo que sugiere una activación temprana de esta citoquina. El análisis densitométrico confirmó un incremento significativo de IL-1β activa en las muestras NLR en etapas iniciales del almacenamiento, seguido de una fase de estabilización sin variaciones significativas en los tiempos posteriores.

Asimismo, al día 21 se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones, mientras que hacia el final del almacenamiento los niveles

tendieron a aproximarse. Este comportamiento sugiere una cinética caracterizada por una fase temprana de activación seguida de una meseta en las bolsas NLR

DISCUSION DE RESULTADOS

La asociación temporal entre el incremento de IL-1 β activa, la disminución exponencial del recuento leucocitario y el aumento de LDH en las unidades NLR sugiere que el procesamiento y liberación de esta citoquina podrían estar vinculados a la lisis leucocitaria previamente demostrada. En este sentido, los leucocitos residuales actuarían como una fuente temprana de mediadores proinflamatorios.

En conjunto, estos resultados indican que la presencia de leucocitos en las unidades no leucorreducidas favorece la generación precoz de un microambiente inflamatorio durante el almacenamiento, mientras que la leucorreducción atenúa esta acumulación.

Si bien en este estudio no se evaluó directamente la activación del inflamasoma, el predominio de la forma activa de IL-1 β resulta compatible con la participación de vías de procesamiento inflamatorio asociadas al daño leucocitario.

ACTIVACIÓN DE NF κ B INDUCIDA POR EL SOBRENADANTE

Adicionalmente, abordamos el potencial efecto estimulante del sobrenadante sobre la activación inflamatoria de macrófagos. Con este fin expusimos a un cultivo de células THP-1 al sobrenadante de las bolsas de transfusión (Figura 7.4). El número de células diferenciadas aumentó en presencia de ambos sobrenadantes, pero fue mayor en presencia del sobrenadante NLR. Al mismo tiempo se produjo la

activación del factor nuclear NF κ B, objetivado por un aumento de la colocalización de la señal con la señal nuclear. La localización nuclear del factor se produjo con ambos sobrenadantes, pero fue significativamente superior en las muestras NLR (Figura 7.4), señalando a esta condición de almacenamiento de los cGR como proinflamatoria y potencialmente capaz de inducir una mayor activación de la respuesta inmune en el receptor.

DISCUSION DE RESULTADOS

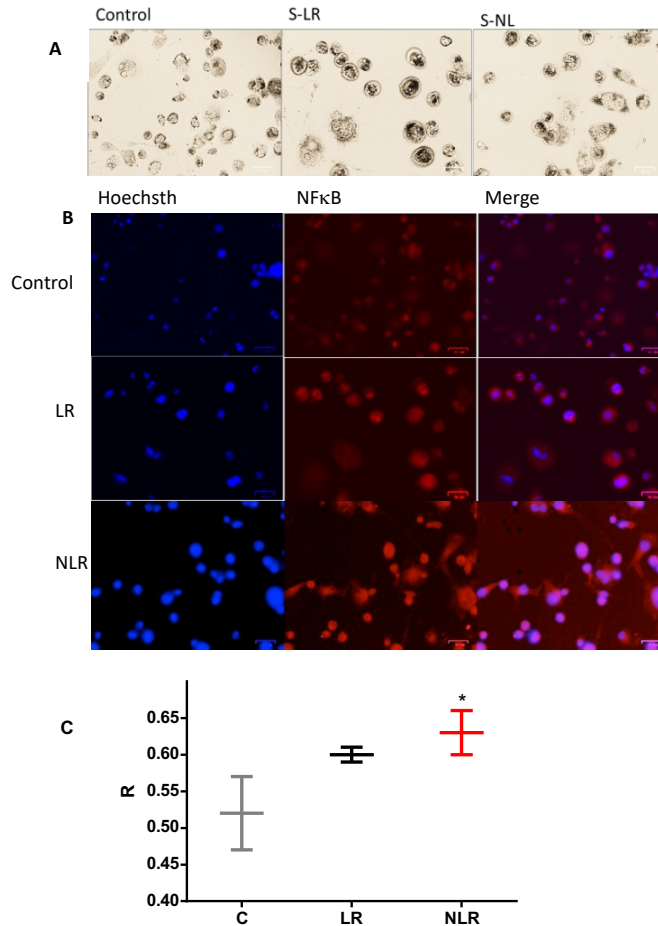


Figura 7.4. Efecto del sobrenadante sobre la activación de NFκB. **A.** Los monocitos THP-1 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 0.5×10^6 células en RPMI completo, y se diferenciaron en presencia de 200 nM PMA por 48h. Luego se incubaron 24 h en RPMI completo en ausencia (control) y en presencia de sobrenadante de bolsas LR y NLR (1:1 en RPMI). Las células se observaron con microscopio de campo claro. **B.** La presencia del factor nuclear NFκB se evidenció empleando un anticuerpo monoclonal anti-p65-NFκB-Alexa594nm y los núcleos se tiñeron con Hoechst, empleando el microscopio de fluorescencia Zoe. **C.** ImageJ se empleó para el análisis de las imágenes y el cálculo de la R de Pearson. Las diferencias en la colocalización de las señales con los diferentes tratamientos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido por *Tukey's multiple comparisons test* (*, $p < 0.05$).

Estos hallazgos indican que el sobrenadante de las unidades almacenadas no solo contiene mediadores inflamatorios, sino que estos conservan su capacidad funcional de activar células del sistema inmune.

La mayor activación observada en las muestras NLR es consistente con la acumulación de mediadores proinflamatorios previamente descritos, incluyendo IL-1 β y productos derivados de la lisis leucocitaria. En este contexto, la activación de NF κ B podría estar mediada por la acción combinada de citoquinas y DAMPs liberados durante el almacenamiento.

Asimismo, el aumento en la activación de NF κ B sugiere que el sobrenadante proveniente de unidades no leucorreducidas genera un microambiente con mayor potencial inmunoestimulador. Esto señala a esta condición de almacenamiento como proinflamatoria y potencialmente capaz de inducir una mayor activación de la respuesta inmune en el receptor.

Adicionalmente, estos resultados refuerzan que la leucorreducción no solo disminuye la carga celular residual, sino que también atenúa el impacto funcional del sobrenadante sobre células inmunes.

Este experimento fue concebido como una prueba de concepto orientada a evaluar la capacidad del sobrenadante de inducir activación celular en la condición de mayor relevancia biológica, correspondiente al sobrenadante de unidades NLR, almacenadas durante 42 días. Si bien podrían incorporarse controles adicionales, los resultados obtenidos permiten evidenciar la actividad proinflamatoria diferencial entre condiciones.

ACTIVIDAD PROCOAGULANTE DEL SOBRENADANTE DE LOS CGR

Dado que la inflamación y la coagulación constituyen sistemas biológicos estrechamente interrelacionados, planteamos la hipótesis de que los cambios inducidos durante el almacenamiento de los concentrados de glóbulos rojos podrían impactar no solo sobre la activación inflamatoria, sino también sobre la activación de la coagulación.

En particular, la lisis celular, la liberación de mediadores inflamatorios y la generación de microvesículas durante el almacenamiento podrían favorecer un estado procoagulante en el sobrenadante.

Con este objetivo, evaluamos la capacidad del sobrenadante de las bolsas de transfusión de inducir la formación de gel de fibrina mediante un ensayo de turbidimetría, que permite monitorear la polimerización de fibrina a través del aumento de la absorbancia a 350 nm.

El agregado de calcio al plasma induce la activación de trombina y la polimerización de fibrinógeno, llevando a la gelificación del plasma y produciendo un aumento de absorbancia a 350 nm (Figura 7.5.A). El análisis funcional de la capacidad procoagulante del sobrenadante se realizó mediante ensayos de formación de gel de fibrina en presencia de sobrenadante de bolsas almacenadas 1 y 42 días.

El gráfico de gelificación (absorbancia a 350 nm) en función del tiempo mostró una forma sigmoidea, con una fase inicial de latencia, seguida por un aumento rápido de gelificación y culminando con una fase estacionaria (Figura 7.5.A). El agregado de sobrenadante de las bolsas de transfusión provocó un aumento en la pendiente de incremento de la absorbancia (Figura 7.5.B).

Este aumento en la pendiente refleja una aceleración de la cinética de formación del gel de fibrina, indicando un incremento en la actividad procoagulante del sobrenadante.

Esas pendientes aumentaron linealmente con la cantidad de proteína del sobrenadante agregada. Esta relación dosis-dependiente ($R^2 > 0,8$) sugiere que el efecto procoagulante está mediado por componentes solubles presentes en el sobrenadante, cuya concentración aumenta con el almacenamiento.

El aumento de la pendiente, inducido por el sobrenadante de las bolsas NLR almacenadas por 42 días (263 ± 9 %/mg de proteína), fue mayor que el provocado por las bolsas almacenadas LR durante el mismo tiempo (160 ± 17 %/mg de proteína) y que las bolsas conteniendo cGR frescos (1 día de almacenamiento) (141 ± 47 %/mg de proteína). Estos resultados indican que el almacenamiento prolongado, particularmente en presencia de leucocitos, potencia significativamente la capacidad procoagulante del sobrenadante.

Por otro lado, el tiempo hasta generar la mitad de la señal ($t_{1/2}$) disminuyó con la adición del sobrenadante, y esta disminución fue más evidente para el agregado del sobrenadante de las bolsas almacenadas por 42 días que para los sobrenadantes de las bolsas frescas (Figura 7.5.C). La reducción del $t_{1/2}$ refuerza la idea de una aceleración del proceso de formación del coágulo, consistente con un aumento en la velocidad de generación de trombina o en la eficiencia del ensamblaje de los complejos de coagulación.

El almacenamiento en presencia de leucocitos indujo un aumento significativo en la velocidad (pendiente) de gelificación del plasma (Fig. 7.5.D). De hecho, la pendiente de las muestras almacenadas 42 días en presencia de leucocitos ($168 \pm$

20 %/mg de proteína), fue significativamente mayor que la pendiente inducida por el agregado de la muestra almacenada 42 días en ausencia de leucocitos (118 ± 45 %/mg de proteína, $p < 0,05$) y también que la de las muestras frescas (NLR 115 ± 19 %/mg de proteína, $p < 0,01$ y LR 86 ± 27 %/mg de proteína, $p < 0,001$) (Fig. 7.5.D). Por otro lado, las $t_{1/2}$ de las muestras almacenadas por 42 días fueron similares en ambas condiciones de almacenamiento (NLR 62 ± 6 % y LR 59 ± 5) y menores a las observadas y menores a las observadas en las muestras frescas (NLR 83 ± 7 y LR 88 ± 7) (Figura 7.5.E).

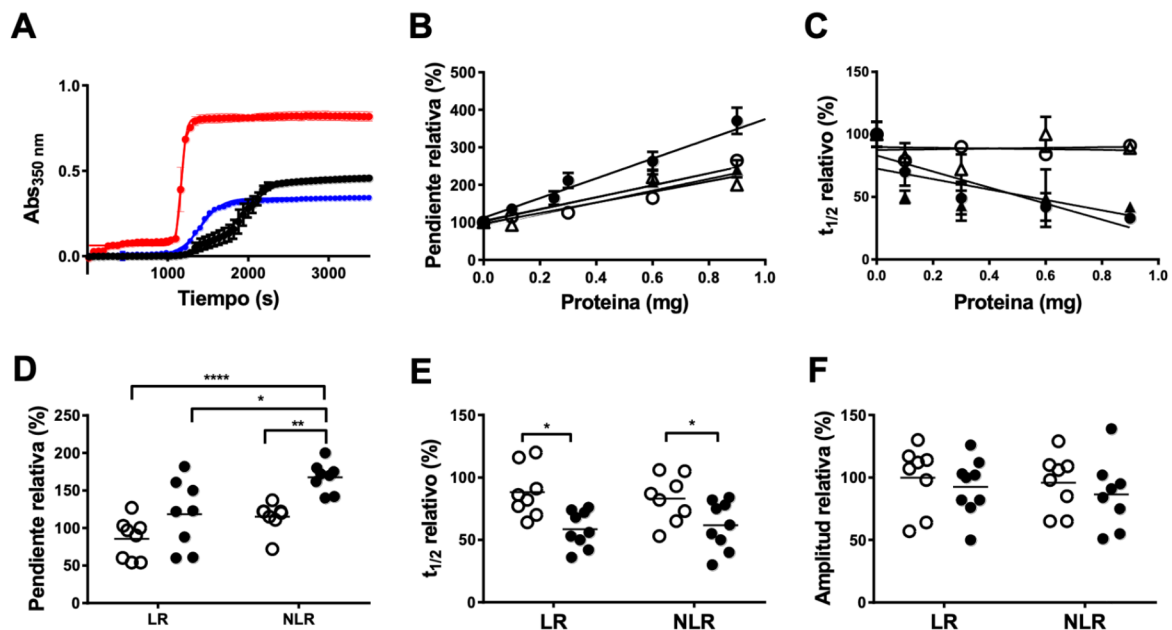


Figure 7.5. Gelificación del plasma en presencia de iones calcio. **A.** La formación del coagulo de fibrina en el plasma humano (9.5 mg de proteína/mL) expuesto a 2 mM de CaCl a 37° C en TBS, se siguió a 350 nm en ausencia (línea negra) y en presencia de 0.25 y 2 mg de proteína/mL de sobrenadante de una bolsa de transfusión NLR almacenada por 42 días (los registros son representativos de 8 determinaciones con muestras de donantes diferentes). **B.** La formación del gel de fibrina se desencadenó en presencia de concentraciones crecientes de proteínas del sobrenadante de bolsas LR almacenadas por 1 (Δ) y 42 (▲) días, y del sobrenadante de bolsas NLR almacenadas por 1 (○) y 42 días (●). Los valores se muestran como media ± SD de tres determinaciones de donantes independientes. Los valores de R² para el ajuste lineal fueron 0.818 (p = 0.09), 0.988 (p = 0.07), 0.91 (p = 0.012) y 0.995 (p < 0.0001), para las bolsas LR almacenadas por 1 y 42 días, y para las NLR almacenadas por 1 y 42 días, respectivamente. **C.** Correlación entre el tiempo medio (t_{1/2}) relativo y la concentración de proteína del sobrenadante de bolsas de transfusión almacenadas por 1 (Δ) y 42 (▲) días, y del sobrenadante NLR de bolsas almacenadas por 1 (○) y 42 días (●). **D.** Pendiente relativa de formación del coagulo de fibrina obtenida adicionando al plasma los 1 mg proteína/mL de sobrenadantes de las muestras almacenadas LR y NLR durante 1 (símbolos claros) y 42 días (símbolos oscuros). **E.** t_{1/2} relativa de formación del coagulo de fibrina obtenida adicionando al plasma 1 mg proteína/mL de sobrenadantes de las muestras almacenadas LR y NLR durante 1 día (símbolos claros) y 42 días (símbolos oscuros). **F.** Amplitud relativa de formación del coagulo de fibrina obtenida adicionando al plasma 1 mg de proteína/mL de sobrenadantes de las muestras almacenadas LR y NLR durante 1 día (símbolos claros) y 42 días (símbolos oscuros). Las diferencias se calcularon mediante ANOVA de dos vías seguido por Tukey para comparaciones múltiples (*, p < 0.05; **, p < 0.01; ****, p < 0.0001).

Estos resultados confirman, en condiciones comparables de carga proteica, que el efecto procoagulante es máximo en las unidades NLR almacenadas

prolongadamente.

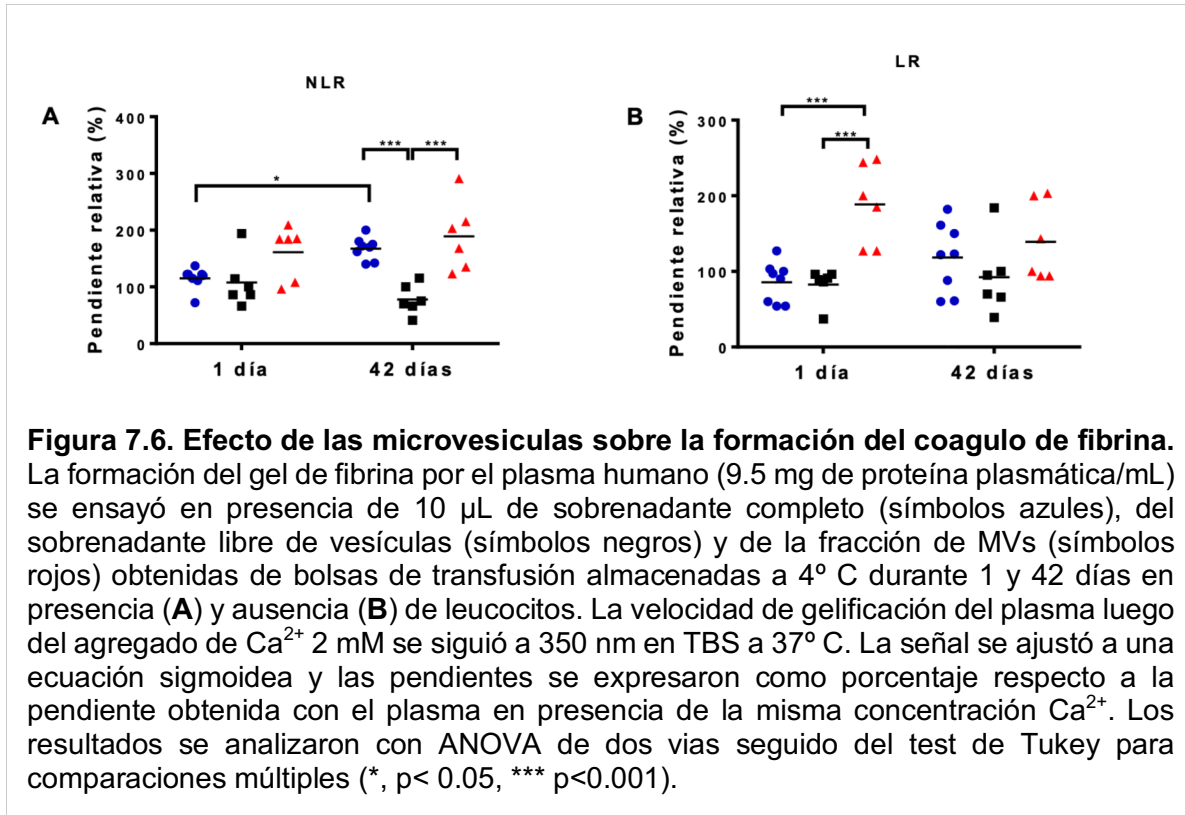
Por su parte, la amplitud de la señal no mostró una variación sustantiva con ninguna de las condiciones (Figura 7.5.F). La ausencia de cambios en la amplitud sugiere que la cantidad final de fibrina formada no se modifica, sino que el efecto del sobrenadante es predominantemente cinético, acelerando la formación del coágulo sin alterar la masa final del gel.

Este hallazgo indica que los componentes presentes en el sobrenadante actúan como moduladores de la velocidad del proceso, más que como determinantes de la cantidad de fibrina generada.

Cuando se aislaron del sobrenadante de las bolsas para transfusión las fracciones de SVE y de VE, se observó un efecto estimulador mayor de esta última fracción en la formación del gel de fibrina (Figura 7.6.A). Esto sugiere que las microvesículas contienen los principales determinantes de la actividad procoagulante observada en el sobrenadante.

De hecho, el agregado de VE aisladas de las muestras NLR almacenados durante 42 días indujeron un aumento de la velocidad de formación del gel de fibrina ($189 \pm 25 \%$) mayor al provocado por el sobrenadante completo ($168 \pm 7 \%$). Este resultado indica que la fracción de VE no solo contribuye, sino que concentra la actividad procoagulante del sobrenadante.

Contrariamente la fracción SVE almacenada en las mismas condiciones fue incapaz de estimular la formación del coágulo ($78 \pm 11 \%$), independientemente del tiempo



de almacenamiento. En las muestras frescas LR, se observó un aumento en la pendiente, inducido por la fracción de VE (Figura 7.6.B), probablemente atribuible a la pérdida de inhibidores de peptidasas en el procesamiento de las muestras. Sin embargo, consistente con la falta de efecto del sobrenadante completo observada previamente, las fracciones aisladas de las muestras LR con 42 días de almacenamiento no generaron cambios en las pendientes de formación del gel de fibrina (Figura 7.6.B). Estos resultados indican que el efecto procoagulante del sobrenadante de las bolsas de transfusión almacenadas en presencia de leucocitos (NLR) está asociado principalmente a las VE.

Desde el punto de vista biológico y fisiopatológico, este efecto podría explicarse por la exposición de fosfatidilserina en la superficie de las microvesículas, que actúa como plataforma para el ensamblaje de complejos de coagulación, facilitando la

generación de trombina y acelerando la formación del coágulo. Asimismo, la liberación de fragmentos de membrana, factor tisular y otros componentes celulares durante la lisis contribuiría a este estado procoagulante.

DISCUSION INTEGRATIVA DE RESULTADOS

Con el objetivo de integrar los hallazgos obtenidos, se presenta un esquema resumen de los principales cambios asociados al almacenamiento de los concentrados de glóbulos rojos (Figura 7.7).

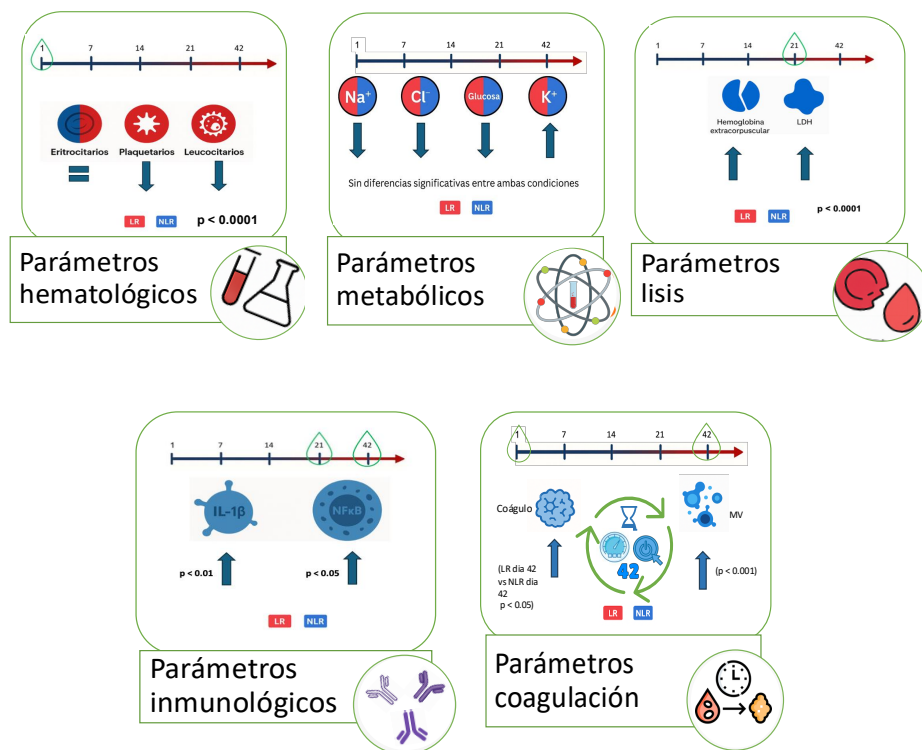


Figura 7.7. Evolución de parámetros durante el almacenamiento de GR leucorreducidos (LR) y no leucorreducidos (NLR). Se agrupan en cinco categorías: **Hematológicos:** disminución de plaquetas y leucocitos posterior a leucorreducción, diferencias significativas entre condiciones. **Lisis:** aumento de Hb extracorpúscular y LDH mayor en NLR, con diferencias significativas al día 21 ($p < 0.0001$). **Metabólicos:** las concentraciones de sodio, cloro, glucosa y potasio mostraron variaciones temporales esperables, sin diferencias significativas entre grupos. **Inmunológicos:** incremento de IL-1 β y activación de NF- κ B, más marcado en NLR. **Coagulación:** el sobrenadante de unidades NLR a los 42 días generó una

mayor formación de microvesículas y una aceleración en la formación del coágulo en comparación con LR. Las líneas de tiempo superiores representan los puntos de muestreo (días 1, 7, 14, 21 y 42).

En la Figura 7.7 se esquematizan los principales hallazgos observados durante el almacenamiento de unidades leucorreducidas (LR) y no leucorreducidas (NLR), integrando en un mismo modelo las alteraciones hematológicas, metabólicas, de lisis, inmunológicas y de coagulación.

Los parámetros hematológicos se mantienen estables en el tiempo, confirmando la comparabilidad inicial entre condiciones. Durante el almacenamiento, se evidencian alteraciones metabólicas eritrocitarias caracterizadas por disminución de glucosa y cambios en el equilibrio iónico ($\downarrow \text{Na}^+$ y Cl^- , $\uparrow \text{K}^+$), sin diferencias entre LR y NLR.

En paralelo, en las unidades NLR se observa una lisis leucocitaria temprana, asociada a un aumento de LDH, seguida de daño eritrocitario progresivo evidenciado por el incremento de hemoglobina extracorpúscular. Estos fenómenos se acompañan de la acumulación de mediadores inflamatorios, incluyendo IL-1 β activa, y de la activación de NF κ B en células inmunes expuestas al sobrenadante.

Finalmente, el sobrenadante presenta actividad procoagulante, evidenciada por la formación de coágulo y la presencia de microvesículas.

La integración de estos hallazgos sugiere que los cambios observados durante el almacenamiento no constituyen eventos aislados, sino que responden a una

secuencia temporal de fenómenos interrelacionados, donde la lisis celular, la activación inflamatoria y la coagulación forman parte de un mismo proceso biológico.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el almacenamiento de concentrados de glóbulos rojos se asocia a una serie de cambios progresivos que abarcan alteraciones metabólicas, lisis celular y la generación de un microambiente proinflamatorio y procoagulante en el sobrenadante.

En primer lugar, las modificaciones en los parámetros metabólicos reflejan el deterioro funcional del eritrocito durante el almacenamiento, caracterizado por la disminución de glucosa y el consecuente descenso en la producción de ATP, lo que impacta sobre la actividad de bombas iónicas como la Na^+/K^+ -ATPasa y genera el desequilibrio iónico observado. Estos cambios no se vieron modificados por la leucorreducción, indicando que corresponden a un fenómeno intrínseco al metabolismo eritrocitario.

Por otro lado, la lisis leucocitaria se presentó como un evento temprano y dinámico en las unidades no leucorreducidas, con una disminución exponencial del recuento leucocitario y un aumento concomitante de LDH en el sobrenadante. Este proceso se asoció temporalmente con la liberación de mediadores inflamatorios, evidenciado por el aumento precoz de la forma activa de $\text{IL-1}\beta$, lo que sugiere que los leucocitos residuales constituyen una fuente relevante de señales proinflamatorias durante las fases iniciales del almacenamiento.

También se evidenció daño eritrocitario, reflejado en el aumento de hemoglobina extracorpúscular, indicando que la integridad de la membrana de los glóbulos rojos se ve comprometida a medida que progresa el almacenamiento.

Finalmente, los ensayos funcionales demostraron que estos cambios no son únicamente bioquímicos, sino que tienen relevancia biológica. El sobrenadante fue capaz de inducir activación inflamatoria en células del sistema inmune, evidenciada por la translocación nuclear de NFκB, siendo este efecto significativamente mayor en las unidades no leucorreducidas.

Asimismo, el sobrenadante de las unidades almacenadas fue capaz de inducir la formación de coágulo de fibrina, evidenciando la presencia de actividad procoagulante. Este fenómeno se observó en ambas condiciones, aunque con mayor precocidad y velocidad en las muestras no leucorreducidas.

Este comportamiento, junto con la evidencia experimental obtenida, sugiere que el efecto procoagulante del sobrenadante está principalmente mediado por la acumulación de microvesículas y productos derivados de la lisis celular, que generan un entorno favorable para la activación de la coagulación.

En conjunto, estos hallazgos permiten proponer un modelo en el cual la lisis leucocitaria temprana conduce a la liberación de DAMPs y citoquinas como IL-1β, que activan vías de señalización inflamatoria como NFκB y contribuyen a la

generación de un entorno proinflamatorio. Paralelamente, la acumulación de microvesículas y otros componentes derivados del daño celular favorecería la activación de la cascada de coagulación, generando un estado procoagulante.

CONCLUSIONES

1. La leucorreducción de cGR resultó eficaz en la eliminación de leucocitos, sin alterar los parámetros eritrocitarios básicos. Esto sugiere que la técnica es segura y no compromete la calidad hematológica inicial del componente.
2. En los parámetros analizados no se encontraron diferencias significativas entre las muestras LR y NLR, salvo en la concentración de Hb extra corpuscular que fue significativamente mayor en las muestras NLR al día 42 de almacenamiento. Si bien la LDH aumentó en el líquido extracelular en los preparados NLR, este aumento estaría relacionado a la lisis de los leucocitos presentes en esta condición.
3. Se detectó la presencia de IL-1 β activa en los sobrenadantes de los preparados almacenados para transfusión, que fue mayor en los cGR NLR y este sobrenadante fue capaz de activar e inducir la migración nuclear del factor NF κ B, señalando la actividad proinflamatoria de estos preparados.
4. Los sobrenadantes de cGR NLR almacenados durante 42 días indujeron una activación procoagulante significativa in vitro, reflejada en el aumento de la pendiente de formación del coágulo de fibrina. Este efecto no fue observado en los productos LR, lo que indica que la leucorreducción previene la

acumulación de factores activadores de la coagulación durante el almacenamiento.

5. Las microvesículas presentes en los cGR NLR fueron responsables, al menos parcialmente, del efecto procoagulante observado, ya que la fracción vesicular aislada reproduce completamente la capacidad de estimular la gelificación del plasma, a diferencia de la fracción libre de vesículas. En los productos LR, ninguna fracción presentó actividad procoagulante, reforzando el rol protector del procedimiento.
6. Estos hallazgos resaltan la importancia de la leucorreducción no solo como medida preventiva frente a reacciones inmunológicas, sino también como herramienta para reducir el potencial procoagulante de los componentes sanguíneos, especialmente relevante en pacientes críticos o con riesgo trombótico.
7. A nivel metodológico, el ensayo de gelificación utilizado demostró ser una herramienta sensible para detectar actividad procoagulante en sobrenadantes de cGR, proponiéndose como método complementario para evaluar la calidad funcional de componentes sanguíneos almacenados.
8. Este trabajo respalda la implementación de la leucorreducción universal en bancos de sangre de Uruguay, con el objetivo de mejorar la seguridad transfusional mediante la reducción de mediadores bioactivos proinflamatorios y procoagulantes acumulados durante el almacenamiento.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo abren diversas líneas de investigación futuras orientadas a profundizar en los mecanismos involucrados en las lesiones por almacenamiento y su impacto biológico en el receptor.

En primer lugar, sería relevante avanzar en la caracterización más detallada de los mediadores presentes en el sobrenadante de los concentrados de glóbulos rojos, particularmente aquellos derivados de la lisis leucocitaria y eritrocitaria, incluyendo citoquinas, microvesículas y otros componentes con potencial actividad biológica.

Asimismo, resultaría de interés evaluar de manera más directa la participación de vías inflamatorias específicas, como la activación del inflammasoma, mediante el análisis de sus componentes moleculares y su relación con la generación de IL-1 β activa durante el almacenamiento.

Por otro lado, los hallazgos vinculados a la actividad procoagulante del sobrenadante sugieren la necesidad de profundizar en el rol de las microvesículas, particularmente en lo que respecta a su origen celular, composición y capacidad funcional para modular la coagulación en modelos más complejos.

Desde una perspectiva funcional, sería relevante evaluar el impacto de estos cambios en modelos celulares y, eventualmente, en modelos in vivo, con el fin de determinar su relevancia en el contexto clínico de la transfusión.

En este sentido, estudios futuros podrían orientarse a analizar la respuesta inflamatoria y hemostática en receptores de transfusiones, así como la posible asociación entre las características del hemocomponente transfundido y la aparición de eventos adversos.

Finalmente, los resultados obtenidos refuerzan la importancia de la leucorreducción como estrategia para disminuir la carga biológica del sobrenadante. En este contexto, este trabajo podría contribuir a la evaluación de la implementación de la leucorreducción como estándar en los bancos de sangre de Uruguay, considerando su potencial impacto en la reducción de mediadores proinflamatorios y procoagulantes y, en consecuencia, en la seguridad transfusional.

REFERENCIAS

- [1] W.F. Boron, Evaluating the role of carbonic anhydrases in the transport of HCO₃⁻-related species, *Biochim Biophys Acta* 1804 (2010) 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.021>.
- [2] M.M. Faghih, M.K. Sharp, Modeling and prediction of flow-induced hemolysis: a review, *Biomech Model Mechanobiol* 18 (2019) 845–881. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01137-1>.
- [3] V. Kuhn, L. Diederich, T.C.S. Keller, C.M. Kramer, W. Lückstädt, C. Panknin, T. Suvorava, B.E. Isakson, M. Kelm, M.M. Cortese-Krott, Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia, Antioxid Redox Signal 26 (2017) 718–742. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>.
- [4] X. Zhang, Y. Lin, J. Xin, Y. Zhang, K. Yang, Y. Luo, B. Wang, Red blood cells in biology and translational medicine: natural vehicle inspires new biomedical applications, *Theranostics* 14 (2024) 220–248. <https://doi.org/10.7150/thno.87425>.
- [5] W. Sae-Lee, C.L. McCafferty, E.J. Verbeke, P.C. Havugimana, O. Papoulas, C.D. McWhite, J.R. Houser, K. Vanuytsel, G.J. Murphy, K. Drew, A. Emili, D.W. Taylor, E.M. Marcotte, The protein organization of a red blood cell, *Cell Rep* 40 (2022) 111103. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111103>.
- [6] H. Mairböurl, O. Oelz, P. Bärtsch, Interactions between Hb, Mg, DPG, ATP, and Cl determine the change in Hb-O₂ affinity at high altitude, *J Appl Physiol* (1985) 74 (1993) 40–48. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.74.1.40>.
- [7] T.G. Fai, A. Leo-Macias, D.L. Stokes, C.S. Peskin, Image-based model of the spectrin cytoskeleton for red blood cell simulation, *PLoS Comput Biol* 13 (2017) e1005790. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005790>.
- [8] N. Li, S. Chen, K. Xu, M.-T. He, M.-Q. Dong, Q.C. Zhang, N. Gao, Structural basis of membrane skeleton organization in red blood cells, *Cell* 186 (2023) 1912–1929.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.017>.
- [9] S.E. Lux IV, Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions, *Blood* 127 (2016) 187–199. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>.
- [10] J.G. Danielczok, E. Terriac, L. Hertz, P. Petkova-Kirova, F. Lautenschläger, M.W. Laschke, L. Kaestner, Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca²⁺-mediated Adaptations, *Front. Physiol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00979>.
- [11] J.S. Wiley, K.E. McCulloch, Calcium ions, drug action and the red cell membrane, *Pharmacol Ther* 18 (1982) 271–292. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(82\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(82)90070-5).
- [12] V.L. Lew, The Calcium Homeostasis of Human Red Blood Cells in Health and Disease: Interactions of PIEZO1, the Plasma Membrane Calcium Pump, and Gardos Channels, *Annu Rev Physiol* 87 (2025) 257–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022724-105119>.
- [13] A. Issaian, A. Hay, M. Dzieciatkowska, D. Roberti, S. Perrotta, Z. Darula, J. Redzic, M.P. Busch, G.P. Page, S.C. Rogers, A. Doctor, K.C. Hansen, E.Z. Eisenmesser, J.C. Zimring, A. D'Alessandro, The interactome of the N-terminus of band 3 regulates red blood cell metabolism and storage quality, *Haematologica* 106 (2021) 2971–2985. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.278252>.
- [14] T.J. Satchwell, A.M. Toye, Band 3, an essential red blood cell hub of activity, *Haematologica* 106 (2021) 2792–2793. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.278643>.
- [15] P.S. Low, P. Rathinavelu, M.L. Harrison, Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3, *J Biol Chem* 268 (1993) 14627–14631.

- [16] T.J. McMahon, C.C. Darrow, B.A. Hoehn, H. Zhu, Generation and Export of Red Blood Cell ATP in Health and Disease, *Front Physiol* 12 (2021) 754638. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.754638>.
- [17] H. Chu, M.M. McKenna, N.A. Krump, S. Zheng, L. Mendelsohn, S.L. Thein, L.J. Garrett, D.M. Bodine, P.S. Low, Reversible binding of hemoglobin to band 3 constitutes the molecular switch that mediates O₂ regulation of erythrocyte properties, *Blood* 128 (2016) 2708–2716. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-692079>.
- [18] M.L. Jennings, Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1, *Am J Physiol Cell Physiol* 321 (2021) C1028–C1059. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00275.2021>.
- [19] I.A. Kolosova, T. Mirzapozova, L. Moreno-Vinasco, S. Sammani, J.G.N. Garcia, A.D. Verin, Protective effect of purinergic agonist ATPγS against acute lung injury, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294 (2008) L319–324. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00283.2007>.
- [20] W.H. Organization, El Uso clínico de la sangre en medicina, obstetricia, pediatria y neonatología, cirugía y anestesia, trauma y quemaduras, Organización Mundial de la Salud, 2002. <https://iris.who.int/handle/10665/42431> (accessed August 5, 2025).
- [21] Decreto N° 118/024, (n.d.). <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/118-2024> (accessed April 8, 2026).
- [22] World Health Organization, Global status report on blood safety and availability 2021, (n.d.). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240051683> (accessed August 15, 2025).
- [23] C.G. Koch, L. Li, D.I. Sessler, P. Figueroa, G.A. Hoeltge, T. Mihaljevic, E.H. Blackstone, Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery, *N Engl J Med* 358 (2008) 1229–1239. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070403>.
- [24] Z.K. McQuilten, C.J. French, A. Nichol, A. Higgins, D.J. Cooper, Effect of age of red cells for transfusion on patient outcomes: a systematic review and meta-analysis, *Transfus Med Rev* 32 (2018) 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2018.02.002>.
- [25] P. Thiagarajan, C.J. Parker, J.T. Prchal, How Do Red Blood Cells Die?, *Front Physiol* 12 (2021) 655393. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.655393>.
- [26] T. Thomas, S.L. Spitalnik, Hitchhiker’s guide to the red blood cell storage lesion, *Blood Transfus* 17 (2019) 1–3. <https://doi.org/10.2450/2019.0257-18>.
- [27] S.B. Bayer, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn, Accumulation of oxidized peroxiredoxin 2 in red blood cells and its prevention, *Transfusion* 55 (2015) 1909–1918. <https://doi.org/10.1111/trf.13039>.
- [28] P.J. Norris, K. Schechtman, H.C. Inglis, A. Adelman, J.W. Heitman, R. Vilardi, A. Shah, N.H. Roubinian, A. Danesh, A.M. Guiltinan, S.M. Keating, J. Lacroix, M.J. Cohen, P.C. Spinella, Influence of blood storage age on immune and coagulation parameters in critically ill transfused patients, *Transfusion* 59 (2019) 1223–1232. <https://doi.org/10.1111/trf.15250>.
- [29] S. Rocha, D. Gomes, M. Lima, E. Bronze-da-Rocha, A. Santos-Silva, Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H₂O₂-induced oxidative stress, *Free Radic Res* 49 (2015) 990–1003. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1028402>.
- [30] A. D’Alessandro, A.D. Gray, Z.M. Szczepiorkowski, K. Hansen, L.H. Herschel, L.J. Dumont, Red blood cell metabolic responses to refrigerated storage, rejuvenation, and frozen storage, *Transfusion* 57 (2017) 1019–1030. <https://doi.org/10.1111/trf.14034>.
- [31] T. Yoshida, M. Prudent, A. D’Alessandro, Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences, *Blood Transfus* 17 (2019) 27–52. <https://doi.org/10.2450/2019.0217-18>.

- [32] M.H. Antonelou, A.G. Kriebardis, K.E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L.H. Margaritis, I.S. Papassideri, Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol, *Transfusion* 50 (2010) 376–389. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02449.x>.
- [33] F. Amen, A. Machin, C. Touriño, I. Rodríguez, A. Denicola, L. Thomson, N-acetylcysteine improves the quality of red blood cells stored for transfusion, *Arch. Biochem. Biophys.* 621 (2017) 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.02.012>.
- [34] V.M. Harper, J.Y. Oh, R. Stapley, M.B. Marques, L. Wilson, S. Barnes, C.-W. Sun, T. Townes, R.P. Patel, Peroxiredoxin-2 Recycling Is Inhibited During Erythrocyte Storage, *Antioxid Redox Signal* 22 (2015) 294–307. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5950>.
- [35] R.S. Hoehn, P.L. Jernigan, A.L. Chang, M.J. Edwards, T.A. Pritts, Molecular mechanisms of erythrocyte aging, *Biol Chem* 396 (2015) 621–631. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0292>.
- [36] I. Mustafa, A. Al Marwani, K. Mamdouh Nasr, N. Abdulla Kano, T. Hadwan, Time Dependent Assessment of Morphological Changes: Leukodepleted Packed Red Blood Cells Stored in SAGM, *BioMed Research International* 2016 (2016) 4529434. <https://doi.org/10.1155/2016/4529434>.
- [37] B. Blasi, A. D’Alessandro, N. Ramundo, L. Zolla, Red blood cell storage and cell morphology, *Transfus Med* 22 (2012) 90–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2012.01139.x>.
- [38] M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles, *Annu Rev Cell Dev Biol* 30 (2014) 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- [39] C. Théry, K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-Smith, D.C. Ayre, J.-M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, S. Baldacchino, N.N. Bauer, A.A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A. Bedina Zavec, A. Benmoussa, A.C. Berardi, P. Bergese, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-Wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F.E. Borràs, S. Bosch, C.M. Boulanger, X. Breakefield, A.M. Breglio, M.Á. Brennan, D.R. Brigstock, A. Brisson, M.L. Broekman, J.F. Bromberg, P. Bryl-Górecka, S. Buch, A.H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.I. Buzás, J.B. Byrd, G. Camussi, D.R. Carter, S. Caruso, L.W. Chamley, Y.-T. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, A.R. Chin, A. Clayton, S.P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, R.J. Coffey, A. Cordeiro-da-Silva, Y. Couch, F.A. Coumans, B. Coyle, R. Crescitelli, M.F. Criado, C. D’Souza-Schorey, S. Das, A. Datta Chaudhuri, P. de Candia, E.F. De Santana, O. De Wever, H.A. Del Portillo, T. Demaret, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L.C. Dieterich, V. Dolo, A.P. Dominguez Rubio, M. Dominici, M.R. Dourado, T.A. Driedonks, F.V. Duarte, H.M. Duncan, R.M. Eichenberger, K. Ekström, S. El Andaloussi, C. Elie-Caille, U. Erdbrügger, J.M. Falcón-Pérez, F. Fatima, J.E. Fish, M. Flores-Bellver, A. Försönits, A. Frelet-Barrand, F. Fricke, G. Fuhrmann, S. Gabrielsson, A. Gámez-Valero, C. Gardiner, K. Gärtner, R. Gaudin, Y.S. Gho, B. Giebel, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D.C. Goberdhan, A. Görgens, S.M. Gorski, D.W. Greening, J.C. Gross, A. Gualerzi, G.N. Gupta, D. Gustafson, A. Handberg, R.A. Haraszti, P. Harrison, H. Hegyesi, A. Hendrix, A.F. Hill, F.H. Hochberg, K.F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer, B. Hosseinkhani, G. Hu, Y. Huang, V. Huber, S. Hunt, A.G.-E. Ibrahim, T. Ikezu, J.M. Inal, M. Isin, A. Ivanova, H.K. Jackson, S. Jacobsen, S.M. Jay, M. Jayachandran, G. Jenster, L. Jiang, S.M. Johnson, J.C. Jones, A. Jong, T. Jovanovic-Talisman, S. Jung, R. Kalluri, S.-I. Kano, S. Kaur, Y. Kawamura, E.T. Keller, D. Khamari, E. Khomyakova, A. Khvorova, P. Kierulf, K.P. Kim, T. Kislinger, M. Klingeborn, D.J. Klinker, M. Kornek, M.M. Kosanović, Á.F. Kovács, E.-M. Krämer-Albers, S. Krasemann, M. Krause, I.V. Kurochkin, G.D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S.M. Langevin, L.R. Languino, J. Lannigan, C. Lässer, L.C. Laurent, G. Lavieu, E. Lázaro-Ibáñez, S. Le Lay, M.-S. Lee, Y.X.F. Lee, D.S. Lemos, M. Lenassi, A. Leszczynska, I.T. Li, K. Liao, S.F. Libregts, E.

- Ligeti, R. Lim, S.K. Lim, A. Linē, K. Linnemannstōns, A. Llorente, C.A. Lombard, M.J. Lorenowicz, Á.M. Lőrincz, J. Lötval, J. Lovett, M.C. Lowry, X. Loyer, Q. Lu, B. Lukomska, T.R. Lunavat, S.L. Maas, H. Malhi, A. Marcilla, J. Mariani, J. Mariscal, E.S. Martens-Uzunova, L. Martin-Jaular, M.C. Martinez, V.R. Martins, M. Mathieu, S. Mathivanan, M. Maugeri, L.K. McGinnis, M.J. McVey, D.G. Meckes, K.L. Meehan, I. Mertens, V.R. Minciocchi, A. Möller, M. Møller Jørgensen, A. Morales-Kastresana, J. Morhayim, F. Mullier, M. Muraca, L. Musante, V. Mussack, D.C. Muth, K.H. Myburgh, T. Najrana, M. Nawaz, I. Nazarenko, P. Nejsun, C. Neri, T. Neri, R. Nieuwland, L. Nimrichter, J.P. Nolan, E.N. Nolte-’t Hoen, N. Noren Hooten, L. O’Driscoll, T. O’Grady, A. O’Loghlen, T. Ochiya, M. Olivier, A. Ortiz, L.A. Ortiz, X. Osteikoetxea, O. Østergaard, M. Ostrowski, J. Park, D.M. Pegtel, H. Peinado, F. Perut, M.W. Pfaffl, D.G. Phinney, B.C. Pieters, R.C. Pink, D.S. Pisetsky, E. Pogge von Strandmann, I. Polakovicova, I.K. Poon, B.H. Powell, I. Prada, L. Pulliam, P. Quesenberry, A. Radeghieri, R.L. Raffai, S. Raimondo, J. Rak, M.I. Ramirez, G. Raposo, M.S. Rayyan, N. Regev-Rudzki, F.L. Ricklefs, P.D. Robbins, D.D. Roberts, S.C. Rodrigues, E. Rohde, S. Rome, K.M. Rouschop, A. Rughetti, A.E. Russell, P. Saá, S. Sahoo, E. Salas-Huenuleo, C. Sánchez, J.A. Saugstad, M.J. Saul, R.M. Schiffelers, R. Schneider, T.H. Schøyen, A. Scott, E. Shahaj, S. Sharma, O. Shatnyeva, F. Shekari, G.V. Shelke, A.K. Shetty, K. Shiba, P.R.-M. Siljander, A.M. Silva, A. Skowronek, O.L. Snyder, R.P. Soares, B.W. Sódar, C. Soekmadji, J. Sotillo, P.D. Stahl, W. Stoorvogel, S.L. Stott, E.F. Strasser, S. Swift, H. Tahara, M. Tewari, K. Timms, S. Tiwari, R. Tixeira, M. Tkach, W.S. Toh, R. Tomasini, A.C. Torrecilhas, J.P. Tosar, V. Toxavidis, L. Urbanelli, P. Vader, B.W. van Balkom, S.G. van der Grein, J. Van Deun, M.J. van Herwijnen, K. Van Keuren-Jensen, G. van Niel, M.E. van Royen, A.J. van Wijnen, M.H. Vasconcelos, I.J. Vechetti, T.D. Veit, L.J. Vella, É. Velot, F.J. Verweij, B. Vestad, J.L. Viñas, T. Visnovitz, K.V. Vukman, J. Wahlgren, D.C. Watson, M.H. Wauben, A. Weaver, J.P. Webber, V. Weber, A.M. Wehman, D.J. Weiss, J.A. Welsh, S. Wendt, A.M. Wheelock, Z. Wiener, L. Witte, J. Wolfram, A. Xagorari, P. Xander, J. Xu, X. Yan, M. Yáñez-Mó, H. Yin, Y. Yuana, V. Zappulli, J. Zarubova, V. Žekas, J.-Y. Zhang, Z. Zhao, L. Zheng, A.R. Zheutlin, A.M. Zickler, P. Zimmermann, A.M. Zivkovic, D. Zocco, E.K. Zuba-Surma, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *J Extracell Vesicles* 7 (2018) 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- [40] J.K.F. Leal, M.J.W. Adjobo-Hermans, G.J.C.G.M. Bosman, Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease, *Front Physiol* 9 (2018) 703. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00703>.
- [41] D.B. Nguyen, T.B.T. Ly, M.C. Wesseling, M. Hittinger, A. Torge, A. Devitt, Y. Perrie, I. Bernhardt, Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells, *Cell Physiol Biochem* 38 (2016) 1085–1099. <https://doi.org/10.1159/000443059>.
- [42] J. Sudnitsyna, E. Skverchinskaya, I. Dobrylko, E. Nikitina, S. Gambaryan, I. Mindukshev, Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes, *Antioxidants (Basel)* 9 (2020) 929. <https://doi.org/10.3390/antiox9100929>.
- [43] K. Thangaraju, S.N. Neerukonda, U. Katneni, P.W. Buehler, Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy, *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2021) 153. <https://doi.org/10.3390/ijms22010153>.
- [44] J.K. Freitas Leal, E. Lasonder, V. Sharma, J. Schiller, G. Fanelli, S. Rinalducci, R. Brock, G. Bosman, Vesiculation of Red Blood Cells in the Blood Bank: A Multi-Omics Approach towards Identification of Causes and Consequences, *Proteomes* 8 (2020) 6. <https://doi.org/10.3390/proteomes8020006>.
- [45] D.F. Noubouossie, M.W. Henderson, M. Mooberry, A. Ilich, P. Ellsworth, M. Piegore, S.C. Skinner, R. Pawlinski, I. Welsby, T. Renné, M. Hoffman, D.M. Monroe, N.S. Key, Red blood cell

- microvesicles activate the contact system, leading to factor IX activation via 2 independent pathways, *Blood* 135 (2020) 755–765. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001643>.
- [46] M. Mo, Z. Lian, Y. Xiang, X. Du, H. Liu, J. Sun, R. Wang, Association between perioperative red blood cell transfusions and postoperative venous thromboembolism: A systematic review and meta-analysis, *Thrombosis Research* 237 (2024) 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2024.03.032>.
- [47] G. Liu, P. Lei, C. Liao, K. Huang, L. Li, Y. Cao, J. Chen, Red blood cell transfusion is associated with an increased risk of splanchnic vein thrombosis in patients with cirrhosis, *Transfus Med* 33 (2023) 61–67. <https://doi.org/10.1111/tme.12937>.
- [48] K. Schroder, J. Tschopp, The inflammasomes, *Cell* 140 (2010) 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>.
- [49] P.I. Johansson, J. Stensballe, S.R. Ostrowski, Shock induced endotheliopathy (SHINE) in acute critical illness - a unifying pathophysiologic mechanism, *Crit Care* 21 (2017) 25. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1605-5>.
- [50] A.P.J. Vlaar, N.P. Juffermans, Transfusion-related acute lung injury: a clinical review, *Lancet* 382 (2013) 984–994. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62197-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62197-7).
- [51] J.W. Semple, J. Rebetz, R. Kapur, Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury, *Blood* 133 (2019) 1840–1853. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-860809>.
- [52] Y. Yu, Z. Lian, Update on transfusion-related acute lung injury: an overview of its pathogenesis and management, *Front. Immunol.* 14 (2023). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1175387>.
- [53] E.A. Hod, G.M. Brittenham, G.B. Billote, R.O. Francis, Y.Z. Ginzburg, J.E. Hendrickson, J. Jhang, J. Schwartz, S. Sharma, S. Sheth, A.N. Sireci, H.L. Stephens, B.A. Stotler, B.S. Wojczyk, J.C. Zimring, S.L. Spitalnik, Transfusion of human volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and circulating non-transferrin-bound iron, *Blood* 118 (2011) 6675–6682. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371849>.
- [54] E.A. Hod, N. Zhang, S.A. Sokol, B.S. Wojczyk, R.O. Francis, D. Ansaldi, K.P. Francis, P. Della-Latta, S. Whittier, S. Sheth, J.E. Hendrickson, J.C. Zimring, G.M. Brittenham, S.L. Spitalnik, Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation, *Blood* 115 (2010) 4284–4292. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-245001>.
- [55] M. Straat, A. Tuip, T.R.L. Klei, B.M. Beuger, J.J.T.H. Roelofs, R. van Bruggen, N.P. Juffermans, Endotoxemia Results in Trapping of Transfused Red Blood Cells in Lungs with Associated Lung Injury, *Shock* 48 (2017) 484–489. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000875>.
- [56] A.P.J. Vlaar, J.J. Hofstra, M. Levi, W. Kulik, R. Nieuwland, A.T.J. Tool, M.J. Schultz, D. de Korte, N.P. Juffermans, Supernatant of aged erythrocytes causes lung inflammation and coagulopathy in a “two-hit” in vivo syngeneic transfusion model, *Anesthesiology* 113 (2010) 92–103. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181de6f25>.
- [57] A.K. Keir, A.J. McPhee, C.C. Andersen, M.J. Stark, Plasma cytokines and markers of endothelial activation increase after packed red blood cell transfusion in the preterm infant, *Pediatr Res* 73 (2013) 75–79. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.144>.
- [58] A.M. Larsen, E.B. Leinøe, P.I. Johansson, H. Birgens, S.R. Ostrowski, Haemostatic function and biomarkers of endothelial damage before and after RBC transfusion in patients with haematologic disease, *Vox Sang* 109 (2015) 52–61. <https://doi.org/10.1111/vox.12249>.
- [59] A.P.J. Vlaar, A.D. Cornet, J.J. Hofstra, L. Porcelijn, A. Beishuizen, W. Kulik, M.B. Vroom, M.J. Schultz, A.B.J. Groeneveld, N.P. Juffermans, The effect of blood transfusion on pulmonary permeability in cardiac surgery patients: a prospective multicenter cohort study, *Transfusion* 52 (2012) 82–90. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03231.x>.

- [60] A.A. Khorana, C.W. Francis, N. Blumberg, E. Culakova, M.A. Refaai, G.H. Lyman, Blood transfusions, thrombosis, and mortality in hospitalized patients with cancer, *Arch Intern Med* 168 (2008) 2377–2381. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.21.2377>.
- [61] M. Maimaitiming, C. Zhang, J. Xie, Z. Zheng, H. Luo, O.C. Ooi, Impact of restrictive red blood cell transfusion strategy on thrombosis-related events: A meta-analysis and systematic review, *Vox Sanguinis* 117 (2022) 887–899. <https://doi.org/10.1111/vox.13274>.
- [62] L. van Manen, M.E. van Hezel, M. Boshuizen, M. Straat, A.M.E. de Man, C. Dekimpe, K. Vanhoorelbeke, R. van Bruggen, N.P. Juffermans, Effect of red blood cell transfusion on inflammation, endothelial cell activation and coagulation in the critically ill, *Vox Sanguinis* 117 (2022) 64–70. <https://doi.org/10.1111/vox.13125>.
- [63] A.P.J. Vlaar, W. Kulik, R. Nieuwland, C.P. Peters, A.T.J. Tool, R. van Bruggen, N.P. Juffermans, D. de Korte, Accumulation of bioactive lipids during storage of blood products is not cell but plasma derived and temperature dependent, *Transfusion* 51 (2011) 2358–2366. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03177.x>.
- [64] C. Heranney, M. Portier, F. Cognasse, D. Anne-Claire, Inflammation induced by lipid mediators and protein from transfusion products, *Current Opinion in Immunology* 95 (2025) 102605. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2025.102605>.
- [65] Y.M. Bilgin, A. Brand, Transfusion-related immunomodulation: a second hit in an inflammatory cascade?, *Vox Sang* 95 (2008) 261–271. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01100.x>.
- [66] E.C. Vamvakas, M.A. Blajchman, Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update, *Blood Rev* 21 (2007) 327–348. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2007.07.003>.
- [67] E.C. Vamvakas, M.A. Blajchman, Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction?, *Blood* 97 (2001) 1180–1195. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.5.1180>.
- [68] M. Ghio, P. Contini, S. Negrini, C. Mazzei, M.R. Zocchi, A. Poggi, Down regulation of human natural killer cell-mediated cytotoxicity induced by blood transfusion: role of transforming growth factor- β (1), soluble Fas ligand, and soluble Class I human leukocyte antigen, *Transfusion* 51 (2011) 1567–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.03000.x>.
- [69] K. Long, C. Meier, A. Bernard, D. Williams, D. Davenport, J. Woodward, T-cell suppression by red blood cells is dependent on intact cells and is a consequence of blood bank processing, *Transfusion* 54 (2014) 1340–1347. <https://doi.org/10.1111/trf.12472>.
- [70] J. Muszynski, J. Nateri, K. Nicol, K. Greathouse, L. Hanson, M. Hall, Immunosuppressive effects of red blood cells on monocytes are related to both storage time and storage solution, *Transfusion* 52 (2012) 794–802. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03348.x>.
- [71] C.S. Cohn, Technical Manual (Aabb), American Association of Blood Banks, 2020.
- [72] Standards & Accreditation - Association for the Advancement of Blood & Biotherapies, [Www.Aabb.Org](http://www.aabb.org/standards-accreditation) (n.d.). <https://www.aabb.org/standards-accreditation> (accessed April 8, 2026).
- [73] A.B. Narvios, F.E. Alvarez, A. Glassman, B. Lichtiger, Assessing the efficiency of leukoreduction of cellular blood components. Use of a simplified formalin-fixation and batch-counting method, *Am J Clin Pathol* 107 (1997) 111–113. <https://doi.org/10.1093/ajcp/107.1.111>.
- [74] M.M. Loi, M. Kelher, M. Dzieciatkowska, K.C. Hansen, A. Banerjee, F.B. West, C. Stanley, M. Briel, C.C. Silliman, A comparison of different methods of red blood cell leukoreduction and additive solutions on the accumulation of neutrophil-priming activity during storage, *Transfusion* 58 (2018) 2003–2012. <https://doi.org/10.1111/trf.14788>.
- [75] R.R. Sharma, N. Marwaha, Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries, *Asian J Transfus Sci* 4 (2010) 3–8. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.59384>.

- [76] C.C. Silliman, M.R. Kelher, S.Y. Khan, M. LaSarre, F.B. West, K.J. Land, B. Mish, L. Ceriano, S. Sowemimo-Coker, Experimental prestorage filtration removes antibodies and decreases lipids in RBC supernatants mitigating TRALI in vivo, *Blood* 123 (2014) 3488–3495. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532424>.
- [77] W.Y. Bassuni, M.A. Blajchman, M.A. Al-Moshary, Why implement universal leukoreduction?, *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 1 (2008) 106–123. [https://doi.org/10.1016/s1658-3876\(08\)50042-2](https://doi.org/10.1016/s1658-3876(08)50042-2).
- [78] X. Fu, J.R. Felcyn, K. Odem-Davis, J.C. Zimring, Bioactive lipids accumulate in stored red blood cells despite leukoreduction: a targeted metabolomics study, *Transfusion* 56 (2016) 2560–2570. <https://doi.org/10.1111/trf.13748>.
- [79] O. Garraud, S. Tariket, C. Sut, A. Haddad, C. Aloui, T. Chakroun, S. Laradi, F. Cognasse, Transfusion as an Inflammation Hit: Knowns and Unknowns, *Front Immunol* 7 (2016) 534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00534>.
- [80] R. Larsen, N. Sandhu, N.H.H. Heegaard, H. Ullum, J.H. von Stemann, E. Sørensen, D.S. Nellemann, M.B. Hansen, Changes in circulating inflammatory markers following febrile non-haemolytic transfusion reactions to leucoreduced red cells, *Vox Sang* 113 (2018) 76–79. <https://doi.org/10.1111/vox.12607>.
- [81] J. Addams, T. Nester, Chapter 50 - Leukoreduction of Blood Products, in: B.H. Shaz, C.D. Hillyer, J. Schwartz, M.R. Gil (Eds.), *Transfusion Medicine and Hemostasis (Fourth Edition)*, Elsevier, 2025: pp. 233–235. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96014-4.00063-X>.
- [82] R. Shukla, T. Patel, S. Gupte, Release of cytokines in stored whole blood and red cell concentrate: Effect of leukoreduction, *Asian J Transfus Sci* 9 (2015) 145–149. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.162708>.
- [83] M.H. Antonelou, V.L. Tzounakas, A.D. Velentzas, K.E. Stamoulis, A.G. Kriebardis, I.S. Papassideri, Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome, *J Proteomics* 76 Spec No. (2012) 220–238. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.032>.
- [84] D. Madkaiker, S. Ojha, A. N, K. Chawan, Effects of pre-storage leukoreduction on erythrocyte concentrates and performance of newer generation leuko-filters at a tertiary care oncology hospital in Western India, *Afr J Lab Med* 14 (2025) 2723. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v14i1.2723>.
- [85] J.R. Richter, J.M. Sutton, P. Hexley, T.A. Johannigman, A.B. Lentsch, T.A. Pritts, Leukoreduction of packed red blood cells attenuates proinflammatory properties of storage-derived microvesicles, *J Surg Res* 223 (2018) 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.09.052>.
- [86] World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects, *Bull. World Health Organ.* 79 (2001) 373–374.
- [87] F. Orrico, M.N. Möller, A. Cassina, A. Denicola, L. Thomson, Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H₂O₂ consumption by red blood cells, *Free Radic Biol Med* 121 (2018) 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.006>.
- [88] C.C. Winterbourn, Oxidative reactions of hemoglobin, *Methods Enzymol* 186 (1990) 265–272. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86118-f](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86118-f).
- [89] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [90] J. Renart, J. Reiser, G.R. Stark, Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure., *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 3116–3120.

- [91] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
- [92] S.V. Costes, D. Daelemans, E.H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, S. Lockett, Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells, *Biophys J* 86 (2004) 3993–4003. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038422>.

Publicaciones

Orrico F, López AC, Saliweczyk D, Acosta C, Rodriguez-Grecco, 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* 298(1): 101503. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101503

Manuscrito en preparación

López AC; Acosta C; Silva N; Möller M; Thomson L. Procoagulant effect of microvesicles derived from stored red blood cells.

Presentamos resultados en eventos científicos:

López AC; Acosta C; Möller M; Thomson L. Estrés oxidativo en la membrana de GR almacenados para transfusión. Presentado en las XIV Jornadas de la SBBM. Montevideo, 2024.

López AC, Acosta C, Agostini C, Sánchez F, Rodríguez I, Möller MN, Thomson L. Oxidative Stress on the Membrane of Red Blood Cells Stored for Transfusion. Presentado en 30th Annual Conference of the Society for Redox Biology and Medicine 2023. Publicado en *Journal Free Radical Biology and Medicine* 208: S128-S129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.292>

Orrico F, López AC, Saliweczyk D, Acosta C, Rodriguez-Grecco, Mouro-Chanteloup I, Ostuni MA, Denicola A, Thomson L, Möller MN. Permeability of phospholipid membranes and human red blood cell membranes to hydrogen peroxide. Presentado en 29th Annual Conference of the Society for Redox Biology and Medicine 2022. Publicado en el *Journal Free Radical Biology and Medicine* 180: S65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.148>

Acosta C, Agostini C, Sánchez F, Rodríguez I y Thomson L, Cambios en los mediadores inflamatorios asociados a la leucorreducción de GR para transfusión. Poster jornadas PROINBIO. 2022.

Acosta C, Saliweczyk D, Rodriguez-Grecco, Denicola A, Thomson L, Möller MN. Leukoreduction of red blood cell concentrates for transfusion. 27th Annual Conference of the Society for Redox Biology and Medicine 2020. Publicado en *Journal of Free Radical Biology and Medicine* 159 (S1): 38. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.109>

Acosta C, Conferencia: “Cambios en los mediadores inflamatorios asociados a la leucorreducción de GR para transfusión”. Presentada en el Simposio Hemotherapy, from basic to bedside. Montevideo 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi tutora **Dra. Leonor Thomson** por haberme acompañado a lo largo de este camino. Su constante motivación, generosidad y solidez académica fueron pilares fundamentales en este proceso de formación e investigación.

Agradezco especialmente al **Prof. Dr. Ismael Rodríguez**, por su compromiso y participación activa en cada etapa de este trabajo. Su guía y disponibilidad permanente facilitaron enormemente mi aprendizaje y crecimiento profesional.

Mi reconocimiento también al **Dr. Matías Moller**, por estar siempre dispuesto a compartir sus conocimientos, debatir resultados y colaborar en la definición de estrategias.

Al equipo del **Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Clínicas**, en particular a los doctores **Cristian Agostini** y **Fernanda Sánchez**, por su apertura al intercambio de saberes y por hacer posible el procesamiento de muestras, brindando además un valioso aporte en la interpretación integral de los resultados.

Al **Dr. Bruno Musetti**, por su ayuda en el cultivo celular y en los análisis por microscopía.

Agradezco también a la **Mag. Ana Clara López**, por su acompañamiento durante el procesamiento de muestras y su orientación constante en el trabajo de laboratorio, así como en el tratamiento y análisis de los datos obtenidos.

Al **Mag. Nicolás Silva** y a la **Dra. Daniela Saliwonkzyk**, por su colaboración en la obtención de los productos desde el banco de sangre.

Finalmente, a mi familia, por su amor incondicional, por sostenerme y brindarme el apoyo necesario para transitar esta etapa de aprendizaje con entusiasmo y perseverancia.