

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Sub área Bioquímica.

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Envejecimiento de Glóbulos Rojos para transfusión.

Suplementación con N-acetil cisteína

Lic. Florencia Amen

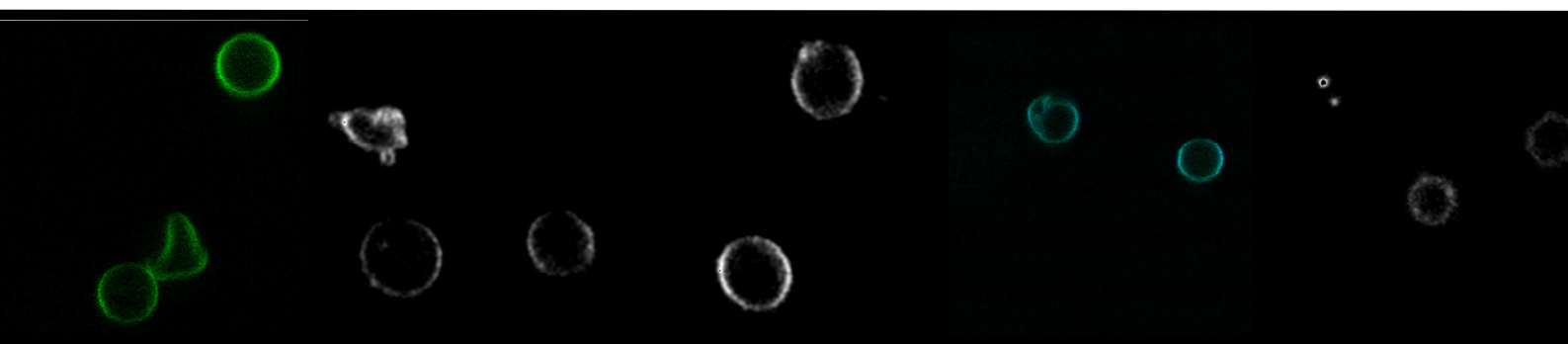
Directoras:

Dra Leonor Thomson

Dra Ana Denicola



Montevideo, Abril de 2016



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas - Subárea Bioquímica
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA – Biología

**Envejecimiento de Glóbulos Rojos para transfusión. Suplementación con
N-acetil cisteína**

Lic. Florencia Amen

Directoras de Tesis:

Dra. Ana Denicola, PhD

Dra. Leonor Thomson, PhD

Laboratorio de Fisiología Biológica y Enzimología, Instituto de Química Biológica,
Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Agradecimientos

Esta tesis fue llevada a cabo gracias a la colaboración de las siguientes agencias y programas: Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Comisión Académica de Posgrado (CAP), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y Facultad de Ciencias, Universidad de la República (F.Cien -UDELAR).

En primer lugar quisiera agradecer a mis tutoras Leo y Ana, por el apoyo en este proceso con sus idas y venidas. Especialmente les agradezco el apoyo que me han brindado en estos últimos meses que han sido de los más complicados, y todo el tiempo y dedicación que me han brindado a mí y a este proyecto. Sin ellas esta tesis no saldría a la luz.

En segundo lugar quiero agradecer a todos mis compañeros de los laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica, los que están, y los que estuvieron y luego tomaron otro camino. Gracias a todos por crear un lindo ambiente de trabajo y por el aporte continuo de nuevas ideas. Todos aportaron su granito de arena y me ayudaron de una u otra forma en este proceso.

En la última etapa de la tesis obtuve especial ayuda de Leonel Malacrida, que me ayudó con la técnica de Microscopía de Fluorescencia, y de Matías Moller quien me ayudó con el aislamiento de proteínas glutationiladas, a ambos les quiero agradecer por tomarse un tiempo para enseñarme.

Finalmente me gustaría agradecer a mi familia por apoyarme en mi formación y motivarme a seguir creciendo, y por estar siempre presentes en los momentos de frustración.

A todas las personas que me acompañaron en este proceso les digo ¡GRACIAS!

Contenido

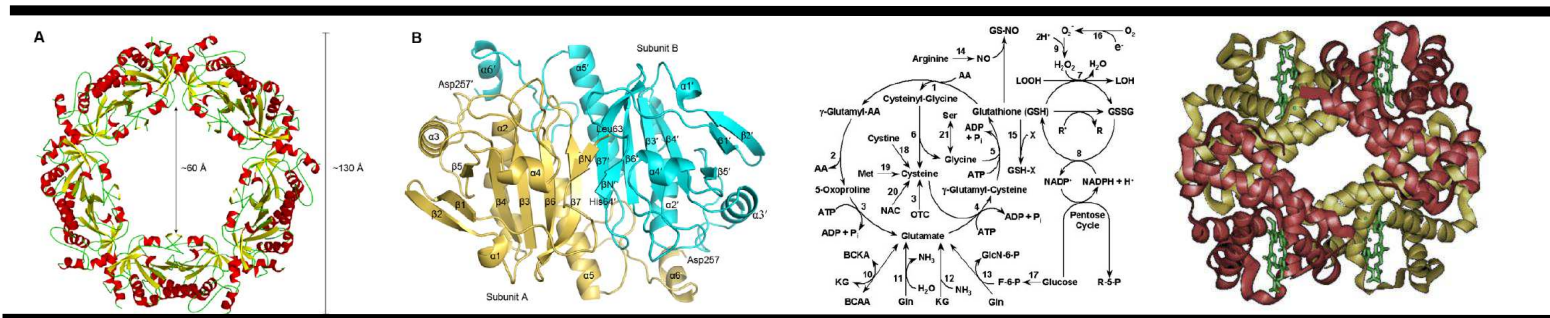
Introducción	6
Generalidades de los Glóbulos Rojos.....	7
Formación de los eritrocitos.....	7
Estructura de los eritrocitos	9
Péptidos y Proteínas principales de los GR	9
Hemoglobina.....	9
Banda 3	10
Interacción de la Hb con la membrana celular	13
Obtención de Energía.....	14
GR y óxido nítrico – Regulación vascular.....	15
Especies reactivas y estrés oxidativo en los eritrocitos	17
Estrés oxidativo en los GR	17
Formación de EROS y ERN por reacciones redox de la Hb.....	19
NADPH oxidasa en GR	21
Antioxidantes en los GR	21
Sistemas antioxidantes en los GR	21
Glutación.....	21
Ácido ascórbico	25
Superóxido dismutasa	27
Catalasa	29
Glutación peroxidasa	31
Glutarredoxina	32
Peroxirredoxinas	34
Envejecimiento y remoción de GR.....	41
GR y envejecimiento celular	41
Remoción de los GR de la circulación	42
Eriptosis	43
GR en almacenamiento para transfusión.....	45
Requerimientos para la transfusión.....	46
Cambios durante el almacenamiento	47
Vesiculación	51
Propuestas para mejorar la calidad del almacenamiento	52
Suplementación con antioxidantes.....	53
Hipótesis y Objetivos.....	54

Hipótesis	55
Objetivo General	55
Objetivos específicos	55
Materiales y Métodos	56
Reactivos y materiales.....	57
Obtención de muestras	57
Procesamiento de las muestras.....	57
Cuantificación celular	57
Obtención de fracción citosólica de bajo peso molecular	58
Medidas de concentración de hemoglobina.....	58
Evaluación de la concentración de tioles intraeritrocitarios de bajo peso molecular	58
Electroforesis 1D.....	60
Electroforesis diagonales.....	60
Western Blot.....	60
Aislamiento de proteínas glutationiladas.....	61
Consumo de H ₂ O ₂	62
Microscopía confocal	63
Análisis estadístico de los datos	63
Resultados	64
Cambios citosólicos en los GR	65
Ingreso de NAC a los GR	65
Estado redox de la hemoglobina citosólica durante el almacenamiento con y sin NAC.....	66
Cambios en la concentración de GSH con el almacenamiento	66
Glutationilación de proteínas eritrocitarias	68
Aislamiento de proteínas glutationiladas.....	69
Cambios en el estado redox de Prx-2.....	71
Consumo de H ₂ O ₂ por los GR.....	73
Estudios de integridad de la membrana	74
Estudio de la membrana empleando LAURDAN y microscopía confocal	76
Conclusiones.....	78
Referencias	80

Índice de abreviaturas

GR - Glóbulos Rojos
PHSC - célula precursora hematopoyética pluripotencial
Hb - Hemoglobina
EROS - especies reactivas del oxígeno
Cdb3 - dominio citoplasmático de la banda 3
GAPDH - Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
 $\cdot\text{NO}$ - óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico sintasa
 H_2O_2 - peróxido de hidrógeno
SOD - Superóxido dismutasa
ERN - especies reactivas del nitrógeno
 ONOO^- - peroxinitrito
GSH - Glutación en su forma reducida
GSSG - Glutación en su forma oxidada
G6PDH - Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GCS - Glutamil cisteína sintetasa
ATP - adenosina trifosfato
 $\text{Asc}^{\cdot-}$ - radical ascorbato
DHA - ácido dehidroascórbico
Cat – Catalasa
GPx - Glutación peroxidasa
Grx – Glutarredoxina
Prx – Peroxirredoxinas
GST - Glutation S-transferasa
NEM - N-etilmaleimida
AT - 3-Amino-1, 2, 4-triazol
HRP - Peroxidasa de rábano

1. Introducción



1. Generalidades de los Glóbulos Rojos

1.1. Formación de los eritrocitos

Los primeros glóbulos rojos (GR) son producidos en las primeras semanas de vida embrionaria, en el saco vitelino. Durante el segundo trimestre de gestación, el hígado es el principal órgano productor de eritrocitos, pero también se produce un número razonable en el bazo y en los ganglios linfáticos (Hall 2011). Finalmente, durante el último mes de gestación y tras el nacimiento, los eritrocitos se producen exclusivamente en la médula ósea. Las células sanguíneas comienzan su vida en la médula ósea a partir de un solo tipo de célula llamado célula precursora hematopoyética multipotente, de la cual derivan todas las células de la sangre. La Figura 1 muestra las sucesivas divisiones de las células multipotentes para formar las diferentes células sanguíneas. A medida que se reproducen estas células, una pequeña parte de ellas permanece exactamente igual que las células pluripotenciales originales y se queda en la médula ósea para mantener el aporte, aunque su número disminuye con la edad. Pero la mayoría de las células reproducidas se diferencian hasta formar los otros tipos celulares mostrados en la Figura 1. Las células en un estadio intermedio son muy parecidas a las células precursoras multipotentes, aunque ya estén comprometidas en una línea celular en particular y reciben el nombre de células precursoras comprometidas (Hall 2011).

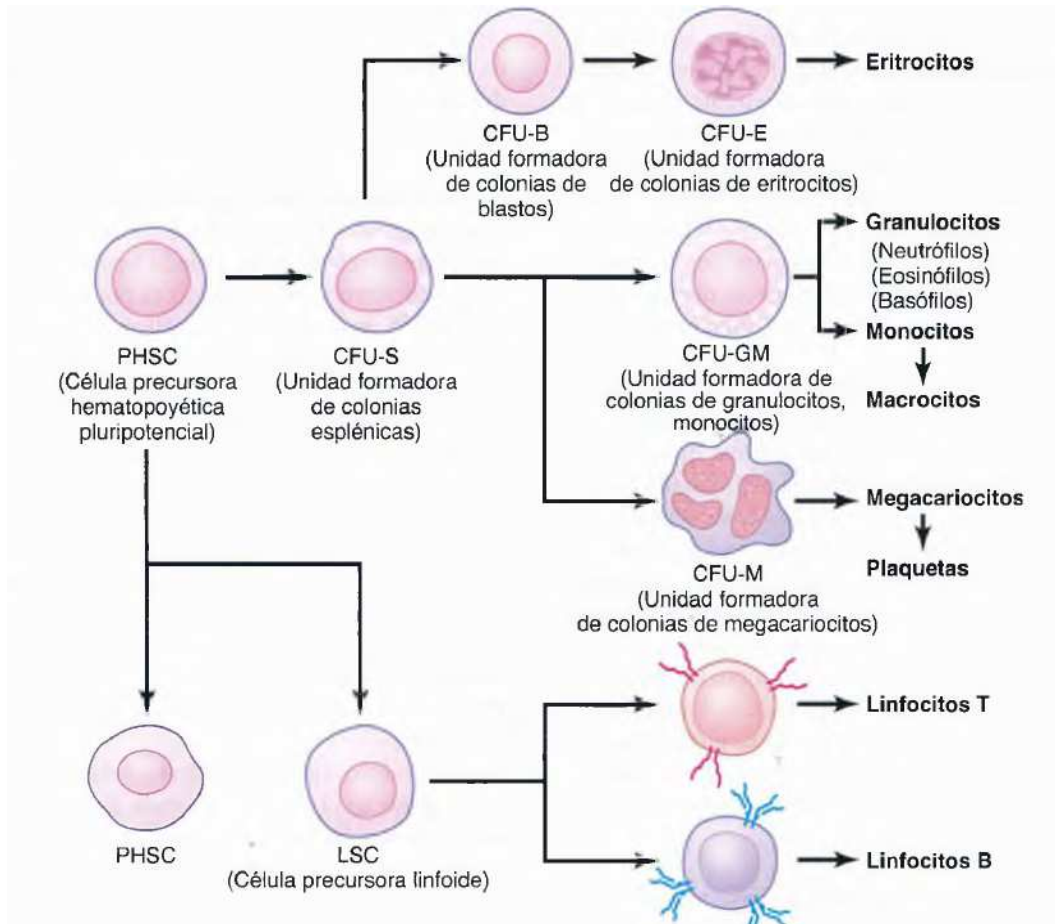


Figura 1. Formación de células sanguíneas. Formación de células sanguíneas a partir de la célula precursora hematopoyética multipotencial (PHSC) en la médula ósea. Imagen obtenida de (Hall 2011).

La primera célula que se compromete con la formación de GR es llamada BFU-E, la misma se diferencia posteriormente en proeritoblasto y en reticulocitos. En este proceso de diferenciación el núcleo es degenerado y extruido (Korell, Coulter et al. 2011). Los reticulocitos resultantes contienen algunas mitocondrias, ribosomas y ARN ribosomal, necesario para la síntesis proteica. Estos migran a la circulación y se diferencian en GR maduros perdiendo los organelos restantes (Korell, Coulter et al. 2011). Se ha estimado que el 20 – 30% de la Hemoglobina (Hb) total se sintetiza en los reticulocitos (Hall 2011). La vida media de estas células es de 30 horas antes de transformarse en GR maduros, los cuales han eliminado completamente la mitocondria, retículo endoplásmico y ribosoma (Rifkind and Nagababu 2013).

La producción de los GR es regulada por retroalimentación negativa, donde los niveles de oxígeno determinan los niveles plasmáticos de eritropoyetina, una glicoproteína con una masa molecular de 34 kDa, y el principal factor de crecimiento responsable de la regulación de la eritropoyesis (Ji, Murata-Hori et al. 2011). La eritropoyesis terminal se da en un microambiente especializado llamado islas eritroblásticas (Bessis 1958), donde los macrófagos participan activamente en el desarrollo de los GR aportando hierro para la síntesis del hemo y fagocitando el núcleo que es expulsado durante la diferenciación de los eritrocitos (Bessis and Breton-Gorius 1962). En individuos sanos

los GR exceden el número de 4×10^{12} por litro de sangre en circulación (Foller, Huber et al. 2008, Lang, Gulbins et al. 2008, Lang, Qadri et al. 2012), encontrándose entre las células más abundantes del cuerpo humano (Kiefer and Snyder 2000, Arese, Turrini et al. 2005, Bosman, Willekens et al. 2005). La vida media de los GR es de 100 a 120 días (Foller, Huber et al. 2008, Lang, Gulbins et al. 2008, Lang, Qadri et al. 2012), y existen estudios que demuestran que la sobrevivencia de los GR tiene una variación entre individuos de aproximadamente 15% (Cohen, Franco et al. 2008). Debido a esto en un individuo con 5L de sangre más de 10^{11} GR son formados y el mismo número es removido de la circulación diariamente (Foller, Huber et al. 2008, Lang, Gulbins et al. 2008, Lang, Qadri et al. 2012).

1.2. Estructura de los eritrocitos

Los GR maduros son células anucleadas y sin organelos. La membrana plasmática de los GR consiste en una bicapa lipídica con fosfolípidos y colesterol, con proteínas glicosiladas y lípidos glicosilados en la superficie exterior. La superficie interior contiene proteínas transmembrana, unidas a un citoesqueleto que consta de una red elástica de proteínas, lo que permite al GR deformarse y fluir a través de los capilares estrechos de la microcirculación para cumplir así su función, suministrando oxígeno a los tejidos. La membrana también contiene canales proteicos para la absorción y liberación de iones y compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular necesarios para mantener la homeostasis iónica.

Los GR están diseñados especialmente para llevar oxígeno a los tejidos, para ello cuentan con una alta concentración de Hb celular, la cual se une al oxígeno de forma reversible. Tanto la forma bicóncava como la elasticidad son necesarias para que la célula se deforme en capilares estrechos y pueda acceder a los tejidos.

Los GR cuentan además con un amplio sistema antioxidante diseñado para eliminar las especies reactivas del oxígeno (EROS) generadas por la exposición constante a niveles variables de oxígeno.

1.3. Péptidos y Proteínas principales de los GR

Los avances en los estudios de proteómica producen un rápido aumento en la cantidad de proteínas que se sabe se pueden encontrar en el interior de un GR. Al momento se conocen 2289 proteínas en el GR. A continuación se hará una breve descripción de las más relevantes para este trabajo (D'Alessandro, Righetti et al. 2010, Goodman, Daescu et al. 2013).

1.4. Hemoglobina

La síntesis de Hb comienza en los proeritroblastos y continúa incluso en el estadio de reticulocitos. Luego, cuando los reticulocitos dejan la médula ósea y pasan al torrente sanguíneo, continúan formando mínimas cantidades de Hb hasta que se convierten en un eritrocito maduro (Hall 2011).

En primer lugar, la succinil CoA, formada en el ciclo de Krebs, se une a la glicina para formar una molécula de pirrol. A su vez, cuatro pirroles se combinan para formar la protoporfirina IX, que se asocia con hierro para formar la molécula de hemo. Finalmente, cada molécula de hemo se combina con una cadena polipeptídica larga, una globina sintetizada por los ribosomas, formando una cadena de Hb. Cada cadena tiene una masa molecular de 16 kDa; cuatro de ellas se unen a su vez mediante enlaces débiles para formar la molécula de Hb completa (Hall 2011) (Figura 2)

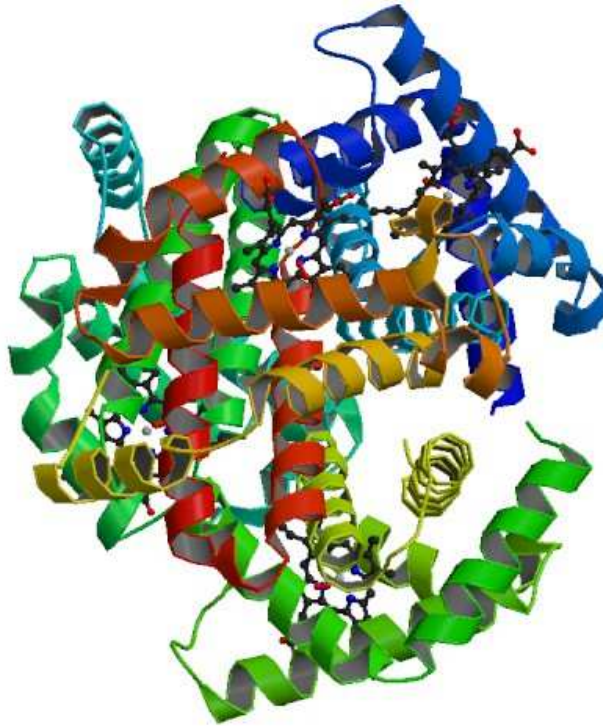


Figura 2. Molécula de hemoglobina. Hb con 4 oxígenos unidos, uno a cada subunidad. Imagen obtenida de Protein Data Bank (código 1GZX), con referencia (Paoli, Liddington et al. 1996)

Hay variaciones ligeras en las diferentes subunidades de cadenas de Hb, dependiendo de la composición en aminoácidos de la porción polipeptídica. Los diferentes tipos de cadenas se denominan cadenas alfa, cadenas beta, cadenas gamma y cadenas delta. La forma más común de Hb en el ser humano adulto, la Hb A, es un tetrámero, combinación de dos cadenas alfa y dos cadenas beta con un peso molecular de 64.458 Da (Hall 2011).

Debido a que cada cadena de Hb tiene un grupo prostético hemo que contiene un átomo de hierro, y debido a que hay cuatro cadenas de globina en cada molécula de Hb, encontramos cuatro átomos de hierro en cada molécula de Hb; cada uno de ellos se une mediante enlaces débiles a una molécula de oxígeno, lo que supone un total de cuatro moléculas de oxígeno que puede transportar cada molécula de Hb. La unión de oxígeno al hemo de la Hb está finamente regulada por varios factores, desde la concentración misma de oxígeno, el estado de oxidación del hemo, el pH, la concentración de 2,3-difosfoglicerato, entre otros. Incluso la unión del ligando al hemo acarrea un cambio conformacional de estructura cuaternaria, del estado T (por “tenso”) en la desoxiHb al estado R (por “relajado”) en la oxiHb.

1.5. Banda 3

La membrana de los GR se asienta sobre un esqueleto de espectrina y actina, conectado a intervalos regulares con las proteínas integrales de membrana, banda 3 y glicoporina C, mediante las proteínas de unión ankirina y banda 4.1 (Zhang, Kiyatkin et al. 2000) (Figura 3).

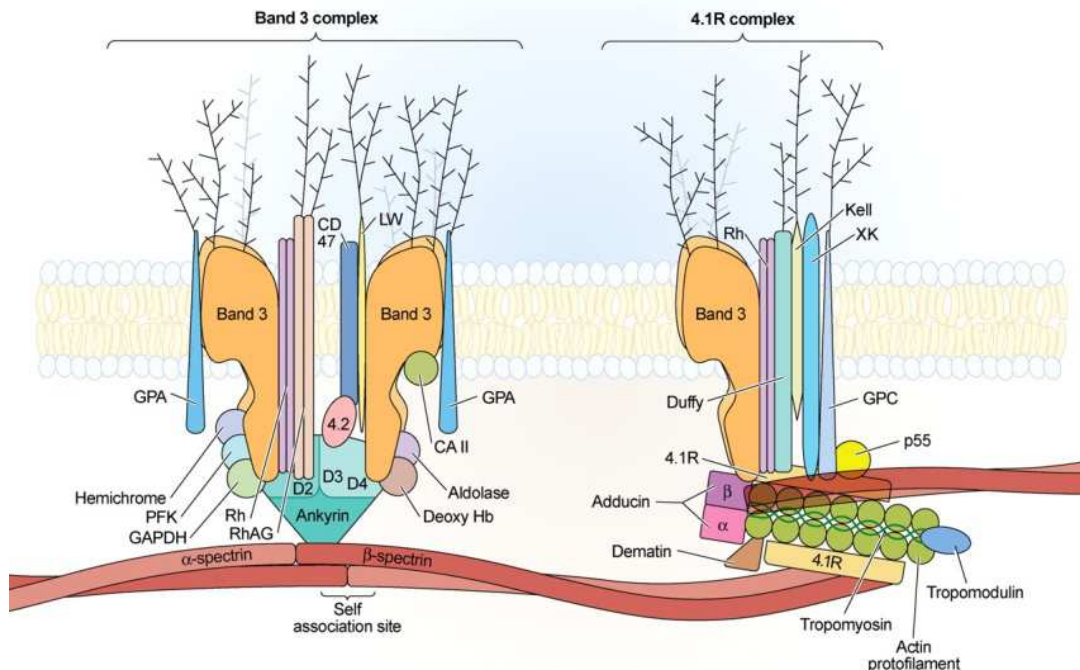


Figura 3. Complejos multiproteicos en la membrana del GR. Izquierda: la banda 3 tetramérica se une a anquirina, la cual a su vez se une a espectrina. La proteína citoesquelética de membrana 4.2 tiene sitios de unión para banda 3 y para anquirina. Además las glicoproteínas transmembrana GPA, Rh y RhAG se unen a la banda 3 y CD47 y se asocian con Rh/RhAG. Los 2 dominios citoplasmáticos de la banda 3 contienen sitios de unión para proteínas solubles, el dominio C-terminal para CA II y el N-terminal para desoxihemoglobina, para la enzima glicolítica aldolasa, la fosfofructoquinasa y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Derecha: complejo proteico en la unión citoesquelética. La unión contiene la estructura terciaria del complejo espectrina, F-actina, y 4.1R, así como las proteínas de unión a actina tropomiosina, tropomodulina, aducina y dematina. 4.1R entra en una interacción adicional con la proteína transmembrana GPC y p55 y también se une a la banda 3 en la forma de un dímero, el cual también lleva GPA. Rh, Kell y XK también tienen sitios de unión en 4.1R. Sin embargo, la cantidad de proteínas transmembrana (excepto GPA y GPC) es baja como para estar presentes en todos los complejos. Imagen obtenida de (Salomao, Zhang et al. 2008)

La banda 3, también llamada intercambiador aniónico (AE1) es la proteína transmembrana dominante en los GR, comprendiendo el 25% del total de proteínas de membrana (Zhang, Kiyatkin et al. 2000). Es miembro de la familia de intercambiadores aniónicos SLC4, y cumple varias funciones fundamentales como ser facilitar el transporte de CO_2 mediante el intercambio de Cl^- y HCO_3^- (Alper 2006). También participa en la comunicación entre el citoesqueleto y la membrana, responsable de mantener la forma celular, e interactúa con proteínas citosólicas vía la región amino terminal, la cual sobresale en el citosol (Figura 3). Esta región de la banda 3 asocia de forma competitiva a la Hb y a enzimas glicolíticas (Mohandas and Gallagher 2008). La banda 3 puede ser cortada en 2 dominios estructurales independientes que retienen las características funcionales que tenían en la proteína intacta. El dominio transmembrana de 55 kDa, el cual atraviesa 12 veces la membrana, cataliza el

intercambio de aniones a través de la membrana (principalmente Cl^- por HCO_3^-) durante el transporte de gases en sangre (Zhang, Kiyatkin et al. 2000). El dominio transmembrana también puede mediar la remoción de GR senescentes de la circulación (King, Garcon et al. 2015). El dominio citoplasmático de la banda 3 (cdb3) funciona primariamente como un sitio de anclaje para otras proteínas asociadas a membrana. Incluidas entre ellas la ankirina (Bennett and Stenbuck 1980), banda 4.2 (Cohen, Dotimas et al. 1993, Rybicki, Schwartz et al. 1996), banda 4.1 (Deliconstantinos, Villiotou et al. 1995, An, Takakuwa et al. 1996), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Rogalski, Steck et al. 1989), fosfofructoquinasa (Jenkins, Madden et al. 1984), aldolasa (Murthy, Liu et al. 1981), Hb (Walder, Chatterjee et al. 1984, Salhany and Cassoly 1989), hemicromos (Waugh and Low 1985) y la proteína tirosina quinasa (p72syk) (Harrison, Isaacson et al. 1994). Cada una de estas interacciones de la banda 3 tiene consecuencias para la estructura y la función de la célula, como control de la flexibilidad y la forma (Low, Willardson et al. 1991), regulación del metabolismo de glucosa (Low, Rathinavelu et al. 1993), transporte iónico (Malik, Sami et al. 1993) y vida celular (Kannan, Yuan et al. 1991). Cambios en la banda 3 se han visto asociados al envejecimiento de los GR, incluyendo la externalización de antígenos específicos de senescencia que se unen a IgG, activando así la eliminación de los GR (Kay 1993, Lutz 2004, Kay 2005). La unión de IgG también se ha asociado a los agrupamientos de banda 3, que se activa por la unión de la Hb oxidada (hemicromos) a la banda 3 (Low, Waugh et al. 1985, Rettig, Low et al. 1999, Ferru, Giger et al. 2011).

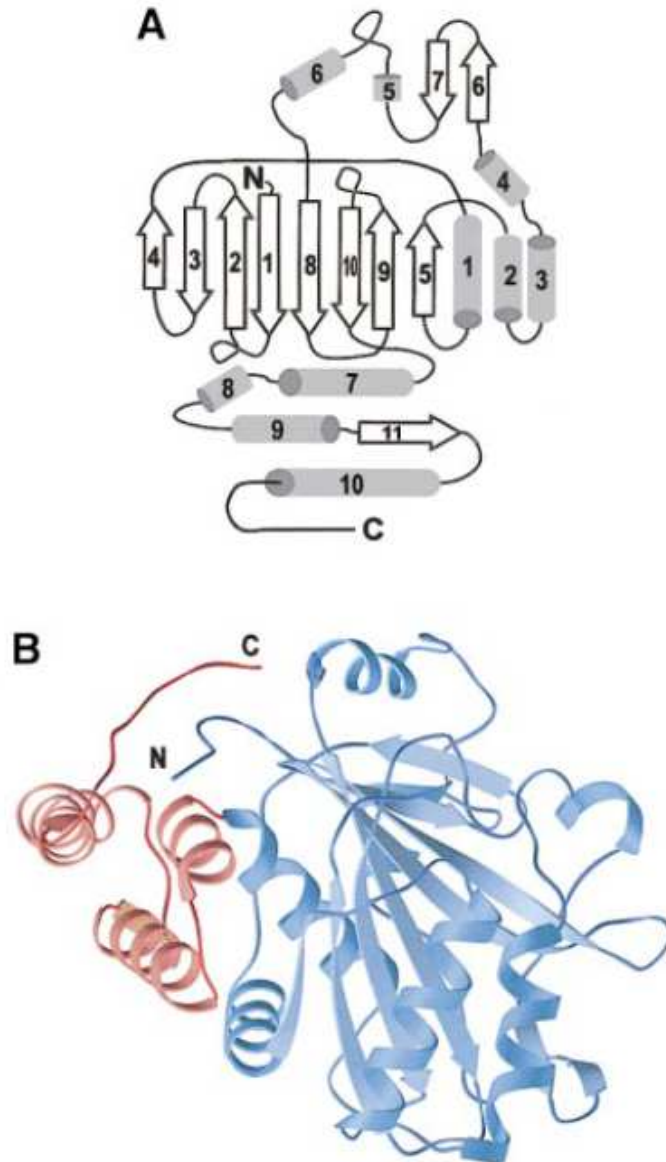


Figura 4. Banda 3. Estructura cristalina del dominio citoplasmático de la Banda 3 de GR humanos (A) diagrama de la estructura secundaria de cdb3 (B) diagrama en cinta de un monómero de cdb3, donde azul corresponde al dominio de unión periférico y rojo al brazo de dimerización (Zhang, Kiyatkin et al. 2000).

1.6. Interacción de la Hb con la membrana celular

La Hb, así como un número de enzimas glicolíticas, se une a la porción amino terminal de la banda 3, la cual sobresale en la región citosólica de la membrana. La oxihemoglobina tiene una afinidad relativamente baja por la banda 3, mientras que desoxihemoglobina tiene una mayor afinidad por la misma (Chu, Breite et al. 2008). Datos recientes sugieren que la Hb parcialmente oxigenada, que es la forma dominante de Hb en la microcirculación, puede tener una mayor afinidad por la banda 3 que la desoxihemoglobina (Cao, Bell et al. 2009). Esto puede deberse a la mayor flexibilidad en la interface entre las subunidades de Hb, donde ocurre la unión a la banda 3. A pesar de que la banda 3 representa una fracción importante de las proteínas de la membrana de GR, el número total de sitios de banda de 3 ($1,2 \times 10^6$ /cel)

corresponde a menos del 1% de las moléculas de Hb ($\sim 2,4 \times 10^8$ moléculas/cel) y la mayoría de las reacciones redox que involucran Hb ocurren en el citosol. Sin embargo, debido a que las enzimas antioxidantes son predominantemente citosólicas, las especies reactivas que no son neutralizadas por las enzimas antioxidantes son producidas predominantemente por las reacciones redox de la Hb que está unida a la membrana (Demehin, Abugo et al. 2002, Nagababu, Mohanty et al. 2010, Rifkind and Nagababu 2013).

La oxigenación parcial de la Hb no sólo aumenta la afinidad por la membrana de los GR, sino que también aumenta dramáticamente la auto oxidación de la Hb (Abugo and Rifkind 1994). Este aumento en la auto oxidación ha sido atribuido a un aumento en la interface $\alpha 1\beta 1$ que altera el bolsillo de hemo distal de las cadenas oxigenadas, aumentando la probabilidad de un desplazamiento de la histidina distal que podría actuar como nucleófilo, desestabilizando la unión hierro-oxígeno y facilitando la liberación de este último como superóxido (Balagopalakrishna, Manoharan et al. 1996). Este superóxido puede atacar directamente a la banda 3 de los GR y/o escaparse de los GR a través del canal de aniones. Una vez afuera de la célula va a dismutar a H_2O_2 (Kiefmann, Rifkind et al. 2008). Debido a la afinidad aumentada de la Hb parcialmente oxigenada por la membrana, la hipoxia no sólo aumenta la producción de EROS, sino que también complica la defensa celular por las enzimas antioxidantes. Esto es confirmado por los elevados niveles de estrés oxidativo observados en los GR de ratones anémicos, los cuales generalmente experimentan mayor hipoxia que los GR de ratones sanos (Nagababu, Gulyani et al. 2008).

Por su parte, la actividad nitrito reductasa de la desoxiHb requiere cadenas no ligadas y es favorecida por la conformación cuaternaria R. Esta reacción es por lo tanto más eficiente para la Hb parcialmente oxigenada. Además de la unión reversible a la banda 3 asociada con la oxigenación de la Hb, se ha demostrado que la Hb oxidada y particularmente los hemicromos, formados por la desnaturalización de la Hb, tienen una mayor afinidad por la membrana del GR, produciendo entrecruzamientos irreversibles que involucran la banda 3 (Low, Waugh et al. 1985, Rettig, Low et al. 1999) y la espectrina (Kiefer and Snyder 2000). La formación de la Hb desnaturalizada unida a la membrana no aumenta linealmente a medida que las células envejecen, sino que se forma en las células más envejecidas y deshidratadas. La interacción de la banda 3 con los hemicromos, a diferencia de la interacción con la desoxiHb, involucra una estequiometría 2,5:1 (Hb a banda 3). Esta unión también se cree que rompe las interacciones de la banda 3 con la ankirina, debilitando la unión de la banda 3 al citoesqueleto y activando la formación de aductos de banda 3. Se ha visto que los aductos de banda 3 promueven la unión de IgG a la banda 3, la cual contribuye a la fagocitosis de los GR por los macrófagos (Ferru, Giger et al. 2011).

1.7. Obtención de Energía

Durante su vida intravascular los GR requieren energía para mantener sus funciones vitales, pero debido a la falta de núcleo y mitocondria, la misma no puede ser obtenida mediante el ciclo de Krebs. Por esto los GR dependen de la conversión anaeróbica de glucosa mediante la vía de Embden-Meyerhof para la generación y almacenamiento de fosfatos de alto valor energético (Figura 5). Por otro lado los GR tienen una capacidad única de producción de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DFG) por la derivación de Rapoport Luerbering. Esta derivación omite el paso de la fosfoglicerato quinasa, y es responsable

de la síntesis y regulación de niveles de 2,3-DPG (van Wijk and van Solinge 2005).

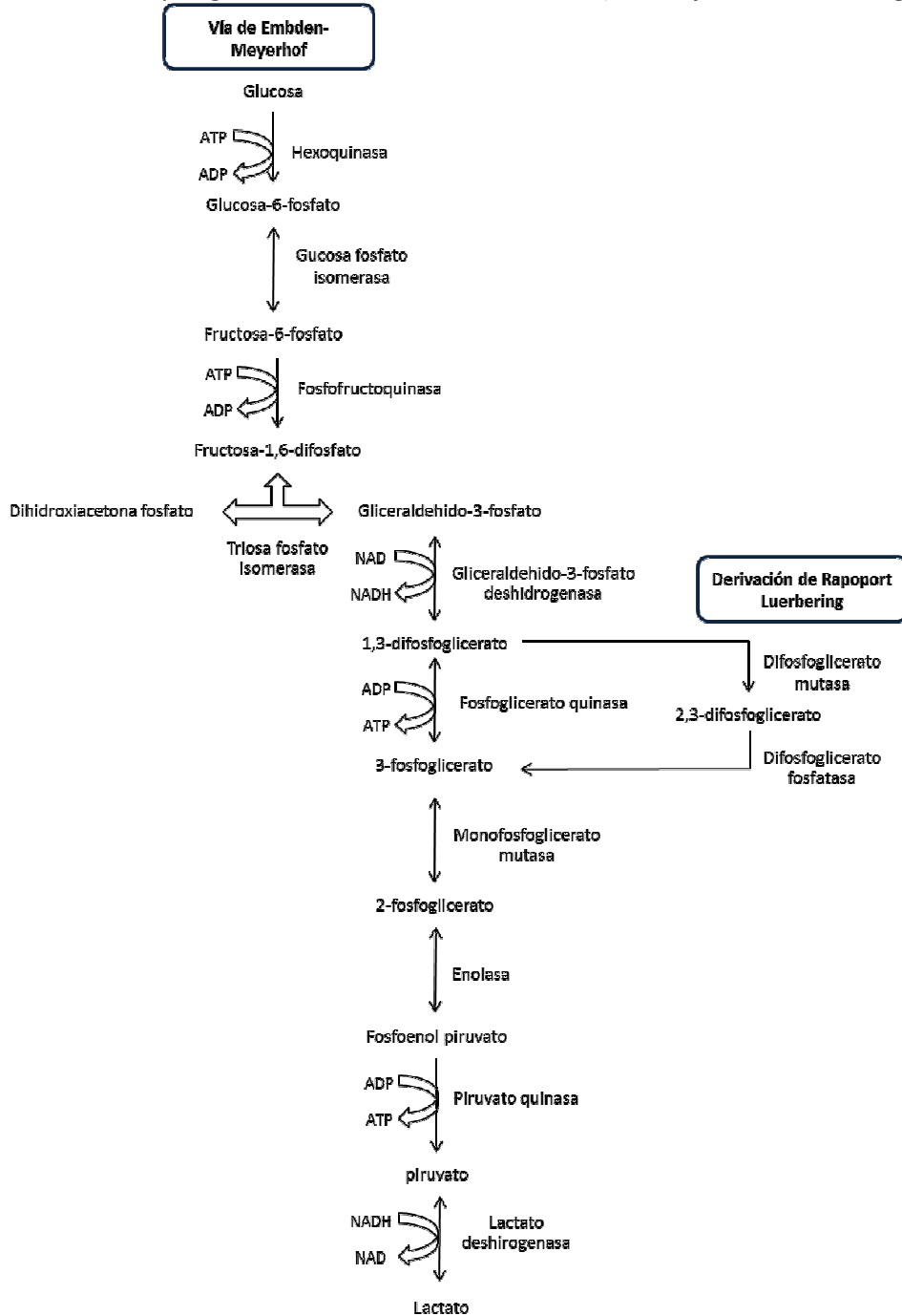


Figura 5. Vía de Embden-Meyerhof. Se observa un esquema de la vía de Embden-Meyerhof con la derivación de Rapoport Luerbering.

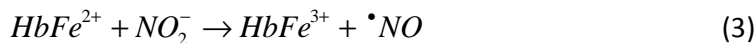
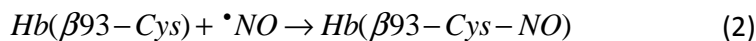
1.8. GR y óxido nítrico – Regulación vascular

El óxido nítrico (*NO) es un producto de señalización y regulación del endotelio que tiene una vida corta y es de importancia crítica para la salud vascular (Cortese-Krott and Kelm 2014). La primera actividad biológica atribuida al *NO fue la habilidad de inducir la relajación de las preparaciones vasculares aórticas, y debido a que se

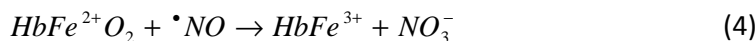
desconocía su naturaleza química se le llamó "factor de relajación derivado del endotelio"(Furchgott and Zawadzki 1980, Palmer, Ferrige et al. 1987).

En la actualidad se sabe que el $\cdot\text{NO}$ es un radical libre que se forma endógenamente por la enzima NOS (óxido nítrico sintasa, EC 1.14.13.39) y tiene un rol fundamental en el control del flujo sanguíneo vascular (Vallance, Collier et al. 1989), como señalizador en el sistema cardiovascular (Moncada 1997), es crítico en la neurotransmisión (Bredt and Snyder 1994) y en los procesos de defensa e inflamatorios (Nathan 2002).

Las NOS son proteínas que contienen hemo y catalizan la oxidación de la L-arginina a citrulina. En mamíferos existen tres isoformas distintas de esta enzima, codificadas por tres genes diferentes. En humanos los loci se conocen como NOS1 (gen 8442) que codifica para la neuronal (nNOS); NOS2 (gen 8443) para la inducible (iNOS); y NOS3 (gen 4846) para la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). La iNOS participa principalmente en mecanismos de defensa desencadenados por microorganismos y en el estrés celular, produciendo altos niveles de $\cdot\text{NO}$. Por su parte, las isoformas nNOS y eNOS se expresan constitutivamente y producen menores cantidades de $\cdot\text{NO}$, siendo importantes en la regulación de las condiciones basales, como señalización neuronal, inhibición del sistema hemostático, vasodilatación y regulación de la presión sanguínea (Stuehr 2004, Cortese-Krott and Kelm 2014). Recientemente, en los GR se encontró la presencia de eNOS funcional (Kleinbongard, Schulz et al. 2006, Cortese-Krott, Rodriguez-Mateos et al. 2012). Particularmente bajo condiciones de hipoxia, se ha demostrado que los GR inducen vaso relajación dependiente de $\cdot\text{NO}$ (Cosby, Partovi et al. 2003, Crawford, Isbell et al. 2006, Webb, Milsom et al. 2008). Los mecanismos de liberación y las posibles fuentes de $\cdot\text{NO}$ en los GR están aún en debate, pero entre los candidatos se encuentran el complejo hierro-nitrosilo-hemoglobina (Herold 2004) cuya formación se produciría bajo condiciones de bajo oxígeno (Ec. 1), S-nitroso Hb (Jia, Bonaventura et al. 1996, Gladwin, Lancaster et al. 2003, Rassaf, Bryan et al. 2003) (Ec. 2) y nitrito (Dejam, Hunter et al. 2005, Vitturi, Teng et al. 2009). Este último puede formar $\cdot\text{NO}$ vía desoxiHb (Cosby, Partovi et al. 2003, Nagababu, Ramasamy et al. 2003) (Ec. 3).



La Hb tendría un verdadero rol regulador de la biodisponibilidad del $\cdot\text{NO}$, dado que en condiciones de alta concentración de oxígeno, cuando la Hb se encuentra fundamentalmente oxigenada reacciona con $\cdot\text{NO}$ ($1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) generando nitrato (Ec. 4) (Crawford, Isbell et al. 2006).



Existen dudas sobre la función de la NOS en los GR, debido a que estas células contienen altas concentraciones de oxihemoglobina, correspondiendo a una

concentración de hemo de 20 mM (Helms and Kim-Shapiro 2013). La oxihemoglobina es altamente eficiente en la remoción de $\cdot\text{NO}$ ($k = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$) (Schopfer, Mondal et al. 2009), por lo que la intuición indicaría que el $\cdot\text{NO}$ producido por la eNOS en el GR, sería rápidamente convertido en nitrato por la oxihemoglobina. De acuerdo a esta lógica, la eNOS de los GR debería tener una significancia fisiológica muy limitada, sin embargo la actividad de NOS ha sido medida en GR en condiciones de normoxia, midiendo la formación de $\cdot\text{NO}$ y metabolitos derivados de $\cdot\text{NO}$ (nitrito y nitrato) en el sobrenadante de GR (Deliconstantinos, Villiotou et al. 1995, Kleinbongard, Schulz et al. 2006, Mihov, Vogel et al. 2009, Yang, Gonon et al. 2013) y midiendo la conversión de L- ^3H arginina a L- ^3H citrulina en presencia de cofactores (NADPH, THB, Ca^{2+} , calmodulina) (Chen and Mehta 1998). La adición de inhibidores de NOS disminuyó la acumulación de metabolitos de $\cdot\text{NO}$ (Deliconstantinos, Villiotou et al. 1995, Kleinbongard, Schulz et al. 2006, Mihov, Vogel et al. 2009) y la producción de citrulina (Yang, Nichols et al. 1996). Cuando se aumentó la concentración de arginina, ésta causó inhibición de la arginasa, aumentando la liberación de nitrato (Yang, Gonon et al. 2013).

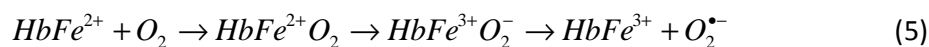
2. Especies reactivas y estrés oxidativo en los eritrocitos

2.1. Estrés oxidativo en los GR

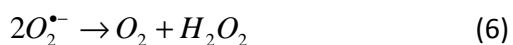
La generación y neutralización de radicales libres es un proceso fisiológico. Si los mismos son eliminados por el sistema antioxidante celular, no se sienten sus efectos deletéreos, sin embargo, cuando se da un desbalance en favor de las especies oxidantes resulta en estrés oxidativo.

Existe una amplia gama de procesos oxidativos que dañan los GR en la medida que estos envejecen. Sin embargo, el rol relativo de cada uno de estos procesos en el envejecimiento de los GR y en la remoción de los mismos de la circulación no es claro. Existe un rol significativo del estrés oxidativo al determinar el envejecimiento de los GR. Ejemplos de la contribución del estrés oxidativo a estos procesos incluye: (i) homeostasis de calcio distorsionada, que se ha atribuido al estrés oxidativo (Lang, Durantou et al. 2003, Antonelou, Kriebardis et al. 2010); (ii) la activación de la caspasa-3 ha sido también atribuida al estrés oxidativo (Kay 1993, Suzuki, Ohkubo et al. 2007); (iii) así como la exposición de los neo-antígenos en la banda 3 y la formación de agrupamientos (clusters) de banda 3 se desencadena por estrés oxidativo (Low, Waugh et al. 1985, Kay 1993). El factor predominante que determina el estrés oxidativo en los GR es la Hb. Los radicales libres producidos en las reacciones de la Hb y en las interacciones de la Hb con la membrana y el citoesqueleto producen EROS y están implicados en el envejecimiento de los GR.

El transporte de oxígeno por los GR involucra la unión reversible de oxígeno a la Hb tetramérica, cuya concentración en la célula es aproximadamente 5 mM. La oxigenación reversible requiere que el hierro del hemo esté en la forma reducida Fe(II). Sin embargo, el Fe(II) se oxida fácilmente a Fe(III). Aunque la oxidación del Fe(II) es más lenta cuando el hierro está incorporado en una proteína, el Fe(II) de la Hb también experimenta oxidación de forma continua, aunque a un ritmo mucho más lento. Esta reacción redox involucra al oxígeno unido a la Hb, que se reduce por un electrón produciendo superóxido (Ec. 5).



Aunque esta reacción es lenta en condiciones de normoxia ($K = 0,115 \text{ h}^{-1}$) (Nagababu, Ramasamy et al. 2002), la misma se ve aumentada dramáticamente en condiciones de hipoxia (Abugo and Rifkind 1994). La alta concentración de Hb genera concentraciones apreciables de superóxido, especialmente en las condiciones de hipoxia de la microcirculación (Rifkind, Zhang et al. 1991, Abugo and Rifkind 1994, Rifkind and Abugo 1994, Balagopalakrishna, Manoharan et al. 1996, Ajmani, Fleg et al. 2003, Kiefmann, Rifkind et al. 2008, Rifkind, Salgado et al. 2012). El superóxido dismuta para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un proceso que ocurre de forma espontánea con una velocidad de $3,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y aún más rápido en presencia de superóxido dismutasa (SOD) ($k_{\text{cat}} = 10^4 - 10^5 \text{ s}^{-1}$) (Srncic, Aquilante et al. 2009) (Ec. 6). Tanto el superóxido como el H_2O_2 son especies reactivas, y pueden reaccionar con la Hb así como con otros componentes celulares.

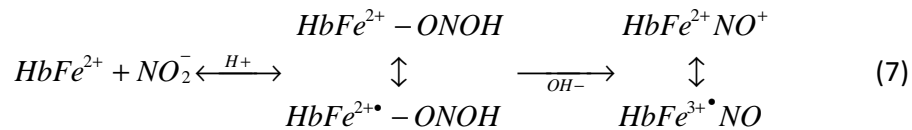


La reacción de autooxidación de la Hb produce metahemoglobina (metHb) y superóxido (Ec. 5). La metHb no une oxígeno, y por lo tanto no puede transportarlo. A modo de mantener la Hb funcional, la mayor parte de la metHb es reducida nuevamente a Hb Fe(II) por la metHb reductasa. La metHb residual que no es reducida tiene una menor afinidad por el grupo prostético hemo, resultando en hemina libre (Hargrove, Singleton et al. 1994). Esta hemina interacciona con la membrana de los GR interfiriendo con las interacciones entre proteínas de citoesqueleto (Shaklai, Avissar et al. 1986, Wyse and Butterfield 1989) y reacciona con hidroperóxidos lipídicos de la membrana liberando radicales lipófilos (Delcarte, Jacques et al. 2001). En presencia de H_2O_2 también se puede producir peroxidación lipídica. En el GR, el glutatión (GSH), el cual se encuentra presente en el rango mM reacciona con la hemina, disminuyendo el daño inducido por la misma (Romero and Radi 2005).

Además de la reacción de autooxidación de la Hb, los GR en la circulación se encuentran expuestos de manera permanente a oxidantes que pueden reaccionar con varios componentes celulares, incluida la Hb (Nohl and Stolze 1998, Aoshiba, Nakajima et al. 1999).

Los GR también están expuestos a $\cdot\text{NO}$ y nitrito, los que pueden producir especies reactivas del nitrógeno (ERN) (Nagababu, Ramasamy et al. 2003, Rifkind, Nagababu et al. 2006, Salgado, Nagababu et al. 2009, Rifkind, Nagababu et al. 2011) produciendo estrés nitrosativo. Aunque existe evidencia de una NOS en el GR, la cual puede generar $\cdot\text{NO}$, la mayor parte del $\cdot\text{NO}$ al que se exponen los GR se origina a partir de NOS3 endotelial (Lancaster 1994). El $\cdot\text{NO}$ en el GR reacciona rápidamente con oxiHb para formar nitrato y metHb o deoxiHb para producir el aducto Hb-Fe(II)NO estable. Aunque estas reacciones son rápidas ($k \approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Cooper 1999), cualquier superóxido presente debido a la autooxidación de oxiHb reacciona con $\cdot\text{NO}$ incluso más rápido que la Hb ($k \approx 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) produciendo peroxinitrito (ONOO^-). El ONOO^- también se genera en el espacio intersticial del endotelio por la reacción del superóxido generado por las NADPH oxidasas, xantina oxidasa y e-NOS desacoplada, que reaccionan con el $\cdot\text{NO}$ generado por la NOS3 (Ray and Shah 2005, Forstermann and Munzel 2006). Este ONOO^- puede difundir a la circulación y luego a los GR. El

ONOO⁻ es una especie altamente reactiva que puede dañar los componentes celulares (Romero and Radi 2005, Romero, Denicola et al. 2006, Pacher, Beckman et al. 2007). Una fuente adicional de ERN en los GR involucra reacciones que implican al nitrito, el cual es producido durante la oxidación de [•]NO por oxígeno o metaloproteínas en el plasma (Shiva, Wang et al. 2006). La mayor parte del nitrito del plasma se origina de la oxidación de [•]NO, lo que explica el uso del nitrito del plasma como una medida de la actividad NOS3 (Nagababu and Rifkind 2007). Sin embargo, parte del nitrito puede obtenerse del nitrito y el nitrato de la dieta. El nitrato también contribuye al pool de nitrito, ya que el mismo es reducido por las bacterias en la saliva (Govoni, Jansson et al. 2008). El nitrito en los GR reacciona con oxyHb para producir nitrato (Ec. 4), el cual no es reactivo, y metHb (Keszler, Piknova et al. 2008). El nitrito también puede reaccionar con deoxyHb (Doyle, Pickering et al. 1981, Cosby, Partovi et al. 2003, Nagababu, Ramasamy et al. 2003). El nitrito, que tiene una baja afinidad por el hemo Fe (II), ayuda a inducir un cambio conformacional que estabiliza el nitrito unido. Una vez que el nitrito unido se ha protonado, una reacción redox resulta en el desplazamiento de un ion hidroxilo del nitrito produciendo un ion nitrosonio unido al hierro Fe(II) (Ec.7). Este último está en equilibrio con el complejo Fe³⁺NO, el cual es fuente de [•]NO a nivel circulatorio (Ec. 8). Este intermediario híbrido también se ha visto en equilibrio con un radical tiilo en el grupo sulfhidrilo (Ec. 9). Estos intermediarios metaestables conservan la bioactividad de [•]NO, pero no se inactivan mediante la reacción con Hb o superóxido.

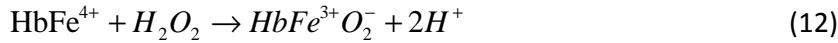
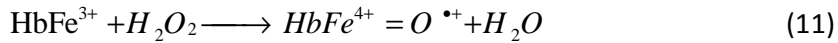
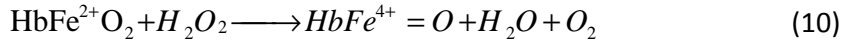


Estos intermediarios, por lo tanto, proporcionan una reserva de [•]NO potencialmente bioactivo, que puede ser liberado a la vasculatura cuando sea necesario (Salgado, Nagababu et al. 2009, Rifkind, Nagababu et al. 2011, Salgado, Ramasamy et al. 2011).

2.2. Formación de EROS y ERN por reacciones redox de la Hb

El superóxido, H₂O₂, radical hidroxilo, ferrilHb, oxyferrilHb y ONOO⁻ generados se ha visto que son capaces de modificar la estructura de los lípidos y proteínas de membrana y del citoesqueleto de los GR, perturbando la forma bicóncava y la capacidad de deformarse que tienen estas células. El estrés oxidativo generado puede además desencadenar el ingreso de calcio a la célula, la activación de caspasas y la disrupción de la asimetría lipídica resultando en la externalización de fosfatidil serina y alterando a la banda 3. Todo estos cambios contribuirían a la remoción de los GR de la circulación por los macrófagos del sistema retículo endotelial (Kay 1993, Kiefer and Snyder 2000, Lang, Duranton et al. 2003, Foller, Huber et al. 2008, Mohandas and Gallagher 2008, Antonelou, Kriebardis et al. 2010).

En particular, el H₂O₂ inicia una cascada de reacciones oxidativas, reacciona con la Hb, tomando 2 electrones del hemo y produciendo ferrilHb (Ec.10), la cual es altamente reactiva. También reaccionará con cualquier metHb produciendo oxyferril Hb, donde un segundo electrón es removido de la globina, formando una proteína radical reactiva (Ec.9).



La ferrilhemoglobina reacciona con una molécula adicional de H₂O₂, que es reducida para formar radical superóxido (Ec. 12) que es retenido en el bolsillo de hemo el tiempo suficiente para reaccionar con el hemo, resultando eventualmente en la degradación del hemo, liberando hierro y formando productos de degradación del hemo que son fluorescentes (Giulivi and Davies 1994, Nagababu and Rifkind 1998, Nagababu and Rifkind 2000, Nagababu and Rifkind 2000, Nagababu and Rifkind 2004). Existe una relación entre la formación de estos productos de degradación del hemo y el envejecimiento celular, que es indicada por la correlación entre el nivel de degradación del hemo y la unión de IgG autóloga a la membrana de GR (Nagababu, Fabry et al. 2008). Este efecto puede ser debido al hierro liberado durante la formación de productos de degradación del hemo. El hierro liberado puede depositarse en la membrana, actuando como un catalizador de Fenton para oxidar lípidos y proteínas. Un aumento en el hierro redox activo se ha observado en el envejecimiento *in vitro* de los GR y en células tratadas con agentes oxidantes. Esta liberación de hierro se ha correlacionado con la unión de IgG autóloga a la membrana celular, sugiriendo que las reacciones redox mediadas por hierro podrían ser responsables de la expresión de antígenos de membrana senescente (Comporti, Signorini et al. 2002). Además de los efectos del hierro, no se puede descartar un posible efecto de estos productos de degradación.

El ONOO⁻ tiene un vida media corta (menor a 10s a pH neutro) y puede reaccionar directamente con varias moléculas biológicas para generar especies tóxicas como radicales [•]OH, [•]NO₂ y CO₃^{-•} (Romero and Radi 2005, Romero, Denicola et al. 2006). En los GR el ONOO⁻ reacciona con la Prx 2 (Manta, Hugo et al. 2009) o con la Hb (Romero, Radi et al. 2003, Romero and Radi 2005). Debido a la reacción de la oxiHb con el ONOO⁻, la formación de 3-nitrotirosina, generalmente considerada un marcador para el ONOO⁻, no es un marcador válido en los GR. Sin embargo se ha demostrado que durante esta reacción se generan pequeñas cantidades de ferrilHb y [•]NO₂, además de metHb. Estos radicales pueden dañar al GR y promover el envejecimiento celular (Romero and Radi 2005). Estudios recientes han demostrado que la adición de ONOO⁻ a los GR causa daños morfológicos, disminución de los tioles celulares, disminución en glicoporina A (un marcador de senescencia), agrupamiento de Banda 3, exposición de fosfatidil serina y activación de las caspasas 2 y 3, las cuales promueven la eritrosis (Pietraforte, Salzano et al. 2001, Celedon, Gonzalez et al. 2007, Pacher, Beckman et al. 2007). Algunos de estos cambios son revertidos por un tratamiento previo con compuestos de tiol como la N-acetilcisteína (NAC) (Celedon, Gonzalez et al. 2007).

Estos resultados indican que el efecto de ONOO^- en los GR involucra una ruptura en los sistemas redox celulares (Pacher, Beckman et al. 2007).

2.3. NADPH oxidasa en Glóbulo Rojo

Recientemente George et al (George, Pushkaran et al. 2013) presentaron evidencia de un nuevo mecanismo de producción de estrés oxidativo en los GR, observaron que las subunidades de la NADPH oxidasa están presentes en los GR humanos. Su actividad parece estar regulada por PKC y extracelularmente por factores de señalización presentes en el plasma de pacientes con anemia de células falciformes (George, Pushkaran et al. 2013).

3. Antioxidantes en los Glóbulos Rojos

3.1. Sistemas antioxidantes en los Glóbulos Rojos

Para minimizar los efectos tóxicos de las reacciones redox los GR tienen un vasto sistema antioxidante, el cual incluye enzimas como la Superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD) que cataliza la dismutación de superóxido a H_2O_2 , Catalasa, Glutación Peroxidasa y Peroxirredoxina 2, la cual elimina peróxidos y ERN (Nagababu, Chrest et al. 2003, Low, Hampton et al. 2008). También poseen un alto número de antioxidantes de bajo peso molecular los cuales ayudan a minimizar el estrés oxidativo (Cimen 2008), como ser el glutatión (Foller, Harris et al. 2013), vitamina C y la vitamina E (Chirico and Pialoux 2012). Además los GR tienen un sistema redox en la membrana que transfiere electrones de sustratos intracelulares a aceptores de electrones extracelulares, que pueden ser NAD^+ o vitamina C (Rizvi, Jha et al. 2006). Así los GR protegen la Hb mediante una barrera selectiva, que permite el transporte gaseoso y de otros ligandos y provee mecanismos enzimáticos para mantener la Hb en un estado funcional no tóxico (Cappadoro, Giribaldi et al. 1998), previendo protección antioxidante, no solo para ellos mismos sino también para otros órganos en el cuerpo (Siems, Sommerburg et al. 2000).

3.2. Glutación

El glutatión es el principal tiol de bajo peso molecular en las células animales. Se trata de un tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina) muy abundante, que puede encontrarse en forma reducida (GSH) (Figura 6) y oxidada (GSSG). GSSG es un homodímero de moléculas de GSH unidas por un enlace disulfuro (Pastore, Federici et al. 2003). La relación GSH:GSSG se emplea a menudo como un indicador del estado redox celular, y en condiciones fisiológicas normales es mayor de 10 (Griffith 1999), siendo la concentración de GSH en el GR aproximadamente 3 mM (Nicolay, Schneider et al. 2006). El GSSG es reducido rápidamente por la glutatión reductasa, enzima que requiere NADPH como cofactor. La degradación de glucosa por la vía de las pentosas fosfato es la única fuente de NADPH en los GR, y una deficiencia ligada al cromosoma X en la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la enzima clave de la vía de las pentosas fosfato, sensibiliza a los eritrocitos al estrés oxidativo, conduciendo a la eriptosis (Lang, Roll et al. 2002).

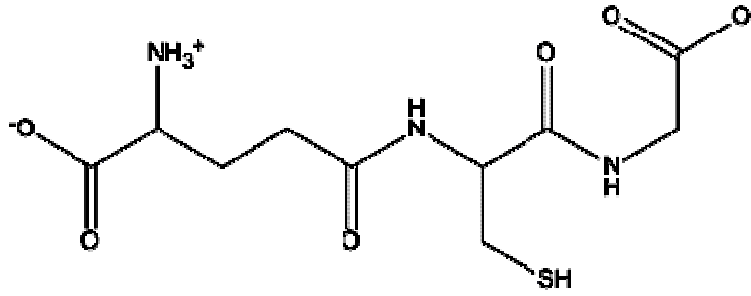


Figura 6. GSH. Fórmula estructural del GSH o N- (N-L-gamma-glutamyl-L-cisteinil) glicina, de peso molecular 307,33g/mol. Figura realizada con ChemDraw Ultra.

Aunque las concentraciones de GSH del eritrocito son muy variables entre individuos, se ha demostrado que permanecen relativamente constante durante meses en los eritrocitos de un individuo saludable (Richie, Abraham et al. 1996). Glutatión tiene un tiempo de recambio de 4–6 días ($24.0 - 16.0 \mu\text{mol} (\text{litró de eritrocitos})^{-1} \text{h}^{-1}$) (Raftos, Whillier et al. 2010), y la tasa de síntesis está limitada por el suministro de cisteína ($5 \mu\text{M}$ en los eritrocitos y $10 \mu\text{M}$ en el plasma). Como el GSH no es atacado por peptidasas ni degradado en los eritrocitos, las concentraciones de estado estacionario se alcanzan por el equilibrio entre la síntesis de GSH y la exportación de GSSG y GSH-conjugados (Raftos, Whillier et al. 2010). La concentración de GSH celular puede verse reducida por una malnutrición proteica, estrés oxidativo y muchas condiciones patológicas (Griffith 1999, Lu 2000). La síntesis de GSH a partir de glutamato, cisteína y glicina es catalizada secuencialmente por 2 enzimas citosólicas: glutamil cisteína sintetasa (GCS) y GSH sintetasa (Figura 7). Esta reacción ocurre en casi todas las células, siendo el hígado el mayor productor y exportador de GSH. En la reacción de GCS, el grupo γ -carboxilo del glutamato reacciona con el grupo amino de la cisteína formando un enlace iso-peptídico que protege al GSH de la hidrólisis por peptidasas intracelulares. El grupo glutamil-cisteína formado puede ser un sustrato para la glutamil ciclotransferasa, sin embargo, la formación de GSH se ve favorecida debido a la mayor afinidad y actividad de la GSH sintetasa (Griffith 1999).

Las K_m en mamíferos para la reacción de glutamato y cisteína son $1,7$ y $0,15 \text{ mM}$ respectivamente, similar a las concentraciones de glutamato ($2-4 \text{ mM}$) y de cisteína ($0,15-0,25\text{mM}$) en hígado de rata (Griffith 1999). Los valores de K_m de GSH sintetasa de mamíferos para glicina y adenosina trifosfato (ATP) son $0,04$ y $0,9 \text{ mM}$ respectivamente, menores que la concentración intracelular de ATP ($2-4 \text{ mM}$) y glicina ($1,5-2 \text{ mM}$) en el hígado de rata (Wu, Fang et al. 2004). La GCS es la enzima limitante para la síntesis de novo de GSH (Lu 2000).

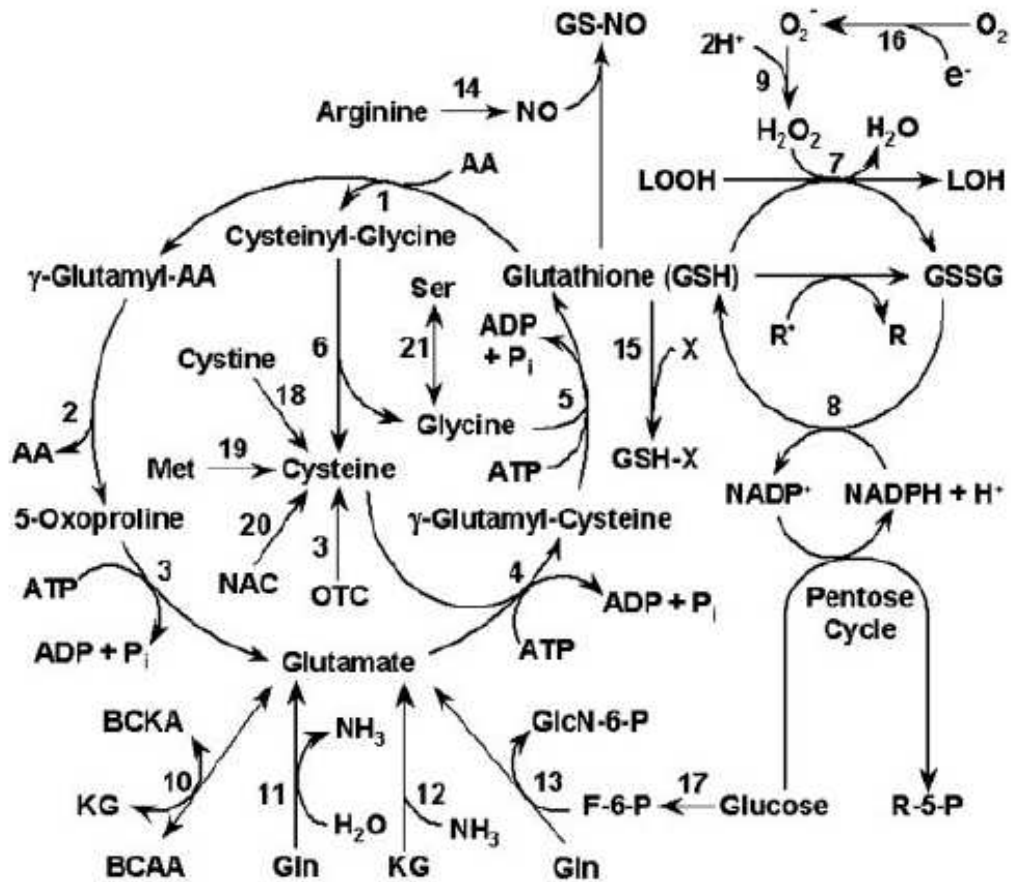


Figura 7. Ciclo del GSH en animales. Las enzimas que catalizan las reacciones indicadas son: 1) glutamil transpeptidasa, 2) glutamil ciclotransferasa, 3) 5-oxoprolinasa, 4) glutamilcisteína sintetasa, 5) glutatión sintetasa, 6) dipeptidasa, 7) glutatión peroxidasa, 8) glutatión reductasa, 9) superóxido dismutasa, 10) BCAA (aminoácidos de cadena ramificada) transaminasa, 11) glutaminasa, 12) glutamato deshidrogenasa, 13) glutamina fructosa-6-fosfato transaminasa 14) óxido nítrico sintasa, 15) glutatión S-transferasa, 16) NAD(P)H oxidasa, 17) glucólisis, 18) glutatión dependiente tioltransferasa, 19) transulfuración, 20) deacilasa y 21) serina hidroximetil transferasa. Imagen obtenida de (Wu, Fang et al. 2004).

3.2.1. Regulación de la síntesis de GSH

i. Regulación por GCS

El estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias, quimioterapia, depleción de GSH, aumento de insulina, entre otros factores, aumentan la transcripción de GCS en varios tipos celulares (Lu 2000, Townsend, Tew et al. 2003). Mientras que deficiencia proteica, eritropoyetina y fosforilación de GCS, entre otros, disminuyen la expresión de GCS (Lu 2000). La S-nitrosación de GCS por dadores de *NO reduce la actividad enzimática (Lu 2000) sugiriendo una relación entre el metabolismo de *NO y de GSH. De hecho, un aumento en la producción de *NO por la NOS inducible produce la inactivación de GCS en macrófagos y neuronas activadas con citoquinas (Canals, Casarejos et al. 2003).

ii. Regulación por Aminoácidos

El pool intracelular de cisteína es relativamente pequeño comparado con el pool de GSH en las células (Chung, Funk et al. 1990). Existen estudios que proporcionan datos para sostener la idea de que la cisteína es el aminoácido limitante para la síntesis de

GSH en humanos, ratas, chanchos y pollos (Chung, Funk et al. 1990, Jahoor, Jackson et al. 1999, Lyons, Rauh-Pfeiffer et al. 2000). Así, factores como la insulina y factores de crecimiento, que estimulan la absorción de cisteína por las células, generalmente aumentan la concentración de GSH intracelular (Lu 2000). Además, la suplementación con cisteína o sus precursores (cistina, N-acetil cisteína o L-2-oxotiasolidina-4-carboxilato) aumenta la síntesis de GSH en varias condiciones patológicas (Townsend, Tew et al. 2003).

En la solución extracelular, la cisteína es rápidamente oxidada a cistina, por tanto la concentración plasmática de cisteína (10-25 μM) es menor que la de cistina (50-150 μM). En general la cisteína y la cistina son transportadas por distintos transportadores de membrana, y las células típicamente transportan una más eficientemente que la otra (Lu 2000). Por su parte, las condiciones reductoras de las células favorecen la presencia de cisteína en el medio intracelular.

Tanto el glutamato intracelular como el extracelular puede ser utilizado para la síntesis de GSH (Reeds, Burrin et al. 1997). Como el glutamato obtenido en la dieta es casi completamente utilizado por el intestino delgado (Reeds, Burrin et al. 1997), el glutamato plasmático deriva principalmente de su síntesis *de novo*, y de la degradación proteica. El glutamato tiene un rol regulador en la síntesis de GSH por 2 mecanismos: la internalización de cisteína, y la prevención de la inhibición de GCS.

El glutamato y la cisteína comparten el sistema transportador de aminoácidos XC (Lu 2000). Cuando el glutamato extracelular se encuentra en alta concentración como en pacientes con cáncer o sida, la internalización de cisteína es inhibida por glutamato, resultando en una reducción en la síntesis de GSH (Tapiero, Mathe et al. 2002).

El GSH es un inhibidor no alostérico de GCS por retroalimentación, pero la unión de GSH a la enzima compite con el glutamato (Griffith 1999). Cuando la concentración de glutamato intracelular es muy alta, mejora la síntesis de GSH y su concentración se torna particularmente alta (Griffith 1999).

La biodisponibilidad de glicina puede verse reducida en respuesta a malnutrición proteica, sepsis o estímulo inflamatorio (Ookhtens and Kaplowitz 1998). Cuando la oxidación hepática de glicina se ve estimulada, en respuesta a altos niveles de glucagón o diabetes (Mabrouk, Jois et al. 1998), este aminoácido puede volverse un factor limitante para la síntesis de GSH.

3.2.2. Roles del GSH

El GSH participa en muchas reacciones celulares. Elimina radicales libres y otras EROS (como radical hidroxilo, ONOO⁻ y H₂O₂) de forma directa e indirecta mediante reacciones enzimáticas (Fang, Yang et al. 2002). Al hacerlo el GSH es oxidado a GSSG, el cual luego es reducido por la glutatión reductasa en forma dependiente de NADPH (Figura 7). Por otro lado, la glutatión peroxidasa cataliza la reducción GSH dependiente de H₂O₂ y otros peróxidos (Lei 2002).

El GSH también reacciona con varios electrófilos, metabolitos endógenos como estrógeno, melanina, prostaglandina y leucotrienos, y también con xenobióticos para formar mercapturatos (Fang, Yang et al. 2002). Estas reacciones son iniciadas por acción de la glutatión-S-transferasa. El GSH también se conjuga con *NO para formar un aducto S-nitrosoglutatión, el cual es clivado por el sistema tiorredoxina liberando GSH y *NO (Fang, Yang et al. 2002). Tanto el GSH como el *NO son necesarios para la

acción hepática de agentes sensibilizadores a la insulina (Guarino, Afonso et al. 2003), indicando su rol crítico en la regulación de lípidos, glucosa y utilización de aminoácidos. El GSH también sirve como sustrato para la formaldehído deshidrogenasa, la cual convierte formaldehído y GSH a S-formil-glutatiión (Townsend, Tew et al. 2003). La remoción de formaldehído (un carcinógeno) es de importancia fisiológica, debido a que el mismo es producido por el metabolismo de metionina, colina, metanol, sarcosina y xenobióticos.

El GSH es requerido para la conversión de prostaglandina H₂ (un metabolito del ácido araquidónico) a prostaglandina D₂ y E₂ por la endoperóxido isomerasa (Lu 2000).

Finalmente, la glutationilación de proteínas como la tioredoxina y la citocromo c oxidasa, tiene un rol importante en la fisiología celular (Townsend, Tew et al. 2003).

Así el GSH cumple funciones de vital importancia en animales. Una concentración adecuada de GSH es necesaria para la proliferación celular (Aw 2003), y un cambio en el estado de oxidación del GSH hacia GSSG activa varias vías de señalización celular, que involucran a la proteína quinasa B, fosfatasa, y factor nuclear κ B (NF κ B) reduciendo la proliferación celular y promoviendo la apoptosis (Sen 2000).

3.3. Ácido ascórbico

El ascorbato, ácido ascórbico o Vitamina C (AsC^H) es un agente reductor y antioxidante soluble en agua. El nombre "ascórbico" proviene del prefijo α - ("sin") y del latín *scorbuticus* ("escorbuto"), por su propiedad de prevenir y curar el escorbuto.

En los humanos, la vitamina C (enantiómero L del ácido ascórbico) no puede ser sintetizada, por lo cual debe ingerirse a través de los alimentos. Esto se debe a la ausencia de la enzima L-gulonolactona oxidasa, que participa en la ruta del ácido úrico. El ácido ascórbico puede sufrir 2 oxidaciones de 1 electrón consecutivas, resultando en la formación de radical ascorbato (Asc[•]) y ácido dehidroascórbico (DHA) (Figura 8).

El ascorbato puede regenerarse de radical ascorbato y de DHA ya sea enzimáticamente o no enzimáticamente. El ascorbato se oxida en forma dependiente de pH produciendo peróxido de hidrógeno (Calcutt 1951), oxidación que es acelerada en presencia de metales catalíticos (Du, Cullen et al. 2012).

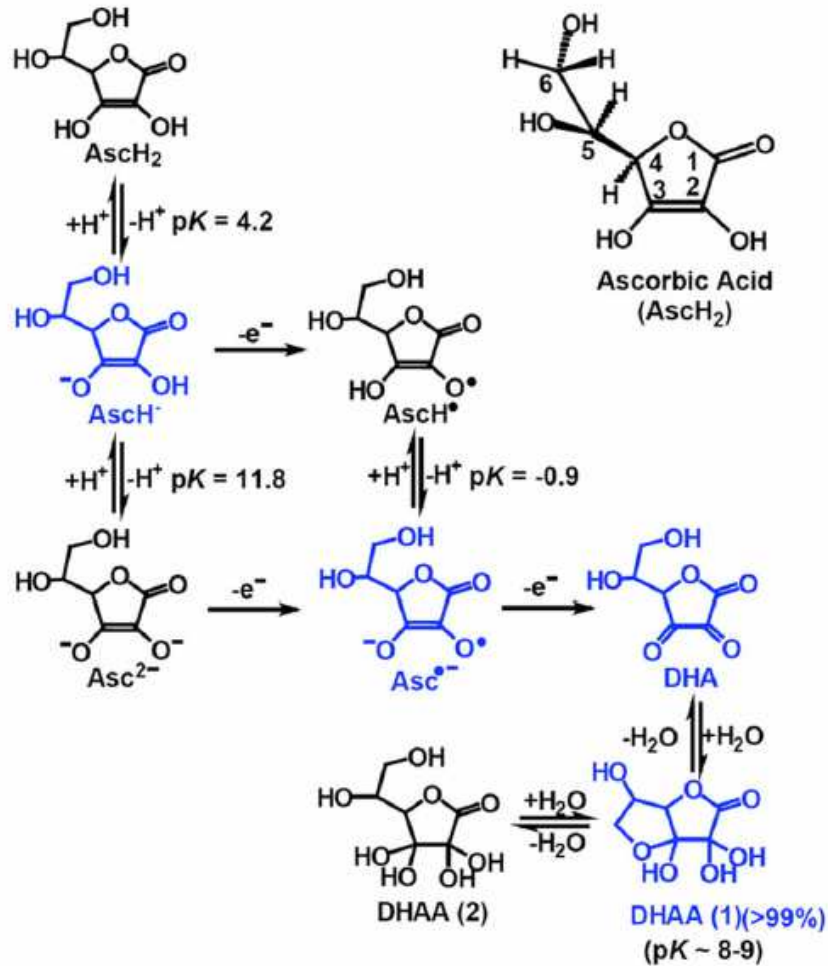


Figura 8. Isoformas de ácido ascórbico. Se observan las estructuras que puede tomar el ácido ascórbico mientras sufre reacciones de oxidación/reducción, protonación y deprotonación. Las abreviaciones utilizadas son: AscH₂, ácido ascórbico; AscH⁻, forma mono anión; Asc²⁻, forma di anión; AscH[•], radical libre ascorbilo; Asc^{•-}, semidihidroascorbato; DHA, dehidroascorbato; DHAA, ácido dehidro-L-ascórbico. En azul se observan las estructuras que dominan la bioquímica de la vitamina C. Imagen obtenida de (Du, Cullen et al. 2012)

La vitamina C es un importante antioxidante en plasma donde consume EROS y ayuda a preservar la vitamina E en las lipoproteínas. Los GR, a diferencia de las células sanguíneas nucleadas que concentran ascorbato, presentan una concentración de ascorbato igual a la del plasma (50 μM). De todas formas, los GR tienen alta capacidad para regenerar vitamina C de su forma oxidada DHA a expensas de GSH en una reacción redox directa. Ascorbato que tiene carga negativa a pH fisiológico, entra y sale de la célula lentamente. De todas formas se ha comprobado que preserva tanto la concentración de ascorbato en plasma como previene la oxidación de tocoferol en LDL plasmática. Además, el ascorbato intracelular mantiene y recicla el tocoferol de la membrana del eritrocito disminuyendo la lipoperoxidación (Mendiratta, Qu et al. 1998).

El ascorbato reacciona con las EROS, y se ha visto que in vitro protege a los GR del estrés oxidativo generado por xenobióticos (Eroglu, Pandir et al. 2013). Además la vitamina C ha sido estudiada como aditivo para mejorar la conservación de los GR en

almacenamiento con buenos resultados (Raval, Fontes et al. 2013). La suplementación con vitaminas C y E in vivo mejora el desempeño cardiovascular, sin embargo, aumenta la hemólisis en pacientes con anemia falciforme, enfermedad asociada con un aumento en el estrés oxidativo (Arruda, Mecabo et al. 2013).

3.4. Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) convierte el superóxido en H_2O_2 . En mamíferos existen 3 formas de SOD: MnSOD que se encuentra en el núcleo y la mitocondria (McCord and Fridovich 1969), CuZnSOD que se encuentra en el citoplasma, núcleo y en el espacio intermembrana en la mitocondria (Field, Furukawa et al. 2003), y por último SOD extracelular, que se encuentra en la membrana plasmática (Folz and Crapo 1994). Los GR únicamente expresan CuZnSOD, también llamada SOD1 (Iuchi, Okada et al. 2009), es una enzima soluble homodimérica que cataliza la dismutación de O_2^- a H_2O_2 (Saito, Shinzawa et al. 1989, Zlatkovic and Filipovic 2011). Los genes que codifican esta enzima se encuentran en el cromosoma 21 en humanos, y en el cromosoma 16 en ratones (Indo, Yen et al. 2015).

Un homodímero de SOD1 consiste en 2 subunidades catalíticamente activas, unidas por un enlace no disulfuro, sin embargo para crear y mantener la estructura de cada monómero si se utilizan enlaces disulfuros intramoleculares (Bouldin, Darch et al. 2012) (Figura 9). Los monómeros formados contienen enlace disulfuro entre los residuos Cys 57 y Cys 146, pero otras cisteínas pueden ser utilizadas en la obtención del plegamiento correcto (Chen, Shang et al. 2012, Wu, Shen et al. 2012). La pérdida del enlace disulfuro intramolecular produce una enzima catalíticamente inactiva.

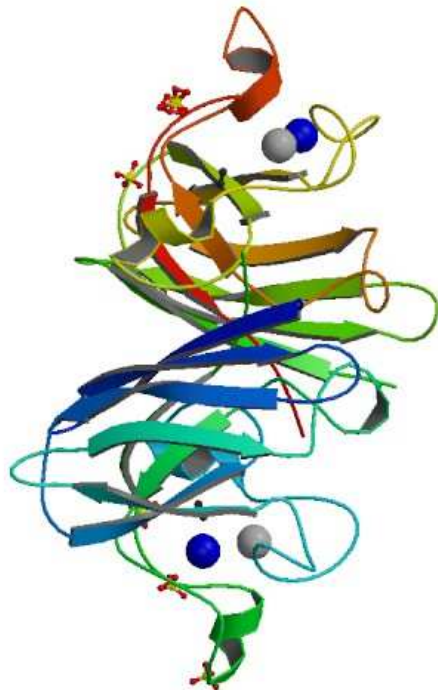


Figura 9. Estructura de la CuZnSOD. Estructura de resolución atómica de la CuZnSOD humana, las cadenas proteicas están coloreadas de la región N-terminal a la región C-terminal utilizando un gradiente de colores. Imagen obtenida de *Protein Data Bank* (código 2C9V) con referencia (Strange, Antonyuk et al. 2006)

Esta proteína fue designada originalmente como eritrocuproina, una proteína de almacenamiento de cobre, hasta que McCord y Fridovich descubrieron su actividad dismutasa. Alteraciones en la SOD1 se han visto asociadas con envejecimiento, cáncer y esclerosis lateral amiotrófica (Andersen and Al-Chalabi 2011, Ticozzi, Tiloca et al. 2011, Hitchler and Domann 2014). Los metales Cu(II) y Zn(II) se encuentran coordinados en el sitio activo de la enzima por residuos de histidina, en humanos se trata de los residuos His 46, 48, 60, 63, 71 y 120 (Hitchler and Domann 2014). Los ratones deficientes en SOD1 sufren anemia hemolítica y mayor estrés oxidativo, y producen anticuerpos anti productos de peroxidación lipídica y anti-GR (Grzelak, Kruszewski et al. 2009, Iuchi, Okada et al. 2009, Starzynski, Canonne-Hergaux et al. 2009). Estos ratones intensifican la vía de las pentosas fosfato, probablemente para fomentar la regeneración de GSH (Iuchi, Okada et al. 2009). Para la catálisis, la SOD1 utiliza un mecanismo tipo ping pong que requiere el ingreso sucesivo de 2 moléculas de O_2^- (Figura 10). En este mecanismo los metales en el núcleo catalítico de SOD1 toman un electrón del primer superóxido y redistribuyen la carga negativa, lo cual favorece la atracción de una segunda molécula de O_2^- (Hitchler and Domann 2014). SOD1 también tiene un bajo nivel de actividad peroxidasa, la cual es única entre las SOD de mamífero (Figura 11). Un mecanismo único de SOD1 es la capacidad de procesar $ONOO^-$, llevando a la nitración de residuos de tirosina (Beckman, Ischiropoulos et al. 1992, Ischiropoulos, Zhu et al. 1992).

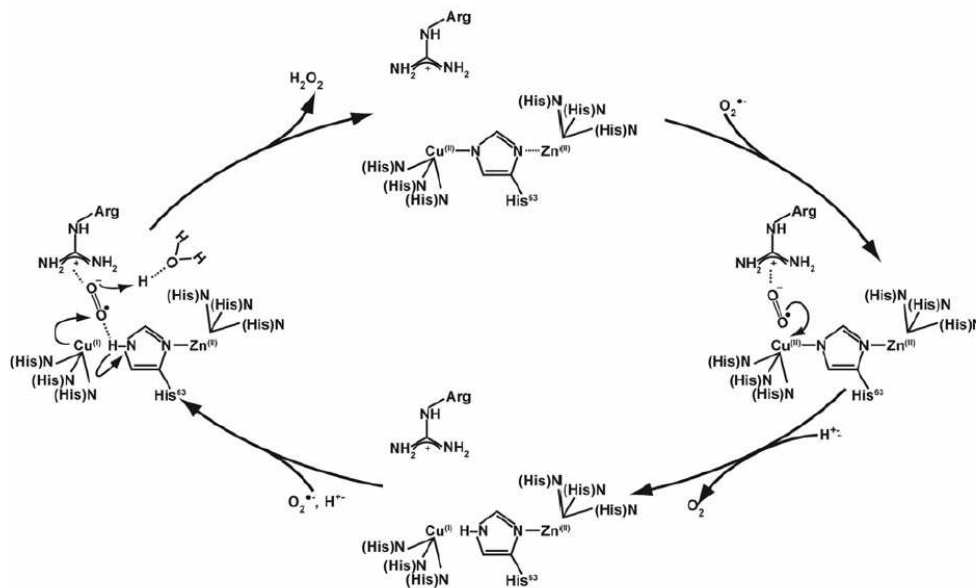


Figura 10. Mecanismo catalítico de la CuZnSOD. La enzima trabaja mediante un mecanismo ping pong, en el cual el primer superóxido que reacciona reduce al Cu en el sitio activo de la holoenzima, depositando un electrón y quedando como oxígeno molecular. El segundo superóxido acepta un electrón del Cu y se convierte en peróxido de hidrógeno y deja el Cu oxidado y pronto para aceptar otro electrón, cerrando así el ciclo. Imagen obtenida de (Hitchler and Domann 2014).

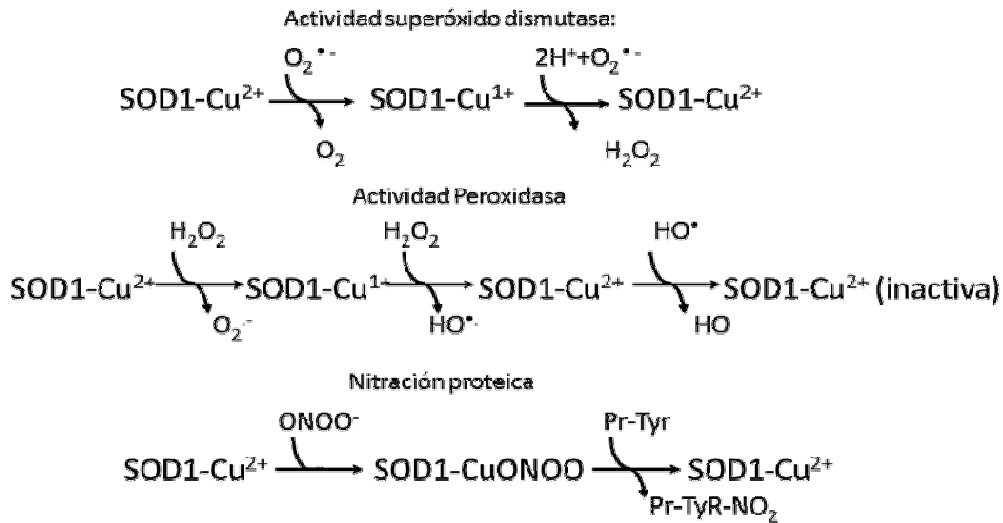


Figura 11. Reacciones catalizadas por CuZnSOD. Esta enzima puede actuar como superóxido dismutasa, como peroxidasa o catalizar la nitración de tirosinas por ONOO⁻. Modificado a partir de (Hitchler and Domann 2014).

3.5. Catalasa

La Catalasa (Cat, EC 1.11.1.6) es una enzima dependiente de hierro hémico que cataliza muy eficientemente la descomposición de H₂O₂ para formar H₂O y O₂ (Putnam, Arvai et al. 2000, Diaz, Loewen et al. 2012). Se trata de una enzima tetramérica con subunidades de aproximadamente 60 kDa cada una, con 527 residuos de aminoácidos y un grupo hemo con Fe³⁺ (Figura 12). El gen que la codifica se encuentra en la posición 11 del cromosoma 13 en humanos.

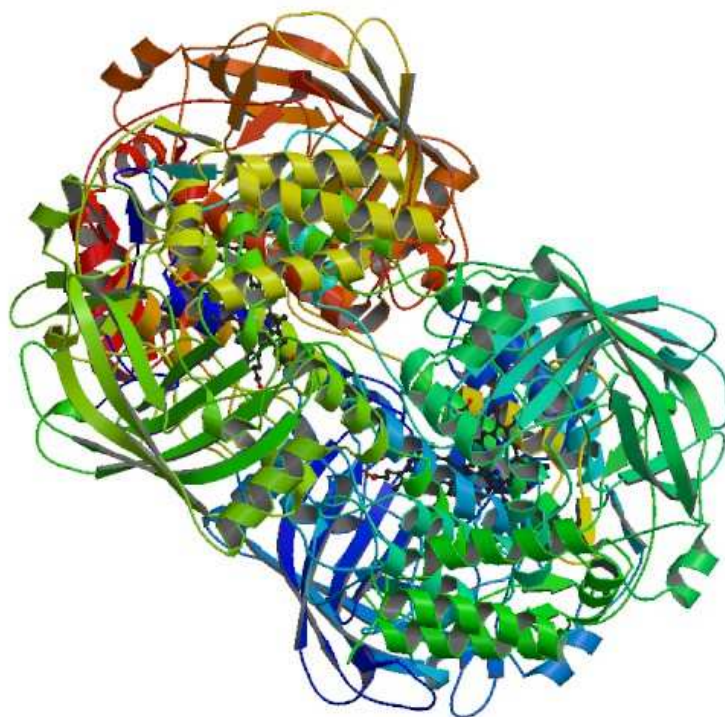


Figura 12. Estructura de la Catalasa de GR humano. Se observan las cadenas proteicas coloreadas de la región N-terminal a la C-terminal utilizando un gradiente de colores. Imagen obtenida del *protein data bank* (código 1F4J) con referencia (Safo, Musayev et al. 2001).

La catalasa es muy abundante en los GR (Gaetani, Galiano et al. 1989). Debido a la actividad de la catalasa se ha propuesto a los GR como eliminadores móviles de EROS, protegiendo otras células del daño oxidativo (Agar, Sadrzadeh et al. 1986).

Esta enzima se ha visto implicada como un factor importante en la inflamación (Halliwell and Gutteridge 1984), la mutagénesis (Vuillaume 1987), la prevención de la apoptosis (Sandstrom and Buttke 1993, Islam, Kayanoki et al. 1997, Yabuki, Kariya et al. 1999), y la estimulación de tumores (Miyamoto, Hayashi et al. 1996).

La acatalasemia, o deficiencia en catalasa, era considerada una deficiencia enzimática benigna y asintomática hasta el año 2000 cuando se encontró una fuerte correlación entre la acatalasemia y la diabetes mellitus (Goth and Eaton 2000, Ogata, Wang et al. 2008). La exposición a niveles elevados de H_2O_2 puede dañar las células pancreáticas, cuya concentración en catalasa es baja (Olejnicka, Andersson et al. 1999).

El mecanismo catalítico de la catalasa consiste en una reacción en 2 pasos (Deisseroth and Dounce 1970). En el primer paso el Fe^{3+} del hemo reduce una molécula de peróxido de hidrógeno a agua y genera una especie oxiferril unida covalentemente ($Fe^{4+}=O$) con un radical porfirina (Ivancich, Jouve et al. 1997) conocido como compuesto I. En el segundo paso el compuesto I oxida una segunda molécula de peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y se regenera la enzima férrica más agua. Los peróxidos orgánicos como el ácido peroxiacético pueden sustituir al peróxido de hidrógeno formando lentamente el compuesto I, sin embargo no reducen nuevamente la catalasa (Chance 1949, Chance 1949). Con los sustratos adecuados el compuesto I

puede ser reducido por un solo electrón para formar compuesto II, en el cual la porfirina se encuentra reducida pero se mantiene el centro oxyferril metal. Muchas catalasas con hemo se unen al reductor NADPH, sin embargo el H_2O_2 es la fuente oxidante y reductor durante el ciclo catalítico normal (Fita and Rossmann 1985).

3.6. Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) es una enzima que contiene selenio (Awasthi, Beutler et al. 1975), reduce los peróxidos lipídicos (Gallo and Martino 2009) y elimina el H_2O_2 generado en la proximidad de la membrana celular (Nagababu, Chrest et al. 2003). Se trata de una enzima intracelular presente en todos los tejidos de todos los animales, y cataliza la reducción por dos electrones de hidroperóxidos, utilizando al GSH como equivalente de reducción. Se trata de un homotetrámero, con un PM por subunidad de aproximadamente 21 kDa (Figura 13). Cada subunidad contiene un átomo de selenio, que en su estado reducido es parte de un residuo de selenocisteína (King and Zanella 2013) (An 2014).

Una deficiencia parcial en la glutación peroxidasa de los GR produce una forma leve de anemia hemolítica (Necheles, Steinberg et al. 1970). En la anemia de células falciformes, la hemólisis se correlaciona con niveles bajos de glutación peroxidasa, y el tratamiento con hidroxiurea restaura la expresión de glutación peroxidasa aminorando los síntomas (Cho, Kato et al. 2010).

El mecanismo de acción de estas peroxidases implica la oxidación de la selenocisteína por transferencia de un átomo de oxígeno, y la reducción del ácido sulfónico ocurre por una reacción de intercambio que implica 2 GSH (Mauri, Benazzi et al. 2003) (Figura 14).

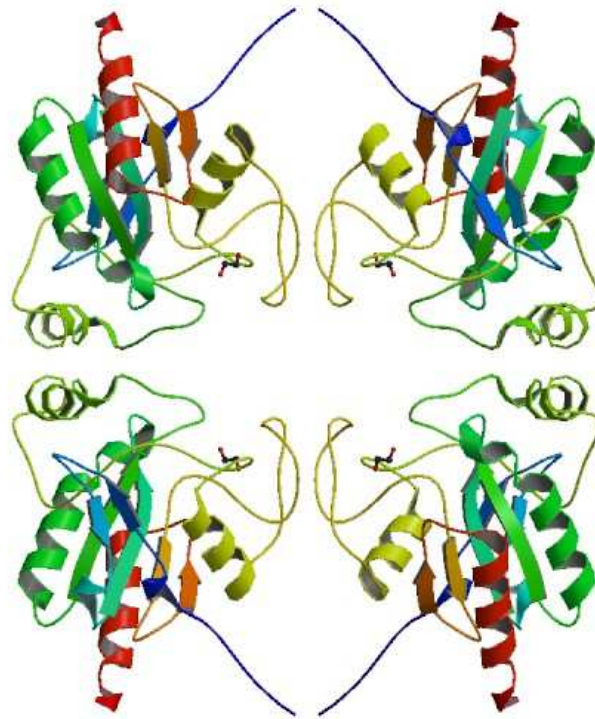


Figura 13. Estructura de Glutación peroxidasa 5 humana. Las cadenas proteicas están coloreadas de la región N-terminal a la C-terminal utilizando un gradiente de colores. Imagen obtenida del *protein data bank* (código 2I3Y) con referencia (Epp, Ladenstein et al. 1983).

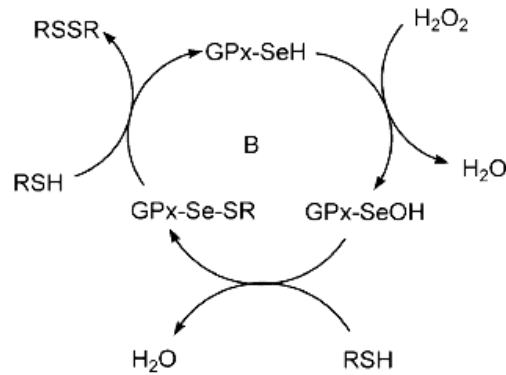


Figura 14. Reacción de la Glutatión peroxidasa con H₂O₂. La peroxidación del tiol por H₂O₂ genera ácido sulfénico altamente reactivo. La reducción ocurre por la reacción de intercambio en la que se consumen 2 equivalentes de tiol (GSH). Imagen obtenida de (Rassaf, Bryan et al. 2003)

3.7. Glutarredoxina

La glutarredoxina (Grx, EC 1.20.4.1) (Figura 15) es una de las proteínas más importantes involucradas en el proceso de reducción de disulfuro y deglutationilación. Las isoenzimas de Grx son proteínas de bajo peso molecular (10-16 kDa), termoresistentes y funcionan como oxidorreductasas dependientes de GSH, que de acuerdo a su estructura, pertenecen a la superfamilia thiorredoxina (Kalinina, Chernov et al. 2014). La secuencia del sitio activo Cys-X-X-Cys/Ser se encuentra en la región N-terminal, mientras que el sitio de unión conservado se encuentra en la región C-terminal.

La forma oxidada de Grx, formada luego de la reducción de disulfuros proteicos o tioles glutationilados es reducida por GSH (Figura 16). Sin embargo la Grx2 entre otras excepciones puede ser reducida por thiorredoxina reductasa (Johansson, Lillig et al. 2004).

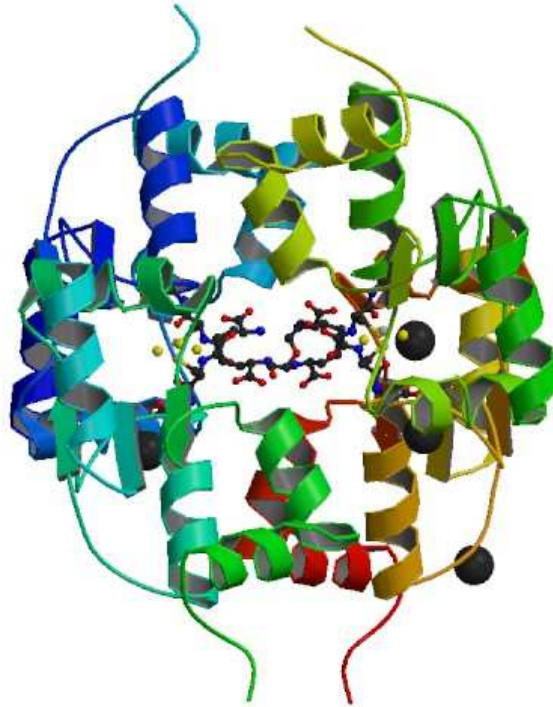


Figura 15. Estructura de Grx 5 humana. Estructura cristalina de Grx5 con un GSH unido en el centro. Imagen obtenida de *protein data bank* (código 2WUL).

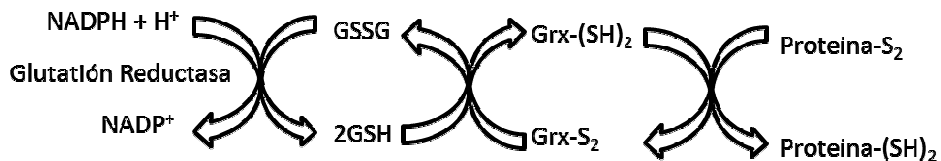


Figura 16. Reacción de Grx. Esquema de las reacciones catalizadas por el sistema dependiente de Grx. La forma oxidada de Grx formada luego de la reducción de los disulfuros proteicos es reducida por GSH. Luego el GSH oxidado es reducido por glutati6n reductasa usando NADP(H+) como coenzima.

Dependiendo de la estructura del sitio activo las Grx pueden ser diti6licas o monoti6licas (secuencias de sitio activo Cys-X-X-Cys o Cys-X-X-Ser) (Lillig, Berndt et al. 2008).

En cuanto a la cat6lisis, las Grx monoti6licas participan en reacciones de deglutationilaci6n. En este caso, la reducci6n de un sustrato glutationilado comienza con el ataque nucleof6lico del tiol catal6tico de la Grx. El sustrato se libera con la formaci6n de un intermediario glutationilado Grx-SSG. Finalmente la Grx se regenera por GSH, formando GSSG. El mecanismo monoti6lico tambi6n puede ser usado por enzimas diti6licas (Deponete 2013). Por otro lado, el mecanismo diti6lico requiere un segundo residuo de ciste6ina, llamado ciste6ina resolutive, que puede o no estar en el sitio activo. El primer paso de la deglutationilaci6n es igual que en el mecanismo monoti6lico, sin embargo el intermediario glutationilado Grx-SSG libera el GSH formando un enlace disulfuro intramolecular entre las ciste6inas catal6tica y resolutive. Este enlace puede ser reducido por 2 mol6culas de GSH o por tiorredoxina reductasa (Xing, Lauri et al. 2006).

Los humanos tienen 4 isoenzimas de Grx: Grx1, Grx2 y Grx3, presentes tanto en el núcleo como en el citosol (Lundberg, Fernandes et al. 2004, Lillig, Berndt et al. 2008, Lonn, Hudemann et al. 2008), y Grx5 que se encuentra únicamente en la mitocondria (Hanschmann, Godoy et al. 2013).

3.8. Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (Prx, EC 1.11.1.15) son un grupo de enzimas dependiente de tiorredoxina que eliminan el peróxido de hidrógeno utilizando tiorredoxina como segundo sustrato (Figura 17). Además de su actividad antioxidante las Prxs se han visto implicadas en numerosas funciones celulares como proliferación, diferenciación (Nemoto, Yamamoto et al. 1990) y señalización intracelular (Kang, Rhee et al. 2005).

Actualmente se han identificado 6 isoformas de esta enzima en mamíferos, Prx 1-6 (Hall, Karplus et al. 2009). Estas enzimas contienen un residuo de cisteína catalítico llamada Cisteína Peroxidática C_P que reacciona con otra cisteína llamada Resolutiva C_R para formar un disulfuro intra o intermolecular, que además puede sufrir sobreoxidación por peróxidos (Low, Hampton et al. 2008). Se sabe que los residuos de cisteína del sitio activo de las Prxs reaccionan con niveles bajos de H_2O_2 (Low, Hampton et al. 2008). En las células, el estado de oxidación de estos residuos de cisteína está regulado reversiblemente por los sistemas dependientes de tiorredoxina y sulfirredoxina (Rhee and Woo 2011). Las Prxs son proteínas antioxidantes, y a la Prx2 se le ha prestado particular atención como posible marcador de estrés oxidativo (Matte, Low et al. 2010, Poynton and Hampton 2014). Existen estudios que reportan que la Prx2 hiperoxidada puede servir como un indicador de oxidación en los GR en conservación (Rinalducci, D'Amici et al. 2011, Rinalducci, D'Amici et al. 2011). Además se han encontrado formas hiperoxidadas de proteínas de la familia Prx en neuronas (Cumming, Dargusch et al. 2007) y en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Yoshida, Yoshikawa et al. 2009).

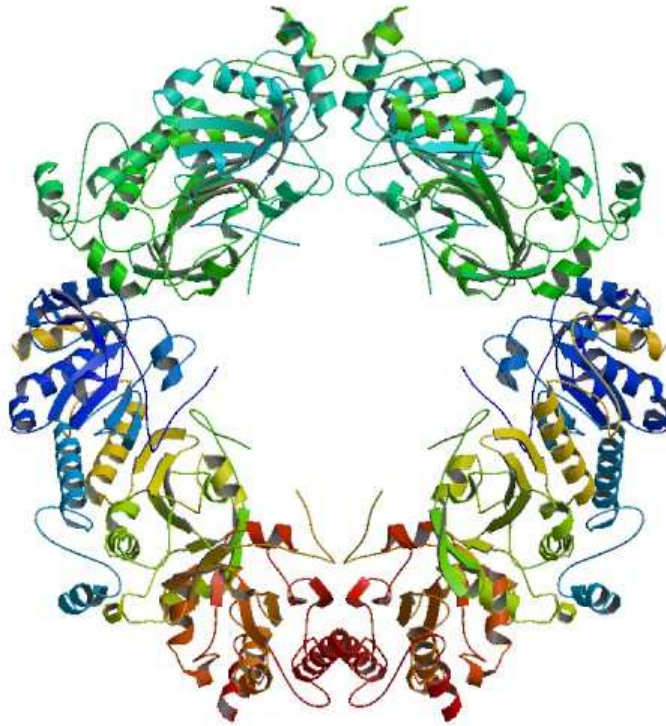


Figura 17. Estructura de Prx4 humana. Estructura cristalográfica de la peroxirredoxina 4 humana, una peroxirredoxina típica de 2 cisteínas, en su forma homodecamérica. Imagen obtenida de *protein data bank* (código 3TKP) con referencia (Wang, Wang et al. 2012).

Las Prx se expresan en gran cantidad, y su alta reactividad, así como su especificidad por los hidroperóxidos las hace sensores ideales para el H_2O_2 endógeno, y probablemente formen el primer paso en la señalización dependiente de H_2O_2 (Flohe and Ursini 2008, Winterbourn and Hampton 2008, Ferrer-Sueta, Manta et al. 2011, Randall, Ferrer-Sueta et al. 2013, Sobotta, Barata et al. 2013). Las modificaciones postraduccionales de las Prxs, las cuales pueden afectar su función, estado redox, estructura oligomérica, o interacciones con otras proteínas van a afectar la señalización redox por H_2O_2 , y existe una hipótesis (hipótesis de “floodgate” “de compuerta”) que propone que la inactivación de Prx vía sobreoxidación es una forma de acumular H_2O_2 para permitir la oxidación de otras proteínas redox (Wood, Poole et al. 2003). La presencia de sulfirredoxina, enzima que reduce específicamente 2Cys Prx sobreoxidadas, apoya la relevancia biológica de la actividad de estas enzimas y el rol en la señalización de su inactivación por oxidación (Lowther and Haynes 2011).

Según su estructura, las Prx se clasifican en 2 grupos: 1 Cys Prx y 2 Cys Prx, según el número de cisteínas activas catalíticamente para reacciones redox en su secuencia (Hall, Karplus et al. 2009). El mecanismo de acción peroxidática es conservado en ambas clases, pero la forma de reciclaje al estado reducido difiere. Las Prxs también pueden clasificarse según su habilidad para formar enlaces disulfuro inter o intramolecularmente (denominándose Prx típicas o atípicas respectivamente) (Hall, Karplus et al. 2009).

Las 1 Cys Prx se oxidan en el residuo de cisteína catalítico para formar cisteína ácido sulfénico (Cys-SOH). La glutatión transferasa π o el ácido ascórbico proveen el poder reductor para reciclar el residuo de ácido sulfénico.

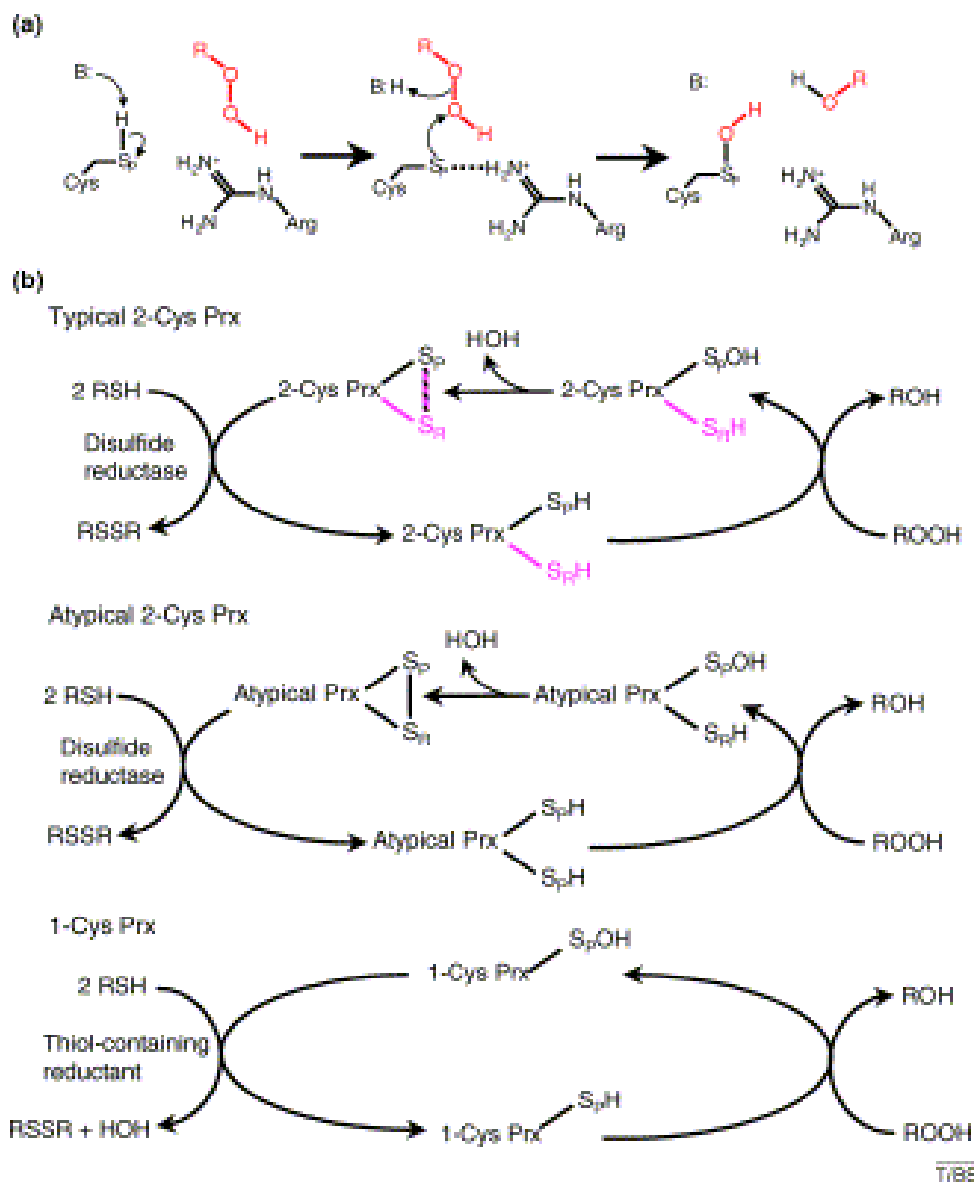


Figura 18. Mecanismos de las Prx. (a) El primer paso en la reducción involucra el ataque nucleofílico por la cisteína peroxidática y la formación del intermediario cisteína ácido sulfénico. (b) Tres mecanismos distinguen las clases de Prx, con cisteínas peroxidáticas y cisteínas resolutivas en estado reducido (S_pH y S_rH), ácido sulfénico (S_pOH) o disulfuro. En el caso de las 2 Cys Prx diméricas la cisteína peroxidática y la resolutiva se originan en distintas subunidades. Imagen obtenida de (Wood, Schroder et al. 2003)

En las 2-Cys Prx el sulfénico formado a nivel de la cisteína catalítica, de vida media muy corta, reacciona con una segunda cisteína “resolutiva” para formar un enlace disulfuro intermolecular en Prxs típicas, e intramolecular en variantes atípicas. El paso de reciclaje involucra la reducción del disulfuro por el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa, utilizando NADPH como fuente de poder reductor. Un segundo ciclo redox puede actuar sobre el intermediario sulfénico de las 2-Cys Prx, donde la cisteína- ácido sulfénico puede ser oxidada nuevamente por H_2O_2 para formar una cisteína-ácido sulfínico más estable ($Cys-SO_2H$), que puede ser reducido a cisteína-sulfénico por la sulfiredoxina, una reductasa dependiente de ATP. La cisteína sulfínico puede oxidarse

nuevamente con H_2O_2 para formar cisteína sulfónico (Cys-SO₃H). Esta reacción es irreversible y remueve la Prx del ciclo redox (Lim, Choi et al. 2008).

In vivo, las Prx con cisteínas sulfónicas han sido detectadas bajo intenso estrés oxidativo en células HeLa (Wagner, Luche et al. 2002, Lim, Choi et al. 2008). Mientras que en condiciones normales las Prx con cisteínas sulfónicas y sulfínicas están presentes como especies minoritarias (Wagner, Luche et al. 2002).

La estructura cuaternaria de las Prx es dinámica, y cada estado conformacional puede tener asociada una función. Las Prx oxidadas a disulfuro tienden a favorecer una estructura dimérica, mientras que las Prx reducidas o hiperoxidadas pueden adoptar también una estructura decamérica o dodecamérica (Cao, Roszak et al. 2005, Hall, Karplus et al. 2009).

La Prx 2 en humanos y en levadura posee actividad tipo-chaperona cuando se encuentra en los complejos de alto peso molecular (Barranco-Medina, Lazaro et al. 2009, Park, Lee et al. 2014).

3.9. Peroxirredoxina 2

La peroxirredoxina 2 (Prx2) es una 2-Cys Prx típica, decamérica (arreglo de 5 homodímeros), sensible a la oxidación por peróxidos (Hall, Karplus et al. 2009, Rhee and Woo 2011). Se encuentra presente a altas concentraciones en los GR (Moore, Mankad et al. 1991, Low, Hampton et al. 2008), siendo la tercera proteína más abundante luego de la Hb y la anhidrasa carbónica (Schroder, Littlechild et al. 2000, Low, Hampton et al. 2007). Esta enzima es capaz de reducir peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos y ONOO⁻ (Bryk, Griffin et al. 2000), protegiendo así a los GR del estrés oxidativo (Manta, Hugo et al. 2009), así como participando en la proliferación y migración celular (Immenschuh and Baumgart-Vogt 2005), y otras vías de transducción de señales. La Prx2 es una enzima citosólica (identificada originalmente como calpromotina), que se une a la membrana y participa en la pérdida de K⁺ en el GR por el canal de K⁺ activado por Ca²⁺ (Moore, Mankad et al. 1991, Low, Hampton et al. 2008). La regeneración de esta proteína requiere tioredoxina reductasa, cuya concentración es baja en los GR (Low, Hampton et al. 2007).

Se ha observado que esta proteína es esencial para la supervivencia normal de los GR. Los ratones “knock out” para Prx2 sufren anemia hemolítica, con formación de cuerpos de Heinz (Lee, Kim et al. 2003), menor deformabilidad y aumento en la oxidación de proteínas de membrana que contienen residuos de cisteína (Lee, Kim et al. 2003, Johnson, Ho et al. 2010, Yang, Kwon et al. 2012, Nagababu, Mohanty et al. 2013). Los cuerpos de Heinz consisten en Hb desnaturalizada por oxidación y estos descubrimientos implican que la Prx2 es importante para proteger a los GR del estrés oxidativo (Bayer, Maghzal et al. 2013).

La Prx2 ha sido evaluada por su uso potencial en diagnóstico de enfermedades y en terapia. Estudios de proteómica demostraron que la Prx2 es un posible biomarcador para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (Yoshida, Yoshikawa et al. 2009), tumores vasculares (Lee, Na et al. 2003) y cáncer cervical (Kim, Yu et al. 2009). Prx2 es también un factor de supervivencia tumoral, y se cree que la inhibición de Prx2 podría sensibilizar a las células tumorales a la acción de agentes quimioterapéuticos (Lee, Lee et al. 2011). También se ha observado que la inhibición de Prx2 sensibiliza a las células de glioma al estrés oxidativo, indicando el posible papel de esta proteína como agente terapéutico (Smith-Pearson, Kooshki et al. 2008).

La Prx2 es una proteína típica de 2 cisteínas, que consiste en monómeros de 22kDa que forman homodímeros. Estos existen en condiciones fisiológicas principalmente en la forma reducida ditiol (Hall, Karplus et al. 2009, Rhee and Woo 2011). Los homodímeros son alineados tal que la cisteína peroxidática (C_p) de un monómero se encuentre opuesta a la cisteína resolutive (C_r) del otro monómero. La C_p es muy susceptible a la oxidación por peróxido de hidrógeno, la cual resulta en la formación de un dímero unido por enlace disulfuro (Hall, Karplus et al. 2009). Este dímero es reciclado por el sistema tiorredoxina (Trx)/Tiorredoxina reductasa (TrxR). El reciclado es lento en los GR debido al bajo nivel de TrxR, lo que lleva a la acumulación del dímero en condiciones de estrés (Low, Hampton et al. 2007). La Prx2 del GR es oxidada por el H_2O_2 producido de la auto oxidación de la Hb o por fuentes exógenas (Low, Hampton et al. 2007). A pesar de que los GR también contienen catalasa y glutatión peroxidasa, parecería que cuando el H_2O_2 se agrega en concentraciones bajas el mismo es consumido mayoritariamente por la Prx2 (Johnson, Goyette et al. 2005, Low, Hampton et al. 2007). La oxidación reversible de la Prx2 también es causada por la adición de ácido hipocloroso (HOCl) y cloroaminas al eritrocito (Stacey, Peskin et al. 2009). Además nuestro grupo de trabajo demostró recientemente que la Prx2 del GR no sólo es susceptible a la sobreoxidación por ONOO⁻, sino que también puede nitrarse durante la catálisis (Manta, Hugo et al. 2009). Sorprendentemente, la nitración transforma a la enzima en una peroxidasa más activa y robusta (Randall, Manta et al. 2014). La Prx2 nitrada ha sido detectada en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Reed, Pierce et al. 2009).

El primer paso en la catálisis de la reacción con H_2O_2 es la reacción de la C_p con H_2O_2 para formar un derivado del ácido sulfénico (C_p -SOH) el cual, en las Prx de 2 cisteínas (2Cys Prx) reacciona con otro residuo de cisteína, la C_r , para formar un disulfuro, el cual es reducido por el sistema dependiente de NADPH tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Figura 19) (Hofmann, Hecht et al. 2002, Wood, Poole et al. 2003, Wood, Schroder et al. 2003, Rhee, Chae et al. 2005). En las Prx típicas de 2 cisteínas o en la subfamilia Prx1 (Prx 1-4 en mamíferos (Copley, Novak et al. 2004)), la reacción ocurre entre C_p -SOH de una subunidad y C_p -SH de otra subunidad, así cada homodímero contiene 2 sitios activos (Wood, Schroder et al. 2003). Además para la formación del disulfuro intermolecular es necesario un cambio conformacional que aproxime la C_p -SOH de una subunidad a la C_r de la otra subunidad. Este rearrreglo involucra la transición del llamado estado totalmente plegado (FF por su nombre en inglés “fully folded”), en la cual C_p y C_r se encuentran a una distancia aproximada de 14Å, a la conformación localmente desplegada (LU por su nombre en inglés “locally unfolded”) (Wood, Poole et al. 2002, Wood, Poole et al. 2003, Perkins, Nelson et al. 2013). El intermediario ácido sulfénico puede reaccionar con C_r -SH formando un disulfuro, o con una segunda molécula de H_2O_2 para formar ácido sulfínico (sobreoxidación), inactivando la actividad peroxidática. La oxidación de la cisteína a cisteína ácido sulfínico (C_p SO₂H) es una modificación postraducciona irreversible para la mayoría de las proteínas, pero no para las 2-Cys Prx, donde la sulfirredoxina cataliza la reducción específica de C_p -SO₂H en un mecanismo dependiente de ATP (Biteau, Labarre et al. 2003, Jonsson, Murray et al. 2008).

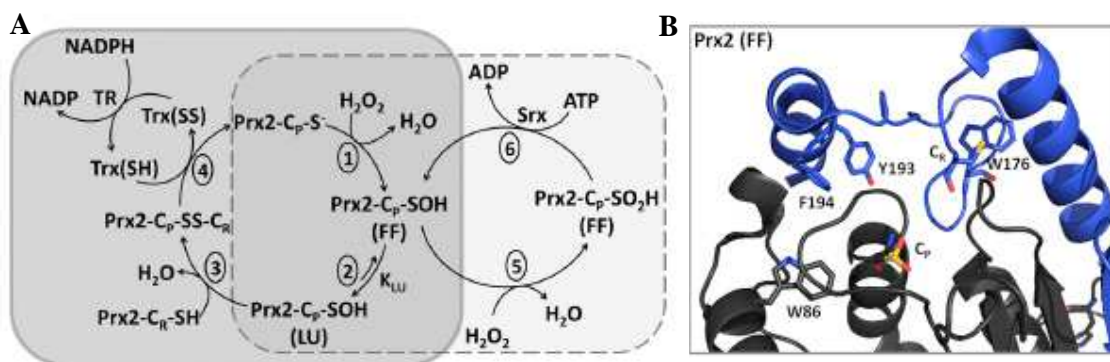


Figura 19. Prx2. (A) Ciclo catalítico de la Prx2: 1, reacción de una molécula de peróxido con el tiolato de la C_p para formar cisteína ácido sulfénico. 2, transición de la conformación FF a la conformación LU. 3, reacción de C_p ácido sulfénico con C_R . 4, reducción del disulfuro. 5, sobreoxidación de C_p a ácido sulfínico. 6, reducción de cisteína ácido sulfínico por sulfirredoxina/ATP. Imagen obtenida de (Randall, Manta et al. 2014) (B) Sitio activo de la Prx2 humana en su conformación totalmente plegada (FF). Imagen obtenida de (Randall, Manta et al. 2016).

3.9.1. Rol de la Prx2

Experimentos realizados por Low y colaboradores (Low, Hampton et al. 2007) confirmaron la relevancia de la Prx2 para el consumo de H_2O_2 en los GR humanos. Determinaciones de las constantes para la reducción de H_2O_2 por los GR humanos están en el rango de $10^7 - 10^8 M^{-1}s^{-1}$ (Peskin, Low et al. 2007, Manta, Hugo et al. 2009). Estos valores indican que la contribución de esta enzima al consumo de H_2O_2 es muy grande. La Prx2 también cumple un rol protegiendo a la Hb de la agregación (Han, Kim et al. 2012) y uniendo muchas proteínas, algunas de ellas de forma redox dependiente (Moore and Shriver 1997, Rinalducci, D'Amici et al. 2011, Matte, Bertoldi et al. 2013, Pallotta, D'Alessandro et al. 2013).

Con la gran capacidad de consumo de H_2O_2 de la Prx2 (Peskin, Low et al. 2007, Manta, Hugo et al. 2009) así como su alta concentración (Moore, Mankad et al. 1991, Cho, Kato et al. 2010) ella sola podría ser la responsable de remover el H_2O_2 fisiológico en los GR humanos. Sin embargo cuando 5×10^9 GR/dm³ son expuestos a un bolo de H_2O_2 5mM durante 1 minuto la mayor parte de la Prx2 es oxidada (Low, Hampton et al. 2007), lo que implicaría que la constante de consumo de H_2O_2 real es menor que la encontrada en la proteína purificada. Debido a esto algunos autores sugieren que la actividad peroxidasa de la Prx2 se encuentra fuertemente y reversiblemente inhibida en las células (Benfeitas, Selvaggio et al. 2014).

3.9.2. Prx2 en la membrana del GR

Los GR humanos han sido estudiados de forma intensiva, y se ha desarrollado un modelo general para la organización estructural de su membrana (Mohandas and Gallagher 2008). Los complejos macromoleculares de proteínas integrales de membrana se encuentran anclados mediante proteínas que las entrelazan a una estructura supramolecular, llamada esqueleto de la membrana. La Banda 3 es la proteína integral de membrana más abundante, y mediante su interacción con la

ankirina, une la bicapa a la red de proteínas de membrana y juega un papel crucial en la manutención de la cohesión de la membrana (Mohandas and Gallagher 2008).

La banda 3 cumple un rol fundamental en la asociación a la membrana de enzimas glicolíticas, y por lo tanto en el metabolismo celular (Lewis, Campanella et al. 2009). Esta proteína es un lugar de unión para la Hb desnaturalizada y los hemicromos, esto hace que oxidantes se generen en proximidad a la membrana y a complejos multiproteicos (Campanella, Chu et al. 2005, Lewis, Campanella et al. 2009), lo que puede inducir daño oxidativo en la membrana del GR.

La Prx2 funciona como antioxidante para el H_2O_2 generado de forma endógena, y evidencia reciente sugiere un rol como chaperona en varios modelos celulares (Wood, Schroder et al. 2003). En los GR la Prx2 fue caracterizada inicialmente como una proteína asociada a membrana, cuya unión de forma reversible a la membrana estaba asociada a la regulación del canal de potasio activado por calcio (canal de Gardos) (Moore, Mankad et al. 1991, Plishker, Chevalier et al. 1992, Moore and Shriver 1997, Moore, Shriver et al. 1997).

Estudios recientes demuestran la unión de Prx2 al dominio citosólico N terminal de la Banda 3 en el GR, observándose que los primeros 11 amino ácidos de dicho dominio son críticos para esta asociación (Matte, Bertoldi et al. 2013).

Existen estudios en los que se observan cambios dependientes del almacenamiento en la asociación de la Prx2 a la membrana del GR (Bosman, Lasonder et al. 2008, Antonelou, Kriebardis et al. 2010).

3.9.3. Prx2 y glutationilación

El tripéptido GSH es el principal antioxidante intracelular de bajo peso molecular. Niveles bajos de GSH resultan en un aumento en las EROS, deterioro en la respuesta inmune, inflamación y mayor susceptibilidad a las infecciones (Ghezzi 2011). Estudios recientes sugieren un rol tanto para el GSH como para el GSSG en la regulación de funciones celulares y expresión génica (Schafer and Buettner 2001, Fratelli, Goodwin et al. 2005). El GSH participa en la regulación redox de la inmunidad (Ghezzi 2005, Ghezzi 2013) vía la formación de disulfuros mixtos con residuos de cisteínas, proceso conocido como glutationilación. Se sabe que este proceso regula la señalización de proteínas y factores de transcripción. La activación inmune, induce a los macrófagos a liberar proteínas glutationiladas, probablemente mediante una vía no clásica (Salzano, Checconi et al. 2014). Se ha demostrado que la forma glutationilada de la Prx2 se encuentra entre las proteínas liberadas en respuesta al estímulo inflamatorio (Salzano, Checconi et al. 2014), y que esta proteína puede glutationilarse tanto en C_p como en C_R . La glutationilación de Prx2 se ha sugerido como un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo, y recientemente Winterbourn y colaboradores (Peskin, Pace et al. 2016) reportaron que la glutationilación de las cisteínas del sitio activo de la Prx2 del GR es revertida por $Grx1$ y GSH, que vuelven la peroxidasa activa, y propusieron el sistema GSH/ Grx como una alternativa al Trx/ $TrxR$. Si bien el sistema GSH/ $Grx1$ es más lento, puede ser prominente en situaciones donde la actividad $TrxR$ es baja (Low, Hampton et al. 2007, Peskin, Pace et al. 2016). En eritrocitos knock-out para $Grx1$ pudieron detectar Prx2 glutationilada (Peskin, Pace et al. 2016).

Los avances en proteómica, en particular en la célula eritrocítica, han identificado una extensa lista de proteínas en el citosol y la membrana del GR que fueron compiladas en (Goodman, Daescu et al. 2013) con más de 2200 entradas. En esta Introducción

hemos presentado brevemente sólo las proteínas más abundantes del GR y con efecto sobre la homeostasis redox de esta célula. Aproximaciones con geles nativo también han demostrado múltiples interacciones entre estas proteínas con más de 50 complejos multiproteicos identificados (Pallotta, D'Alessandro et al. 2013, Zolla, D'Alessandro et al. 2015).

4. Envejecimiento y remoción de GR

4.1. GR y envejecimiento celular

El envejecimiento celular representa una serie de cambios tiempo dependientes y unidireccionales, pero no necesariamente lineales que llevan a la remoción de la circulación (Aminoff, Rolfes-Curl et al. 1992). En condiciones normales los GR viven 120 ± 4 días en la circulación, lo que implica la existencia de mecanismos moleculares muy regulados responsables de programar la vida y la remoción no aleatoria de estas células (Walsh, Lutz et al. 2002, Franco 2009). Se han reportado varios cambios en las enzimas antioxidantes SOD1, catalasa y GPx durante el envejecimiento (Glass and Gershon 1984), así como la deamidación de la proteína 4.1 b a 4.1 a (Lutz, Stammers et al. 1992). También existen estudios que indican cambios en el metabolismo del glutatión como respuesta al envejecimiento celular, incluyendo cambios en enzimas involucradas en la vía de las hexosas monofosfato (Abraham, Taylor et al. 1978, Magnani, Piatti et al. 1983, Glass and Gershon 1984, Imanishi, Nakai et al. 1985, Imanishi, Nakai et al. 1986). Esto incluye cambios en el glutatión, glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual produce el NADPH necesario para la reducción del GSSG. Además existen cambios metabólicos que resultan en una disminución del metabolismo de la glucosa. Este cambio es atribuido a la glicolisis anaerobia (vía de Embden-Myerhoff). Este metabolismo de glucosa reducido es causado principalmente por una disminución en la actividad hexoquinasa. Se ha observado que el metabolismo de glucosa reducido resulta en una disminución en el ATP (Bartosz, Grzelinska et al. 1982, Magnani, Piatti et al. 1983). Una reducción en el ATP afecta muchos procesos celulares. También puede contribuir a la remoción de los GR de la circulación mediante una disminución en la actividad de Ca-ATPasa, la cual limita la concentración de calcio intracelular. El ATP también es requerido para la actividad flippasa, la cual mantiene la asimetría fosfolipídica que previene la exposición de fosfatidil serina (Devaux, Herrmann et al. 2008). La incertidumbre en muchos de estos datos es debida a varios asuntos: (i) Muchos de estos estudios han sido realizados con animales y pueden no estar relacionados directamente con los humanos (ii) Muchos estudios fueron realizados usando la separación celular por densidad, y si bien se ha demostrado que las células envejecidas son más densas, no parece que exista una relación lineal entre la edad celular y la densidad. (iii) Al lidiar con los cambios tiempo dependientes en los GR es necesario distinguir entre cambios atribuidos a reticulocitos convirtiéndose en GR maduros, y el subsecuente envejecimiento de GR maduros. Existen numerosos cambios (entre ellos en muchas enzimas) que ocurren durante la maduración del reticulocito así como también durante el envejecimiento de los GR, y las fracciones menos densas de GR tienden a tener una alta densidad de reticulocitos, es por lo tanto difícil diferenciar entre ambos procesos. Sin embargo es posible determinar la concentración de reticulocitos en cualquier fracción (Siekmeier, Bierlich et al. 2000). Además, estos niveles son por lo general muy bajos en las fracciones más densas de los glóbulos rojos. Así, aunque la

densidad de fraccionamiento no proporciona una medida precisa de los cambios dependientes del tiempo, puede proporcionar una medida de los cambios que ocurren durante el envejecimiento.

Aunque existen incertidumbres acerca de los cambios que se producen durante el envejecimiento celular, está claro que a medida que el GR envejece disminuye la capacidad de la célula para neutralizar EROS (Glass and Gershon 1984). Esto fue confirmado por estudios (Glass and Gershon 1984), donde se determinó el consumo de azul de tripano después de tratar las células con xantina oxidasa. Ellos encontraron que las células más viejas fueron dañadas más fácilmente. Este aumento de la susceptibilidad al daño oxidativo conduce a una sinergia donde los procesos oxidativos del GR descritos anteriormente son más pronunciados en las células más viejas, exacerbando aún más el proceso de envejecimiento.

También se ha demostrado que durante la vida del GR existe una disminución de volumen y un aumento en la concentración de Hb (Werre, Willekens et al. 2004), observándose glicación de la misma (Bosch, Werre et al. 1992). Los GR envejecidos también tienen menor deformabilidad y una mayor rigidez en su membrana, debido al proceso de vesiculación. Este proceso ocurre durante toda la vida del GR, pero es acelerado en la segunda mitad de la misma (Willekens, Roerdinkholder-Stoelwinder et al. 2003). Las vesículas son rápidamente removidas por el sistema fagocítico mononuclear, especialmente por células Kupffer en el hígado. Esta remoción es mediada por receptores que se unen a fosfatidilserina en la membrana de la vesícula (Willekens, Roerdinkholder-Stoelwinder et al. 2003).

Todas estas señales de senescencia celular no parecen expresarse de forma gradual en los GR sino que aparecen de forma rápida y no lineal en la etapa terminal del proceso de envejecimiento, probablemente inmediatamente antes de la remoción de los GR por el sistema fagocítico mononuclear (Franco 2009).

4.2. Remoción de los GR de la circulación

Los GR maduros, sin núcleo, carecen también de muchas de las características de otras células que son responsables de su supervivencia y correcto funcionamiento. No contienen mitocondrias para un metabolismo oxidativo eficiente, tampoco tienen ADN o ribosomas necesarios para la síntesis proteica para reemplazar las proteínas dañadas, y la síntesis *de novo* de lípidos también está impedida metabólicamente.

Los GR en la circulación sufren senescencia, lo que limita su vida a 100-120 días (Kiefer and Snyder 2000, Arese, Turrini et al. 2005, Bosman, Willekens et al. 2005). Este proceso involucra la unión de hemicromos (producto de oxidación y agregación de la Hb) a la banda 3, agrupamientos de banda 3 y deposición de fragmentos C3 del complemento así como inmunoglobulinas anti-banda 3 (Lutz 2004).

Los GR se encuentran expuestos constantemente a estrés oxidativo durante su vida en la circulación, esto conlleva cambios físicos y bioquímicos constantes. Estos cambios alteran la capacidad de los GR de transportar oxígeno y finalmente provocan la eliminación de los mismos de la circulación por el sistema fagocítico mononuclear. Este sistema involucra a las células fagocíticas mononucleares principalmente en el bazo, y también en el hígado y ganglios linfáticos (Figura 20). Los procesos responsables de la activación real de la eliminación se han estudiado ampliamente (Ajmani and Rifkind 1998, Barvitenko, Adragna et al. 2005, Rogers, Said et al. 2009, Antonelou, Kriebardis et al. 2010). La unión de la inmunoglobulina G autóloga (IgG) a los GR inicia la

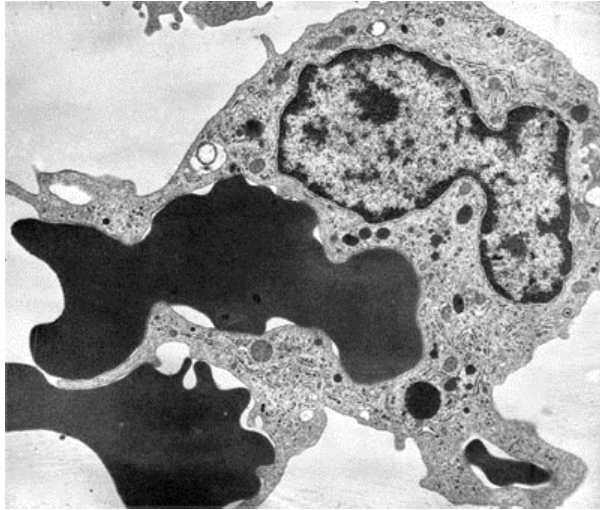


Figura 20. Fagocitosis de GR. Micrografía electrónica de transmisión mostrando la fagocitosis de un GR envejecido por un macrófago del sistema retículo endotelial (tomado de: <http://medcell.med.yale.edu/>).

remoción de los GR senescentes. Un número relativamente pequeño de inmunoglobulinas (100-500 moléculas de IgG/célula) son suficientes para activar la fagocitosis (Kay 2005).

La microvesiculación de la membrana es un proceso regulado que se acelera en las células envejecidas (Wyse and Butterfield 1989) y se afirma es responsable del aumento de la densidad celular junto con una disminución de la deformabilidad y flexibilidad (Bartosz 1991, Waugh, Narla et al. 1992). Estos cambios limitan la capacidad de los GR para mantener la forma bicóncava altamente deformable necesaria para atravesar capilares estrechos, contribuyendo así a su eliminación de la circulación (Rifkind and Nagababu 2013). Se ha demostrado que las vesículas formadas contienen niveles elevados de fosfatidilserina (PS), IgG, y productos de degradación de la banda 3 con sitios antigénicos expuestos, lo que se ha demostrado activa la remoción de los GR de la circulación. Debido a esto se ha sugerido que la vesiculación de los GR podría ser un mecanismo de auto protección para aumentar la vida útil de los mismos (Willekens, Roerdinkholder-Stoelwinder et al. 2003, Willekens, Werre et al. 2008). Los GR senescentes son marcados para su remoción por la unión de IgG autóloga a antígenos de envejecimiento que surgen por cambios en la conformación de la membrana (Kay 2005).

4.3. Eriptosis

Además de la senescencia, se ha visto que los GR pueden sufrir un tipo de muerte programada o eriptosis, la cual se caracteriza por el encogimiento celular, y translocación de fosfatidil serina del interior de la membrana celular a la superficie exterior (Lang, Lang et al. 2006, Lang, Qadri et al. 2012). Como la proteína anexina V se une a la fosfatidil serina con gran afinidad, la misma es utilizada para detectar células eriptóticas (Lang, Lang et al. 2006, Lang, Qadri et al. 2012).

Los GR no poseen núcleo ni mitocondria, elementos críticos en la apoptosis, por lo que no pueden sufrir la clásica apoptosis. Sin embargo la eliminación de los GR envejecidos tiene muchos puntos en común con la apoptosis, como son el encogimiento celular, la formación de vesículas, y la aleatorización de componentes de la membrana celular, llevando a la externalización de fosfatidil serina (Lang, Qadri et al. 2011). La eriptosis

puede ser causada por varios factores que incluyen shock osmótico (Lang, Durantón et al. 2003), depleción de energía (Lang, Roll et al. 2002) y estrés oxidativo (Bracci, Perrone et al. 2002, Lang, Roll et al. 2002, Barvitenko, Adragna et al. 2005). También puede ser estimulada por una amplia variedad de xenobióticos (Felder, Hoelzle et al. 2011, Ghashghaieina, Toulany et al. 2011, Lang, Jilani et al. 2011, Qadri, Kucherenko et al. 2011, Abed, Towhid et al. 2012, Abed, Towhid et al. 2012, Gao, Cheung et al. 2012, Jilani, Lupescu et al. 2012, Lang, Qadri et al. 2012, Zelenak, Pasham et al. 2012, Ahmed, Langer et al. 2013, Zbidah, Lupescu et al. 2013), y la eriptosis excesiva contribuye a la patofisiología de enfermedades como la diabetes (Calderon-Salinas, Munoz-Reyes et al. 2011, Maellaro, Leoncini et al. 2013), insuficiencia renal (Polak-Jonkisz and Purzyc 2012), malaria (Foller, Bobbala et al. 2009, Lang, Kasinathan et al. 2009) y anemia de células falciformes (Lang, Roll et al. 2002).

Antes de la senescencia, los eritrocitos pueden experimentar daños que pueden comprometer su integridad y su supervivencia (Lang, Qadri et al. 2011). En promedio, los GR pasan una vez por minuto por los pulmones donde se ven expuestos a estrés oxidativo, y por los riñones y la médula donde se ven sometidos a shock osmótico. Además los GR tienen que pasar por capilares que son más pequeños que la célula (Lang, Lang et al. 2005), debido a esto la integridad del eritrocito se ve constantemente desafiada (Pandey and Rizvi 2011). Además de estos desafíos los GR también se ven expuestos a las acciones oxidativas de las EROs producidas en la circulación (Perrone, Tataranno et al. 2012), así como a una variedad de xenobióticos durante su vida en la circulación (Pandey and Rizvi 2011). En estas condiciones los GR pueden sufrir eriptosis, removiendo los GR dañados del sistema circulatorio. La eriptosis también puede resultar de defectos genéticos en enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, o defectos en la síntesis de Hb como talasemia o anemia de células falciformes (Lang, Qadri et al. 2012).

Tanto el encogimiento celular como la externalización de fosfatidil serina puede resultar en un aumento en el Ca^{2+} intracelular (Lang, Qadri et al. 2012), el cual puede entrar por los canales catiónicos no selectivos permeables a Ca^{2+} (Foller, Kasinathan et al. 2008, Foller, Sopjani et al. 2009), los cuales son activados por prostaglandinas (Kaestner and Bernhardt 2002, Lang, Kempe et al. 2005) y por estrés oxidativo (Duranton, Huber et al. 2002, Brand, Sandu et al. 2003). La entrada de Ca^{2+} activa los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} (Brugnara, de Franceschi et al. 1993), produciendo la fuga de K^+ , hiperpolarización de la membrana celular, fuga de Cl^- y consecuentemente la pérdida de KCl y agua por osmosis (Lang, Kaiser et al. 2003). La pérdida de KCl es mayor que la entrada simultánea de Na^+ . La disminución de K^+ celular lleva a una despolarización gradual. Eventualmente el aumento de Na^+ excede la pérdida de K^+ y la célula se hincha (Lang, Busch et al. 1998). El hinchamiento excesivo de la célula conduce a una ruptura en la membrana con consiguiente hemólisis (Lang, Busch et al. 1998, Durantón, Huber et al. 2002). La concentración elevada de Ca^{2+} activa la translocación de fosfatidil serina a la superficie del GR (Berg, Engels et al. 2001). Además del estrés oxidativo, la eriptosis también puede ser inducida por shock osmótico (Lang, Durantón et al. 2003), depleción de energía (Klarl, Lang et al. 2006) y activación de caspasas (Lang, Qadri et al. 2012, Lau, Chen et al. 2012, Maellaro, Leoncini et al. 2013).

La eriptosis es inhibida por el *NO (Nicolay, Liebig et al. 2008). En células nucleadas el *NO inhibe la apoptosis, en parte debido a la inhibición de caspasas (Dimmeler, Haendeler et al. 1997, Rossig, Fichtlscherer et al. 1999), éstas sin embargo no son de

importancia crítica para la activación de la eriptosis. De forma similar a lo que ha sido observado para la apoptosis de células nucleadas (Melino, Bernassola et al. 1997, Haendeler, Hoffmann et al. 2002, Haendeler, Hoffmann et al. 2004, Benhar and Stamler 2005), el *NO puede ser efectivo contra la eriptosis por la nitrosilación de enzimas necesarias para la inducción de la aleatorización de los fosfolípidos de membrana (Nicolay, Liebig et al. 2008).

5. GR en almacenamiento para transfusión

La transfusión de sangre puede salvar vidas de pacientes que pasan por una intervención quirúrgica prolongada o quienes sufren de una enfermedad congénita o adquirida. La transfusión de glóbulos rojos se usa principalmente para tratar hemorragias severas y para mejorar el transporte de oxígeno tisular. Para asegurar la seguridad y calidad de los productos sanguíneos, su recolección, producción y almacenamiento en los bancos de sangre a nivel mundial se rige por rigurosos protocolos elaborados por las autoridades sanitarias. Los concentrados de GR para transfusión son un producto muy preciado, con una vida útil corta, por lo tanto necesita de una donación de sangre permanente. Se ha generado una industria de productos sanguíneos artificiales y una línea intensa de investigación en sangre artificial o sustitutos, “hemoglobin-based oxygen carriers” (HBOC), “blood substitutes” (Mozzarelli, Ronda et al. 2010).

Continuamente se buscan soluciones alternativas, más eficientes y en lo posible más económicas. Al ser la sangre de donantes el producto aún más utilizado, preciado y escaso, se trata de mejorar las condiciones de almacenamiento para prolongar su vida útil, siendo éste un particular foco de la medicina de transfusión. El uso de nuevas bolsas plásticas y mejores soluciones de preservación, ha logrado extender el uso de concentrado de GR para transfusión a 42 días (6 semanas) a 4 °C.

En Uruguay se establece que la sangre para transfusión debe ser extraída en citrato-fosfato-dextrosa (CPD) como anticoagulante, centrifugar, separar el plasma y almacenar los glóbulos rojos en solución salina de adenina, glucosa y manitol (SAGM). No se realiza leucofiltración, aunque se ha demostrado que la remoción de los glóbulos blancos disminuye la acumulación de oxidantes EROS y mejora las condiciones de almacenamiento (D'Alessandro, D'Amici et al. 2012). Otra demostración reciente ha sido la mejor performance de nuevas soluciones de preservación, “alternative storage solutions, AS”, AS-1 y AS-3 y más recientemente AS-7, que la tradicional SAGM (Sparrow 2012). Otra estrategia para retardar el agotamiento de ATP del GR durante períodos prolongados de almacenamiento, es la suplementación con una solución de “rejuvenecimiento” que contiene adenina, inosina, fosfato de sodio y piruvato (Meyer, Dumont et al. 2011). También se ha usado un protocolo de rejuvenecimiento, que consiste en tratar los concentrados de GR con esta solución de rejuvenecimiento inmediatamente antes de ser transfundidos, aunque los resultados han sido controversiales (Valeri, Vecchione et al. 1980, Valeri, Zaroulis et al. 1980).

Dado el papel central que juega el estrés oxidativo en la generación de lesiones de almacenamiento (storage lesions), se han propuesto varias formulaciones que incluyen altas dosis de antioxidantes, en particular vitamina C, E y glutatión (Stowell, Smith et al. 2013, Pallotta, Gevi et al. 2014, Pallotta, Naro et al. 2014). Si bien se observaron mejoras en términos de homeostasis redox, menor fragilidad de membrana, preservación de la morfología y mejor recuperación post-transfusión en modelo

murino (Stowell, Smith et al. 2013), se reportaron consecuencias negativas en el metabolismo energético ya que algunos antioxidantes como DHA compiten con glucosa por el transportador GLUT (Pallotta, Gevi et al. 2014). Algunos han recomendado que los donantes aumenten la ingesta de antioxidantes en la dieta, previo a la donación de sangre. Otra propuesta ha sido la remoción de vesículas por filtración, previo a la transfusión, de manera de disminuir respuestas inmunogénicas e inflamatorias en los pacientes transfundidos (Cortes-Puch, Wang et al. 2014, Silliman, Kelher et al. 2014). Lo último en medicina de transfusión es la posibilidad de usar células madre ex vivo induciéndolas a diferenciarse en eritrocitos maduros para la transfusión (revisado en (Zeuner, Martelli et al. 2012)

5.1. Requerimientos para la transfusión

El almacenamiento de los GR para transfusión está acompañado de la exacerbación del proceso de envejecimiento, proceso al que se refiere muchas veces como “lesiones de almacenamiento” (Wolfe 1985, D'Alessandro, Liumbruno et al. 2010, Hess 2010, Lion, Crettaz et al. 2010, Karon, van Buskirk et al. 2012). Las condiciones de almacenamiento imponen un desafío importante para la manutención del metabolismo de los GR (Gevi, D'Alessandro et al. 2012), especialmente para los compuestos de fosfato de alta energía como son el ATP y 2,3-DPG (D'Alessandro, Liumbruno et al. 2010, Hess 2010, Lion, Crettaz et al. 2010, D'Alessandro, D'Amici et al. 2012, Gevi, D'Alessandro et al. 2012, Karon, van Buskirk et al. 2012).

Los requerimientos para que los GR puedan ser transfundidos son que al final del período de almacenamiento, un promedio de al menos 75% de los GR permanezcan en la circulación luego de 24h post- transfusión (Aalberts, Schuurman et al. 2010), y que la hemólisis sea menor a 1% (Zimrin and Hess 2009).

El método más utilizado para medir la sobrevida y la recuperación de las células transfundidas, es marcar las mismas con Cr⁵¹ (Hess 2006), aunque recientemente también se está utilizando la marcación con biotina (Mock, Widness et al. 2014). La recuperación es la fracción de células inyectadas que circulan luego de la infusión, y la sobrevida es el periodo de tiempo por el que circulan. En estos estudios la sangre que es transfundida es la del propio voluntario, o sea que el donante y el receptor son la misma persona (Zimrin and Hess 2009). Estos estudios tienen la ventaja que la remoción mediada por anticuerpos no interfiere con las observaciones, y la reducción en la recuperación y la sobrevida puede ser atribuida al daño de las células debido al sistema de almacenamiento o al paso del tiempo. El problema de este método es que consume mucho tiempo, somete a los voluntarios a niveles bajos de radiación y da resultados muy distintos de un voluntario a otro (Reid, Babcock et al. 1999), observándose que los GR de algunos voluntarios se conservan mejor que los de otros (Reid, Babcock et al. 1999).

5.1.1. Cómo se almacenan los GR para transfusión

La sangre total se extrae del donante en una solución de CPD (3,27 g/l Ácido Cítrico, 26,3 g/l Citrato Trisódico, 2,51 g/l Fosfato de Sodio y 25,5 g/l Glucosa), la cual evita su coagulación. Luego se separan los GR por centrifugación y se almacenan a 4°C en medio SAGM (NaCl 8,8 g/L, Glucosa 8,2 g/L, Manitol 5.2 g/L y adenina 0.3 g/L).

El período de almacenamiento de los GR fue aumentado de 21 a 28 días con la adición de fosfato a la solución, a 35 días con la adición de adenina, y finalmente a 42 días con la utilización de una solución salina adicionada con adenina, glucosa y manitol (SAGM) (Hogman, Hedlund et al. 1978, Beutler and West 1979, Hogman and Hedlund 1985,

Moroff, Holme et al. 1990, Hess, Rugg et al. 2006), solución que es utilizada actualmente para su almacenamiento en Uruguay.

Algunos países han acortado la duración del almacenamiento de los GR, con la expectativa de aumentar la calidad de los GR transfundidos. Como ejemplo Japón redujo el período de almacenamiento en 1995 de 42 días a 21 días, reduciendo así el riesgo de reacciones sépticas (Sakakibara and Juji 1986, Otani, Oki et al. 2012).

La leuco reducción, introducida en el Reino Unido a finales de 1990 (AuBuchon, Elfath et al. 1997) para reducir la transmisión de virus, tuvo como efecto la reducción de la hemólisis (Williamson, Rider et al. 1999). Sin embargo los GR siguen deteriorándose durante el almacenamiento, lo que se ha visto implicado con problemas clínicos en ciertas categorías de pacientes transfundidos (Wang, Sun et al. 2012).

En 2008, Koch et al. concluyeron que la transfusión con GR concentrados almacenados por varias semanas, aumentaban significativamente el riesgo de complicaciones post-cirugía cardíaca (Koch, Li et al. 2008). Por otro lado, otros estudios no vieron diferencias clínicas en pacientes transfundidos con GR almacenados por corto o largo plazo (Ho, Sibbald et al. 2003, Leal-Noval, Jara-Lopez et al. 2003, Middelburg, van de Watering et al. 2013, Lacroix, Hebert et al. 2015). De todas formas, persiste la controversia sobre políticas de transfusión restrictivas vs liberales.

5.2. Cambios durante el almacenamiento

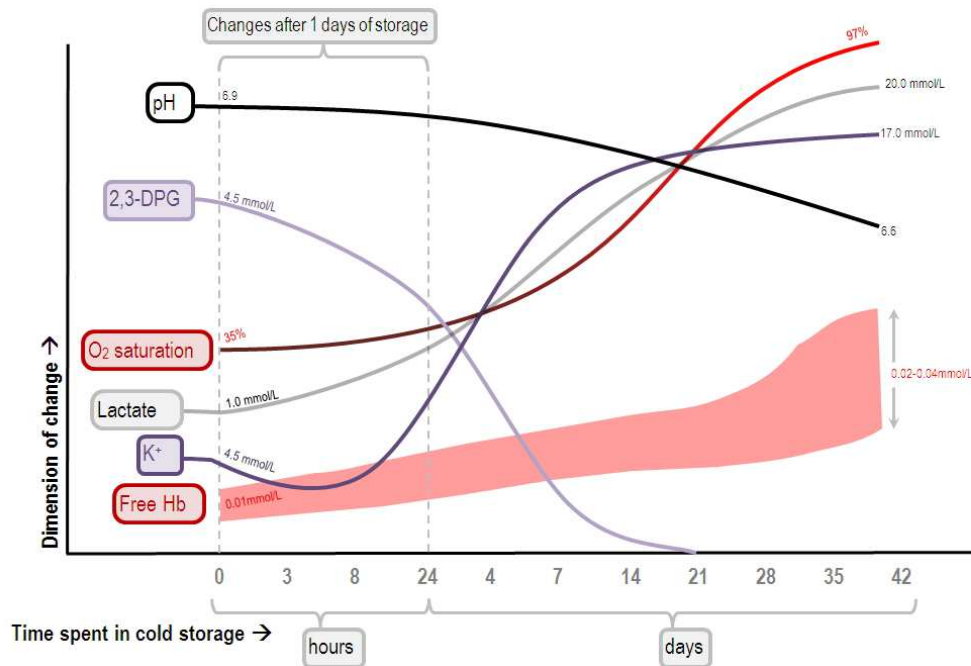


Figura 21. Cambios metabólicos durante el almacenamiento. Se observa la variación de: pH, 2,3-difosfo glicerato, saturación de O₂, lactato, potasio y Hb libre durante el almacenamiento de un concentrado de GR. Imagen obtenida de (<http://www.derangedphysiology.com/>), realizada a partir de (Beutler, Meul et al. 1969, Bennett-Guerrero, Veldman et al. 2007, Hess 2010)

Durante el almacenamiento los GR sufren varias modificaciones metabólicas y funcionales (Bosman, Werre et al. 2008), algunas de las cuales son reversibles. Estos cambios incluyen encogimiento celular, remodelación de membrana, enlentecimiento

del metabolismo con concentración disminuida de ATP, acidosis con concentración disminuida de 2,3-DPG, pérdida de potasio intracelular, hemólisis, daño oxidativo con cambios en la estructura de la banda 3, peroxidación lipídica, pérdida de membrana y aumento en la vesiculización (Hess and Greenwalt 2002, Zimrin and Hess 2009) (Figura 21).

Generalmente, una variedad de sistemas antioxidantes en la célula contrarresta los efectos de las especies reactivas del oxígeno. Cuando se llega a estrés oxidativo y la capacidad antioxidante de los GR es sobrepasada, como durante el almacenamiento, la acumulación de EROS lleva a una oxidación progresiva de la Hb, la cual se une al dominio citoplasmático de la banda 3 (Arese, Turrini et al. 2005, Bosman, Werre et al. 2008, Pantaleo, Giribaldi et al. 2008). Esta cascada de eventos termina induciendo agregados de banda 3, promoviendo la producción de anticuerpo anti-banda 3 y la consiguiente activación del complemento, marcando la célula para su remoción (Kay 1984, Lutz, Bussolino et al. 1987). El daño que las EROS producen en las proteínas depende de la duración del almacenamiento, pero también está relacionado con la dieta del donante y su estilo de vida (como por ejemplo realizar deportes o fumar). Debido a los cambios producidos durante el almacenamiento aproximadamente el 25% de los eritrocitos transfundidos desaparece de la circulación 24 horas luego de la transfusión (Hogman and Meryman 1999), y las gráficas de supervivencia a largo plazo para los GR muestran un tiempo de vida disminuido para los GR remanentes (Mollison 2005).

El almacenamiento lleva a un acortamiento en la vida media en un número considerable de los GR transfundidos (Heaton 1992). Aunque existen algunas diferencias en el perfil de envejecimiento entre los GR *in vivo* y *ex vivo* (Bosman, Werre et al. 2008), parte de los GR en almacenamiento expresan rápidamente señales típicas de senescencia y eritroposis, como formación de complejos Banda 3-IgG (Bosman and Kay 1988) y la exposición de fosfatidil serina (Bessos and Seghatchian 2005). La mayoría de las alteraciones mencionadas ocurren *in vivo* también, lo que lleva a especular que el almacenamiento causa una aceleración en el envejecimiento celular (Bosman and Kay 1988). De hecho durante el almacenamiento, la morfología de los GR cambia progresivamente de discos biconcavos a células con espículas (equinocitos), las espículas se desprenden del equinocito en forma de micro y nano vesículas conteniendo lípidos y Hb entre otras proteínas (Berezina, Zaets et al. 2002, Greenwalt 2006, Bosman, Lasonder et al. 2008)(Figura 22). La pérdida que este proceso conlleva en la flexibilidad de la célula es solo parcialmente reversible, y reduce la habilidad de los GR de pasar por la microcirculación (La Celle 1969, Stadler, Toumbis et al. 1994, Kirkpatrick, Adams et al. 1998, Izzo, Manicone et al. 1999). Esto lleva a una disminución en el flujo microvascular, con hipoxia local, y puede contribuir a trastornos hemorreológicos en pacientes en estado crítico (Tinmouth and Chin-Yee 2001, Ho, Sibbald et al. 2003).

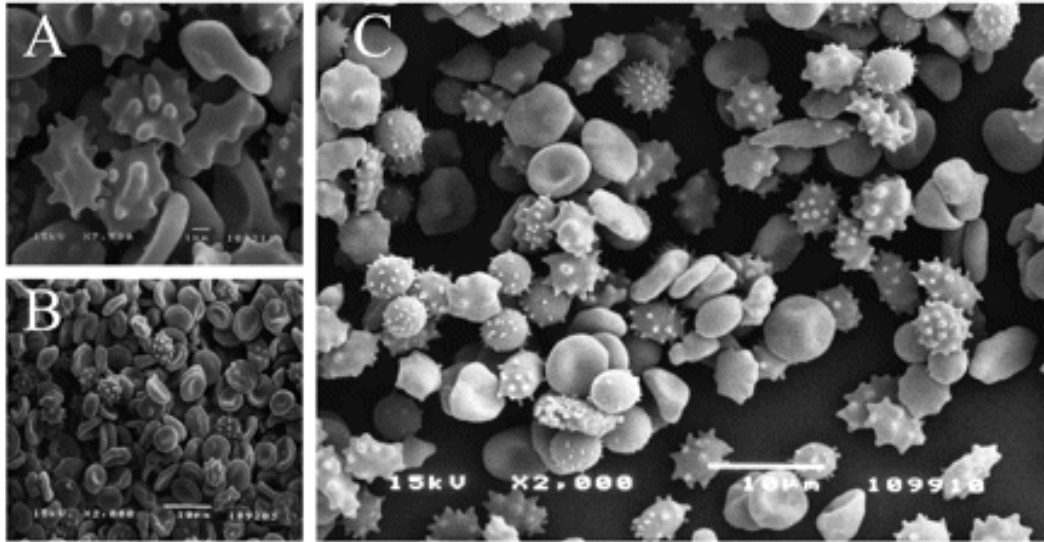


Figura 22. Cambios morfológicos durante el almacenamiento. (A) Detalle de equinocitos tomados mediante microscopía electrónica de barrido de una muestra de GR almacenados durante 42 días (7,500x; barra corresponde a 1 µm). (B) Vista panorámica (2,000x; barra corresponde a 10 µm) de GR con 28, y (C) 42 días de almacenamiento). Imagen obtenida de (D'Alessandro, D'Amici et al. 2012)

La mayoría de las modificaciones irreversibles son consecuencia de daño oxidativo que ocurre en los GR *in vivo* y durante el almacenamiento (Pradhan, Weiser et al. 1990). De hecho, la Hb en la sangre venosa está parcialmente saturada con oxígeno, por lo que el oxígeno está constantemente dejando una molécula de Hb y uniéndose a una nueva. Esta reacción no es perfectamente reversible, y ocasionalmente el oxígeno saliente se lleva un electrón, formando metahemoglobina férrica y anión superóxido. Normalmente la metahemoglobina es reducida (por la metahemoglobina reductasa dependiente de NADH), y el superóxido es dismutado (via SOD) sin consecuencias, pero ocasionalmente el superóxido interacciona con hierro y agua en la reacción de Fenton para formar radical hidroxilo, o reaccionar con NO para formar ONOO-, oxidantes fuertes que pueden atacar y dañar proteínas y lípidos.

La membrana de los GR tiene un canal Ca-ATPasa, el que mantiene una baja concentración intracelular de calcio (Larsen, Katz et al. 1981). Debido a la hipotermia durante el almacenamiento, dicha homeostasis de calcio es interrumpida, y hay un aumento gradual en el calcio intracelular (Samaja, Rubinacci et al. 1990, Kiefer and Snyder 2000). Un aumento en el calcio intracelular activa el canal de potasio Gardos, causando una fuga de potasio de la célula, y resultando en el encogimiento y alteración de la deformabilidad celular (Brugnara 1993, Foller, Kasinathan et al. 2008). El calcio también activa la μ -calpaina, algunas caspasas y a la transglutaminasa-2 que pueden degradar y entrecruzar proteínas del citoesqueleto (Redding, Record et al. 1991). También inhibe a la fosfotirosina fosfatasa, aumentando la fosforilación de la banda 3 (Zipser, Piade et al. 2002).

La bicapa lipídica de los GR contiene una distribución asimétrica de fosfolípidos, la fosfatidilserina se mantiene en la superficie interior por la competencia entre escramblasa que aleatoriza la distribución y la flipasa que internaliza a la PS. El aumento de calcio intracelular se ha relacionado con la exposición de PS, lo que

desencadena la interacción con los macrófagos y la eriptosis (Daleke 2008, Foller, Huber et al. 2008, Weiss, Rees et al. 2011). La activación de la caspasa-3, que modifica la unión de la banda 3 a ankirina y al citoesqueleto, y la actividad flipasa, inducen la exposición PS.

Existe evidencia de la asociación de proteínas a la membrana de los GR, la cual aumenta durante el almacenamiento (Rinalducci, D'Amici et al. 2011). Se ha demostrado que proteínas citosólicas como Hb, 2, 3 difosfoglicerato mutasa (2,3-BGM), CAT y Prx2 migran a la membrana del GR durante el período de almacenamiento. La asociación de la Hb con la membrana es un proceso conocido, de hecho existen estudios que demuestran un aumento de Hb en fantasmas de GR luego de un período prolongado de almacenamiento (Wolfe, Byrne et al. 1986, Kriebardis, Antonelou et al. 2007, Bosman, Lasonder et al. 2008), y la unión no reducible de Hb con proteínas del citoesqueleto como espectrina, ankirina y banda 3, a partir del día 21 de almacenamiento (Rinalducci, D'Amici et al. 2011). El entrecruzamiento entre la espectrina y la Hb se ha reportado en células senescentes *in vivo* (Snyder, Leb et al. 1983), y puede ser reproducido *in vitro* tratando las células con peróxido de hidrógeno (Snyder, Fortier et al. 1985). En cualquier caso, la migración a la membrana representa un proceso de envejecimiento celular. De igual modo, la individualización de 2,3-BGM en la membrana de los GR parece ser un proceso relacionado al envejecimiento, probablemente debido a una preparación de los GR para la eliminación de proteínas dañadas a través de la vesiculación, en una especie de mecanismo protector (Bosman, Lasonder et al. 2008, Willekens, Werre et al. 2008). De acuerdo con esta hipótesis se ha detectado 2,3-BGM en micropartículas originadas de GR con 42 días de almacenamiento (Bosman, Lasonder et al. 2008, Rubin, Crettaz et al. 2008).

La CAT es una enzima citosólica, pero se ha reportado que los GR estresados metabólicamente presentan acumulación dependiente de calcio de CAT unida a la membrana (Allen, Cadman et al. 1977), y también se ha observado un aumento en su unión a la membrana durante el almacenamiento de los GR (Rinalducci, D'Amici et al. 2011), sugiriendo que su presencia en la membrana puede representar una localización óptima para protección contra el estrés.

La Prx2 humana reside en el citoplasma en forma dimérica y decamérica en un equilibrio dinámico (Kristensen, Rasmussen et al. 1999). Aunque la Prx2 es una proteína citosólica, se ha reportado su asociación a la membrana en los GR (Moore, Mankad et al. 1991, Plishker, Chevalier et al. 1992, Moore, Shriver et al. 1997, Murphy, Samuel et al. 2004, Rocha, Vitorino et al. 2008, Rocha, Costa et al. 2009), así como su unión a la Hb para prevenir su oxidación (Stuhlmeier, Kao et al. 2003). Sin embargo existen estudios que sugieren que la oxidación de la Hb y la unión de la Prx2 a la membrana son procesos independientes aunque ambos son inducidos por estrés oxidativo.

Estos cambios en los GR producen, luego de la transfusión, la adhesión a la superficie endotelial, con consecuencias proinflamatorias (Chin-Yee, Keeney et al. 1998, Jeney, Balla et al. 2002, Tinmouth, Fergusson et al. 2006). Otro efecto secundario es la generación de aloanticuerpos y autoanticuerpos contra antígenos de GR. La transfusión expone al receptor a antígenos extraños, lo que puede llevar al desarrollo de anticuerpos antieritrocitos, especialmente en pacientes con múltiples transfusiones (Young, Uzieblo et al. 2004, Garratty 2005).

Todas estas anomalías se relacionan con la promoción de la eriptosis que compromete la sobrevivencia de los GR luego de la transfusión (Lang and Qadri 2012).

La carbonilación de las proteínas del GR es una marca de la exposición a estrés oxidativo. Esta aumenta a medida que progresa el almacenamiento (Kriebardis, Antonelou et al. 2006, Kriebardis, Antonelou et al. 2007, D'Alessandro, D'Amici et al. 2012) (Antonelou, Tzounakas et al. 2012).

Por otro lado se ha reportado que la glicosilación dependiente de EROS afecta a las proteínas más abundantes en el citosol (principalmente cadenas α y β de Hb) (D'Alessandro, Mirasole et al. 2013) y a las proteínas de membrana (Sparrow, Veale et al. 2007). Este proceso puede verse acelerado por la excesiva glucosa encontrada en la solución aditiva. De hecho al final de período de almacenamiento de GR en CPD-SAGM la concentración aproximada de glucosa es 1mM (D'Alessandro, Liumbruno et al. 2010), lo que es mayor que la concentración de glucosa circulante en pacientes diabéticos (Ellmerer, Pachler et al. 2008).

5.3. Vesiculación

Durante su almacenamiento los GR cambian de forma, de discos deformables a equinocitos deformados (Hovav, Yedgar et al. 1999, Tinmouth, Fergusson et al. 2006). Estos cambios se deben a la pérdida irreversible de porciones de membrana celular, la cual ocurre tanto *in vivo* como durante el almacenamiento, debido al desprendimiento de microvesículas (Bessis and Mandon 1972, Laczko, Szabolcs et al. 1985) (Figura 23). *In vivo* estas microvesículas son removidas rápidamente por el sistema fagocítico mononuclear (Bocci, Pessina et al. 1980, Willekens, Roerdinkholder-Stoelwinder et al. 2003). Durante el almacenamiento esta pérdida de membrana, junto con la pérdida de ATP, 2,3-DPG, Hb, y viabilidad, contribuyen a las llamadas lesiones por almacenamiento en los GR. Las microvesículas que se desprenden durante el almacenamiento contienen antígenos sanguíneos A, B, H, P1, D, C, E y F, también contienen lípidos, banda 3, glicoporinas y actina, pero no tienen espectrina ni ankirina (Michel 1964, Cole, Rumsby et al. 1978, Greenwalt, Bryan et al. 1984, Oreskovic, Dumaswala et al. 1992).

Ya en 1980, micrografías electrónicas de barrido demostraron la acumulación de vesículas de 50 a 25 nm de diámetro producidas por GR que habían sido almacenados por 21 días en citrato, fosfato y dextrosa, CPD (Greenwalt, Steane et al. 1980). Posteriormente se descubrió que las vesículas están presentes en el plasma, pero en menor cantidad (Dumaswala and Greenwalt 1984). Esto probablemente se deba a que las mismas son removidas de la circulación por el sistema retículoendotelial (Bocci, Pessina et al. 1980). Por otro lado se ha demostrado que las poblaciones más jóvenes de GR eliminan mayor cantidad de vesículas durante el almacenamiento que las poblaciones envejecidas (Dumaswala and Greenwalt 1984), sugiriendo que la remodelación de la membrana continúa durante el envejecimiento normal del GR (Greenwalt 2006).

Las microvesículas y los GR que han perdido porciones de su membrana se acumulan durante el almacenamiento. La pérdida de banda 3 resulta en cambios metabólicos que son irreversibles (Solheim, Flesland et al. 2004). Las células más rígidas se hemolisan y son rápidamente removidas de la circulación cuando son transfundidas (Hess and Greenwalt 2002). Las células remanentes pueden no circular tan eficientemente cuando son transfundidas, llevando a complicaciones post

transfusionales (Kirkpatrick, Adams et al. 1998, Zallen, Offner et al. 1999, Berezina, Zaets et al. 2002), y la superficie de membrana alterada aumenta la actividad procoagulante (Stadler, Toumbis et al. 1994).

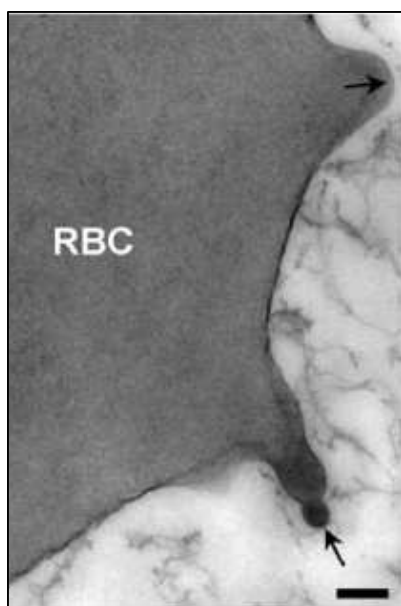


Figura 23. Microvesículas durante el almacenamiento. Microscopía electrónica convencional de GR de 32 días de almacenamiento, donde se observa la vesiculación en la membrana de un GR que ha adquirido forma de equinocito con salientes (flecha). La barra corresponde a 0,5 μm . Imagen obtenida de (Antonelou, Kriebardis et al. 2010)

5.4. Concentrados de GR en Uruguay

La falta de GR para transfusión es un problema de relevancia mundial, en Uruguay se gastan 10 millones de dólares al año en compra de hemoderivados debido a la falta de donantes. En los últimos años, el marcado aumento en los accidentes de tránsito ha producido una demanda masiva de GR. Sin embargo la demanda de GR varía durante el año, lo que se traduce en momentos de escases y momentos de sobrantes de GR. Los momentos de mayor recolección de GR son cuando se realizan campañas masivas incentivando la donación, sin embargo debido a la corta vida media de los concentrados de GR para transfusión, los mismos muchas veces terminan siendo descartados. En el 2014 el 12% de los concentrados de GR donados fueron descartados por haber superado su vida útil.

La mejora en las condiciones de almacenamiento, y el aumento en el tiempo de conservación de los GR sería una herramienta muy fuerte para disminuir la escases de GR, así como el descarte de los mismos por haber expirado sin haber sido utilizados.

6. Propuestas para mejorar la calidad del almacenamiento

Se han sugerido 2 intervenciones que pueden mejorar la calidad, seguridad y eficacia de los concentrados de GR que son almacenados por períodos largos (i) remoción de oxígeno y almacenamiento anaeróbico y (ii) formulación de nuevas soluciones de almacenamiento.

Se ha demostrado que el almacenamiento anaeróbico de los GR, mediante la desoxigenación de los GR, tiene el potencial de extender la vida de los concentrados de eritrocitos hasta 63 días (D'Alessandro, Gevi et al. 2013), preservando mejor los reservorios de ATP y 2,3-DPG (Yoshida, AuBuchon et al. 2007). Sin embargo, la remoción de oxígeno no resulta en niveles menores de estrés oxidativo en la regeneración post transfusión (Rogers, Said et al. 2009, D'Alessandro, Gevi et al. 2013),

al contrario, la hipoxia limita la capacidad antioxidante de los GR ya que bloquea el cambio metabólico a la vía de las pentosas fosfato (Rogers, Said et al. 2009, D'Alessandro, Gevi et al. 2013) que es la responsable de la producción de NADPH, el cual a su vez es esencial para mantener la homeostasis de varias enzimas antioxidantes, en particular las involucradas en la homeostasis de GSH.

En paralelo, alternativas de almacenamiento buscan la formulación de soluciones nuevas de almacenamiento, principalmente basándose en la modulación del pH (que afecta la actividad de las enzimas glicolíticas, lo que a su vez promueve el mantenimiento de los reservorios de ATP y 2,3-DPG) (Hess, Hill et al. 2002, Burger, Korsten et al. 2010, Veale, Healey et al. 2011), y la suplementación con sustratos de carbono para aumentar la producción energética (Yoshida, AuBuchon et al. 2008).

6.1. Suplementación con antioxidantes

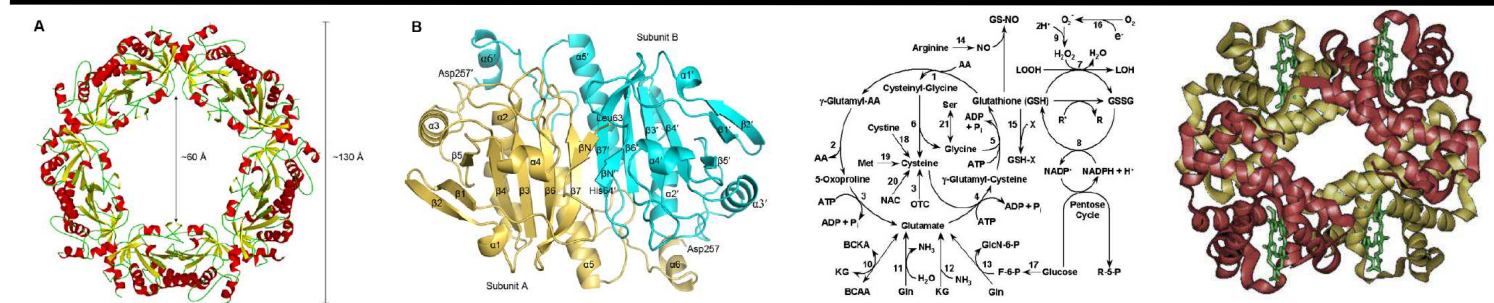
La adición de antioxidantes a los GR en almacenamiento podría tener el potencial de disminuir las lesiones oxidativas (Knight, Voorhees et al. 1992, Dumaswala, Wilson et al. 2000). Los estudios para una mejor preservación de los GR han observado los beneficios de la adición de antioxidantes como la vitamina C a la solución de almacenamiento (Dawson, Hershey et al. 1980, Dawson, Hershey et al. 1981, Stowell, Smith et al. 2013). Los niveles de ascorbato en los GR *in vivo* son los mismos que en el plasma (May 1998), aunque los GR tienen una alta capacidad para regenerar esta vitamina a partir de su forma oxidada ácido dehidroascórbico (Rizvi, Pandey et al. 2009). Además el ascorbato ayuda a preservar el alfa-tocoferol (vitamina E) de la oxidación, compuesto que se encuentra en las lipoproteínas y en la membrana de los GR (May, Qu et al. 1998).

El ácido ascórbico puede disminuir el estrés oxidativo durante el almacenamiento de GR de individuos con talasemia (Freikman, Amer et al. 2008, Freikman, Ringel et al. 2011), los cuales tienen un nivel alto de estrés oxidativo en comparación con los GR de individuos sanos (Amer, Goldfarb et al. 2004), e inhibir la eritrosis (Mahmud, Qadri et al. 2010). Además un estudio realizado en GR humanos demostró que la adición de ácido ascórbico (0.25 mM) a GR humanos reduce la hemólisis a los 52 días de almacenamiento (Raval, Fontes et al. 2013).

Por otro lado, los tioles de bajo peso molecular protegen directamente contra el estrés oxidativo. Se ha propuesto utilizar GSH en concentración mM como aditivo para las soluciones de almacenamiento (Dumaswala, Wilson et al. 2000). Más recientemente se ha combinado N-acetil cisteína (NAC) como precursor de GSH, junto con otros antioxidantes en la preservación de los concentrados de GR (Pallotta, Gevi et al. 2014, Bayer, Hampton et al. 2015).

El NAC tiene un importante potencial antioxidante, ya que se ha demostrado que reduce el estrés oxidativo en pacientes con anemia falciforme (Nur, Brandjes et al. 2012). Tiene efectos sobre la inflamación y la función vasomotora, y se utiliza en la clínica como agente mucolítico. Además el NAC entra a las células y en el citoplasma se convierte en L-cisteína, la cual es un precursor de GSH (Zafarullah, Li et al. 2003, Arruda, Mecabo et al. 2013). Se ha demostrado que la adición de NAC, pero no de GSH a los GR humanos puede restaurar parcialmente la concentración intracelular de tioles, luego del tratamiento con agentes oxidantes (Mazor, Golan et al. 1996).

2. Hipótesis y Objetivos



1. Hipótesis

Se plantea la hipótesis de que cambios redox a nivel de los sulfhidrilos intracelulares del eritrocito, en particular de glutatión y peroxirredoxina, se correlacionan con las *lesiones por almacenamiento* en los GR concentrados para transfusión, entonces la intervención farmacológica mediante la suplementación del medio de conservación con el antioxidante NAC (compuesto aprobado por la FDA, EEUU), podría disminuir dichas lesiones, aumentando la vida útil de estos GR para transfusión.

2. Objetivo General

Estudio de los cambios redox producidos en los GR humanos durante el almacenamiento de los mismos previo a la transfusión, y efecto de la suplementación con NAC.

2.2. Objetivos específicos

- Medida de la concentración y estado redox de sulfhidrilos intraeritrocitarios de bajo peso molecular
- Observación de cambios en la estructura, localización y estado redox de la enzima citosólica Peroxirredoxina 2
- Estudio de la glutationilación de proteínas citosólicas
- Estudio de cambios en el consumo de H_2O_2 con el almacenamiento de los GR
- Evaluación del ingreso de NAC al GR y efectos sobre el envejecimiento de los mismos.

1. Reactivos y materiales

A menos que se especifique lo contrario todos los reactivos fueron obtenidos de SIGMA (EEUU) y AppliChem (Alemania).

Los anticuerpos anti-GSH fueron obtenidos de Abcam (Anti- Glutathione antibody [D8] ab 19534). Los anticuerpos anti-Prx2 se obtuvieron de Abfrontier (Anti-Peroxiredoxin 2 1E8 LF-MA0144). Los anticuerpos secundarios policlonales fluorescentes se obtuvieron de LI-COR Biosciences Inc.

2. Obtención de muestras

Los concentrados de GR fueron obtenidos del Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas de la Universidad de la República, previo consentimiento informado de los donantes. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de dicho hospital. Para la obtención de los concentrados la sangre total donada se mezcla en el momento de la extracción con una solución de citrato, fosfato y dextrosa (CPD), para evitar su coagulación. Posteriormente se centrifugan para separar el plasma y los glóbulos blancos de los GR, los cuales se almacenan a una densidad de 8.77 g/L en una solución denominada SAGM (NaCl 8,8 g/L, Glucosa 8,2 g/L, Manitol 5.2 g/L y adenina 0.3 g/L; OPTISOL, Terumo Corporation, Tokio, Japón). Procedimiento realizado por el personal del Hospital de Clínicas. Luego de analizadas las muestras por la presencia de virus patógenos, éstas fueron liberadas (aproximadamente 3 días después de la extracción) e inmediatamente se procedió a alicuotar las mismas en 2 bolsas de transfusión (Terumo Corporation, Tokio, Japón) de igual volumen, en condiciones estériles, una de las cuales fue suplementada con NAC (en distintas concentraciones finales) y se almacenaron a 4°C.

3. Procesamiento de las muestras

Para realizar los análisis se extrajeron 7 mL de concentrado de GR de las bolsas preservadas bajo las condiciones del banco de sangre a los días de almacenamiento 3, 21, 42 y 60, preservando la esterilidad de las mismas. Se centrifugaron las células a 1000xg por 10 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante (aproximadamente 2 mL). Luego se realizaron 3 lavados con 10 mM fosfato, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH7,4 (PBS), utilizando un volumen de 5 mL más el volumen que se haya obtenido de sobrenadante, centrifugando a 1000xg 10 minutos a 4°C. Finalmente se descartan los 5 mL extra de PBS. Todas las centrifugaciones se realizaron en centrífuga refrigerada (Sigma SK-18). Para el análisis por western blot, previo a los lavados, los GR se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente con 5 mL de PBS conteniendo 50 mM N-etilmaleimida (NEM), y luego se realizaron los lavados correspondientes con este mismo buffer. Posteriormente se lisaron los GR congelando a -80°C con inhibidor de proteasas para células eucariotas (Abcam, Cambridge, UK). Finalmente se separó la fracción citosólica de la membrana por centrifugación a 7000xg durante 20 minutos a 4°C.

4. Cuantificación celular

Posteriormente a los lavados, y previo a la lisis celular, se realizó un conteo del número de células totales, a modo de trabajar siempre con la misma cantidad. El recuento celular se realizó mediante una cámara de Neubauer y utilizando un microscopio óptico XDS-1B Nikkon.

5. Obtención de fracción citosólica de bajo peso molecular

Para aislar el contenido citosólico de bajo PM se utilizaron centricones (Milipore, IL) con tamaño de poro de 10 kDa. La fracción citosólica (en este caso sin bloquear con NEM) se centrifugó 1 h a 7000xg en los centricones, obteniendo así la fracción citosólica de bajo peso molecular.

6. Medidas de concentración de hemoglobina

Los distintos estados de oxidación de la Hb pueden distinguirse por diferencias en sus espectros de absorción, aunque todos absorben mucho entre 480 y 660 nm, de ahí su color rojo. Al cambiar el estado redox de la Hb, también cambian sus características espectrales. La concentración de las distintas formas de Hb en una solución que contiene una mezcla de ellas se puede calcular conociendo los coeficientes de extinción molar de cada estado, Tabla 1

Tabla 1. Coeficientes de extinción molar para oxi y metahemoglobina.

	Coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$)	
	577nm	630nm
Oxihemoglobina	15,0	0,17
Metahemoglobina	4,45	3,63

Así, en el caso de una solución formada por una mezcla de OxiHb y MetHb, midiendo la absorbancia de la solución a 577nm (pico de absorción de la oxihemoglobina) y 630nm (pico de absorción de la metahemoglobina) se puede llegar a la fórmula,

$$[OxiHb] (\mu M) = 66 A_{577} - 80 A_{630}$$

$$[MetHb] (\mu M) = 279 A_{630} - 3 A_{577} \text{ (Winterbourn 1990).}$$

Donde [OxiHb] y [MetHb] representan en realidad la concentración de grupos hemo y no la de Hb (cada molécula de Hb posee 4 cadenas proteicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo).

Se realizaron las medidas de absorbancia a 577nm y 630nm en espectrofotómetro Varian Cary50 (Agilent Technologies, Australia) para calcular la concentración de MetHb y OxiHb durante el almacenamiento. Con estas medidas se determina la concentración de Hb citosólica, en muestras control y suplementadas con NAC, para observar su variación con el almacenamiento. Por otro lado, para evaluar la lisis celular durante el almacenamiento de los GR, se mide la concentración de metahemoglobina y oxihemoglobina extra corpuscular en la solución de almacenamiento.

7. Evaluación de la concentración de tioles intraeritrocitarios de bajo peso molecular

Los tioles de bajo peso molecular se alquilan con monobromobimano (mBrBm) (Figura 24)

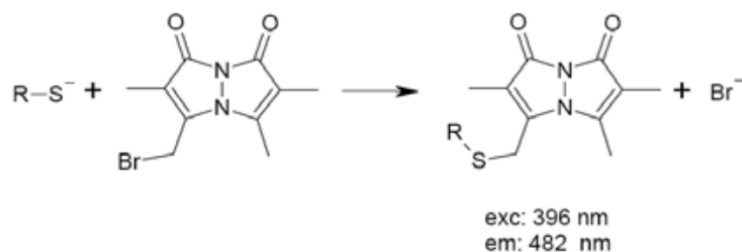


Figura 24. Reacción del monoBrbimano con un tiol.

La derivatización de los tioles se realizó incubando 5 minutos a temperatura ambiente el contenido citosólico de bajo peso molecular con mBBBr en una relación de concentración 1:10 (tioles:mBBBr).

Previo a la derivatización se midió la concentración de tioles de bajo peso molecular en el citosol mediante el método de Ellman. Donde se obtubieron las concentraciones de $(2,4 \pm 0.1)$ mM para la muestra de 1 día de almacenamiento y valores menores a 1mM para las muestras de 21 o más días de almacenamiento. A partir de estas concentraciones se realizaron la diluciones correspondientes en PBS para mantener la relación de concentración 1:10 entre os tioles y el mBBBr. Una vez derivatizada la muestra, sus componentes se separaron mediante HPLC (Agilent 1260 Infinity), empleando una columna de fase reversa (Agilent ZORBAX Eclipse plus C18 4,6x100mm) a 0,5 mL/min con el siguiente gradiente: 5 minutos de elución isocrática con 90% ácido acético 43,67 mM, pH3,01 y 10 % Metanol; 25 minutos de gradiente lineal de 10 a 100% de metanol; y finalmente 5 minutos de elución con metanol. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente, y se midió la fluorescencia de los compuestos derivatizados utilizando una $\lambda_{exc}=396\text{nm}$ y $\lambda_{em}=482\text{nm}$ (Thomson, Denicola et al. 2003).

La concentración de tioles se calculó a partir de curvas de calibración realizadas con concentraciones conocidas de GSH y NAC (Sigma-Aldrich Co, MO, USA), derivatizados en una relación de concentración 1:10 con mBBBr. Al realizar la regresión lineal se obtuvo la curva de calibración para GSH que se muestra en Fig. 25 A y para NAC en Fig. 25 B.

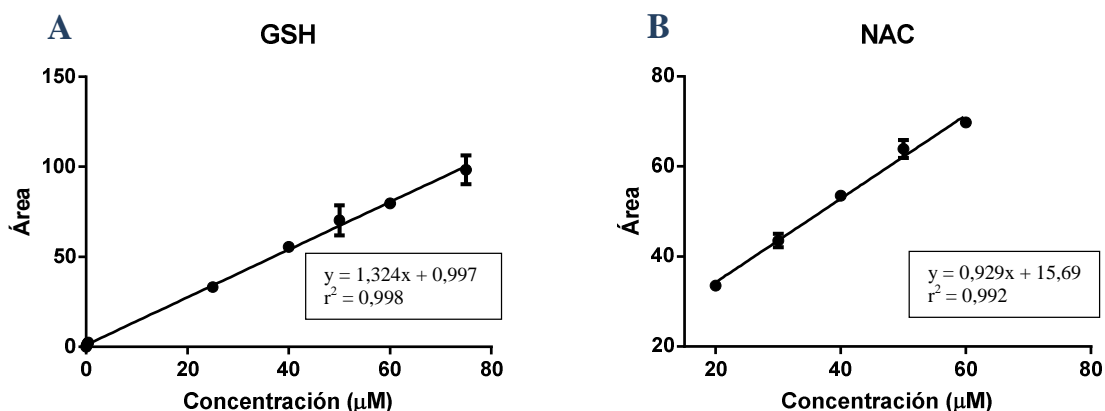


Figura 25. Curvas de calibración para (A) Glutatión y (B) N-acetil cisteína, derivatizados con mBBBr (1:10).

Al correr la fracción citosólica de bajo peso molecular se obtuvo un cromatograma con 2 picos principales (Figura 29 A) que corresponden al GSH con un tiempo de retención de 13 minutos y a NAC con un tiempo de retención de 16 minutos. La concentración intracelular de tioles se calculó considerando un volumen celular 1×10^{-17} L.

8. Electroforesis 1D

Las electroforesis SDS-PAGE en una dimensión se realizaron (a menos que se indique lo contrario) en geles de poliacrilamida 12,5%, a 100V y a temperatura ambiente. El buffer de corrida utilizado fue 192mM glicina, 6,2mM Tris, 3,5mM SDS pH 8,3. El buffer de la muestra para citosol contenía 12,5mM Tris pH 6,8, 1% SDS, 20% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, con o sin 1,4M β -mercaptoetanol (β ME). El buffer de la muestra para membranas contenía 12,5mM Tris, 4% SDS, 20% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, pH 6,8 con o sin 200 mM ditioneitol (DTT). Debido a la dificultad de estandarizar el sembrado en las muestras de membrana, ya que la concentración y proporción de proteínas varía con el tiempo de almacenamiento, se utilizó la masa como método para correr siempre la misma cantidad de muestra, utilizándose 60 μ g de membrana por carril.

9. Electroforesis diagonales

Las electroforesis diagonales se realizaron de acuerdo al método descrito por McDonagh (McDonagh 2009). En la primera dimensión se corrieron 60 μ g de proteína en geles 12.5% con SDS a 60 V, en ausencia de agentes reductores. Luego de la corrida, los carriles correspondientes a cada muestra se cortaron y trataron por 15 min en buffer de equilibración que contenía 6 M Urea, 2% SDS, 20% glicerol, 0.375M Tris, pH 8.8, con 2% DTT y luego 15 min en el mismo buffer, pero en lugar de DTT con 2.5% iodoacetamida (IAA). Posteriormente, los carriles se colocaron sobre un segundo gel SDS-PAGE al 12%, y la segunda dimensión se corrió a 60 V. Finalmente los geles se retiraron y tiñeron con azul coloidal o se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF como se describe en el siguiente párrafo.

10. Western Blot

Para los Western Blot se utilizaron membranas de PVDF 0,45 μ M Hybond (GE Healthcare/Amersham Biosciences, UK). Las mismas se hidrataron en metanol, y luego en buffer de transferencia 192 mM glicina, 3,2 mM Tris, 20% metanol y en este mismo buffer se realizó la transferencia a 4°C: 2 h a 100 V o 16 h a 30 V. El bloqueo se realizó incubando la membrana toda la noche en 5% leche descremada (Conaprole, Uruguay) en TBS-Tween 0,05%. Para el revelado se incubó la membrana durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente con anticuerpo primario monoclonal anti-GSH (Abcam, Cambridge, MA) o anti-Prx2 (AbFrontier, Seúl, Corea). Se realizaron 3 lavados de 5, 10 y 15 minutos con TBS-Tween 0,05%, se incubó 1 hora con agitación a temperatura ambiente con anticuerpo secundario fluorescente anti-IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado a IRDye 680RD (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE), se repitieron los lavados y se reveló empleando G:Box Chemi XT4 (Syngene, Cambridge, UK). Los análisis densitométricos de las bandas se realizaron usando el programa ImageJ 1.47v (NIH, USA).

11. Aislamiento de proteínas glutationiladas

Para aislar proteínas glutationiladas se utiliza la enzima glutación transferasa de *Echinococcus granulosus* (GST) recombinante, purificada en nuestro laboratorio mediante cromatografía de afinidad. El laboratorio cuenta con la secuencia codificante para la GST clonada en un vector pET28a, el cual permite la expresión de la proteína como un producto fusionado a una cola de 6 histidinas (His-tag) amino terminal asociada a un sitio de corte para trombina.

11.1. Producción y purificación de GST

Brevemente, las bacterias transformadas se cultivan 24h en medio LB (Luria Bertani) con kanamicina 50 µg/µL a 37 °C y 200 rpm. Luego se realiza un escalado 1/50 en el mismo medio y cuando el cultivo alcanza una absorbancia a 600 nm de 0.6 se agrega Isopropyl β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.4 mM para inducir la producción de la proteína recombinante. La inducción se realiza durante 3 horas, luego el cultivo se centrifuga a 2.000 g, 15 min. El pellet se resuspende en PBS/tritón 1% (5 mL/ gramo de pellet bacteriano), se somete a 3 ciclos de congelado/descongelado y se sonica por 10 minutos con pulsos de 40 % de amplitud manteniendo el tubo en un baño de agua/hielo. El lisado bacteriano se clarifica centrifugando a 15.000 g, 15 min y el sobrenadante se filtra con un filtro de 0.2 µm y se almacena a -80 °C.

Para la purificación se realiza una cromatografía IMAC, utilizando como buffer de unión 50 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, pH 8, como buffer de elución 50 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8, y como buffer de lavado fosfato de sodio 50 mM, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8, y luego una diálisis contra buffer de unión. La proteína purificada se almacena a 4°C.

11.2. Glutationilación de seroalbúmina humana

Se parte de seroalbúmina humana (HSA) delipidada producida en nuestro laboratorio (Turell, Botti et al. 2008, Alvarez, Carballal et al. 2010). La misma se reduce incubando en una relación de concentración 1:2 con βME 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación. El agente reductor se remueve utilizando una columna PD-10 (GE Healthcare), equilibrada con Buffer Tris 100 mM pH 8, obteniéndose una concentración de 71,5 µM ($\epsilon_{\text{HSA}}=0,531 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La concentración de tioles se mide por el método de Ellman y da un valor de 34,6 µM, lo que nos otorga un porcentaje de reducción de 48%. Para la glutacionilación se agrega en 1 ml de HSA 50 µl de GSSG 100 mM en PBS, y se agita 6h a temperatura ambiente. Finalmente se mide la concentración de tioles por el método de Ellman, obteniéndose una concentración de 10,9 µM tioles (68,5% de glutacionilación para la HSA reducida).

La muestra glutacionilada se almacena a -20 °C.

11.3. Aislamiento de proteínas glutacioniladas por cromatografía de afinidad "en batch"

Primero se unió la GST a la resina, para esto se colocó en un eppendorf 300 µl Resina Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare), y se realizaron 2 lavados con 800 µl H₂O MilliQ y 2 lavados con 800 µl de buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8 (buffer fosfato). Las centrifugaciones se realizaron en minífuga (Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois) 1s y a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 800 µl de GST

22 μM y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente con agitación, para luego realizar 3 lavados con buffer fosfato.

Una vez unida la resina a la GST, se colocó la muestra de interés (estándar de proteína glutationilada o citosol) y se dejó incubando toda la noche en agitación a 4°C protegida en papel de aluminio. La muestra, 140 μl de citosol de GR se pasó previamente por una columna spin trap G-25 (GE Healthcare) para remover el GSH no unido de la muestra. Como control positivo de proteína glutationilada se utilizó albúmina glutationilada en nuestro laboratorio.

Luego de estar toda la noche en agitación se centrifugó 1s en minífuga (Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois) para obtener la fracción no unida, y se realizaron 5 lavados con buffer fosfato.

Finalmente, para eluir la proteína glutationilada de la GST se agregó 700 μl de GSH (60 mM) y se incubó en agitación a temperatura ambiente 15 minutos. Se centrifugó para obtener la fracción que contiene la proteína glutationilada y luego se realizaron 5 lavados con buffer fosfato. Finalmente se corrió SDS-PAGE no reductora y Western Blot según se detalló previamente.

12. Consumo de H_2O_2

Utilizando el método descrito por (Wagner, Witmer et al. 2013) se midió la disminución en la concentración de H_2O_2 extracelular, en presencia de GR con diversos tiempos de almacenamiento, y cómo la misma se ve afectada por el agente bloqueante de tioles N-etilmaleimida (NEM) y el inhibidor de catalasa 3-amino-1, 2, 4-triazol (AT). Brevemente, una dilución de $3,63 \times 10^6$ GR por ml se incubó en placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) con H_2O_2 50 μM distintos tiempos. La reacción se detuvo con una solución de NaHCO_3 3 mM, ácido para-hidroxifenilacético (pHPA) 0.8 mM y peroxidasa de rábano (HRP) 2.2 μM en buffer HEPES (ácido sulfónico 4(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetano) 1mM, pH 7.2-7.5, (solución STOP). La HRP de esta solución reacciona con el H_2O_2 remanente en el pocillo; la HRP oxidada reacciona entonces con pHPA, resultando en la formación de un dímero de pHPA con un pico de emisión de fluorescencia a 425nm que es utilizado para cuantificar la cantidad de H_2O_2 remanente midiendo la emisión de fluorescencia a 37°C con λ_{exc} 345nm y λ_{em} 425nm. Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizaron en lector de placas Varioskan (Thermo, Finland).

Para observar el rol de la catalasa en el consumo de H_2O_2 se utilizó el compuesto AT, el cual produce una inhibición reversible inmediata de la enzima (Heim, Appleman et al. 1955), y lentamente va produciendo una inhibición irreversible de la actividad catalasa a concentración baja y constante de H_2O_2 (Margoliash and Novogrodsky 1958). Esta reacción irreversible es una reacción entre el complejo I y el AT (Margoliash, Novogrodsky et al. 1960).

Por otro lado, para observar el rol de las peroxididas dependientes de tioles (Prx, GPx) en el consumo de H_2O_2 , se utilizó NEM, el cual es un aceptor de Michael que se une a nucleófilos como el grupo tiol. El tioéter resultante tiene un enlace covalente C-S, resultando en una inhibición irreversible para proteínas cuya actividad depende del grupo tiol, como son las peroxiredoxinas y la glutatión peroxidasa de eritrocito.

13. Microscopía confocal

Una dilución de $3,63 \times 10^6$ GR lavados con HBSS, de igual manera que lo descripto previamente para el lavado con PBS, se incubó 45 min en agitación y oscuridad con la sonda Laurdan a una concentración de $4 \mu\text{M}$ (Figura 26).

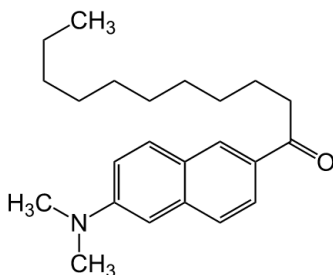


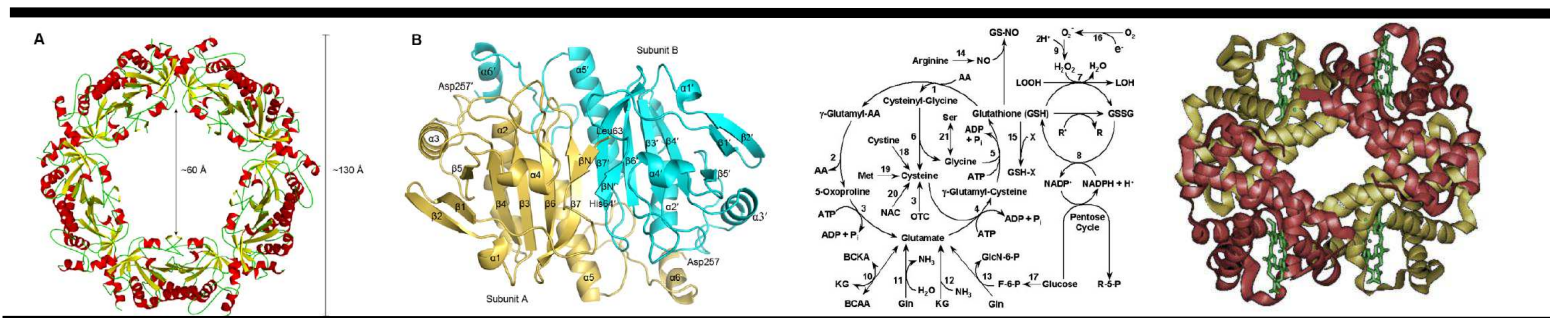
Figura 26. Laurdan, 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno.

Esta sonda se intercala en la membrana del GR y permite detectar cambios en la fluidez de la misma, ya que su fluorescencia es sensible a la polaridad del entorno. El preparado (GR en suspensión) se coloca en portaobjetos recubiertos con poli-lisina de manera de inmovilizar los GR (Tekdon, incorporated), $50 \mu\text{l}$ por pocillo. Utilizando microscopio confocal sp5 (Leica) se observaron las características de emisión de Laurdan intercalado en membranas de GR con distinto tiempo de almacenamiento, y luego de estresar los GR exponiéndolos a H_2O_2 $50 \mu\text{M}$.

14. Análisis estadístico de los datos

Los datos se graficaron y analizaron utilizando Graphpad Prism 4.03 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA). Los datos se reportan como medias y rango. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de Dunnett para comparar variables múltiples. Diferencias con $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativa.

4. Resultados y Discusión



1. Cambios citosólicos en los GR

1.1. Ingreso de NAC a los GR

Luego de suplementar la solución de almacenamiento del concentrado de GR (SAGM) con NAC en concentraciones de 2,5 a 25 mM (SAGM+NAC), con el fin de corroborar el ingreso del antioxidante al interior celular se midió la concentración intracelular de NAC por HPLC. Para ello los GR se lavaron y lisaron para luego separar el contenido citosólico, el cual fue ultrafiltrado a modo de aislar las moléculas de tamaño menor a 10 kDa. La fracción de bajo peso molecular fue tratada con mBrBm para derivatizar tioles los cuales fueron separados por HPLC como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados pueden observarse en la Figura 27.

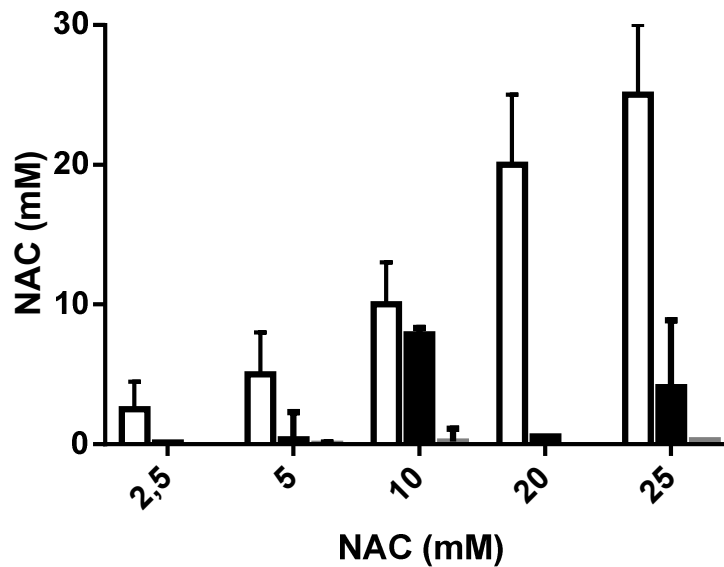


Figura 27. Ingreso de NAC al citosol del GR. El contenido citosólico de bajo peso molecular se trató con monoBromobimano para derivatizar tioles que luego se separan y cuantifican por HPLC de fase reversa. Se midió la concentración de NAC intracelular a los 3 (barras blancas), 21 (barras negras) y 42 (barras grises) días post extracción para los GR suplementados con 2,5, 5, 10, 20 y 25 mM NAC . N=3

Se observa claramente el ingreso de NAC al citosol pero que no perdura con el tiempo de almacenamiento. Una suplementación con mayor concentración de NAC implica un mayor ingreso de esta molécula a la célula, lo que significa que en los rangos de concentración en los que se trabajó, el GR no tiene problemas de permeabilidad para esta molécula. Sin embargo la NAC, independientemente de la concentración utilizada no logró mantenerse en el GR durante el almacenamiento, observándose en todos los casos una disminución mayor al 85 % el día 21 post extracción, y siendo la concentración de la misma casi nula al final del período de almacenamiento. El hecho que NAC sea consumida rápidamente en los GR almacenados podría deberse al estrés

oxidativo al que estas células están sometidas, proporcionando así una defensa antioxidante extra y mejorando las condiciones de almacenamiento para estas células.

1.2. Estado redox de la hemoglobina citosólica durante el almacenamiento con y sin NAC

La Hb es la proteína más abundante en los GR, representa el 97% de la proteína citosólica en los GR (Pasini, Mann et al. 2010). Debido a que se trata de una hemoproteína presenta una absorción característica entre 480 y 600nm que le da su color rojo. Esta propiedad puede utilizarse para diferenciar entre los estados de oxidación de la molécula. En este caso se utilizó la medida de absorbancia para determinar la concentración de Hb en el citosol de GR durante el almacenamiento en bolsas de transfusión.

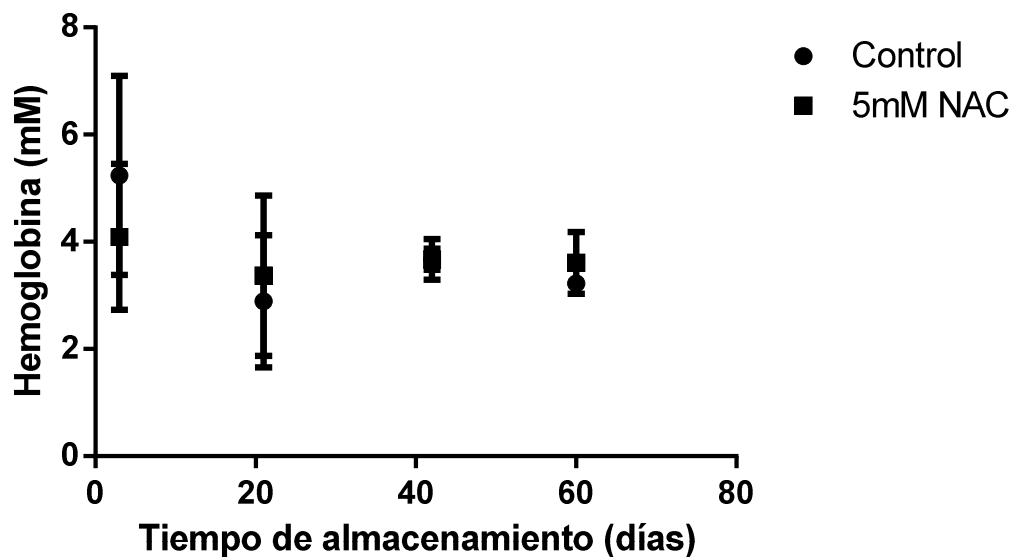


Figura 28. Concentración de hemoglobina Intracelular durante el almacenamiento de los GR para muestras control y suplementadas con NAC 5 mM. N=4. Se midió la concentración de Hb en el citosol de GR durante el almacenamiento en condiciones control, y de suplementación con NAC 5mM.

En ningún caso se observaron diferencias significativas durante el almacenamiento, ni con la suplementación con NAC. Se observa una variación entre individuos, la cual era de esperarse ya que las concentraciones de Hb varían según edad sexo y estilo de vida.

1.3. Cambios en la concentración de GSH con el almacenamiento

Luego de lisados los GR y separadas las fracciones de membrana y citosólica, de esta última se obtienen por ultrafiltración los componentes de peso molecular menor a 10 kDa, los cuales se derivatizaron con el reactivo alquilante de tioles mBr, para luego separarse por HPLC, según se describió en Materiales y Métodos. De esta manera se puede cuantificar GSH intracelular y NAC en el caso de las bolsas suplementadas con este tiol. En la Figura 29 A se observa el perfil de elución del aducto GSH-mBr con un tiempo de retención de 13 minutos y el de NAC-mBr con un tiempo de retención de 16 minutos.

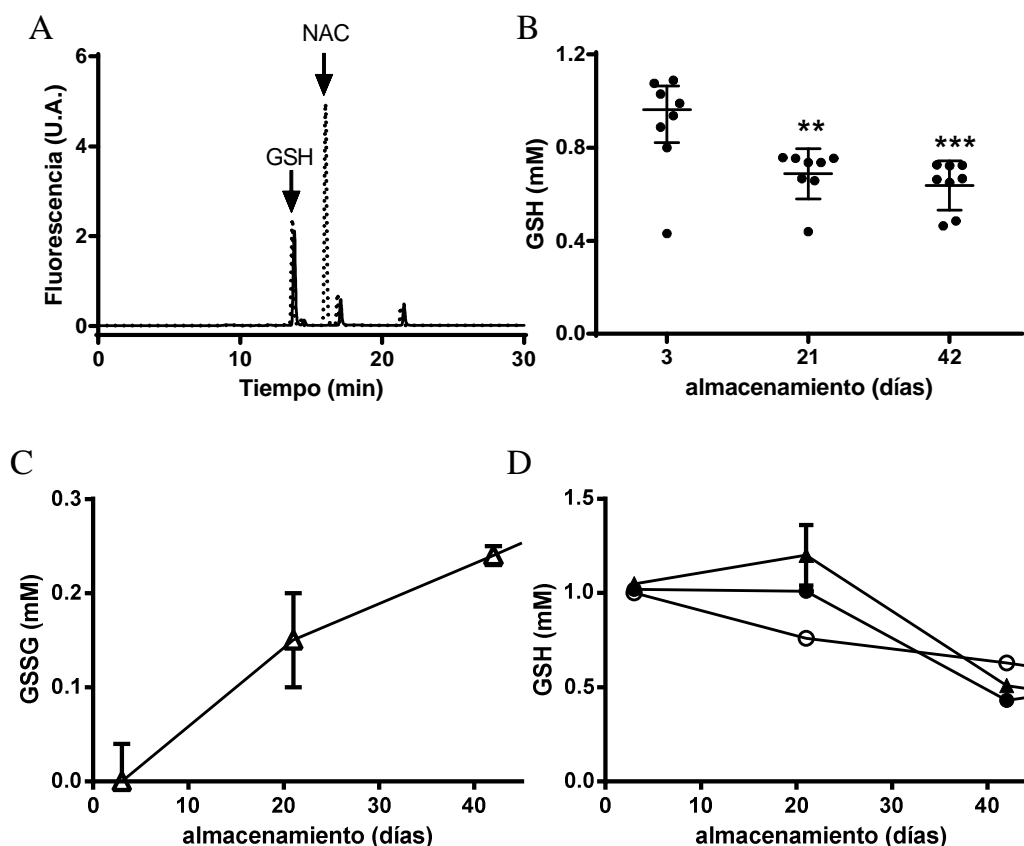


Figura 29. Efecto del almacenamiento sobre la concentración de glutatión intracelular. A) Perfil de elución de GSH y NAC asociados a mBrBm de la cromatografía HPLC en fase reversa. B) Efecto del almacenamiento sobre la concentración de GSH citosólico (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ con respecto al día 3). C) La concentración citosólica de GSSG se calculó a partir de la concentración de GSH medida antes y después del tratamiento de las muestras con DTT. D) GSH intracelular en GR almacenados en ausencia (○) y presencia de 2,5mM (●) y 10 mM NAC (Δ).

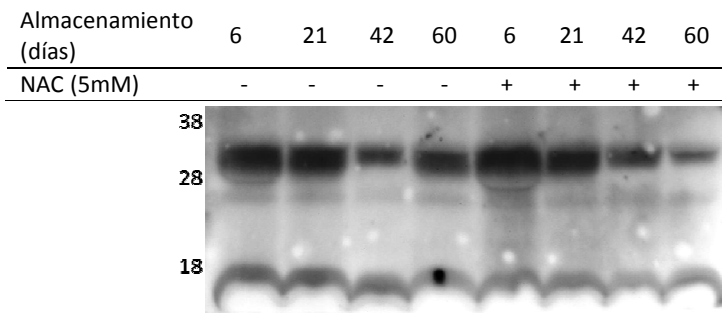
Se evaluó la concentración de GSH intracelular en los GR almacenados. Como se observa en la Figura 29 B, la concentración de glutatión reducido en las muestras analizadas al día 3 post-extracción, osciló entre 0,43 y 1,07 mM, con una mediana de 0,96 mM. Las concentraciones intraeritrocíticas de GSH varían ampliamente entre individuos (de 0.4 mM a 3 mM con un coeficiente de varianza de 36%) independiente de la edad del donante o del método de detección utilizado (ver Tabla 1 en (van 't Erve, Wagner et al. 2013)). Se ha demostrado que la concentración intracelular de GSH en GR depende no sólo de factores ambientales como la dieta y estilo de vida del donante sino que también depende de factores genéticos (van 't Erve, Doskey et al. 2014). Nuestros resultados muestran que los niveles de GSH bajan con el almacenamiento de los GR, en concordancia con lo reportado anteriormente (Dumaswala, Zhuo et al. 2001, Gevi, D'Alessandro et al. 2012, Bayer, Hampton et al. 2015). Constatamos una disminución estadísticamente significativa, mayor al 20% durante los primeros 21 días de almacenamiento, lo que lleva a una mediana de 0,73 mM (rango: 0,44-0,76mM) a los 21 días de almacenamiento, y finalmente una mediana de 0,59 mM (rango: 0,51-0,66mM) a los 42 días de almacenamiento. La formación de glutatión disulfuro (GSSG) dio cuenta prácticamente del 100% de la disminución del antioxidante (Fig. 29 C). Las

concentraciones de ambas formas, GSH y GSSG, permanecieron constantes luego del descenso inicial, apuntando a un proceso adaptativo por parte de la maquinaria antioxidante del glóbulo, capaz de salvaguardar o reabastecer el pool de GSH. Por otro lado, la adición de NAC 2,5 y 10 mM solo fue capaz de prevenir la disminución de GSH al principio del almacenamiento, siendo ambas concentraciones incapaces de mantener los niveles iniciales de glutatión en su estado reducido hasta el final del período de almacenamiento. Dado que, como se demostró previamente, el NAC penetra de forma efectiva (y concentración dependiente) la membrana celular, esta falta de efecto del NAC en períodos largos de almacenamiento puede explicarse por un consumo del antioxidante por la célula.

1.4. Glutathionilación de proteínas eritrocitarias

Dado que el GSSG puede abstraer un electrón de tioles proteicos, liberando GSH y adicionando un GS[•] bajo la forma de un disulfuro mixto a proteínas, se realizaron corridas electroforéticas SDS-PAGE en condiciones no reductoras para proteínas citosólicas y posterior análisis de western blot revelado con anticuerpo anti-GSH de manera de detectar proteínas glutathioniladas.

A



B

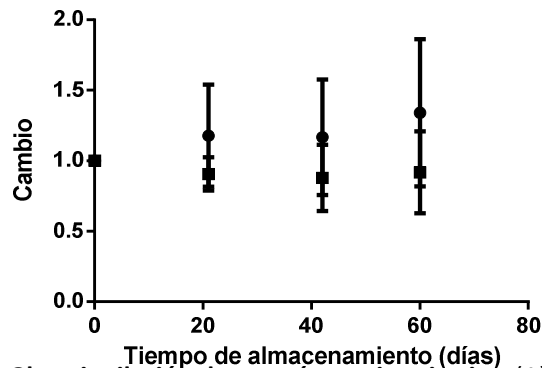


Figura 30. Glutathionilación de proteínas eritrocitarias. (A) Empleando la fracción citosólica de 1×10^6 GR (no tratada con NEM), se realizaron electroforesis no reductoras y posterior western blot anti GSH. (B) Análisis densitométrico de la banda principal expresada como cambio con respecto al primer día de amacenamiento \pm SD para el control (●) y las muestras suplementadas con NAC 5mM (■).

En la Figura 30 A se observan 2 bandas que corresponden a proteínas glutathioniladas. La banda proteica más abundante migra con un peso molecular aproximado de 30 kDa, mientras que la banda de menor intensidad migra con un peso molecular de

aproximadamente 27 kDa. La banda de ~30 kDa se corresponde con el peso molecular de la Anhidrasa carbónica, la segunda proteína en orden de abundancia en el GR, la cual se ha demostrado que puede glutationilarse (Kim and Levine 2005). También podría corresponder ese peso molecular a los dímeros de Hb, la cual además de ser la proteína predominante en este tipo celular también puede ser modificada por adición de glutationilo (Shet, Pinto et al. 2012). La glutationilación proteica solo agrega a la proteína una masa de aproximadamente 307 Da, lo que no representa un cambio significativo de su movilidad electroforética para esta técnica. Finalmente, al correr las mismas muestras en condiciones reductoras (agregando DTT) desaparecen las bandas en el WB anti-GSH (no se muestra), lo que nos indica que efectivamente las bandas correspondían a proteínas glutationiladas.

Como puede observarse en la Figura 30 no hubo un aumento en el nivel de glutationilación con el tiempo de preservación, sin embargo en las muestras almacenadas en presencia de NAC 5 mM hubo un descenso en la glutationilación de la banda dominante.

1.5. Aislamiento de proteínas glutationiladas

Con el fin de aislar las proteínas glutationiladas presentes en el citosol de GR, se utilizó una aproximación novedosa: cromatografía de afinidad preparando una columna de Glutation S-transferasa (GST) unida a una resina de Sefarosa. Se incubó con esta resina la fracción citosólica de GR, en batch, permitiendo la unión de las proteínas glutationiladas al sitio de unión a GSH de la GST. Finalmente se eluyó con GSH para obtener las proteínas de interés y se corrió una SDS-PAGE no reductora (Fig. 31).

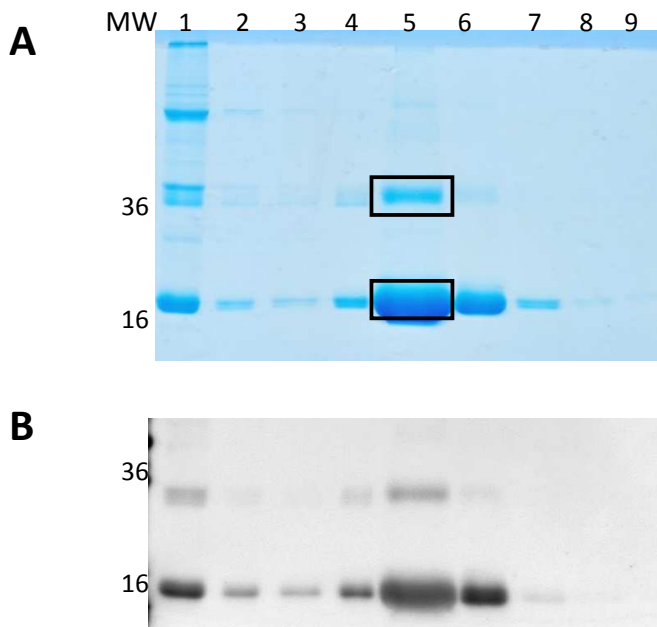


Figura 31. Aislamiento de proteínas glutationiladas por cromatografía de afinidad. Se observa la electroforesis (A) y posterior Western Blot anti-GSH (B) de una dilución $\frac{1}{4}$ para los 4 lavados pre-elución (carriles 1-4), la fracción que eluye al agregar GSH (carril 5) y los 4 lavados posteriores (carriles 6-9). En el carril 5 se marcan con un rectángulo los sectores cortados y empleados para identificación mediante MS/MS.

En la Figura 31 se observa claramente la presencia de 2 bandas proteicas positivas para el anticuerpo anti-GSH, una mayoritaria de peso molecular aproximado de 16 kDa, y otra con un peso molecular de aproximadamente 32 kDa. Ambas bandas proteicas se cortaron, digirieron en gel con tripsina y se analizaron por espectrometría de masas MS/MS en el Instituto Pasteur de Montevideo, Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas identificadas por espectrometría de masas MS/MS.

Masa mol. en el gel (kDa.)	Proteína identificada por EM	Masa teórica (Da)	Score	Cobertura (%)
16	hemoglobina cadena alfa-1, <i>Homo sapiens</i> .	10776	324	60%
	Cadena B, Hemoglobina Humana	15906	272	76%
32	Cadena A, Albúmina sérica humana	66130	283	25%
	Cadena B, Hemoglobina humana	15906	196	65%
	alpha 2 globin variant <i>Homo sapiens</i>	15271	143	35%

Mascot: El score de proteínas es $-10 \cdot \log(P)$. P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento al azar. Los scores de los iones individuales > 91 indican identidad u homología extensa ($p < 0.05$). Los scores proteicos derivan de los scores de los iones en base no probabilística.

Como se detalla en la Tabla 2, en la banda de ~16 kDa se identificaron las cadenas α (60 % de cobertura) y β (76% de cobertura) de la Hb. Por otro lado en la banda de ~32kDa se encontraron la cadena β de la Hb, la cadena A de la albúmina sérica, y una globina $\alpha 2$.

La unión de glutatión a la Cys93 de la cadena β de Hb se conoce desde hace más de 20 años y se asocia con inhibición de la polimerización de la proteína que caracteriza a la anemia drepanocítica, así como con aumento de la afinidad por el oxígeno, disminución de la cooperatividad y reducción del efecto Bohr (Huisman and Dozy 1962, Craescu, Poyart et al. 1986). Respecto al mecanismo de formación de este aducto con glutatión, en células normales, su formación a partir de reacciones de intercambio tiol-disulfuro con GSSG sería escasa porque la concentración intracelular de glutatión oxidado es muy baja y además éste reacciona muy lentamente con Hb (Garel, Beuzard et al. 1982). Sin embargo, se ha demostrado la formación del disulfuro mixto mediante una reacción en dos pasos que involucra la formación de un intermediario ácido sulfénico (Regazzoni, Panusa et al. 2009). De hecho, hasta un 25% de la Hb intraeritrocítica se ha encontrado glutatiónilada bajo condiciones normales (Craescu, Poyart et al. 1986) y se han descrito por lo menos tres tipos de aductos diferentes Hb-glutatión: 1) con la Cys93 de la cadena β en la Hb reducida, 2) con Cys93 de la cadena β de metHb, y 3) aunque menos frecuentemente, con las Cys102 y Cys112 de las cadenas α y β , respectivamente (Mawatari and Murakami 2004, Metere, Iorio et al. 2014). Sin embargo, los péptidos que contienen a estas cisteínas no fueron identificados por espectrometría de masa en nuestras muestras y además faltaría identificar el o los

residuos de cisteína modificados por adición de glutatión, para corroborar que se trata de Hb glutationilada lo que aislamos en la cromatografía.

Por otro lado, en principio sorprende la identificación de la cadena A de la albúmina humana en la fracción de 32 kDa. La albúmina es la proteína más abundante del plasma (~0,6 mM), puede aparecer adsorbida a la membrana de los GR, incluso se ha reportado una trasvasación del plasma al interior del GR. De todas formas, parece improbable que sea la proteína glutationilada en el interior del GR y el nivel de cobertura en nuestros experimentos fue menor a 30%.

1.6. Cambios en el estado redox de Prx-2

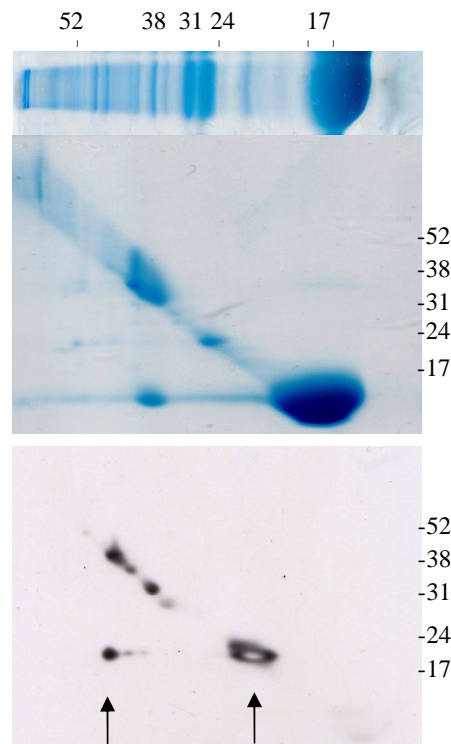


Figura 32. Electroforesis diagonal (con y sin reductor). Gel y western blot diagonales anti-Prx-2 de fracción citosólica de GR sin almacenar. Las flechas marcan la posición del monómero (22 kDa) y del homo-dímero (44 kDa)

Dado que la Prx-2 es la principal proteína antioxidante en el GR y su actividad depende de un tiol muy reactivo, decidimos explorar la evolución en el estado de oxidación de dicha enzima con el tiempo de almacenamiento. Al comienzo del período de preservación la enzima se encontró predominantemente bajo la forma monomérica y formando complejos de alto peso molecular (probablemente decámeros), con escasez de otras bandas en los geles 1D (Fig. 32). En los geles diagonales que suponen una mayor carga proteica, además de la enzima monomérica altamente predominante, se observaron otros complejos. Algunas de las asociaciones proteicas dependieron de puentes disulfuro, ya que luego del tratamiento con DTT de las bandas proteicas de la primera dimensión (no reductora) aparecieron en la segunda dimensión por debajo de la diagonal (indicativo de puentes disulfuro intermoleculares), con un peso molecular correspondiente a monómeros de Prx-2 (22 kDa). Entre estos spots predominó la forma dimérica de la enzima, que en la primera dimensión migró con un peso molecular correspondiente a 44 kDa. También se pudieron observar complejos de

menor peso molecular, entre los que probablemente participó Hb, cuya asociación a Prx-2 ha sido reportada por otros autores (Rinalducci, D'Amici et al. 2011). Varios complejos resistentes a DTT se observaron en la diagonal, aunque los homomultímeros de la enzima no se observaron, probablemente por limitaciones de la técnica (Fig. 32). El almacenamiento indujo un aumento en la dimerización de la Prx-2. Estos dímeros fueron reducidos por el agregado de β -mercaptoetanol (Fig. 33). El agregado de NAC 5 mM no disminuyó la dimerización progresiva de la enzima, en lugar de esto se vio un incremento, aunque moderado, de la banda a 44 kDa, coincidente con otros reportes (Bayer, Hampton et al. 2015).

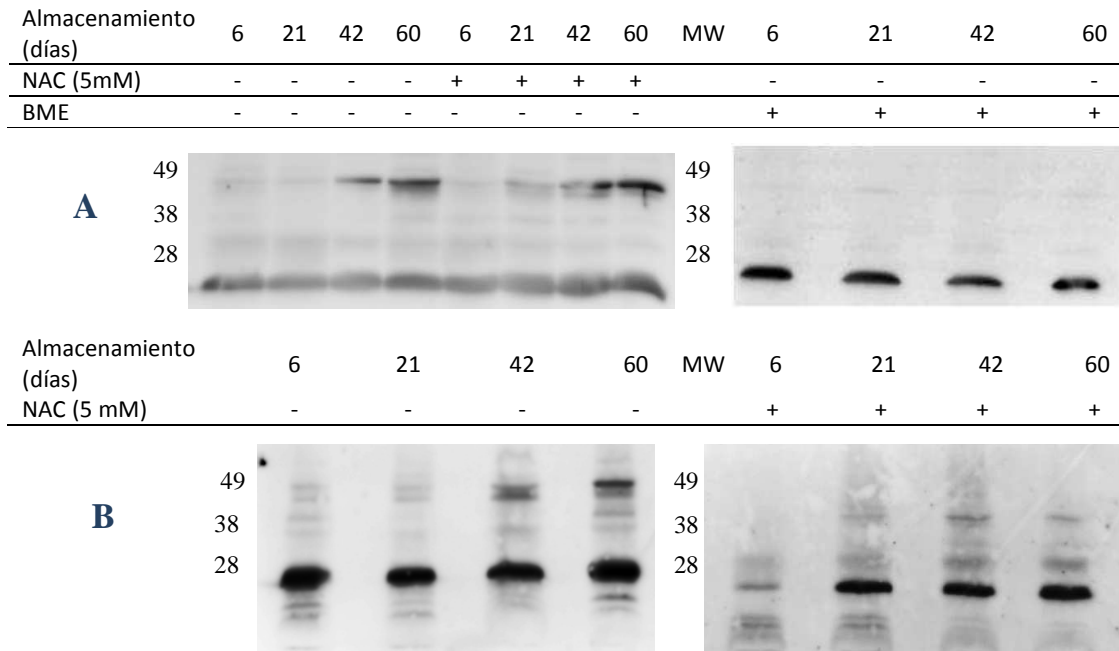


Figura 33. Efecto de NAC en el estado redox de Prx2. A. Western blot anti-Prx2 de fracción citosólica de células almacenadas en ausencia (-) y en presencia de NAC 5 mM (+) realizado en condiciones no reductoras. A la derecha se muestran el Western Blot de las muestras almacenadas en ausencia de NAC, corridas en condiciones reductoras (+ BME). B). Western blots anti-Prx-2 (en condiciones no reductoras) de la fracción de membrana aisladas de GR con distintos tiempos de almacenamiento en ausencia (-) y en presencia (+) de 5 mM NAC.

En la literatura existen evidencias de la asociación de la proteína citosólica Prx2 con la membrana celular, más específicamente con la región N terminal de la proteína de membrana banda 3 (Low, Hampton et al. 2007). Si bien la razón de esta migración es desconocida existe una hipótesis que la asocia con una defensa contra el estrés oxidativo, y una forma de proteger la membrana del mismo (Matte, Pantaleo et al. 2014). Para estudiar si durante el envejecimiento de las bolsas de transfusión ocurren cambios en la unión a la membrana de la Prx2 se realizaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes y en presencia o ausencia del ditiotretitol (DTT) que es un reductor específico para disulfuros, y posteriormente western blot anti-Prx2 de la fracción de membrana de los GR durante el progreso del almacenamiento, en condiciones control y de suplementación con NAC 5mM (Fig. 33).

En el caso de las membranas, se observaron bandas de diverso peso molecular en los WB no reductores, las cuales aumentaron con el almacenamiento (Fig. 33B). Esto nos indica una asociación de la Prx2 a más de una proteína en la membrana. También se observan bandas por debajo del peso molecular de la Prx2 monomérica, que podría deberse a una degradación parcial de la proteína. Por su parte, la adición de NAC redujo la intensidad de las bandas, apuntando a un efecto protector del antioxidante sobre la fracción de membrana.

1.7. Consumo de H₂O₂ por los GR

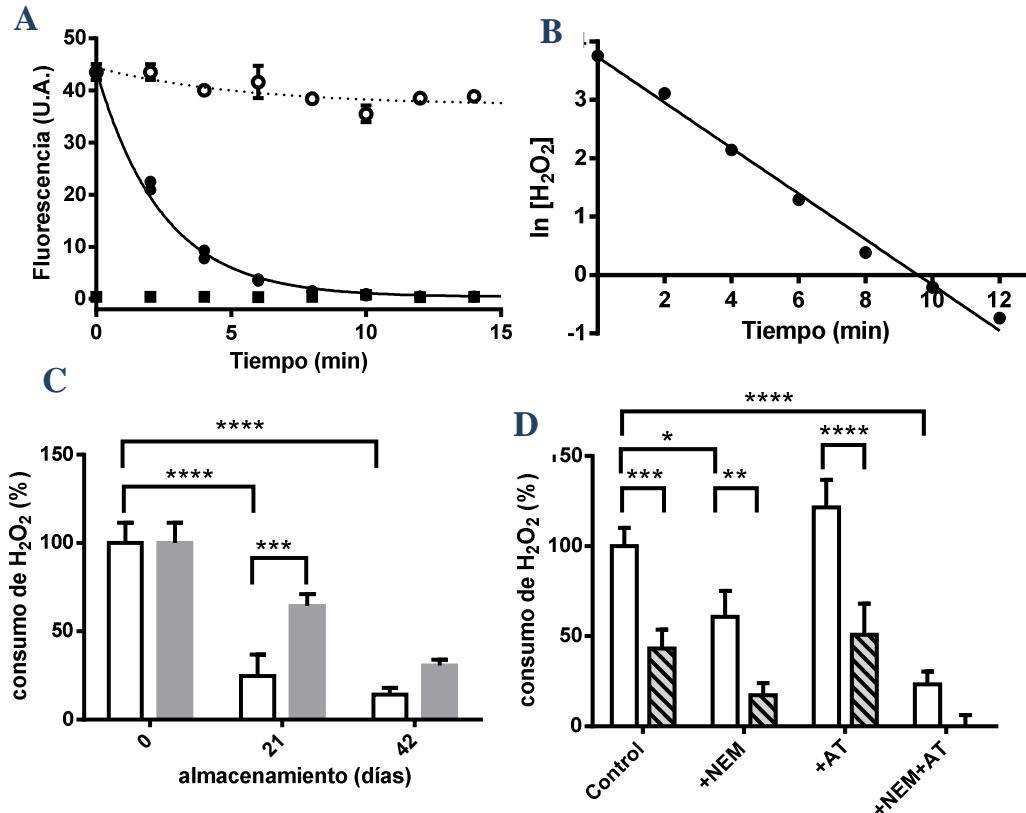


Figura 34. Consumo de H₂O₂. (A) El consumo de H₂O₂ 50 μM por una suspensión de 1,81x10⁵ GR, se midió mediante fluorescencia (●). Se realizaron controles midiendo la evolución temporal de la fluorescencia en presencia de H₂O₂ y ausencia de células (○) y en presencia de buffer solo (■). (B) Linealización de los resultados para GR+H₂O₂. (C) Consumo de H₂O₂ por GR sin suplementar (barras vacías) y suplementados con 5mM NAC (barras grises). (D) Consumo de H₂O₂ por GR sin almacenar (barras vacías) y almacenados por 42 días (barras rayadas), incubados durante 30 min en ausencia (Control), y en presencia de NEM 50 mM (+NEM), AT 50 mM (+AT) o ambos (+NEM+AT). La velocidad de consumo de H₂O₂ se expresó como porcentaje respecto al consumo por las células sin almacenar y sin inhibidores. Los resultados se analizaron por 2way-ANOVA seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunnett (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

Dado que el nivel de los principales sistemas responsables del consumo de H₂O₂ en el GR, GSH (sustrato de la glutatión peroxidasa) y Prx-2, se vieron afectados por el tiempo

de almacenamiento decidimos explorar la capacidad de las células almacenadas de consumir este oxidante. La velocidad de consumo de H_2O_2 por GR durante el transcurso del almacenamiento, en condiciones control y de suplementación con NAC se realizó midiendo la fluorescencia de pHPA en presencia de HRP como se describió en Materiales y Métodos.

La concentración de H_2O_2 presenta un decaimiento exponencial, el cual se graficó de forma logarítmica, obteniéndose así un gráfico lineal cuya pendiente llamamos kobs. Al dividir este valor de kobs entre el número total de células en el experimento obtenemos una constante a la que se llama kcel.

Al igual que lo que fue reportado por (Wagner, Witmer et al. 2013) la kcel para GR recién extraídos varió entre $(6,24 \pm 0,11) \times 10^{-12}$ y $(1,39 \pm 0,16) \times 10^{-12} \text{ s}^{-1} \text{ cel}^{-1}$, dependiendo del donante, excepto para un donante, para el que la kcel en GR recién extraídos fue $(2,28 \pm 0,78) \times 10^{-13} \text{ s}^{-1} \text{ cel}^{-1}$. La kcel reportada en el artículo mencionado es de $(2,9 \pm 0,7) \times 10^{-12} \text{ s}^{-1} \text{ cel}^{-1}$, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

En la Figura 34 A se observa cómo un determinado número de GR consumen el H_2O_2 extracelular y de ahí se puede determinar una constante de velocidad de consumo kobs (Fig. 34 B). Con el tiempo de almacenamiento, el consumo de H_2O_2 disminuye (Fig. 34 C). La suplementación de las bolsas con NAC 5mM preserva el consumo de peróxido inicial durante las primeras semanas de almacenamiento (21 días) pero no previene la caída a tiempos mayores de almacenamiento (42 días).

Finalmente, se pudo observar que al inhibir las peroxidasas dependiente de tioles (por agregado de NEM) se inhibe significativamente el consumo de H_2O_2 , sin embargo al inhibir previamente la catalasa (agregado de AT) el consumo de H_2O_2 se mantiene (Fig. 34 D). La inhibición de ambos sistemas antioxidantes deja a los GR incapaces de reducir el H_2O_2 agregado. Esto nos indica que existe una compensación entre los sistemas antioxidantes, donde ambos son muy eficientes.

2. Estudios de integridad de la membrana

Como medida de integridad de la membrana eritrocitaria se midió la concentración de Hb extracorpúscular. La Hb Fe^{2+} unida a O_2 u oxihemoglobina (oxiHb) es la forma predominante en el GR (97% de saturación en sangre arterial y 75% en sangre venosa). Cuando la célula se lisa y la misma es liberada al medio, es oxidada produciendo la forma férrica Fe^{3+} o metahemoglobina (MetHb). Por tanto, un aumento de MetHb extracorpúscular es un indicativo de que la lisis ocurrió durante el almacenamiento celular, mientras que un aumento en OxiHb indica una lisis reciente.

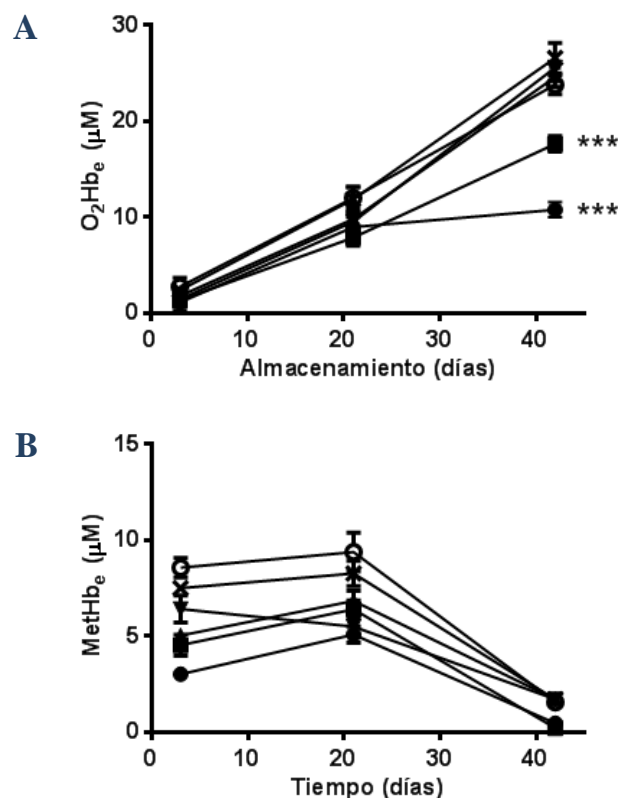


Figura 35. Lisis de GR con el almacenamiento. Para evaluar la lisis celular se midió la concentración de oxihemoglobina (A) y metahemoglobina (B) en el fluido extracelular para 5 concentrados sin suplementar (○), o suplementados con 2,5 (x), 5 (▲), 10 (▼), 20 (■) o 25 (●) mM NAC. Nota: los valores se expresaron por molécula de Hb (64 kDa). (***, $p < 0.001$, para muestras almacenadas 42 días en presencia de NAC 20 y 25mM, contra células almacenadas en ausencia de NAC).

Se observó un aumento estadísticamente significativo de la concentración de oxiHb extracorpúscular durante el almacenamiento en la condición sin tratar con NAC, con una $p < 0.0001$ analizando el día 1 vs el día 42 mediante 2way ANOVA seguido por el test de Dunnett. La adición de NAC 20 mM o 25 mM a la bolsa de almacenamiento previno el egreso de oxiHb, con $p < 0,0001$ cuando se compararon nuevamente el día 1 con el día 42 (Fig. 35 A). Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la concentración de metHb con el transcurso del tiempo, ni con la suplementación con las distintas concentraciones de NAC (Fig. 35 B).

El hecho que la oxiHb aumente con el almacenamiento, pero no se observe el mismo comportamiento para la metHb indica que la Hb extracelular proviene de GR que sufrieron lisis reciente, y puede ser un indicativo que los GR envejecidos son más susceptibles a la lisis celular durante la manipulación (extracción de la bolsa de almacenamiento y centrifugación para separar las células del fluido extracelular), esto podría deberse a una mayor fragilidad en la membrana, y en este caso la suplementación con NAC estaría protegiendo la integridad de la membrana del GR. Cabe destacar que una condición excluyente para que una bolsa de almacenamiento

de GR pueda ser transfundida a un paciente es que la concentración de Hb extracelular no sobrepase el 1%. En este caso el máximo de Hb observado a nivel extracelular siempre fue $\leq 1\%$.

2.1. Estudio de la membrana empleando LAURDAN y microscopía confocal

Con el fin de objetivar si los cambios observados en la concentración de Hb extracorpúscular con el almacenamiento se debieron a alteraciones de membrana, la integridad de las mismas se estudió utilizando la sonda Laurdan. La cola hidrofóbica del Laurdan (Fig. 26) permite solubilizar a la sonda en la bicapa lipídica mientras que el residuo de naftaleno se queda en el entorno del glicerol de los fosfolípidos, ubicándose hacia el solvente. Así ubicado en la membrana, el espectro de emisión del Laurdan tiene un pico máximo a 440 nm en la fase gel y muestra un corrimiento al rojo (490 nm) cuando la membrana sufre transición a la fase líquida, o sea cuando penetran más en la bicapa las moléculas de H₂O del solvente (Fig. 36).

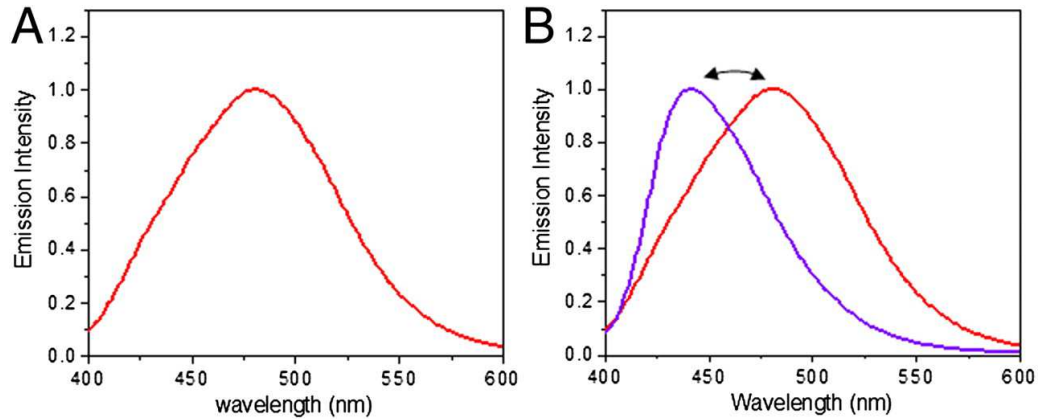
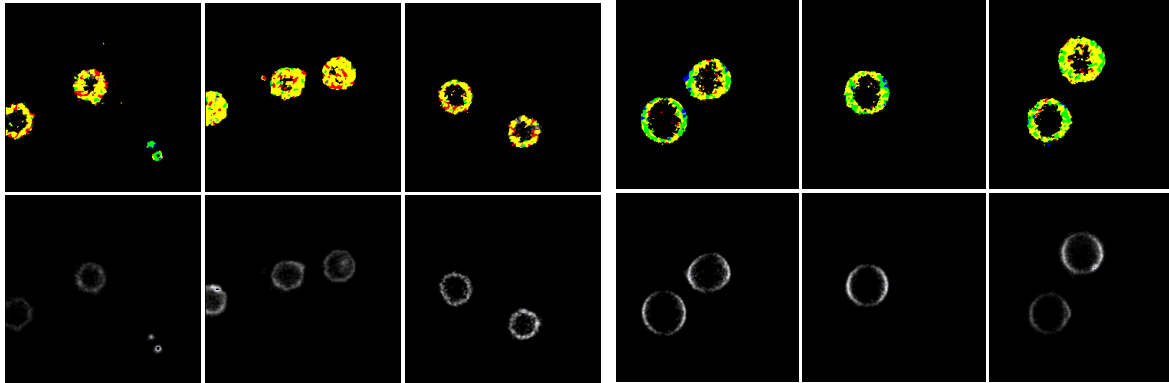


Figura 36. Fluctuación de GP de Laurdan. Espectro de emisión de Laurdan solubilizado en pequeñas vesículas unilaminares de DPPC (A) a 50°C y (B) a 50°C (rojo) y 35°C (azul) utilizando excitación a 340 nm. Imagen obtenida de (Sanchez, Tricerri et al. 2012)

Este corrimiento espectral, que se puede cuantificar calculando la llamada Polarización Generalizada, GP, se debe a la relajación por solvente del estado excitado. Para el Laurdan, el estado excitado presenta un momento dipolar mayor que el estado basal, por lo tanto se estabiliza mejor en solvente polar, siendo la transición al estado basal de menor energía, o sea, mayor longitud de onda. Los valores de GP van desde 1 (sin efecto del solvente) hasta -1 (efecto máximo del solvente polar). Una vez intercalada esta sonda fluorescente en la membrana, podemos medir GP tanto en cubeta como en el microscopio, y nos permite medir la fluidez de la misma. En microscopía, lo que hacemos es ajustar el microscopio con la transmitancia del filtro GP a 440 nm en un canal y a 490 nm en otro canal. En este caso se definió una escala artificial de colores donde el rojo representa el estado más ordenado (GP=+1), pasando luego por el amarillo y el verde, para llegar al estado más desordenado (GP=-1) que se definió con el color azul.

21 días de almacenamiento

32 días de almacenamiento



21 días de almacenamiento + 50 μ M H₂O₂

32 días de almacenamiento + 50 μ M H₂O₂

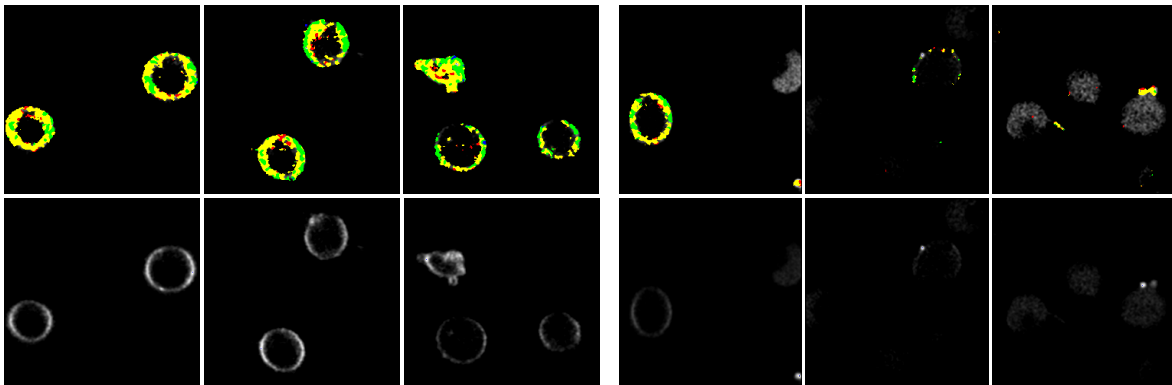


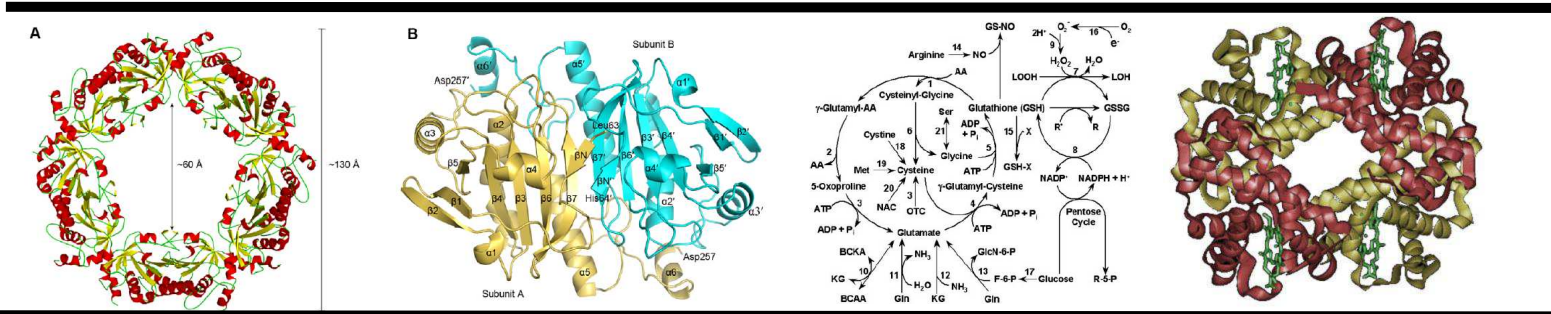
Figura 37. Laurdan incorporado a la membrana de GR. Imágenes de microscopía confocal de la sonda Laurdan en la membrana del GR (GR inmovilizados sobre portaobjetos de polilisina), para muestras de 21 y 32 días de almacenamiento, con y sin tratar con H₂O₂ 50 μ M. Código de color: Rojo, GP = 1 (gel, ordenado); Azul, GP = -1 (líquida, desordenada).

Como puede observarse en la imagen, las membranas de GR de 21 días de almacenamiento presentan un mayor orden que las membranas del día 32. A su vez el agregado de H₂O₂ a baja concentración (50 μ M) desorganiza la membrana plasmática, hay una mayor penetración de moléculas polares de H₂O que alteran la emisión de la sonda, siendo el efecto notoriamente más visible en los GR más envejecidos.

Estos estudios preliminares son prometedores para estudiar a fondo la integridad de la membrana de GR. Restaría ahora avanzar en analizar si la presencia de NAC en la solución de preservación, mantiene por mayor tiempo la integridad de la membrana del GR. Hasta podría llegar a utilizarse en el banco de sangre, como un análisis sencillo de calidad del producto concentrado de GR para transfusión.

- La concentración de GSH en el citosol del eritrocito se vio alterada tempranamente por el almacenamiento
 - El principal producto de oxidación de GSH fue GSSG
 - Los disulfuros mixtos GS-proteína estuvieron presentes aún en los glóbulos extraídos recientemente
 - la proteína predominante identificada por MS/MS en el eluato de la columna de afinidad para glutationilación fue Hb, aunque no se logró identificar el sitio de modificación.
 - La suplementación con NAC (2,5 - 10 mM) en la solución de preservación de concentrados de GR, fue capaz de prevenir la oxidación de GSH sólo por un período de tiempo limitado
 - coincidente con una duración limitada del antioxidante dentro del GR
- El estado de oligomerización de la Prx-2 también se vio afectado por el almacenamiento, observándose:
 - un aumento progresivo de la forma dimérica (disulfuro) de la enzima
 - una disminución rápida de los agregados de alto peso molecular
 - un aumento progresivo de la asociación de la enzima a proteínas de membrana
 - la adición de NAC sólo mostró un efecto protector escaso respecto a la asociación de la Prx-2 a la membrana eritrocítica
- La capacidad de los GR de consumir H_2O_2 agregado al espacio extracelular disminuyó significativamente y de forma temprana durante el almacenamiento
 - El consumo de H_2O_2 fue parcialmente restituido en los GR almacenados en presencia de NAC (5 mM)
 - El agregado del agente alquilante de tioles NEM (50 mM) disminuyó el consumo de H_2O_2 en ~50%, tanto en los glóbulos frescos como almacenados, indicando el rol preponderante de las peroxidasas dependiente de tioles en la remoción de H_2O_2
 - La inhibición de catalasa por aminotriazole (AT, 50 mM) no tuvo efecto sobre el consumo de H_2O_2
 - La adición simultánea del quelante de tioles y del inhibidor de catalasa abolió totalmente el consumo de H_2O_2 en ambas poblaciones celulares, apuntando hacia un trabajo conjunto y complementario de ambos sistemas.
- La integridad de la membrana se vio profundamente alterada con el almacenamiento, ante el agregado de H_2O_2
 - experimentos preliminares de microscopía de fluorescencia de GR incubados con Laurdan, mostraron un mayor “desorden” y una mayor fragilidad de la membrana ante el agregado de H_2O_2

Referencias



Aalberts, J. J., A. G. Schuurman, G. Pals, B. J. Hamel, G. Bosman, Y. Hilhorst-Hofstee, D. Q. Barge-Schaapveld, B. J. Mulder, M. P. van den Berg and J. P. van Tintelen (2010). "Recurrent and founder mutations in the Netherlands: Extensive clinical variability in Marfan syndrome patients with a single novel recurrent fibrillin-1 missense mutation." Neth Heart J **18**(2): 85-89.

Abed, M., S. T. Towhid, S. Mia, T. Pakladok, I. Alesutan, O. Borst, M. Gawaz, E. Gulbins and F. Lang (2012). "Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **303**(9): C991-999.

Abed, M., S. T. Towhid, N. Shaik and F. Lang (2012). "Stimulation of suicidal death of erythrocytes by rifampicin." Toxicology **302**(2-3): 123-128.

Abraham, E. C., J. F. Taylor and C. A. Lang (1978). "Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism." Biochem J **174**(3): 819-825.

Abugo, O. O. and J. M. Rifkind (1994). "Oxidation of hemoglobin and the enhancement produced by nitroblue tetrazolium." J Biol Chem **269**(40): 24845-24853.

Agar, N. S., S. M. Sadrzadeh, P. E. Hallaway and J. W. Eaton (1986). "Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense?" J Clin Invest **77**(1): 319-321.

Ahmed, M. S., H. Langer, M. Abed, J. Voelkl and F. Lang (2013). "The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death." Kidney Blood Press Res **37**(2-3): 158-167.

Ajmani, R. S., J. L. Fleg, A. A. Demehin, J. G. Wright, F. O'Connor, J. M. Heim, E. Tarien and J. M. Rifkind (2003). "Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise." Clin Hemorheol Microcirc **28**(1): 29-40.

Ajmani, R. S. and J. M. Rifkind (1998). "Hemorheological changes during human aging." Gerontology **44**(2): 111-120.

Alper, S. L. (2006). "Molecular physiology of SLC4 anion exchangers." Exp Physiol **91**(1): 153-161.

Alvarez, B., S. Carballal, L. Turell and R. Radi (2010). "Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin." Methods Enzymol **473**: 117-136.

Allen, D. W., S. Cadman, S. R. McCann and B. Finkel (1977). "Increased membrane binding of erythrocyte catalase in hereditary spherocytosis and in metabolically stressed normal cells." Blood **49**(1): 113-123.

Amer, J., A. Goldfarb and E. Fibach (2004). "Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells." Cytometry A **60**(1): 73-80.

Aminoff, D., A. Rolfes-Curl and E. Supina (1992). "Molecular biomarkers of aging: the red cell as a model." Arch Gerontol Geriatr **15 Suppl 1**: 7-15.

An, X. (2014). "The red cell membrane, part 2: disorders of the red cell membrane." Clin Adv Hematol Oncol **12**(9): 606-608.

An, X. L., Y. Takakuwa, W. Nunomura, S. Manno and N. Mohandas (1996). "Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1. Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties." J Biol Chem **271**(52): 33187-33191.

Andersen, P. M. and A. Al-Chalabi (2011). "Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know?" Nat Rev Neurol **7**(11): 603-615.

Antonelou, M. H., A. G. Kriebardis and I. S. Papassideri (2010). "Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice." Blood Transfus **8 Suppl 3**: s39-47.

Antonelou, M. H., A. G. Kriebardis, K. E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L. H. Margaritis and I. S. Papassideri (2010). "Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol." Transfusion **50**(2): 376-389.

Antonelou, M. H., V. L. Tzounakas, A. D. Velentzas, K. E. Stamoulis, A. G. Kriebardis and I. S. Papassideri (2012). "Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome." *J Proteomics* **76 Spec No.:** 220-238.

Aoshiha, K., Y. Nakajima, S. Yasui, J. Tamaoki and A. Nagai (1999). "Red blood cells inhibit apoptosis of human neutrophils." *Blood* **93**(11): 4006-4010.

Arese, P., F. Turrini and E. Schwarzer (2005). "Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes." *Cell Physiol Biochem* **16**(4-6): 133-146.

Arruda, M. M., G. Mecabo, C. A. Rodrigues, S. S. Matsuda, I. B. Rabelo and M. S. Figueiredo (2013). "Antioxidant vitamins C and E supplementation increases markers of haemolysis in sickle cell anaemia patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Br J Haematol* **160**(5): 688-700.

AuBuchon, J. P., M. D. Elfath, M. A. Popovsky, R. R. Stromberg, C. Pickard, L. Herschel, P. Whitley, D. McNeil, N. Arnold and J. L. O'Connor (1997). "Evaluation of a new prestorage leukoreduction filter for red blood cell units." *Vox Sang* **72**(2): 101-106.

Aw, T. Y. (2003). "Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation." *News Physiol Sci* **18**: 201-204.

Awasthi, Y. C., E. Beutler and S. K. Srivastava (1975). "Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase." *J Biol Chem* **250**(13): 5144-5149.

Balagopalakrishna, C., P. T. Manoharan, O. O. Abugo and J. M. Rifkind (1996). "Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions." *Biochemistry* **35**(20): 6393-6398.

Barranco-Medina, S., J. J. Lazaro and K. J. Dietz (2009). "The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function." *FEBS Lett* **583**(12): 1809-1816.

Bartosz, G. (1991). "Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes." *Gerontology* **37**(1-3): 33-67.

Bartosz, G., E. Grzelinska and J. Wagner (1982). "Aging of the erythrocyte. XIV. ATP content does decrease." *Experientia* **38**(5): 575.

Barvitenko, N. N., N. C. Adragna and R. E. Weber (2005). "Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance." *Cell Physiol Biochem* **15**(1-4): 1-18.

Bayer, S. B., M. B. Hampton and C. C. Winterbourn (2015). "Accumulation of oxidized peroxiredoxin 2 in red blood cells and its prevention." *Transfusion* **55**(8): 1909-1918.

Bayer, S. B., G. Maghazal, R. Stocker, M. B. Hampton and C. C. Winterbourn (2013). "Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation." *Faseb J* **27**(8): 3315-3322.

Beckman, J. S., H. Ischiropoulos, L. Zhu, M. van der Woerd, C. Smith, J. Chen, J. Harrison, J. C. Martin and M. Tsai (1992). "Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite." *Arch Biochem Biophys* **298**(2): 438-445.

Benfeitás, R., G. Selvaggio, F. Antunes, P. M. Coelho and A. Salvador (2014). "Hydrogen peroxide metabolism and sensing in human erythrocytes: a validated kinetic model and reappraisal of the role of peroxiredoxin II." *Free Radic Biol Med* **74**: 35-49.

Benhar, M. and J. S. Stamler (2005). "A central role for S-nitrosylation in apoptosis." *Nat Cell Biol* **7**(7): 645-646.

Bennett-Guerrero, E., T. H. Veldman, A. Doctor, M. J. Telen, T. L. Ortel, T. S. Reid, M. A. Mulherin, H. Zhu, R. D. Buck, R. M. Califf and T. J. McMahon (2007). "Evolution of adverse changes in stored RBCs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(43): 17063-17068.

Bennett, V. and P. J. Stenbuck (1980). "Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane." J Biol Chem **255**(13): 6424-6432.

Berezina, T. L., S. B. Zaets, C. Morgan, C. R. Spillert, M. Kamiyama, Z. Spolarics, E. A. Deitch and G. W. Machiedo (2002). "Influence of storage on red blood cell rheological properties." J Surg Res **102**(1): 6-12.

Berg, C. P., I. H. Engels, A. Rothbart, K. Lauber, A. Renz, S. F. Schlosser, K. Schulze-Osthoff and S. Wesselborg (2001). "Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis." Cell Death Differ **8**(12): 1197-1206.

Bessis, M. (1958). "[Erythroblastic island, functional unity of bone marrow]." Rev Hematol **13**(1): 8-11.

Bessis, M. and P. Mandon (1972). "[Microspherulation and myelinic forms of erythrocytes. Comparative examination with the scanning and transmission electron microscope]." Nouv Rev Fr Hematol **12**(4): 443-454.

Bessis, M. C. and J. Breton-Gorius (1962). "Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review." Blood **19**: 635-663.

Bessos, H. and J. Seghatchian (2005). "Red cell storage lesion: the potential impact of storage-induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells." Transfus Apher Sci **32**(2): 227-232.

Beutler, E., A. Meul and L. A. Wood (1969). "Depletion and regeneration of 2,3-diphosphoglyceric acid in stored red blood cells." Transfusion **9**(3): 109-115.

Beutler, E. and C. West (1979). "The storage of hard-packed red blood cells in citrate-phosphate-dextrose (CPD) and CPD-adenine (CPDA-1)." Blood **54**(1): 280-284.

Biteau, B., J. Labarre and M. B. Toledano (2003). "ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin." Nature **425**(6961): 980-984.

Bocci, V., G. P. Pessina and L. Paulesu (1980). "Studies of factors regulating the ageing of human erythrocytes--III. Metabolism and fate of erythrocytic vesicles." Int J Biochem **11**(2): 139-142.

Bosch, F. H., J. M. Werre, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, T. H. Huls, F. L. Willekens and M. R. Halie (1992). "Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation." Blood **79**(1): 254-260.

Bosman, G. J. and M. M. Kay (1988). "Erythrocyte aging: a comparison of model systems for simulating cellular aging in vitro." Blood Cells **14**(1): 19-46.

Bosman, G. J., E. Lasonder, M. Lutten, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, V. M. Novotny, H. Bos and W. J. De Grip (2008). "The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions." Transfusion **48**(5): 827-835.

Bosman, G. J., J. M. Werre, F. L. Willekens and V. M. Novotny (2008). "Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion." Transfus Med **18**(6): 335-347.

Bosman, G. J., F. L. Willekens and J. M. Werre (2005). "Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?" Cell Physiol Biochem **16**(1-3): 1-8.

Bouldin, S. D., M. A. Darch, P. J. Hart and C. E. Outten (2012). "Redox properties of the disulfide bond of human Cu,Zn superoxide dismutase and the effects of human glutaredoxin 1." Biochem J **446**(1): 59-67.

Bracci, R., S. Perrone and G. Buonocore (2002). "Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period." Acta Paediatr Suppl **91**(438): 130-134.

Brand, V. B., C. D. Sandu, C. Duranton, V. Tanneur, K. S. Lang, S. M. Huber and F. Lang (2003). "Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte." Cell Physiol Biochem **13**(6): 347-356.

Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." Annu Rev Biochem **63**: 175-195.

Brugnara, C. (1993). "Membrane transport of Na and K and cell dehydration in sickle erythrocytes." Experientia **49**(2): 100-109.

Brugnara, C., L. de Franceschi and S. L. Alper (1993). "Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives." J Clin Invest **92**(1): 520-526.

Bryk, R., P. Griffin and C. Nathan (2000). "Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins." Nature **407**(6801): 211-215.

Burger, P., H. Korsten, D. De Korte, E. Rombout, R. Van Bruggen and A. J. Verhoeven (2010). "An improved red blood cell additive solution maintains 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate levels by an enhancing effect on phosphofructokinase activity during cold storage." Transfusion **50**(11): 2386-2392.

Calcutt, G. (1951). "The formation of hydrogen peroxide during the autoxidation of ascorbic acid." Experientia **7**(1): 26.

Calderon-Salinas, J. V., E. G. Munoz-Reyes, J. F. Guerrero-Romero, M. Rodriguez-Moran, R. L. Bracho-Riquelme, M. A. Carrera-Gracia and M. A. Quintanar-Escorza (2011). "Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease." Mol Cell Biochem **357**(1-2): 171-179.

Campanella, M. E., H. Chu and P. S. Low (2005). "Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2402-2407.

Canals, S., M. J. Casarejos, S. de Bernardo, E. Rodriguez-Martin and M. A. Mena (2003). "Nitric oxide triggers the toxicity due to glutathione depletion in midbrain cultures through 12-lipoxygenase." J Biol Chem **278**(24): 21542-21549.

Cao, Z., J. B. Bell, J. G. Mohanty, E. Nagababu and J. M. Rifkind (2009). "Nitrite enhances RBC hypoxic ATP synthesis and the release of ATP into the vasculature: a new mechanism for nitrite-induced vasodilation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(4): H1494-1503.

Cao, Z., A. W. Roszak, L. J. Gourlay, J. G. Lindsay and N. W. Isaacs (2005). "Bovine mitochondrial peroxiredoxin III forms a two-ring catenane." Structure **13**(11): 1661-1664.

Cappadoro, M., G. Giribaldi, E. O'Brien, F. Turrini, F. Mannu, D. Ulliers, G. Simula, L. Luzzatto and P. Arese (1998). "Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency." Blood **92**(7): 2527-2534.

Celedon, G., G. Gonzalez, J. Pino and E. A. Lissi (2007). "Peroxynitrite oxidizes erythrocyte membrane band 3 protein and diminishes its anion transport capacity." Free Radic Res **41**(3): 316-323.

Cimen, M. Y. (2008). "Free radical metabolism in human erythrocytes." Clin Chim Acta **390**(1-2): 1-11.

Cohen, C. M., E. Dotimas and C. Korsgren (1993). "Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin)." Semin Hematol **30**(2): 119-137.

Cohen, R. M., R. S. Franco, P. K. Khera, E. P. Smith, C. J. Lindsell, P. J. Ciruolo, M. B. Palascak and C. H. Joiner (2008). "Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c." Blood **112**(10): 4284-4291.

Cole, W. F., M. G. Rumsby, G. H. Longster and L. A. Tovey (1978). "The release of erythrocyte membrane antigens to the plasma as membrane microvesicles during the storage of human blood for transfusion [proceedings]." Biochem Soc Trans **6**(6): 1375-1378.

Comporti, M., C. Signorini, G. Buonocore and L. Ciccoli (2002). "Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing." Free Radic Biol Med **32**(7): 568-576.

Cooper, C. E. (1999). "Nitric oxide and iron proteins." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 290-309.

Copley, S. D., W. R. Novak and P. C. Babbitt (2004). "Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor." Biochemistry **43**(44): 13981-13995.

Cortes-Puch, I., D. Wang, J. Sun, S. B. Solomon, K. E. Remy, M. Fernandez, J. Feng, T. Kaniyas, L. Bellavia, D. Sinchar, A. Perlegas, M. A. Solomon, W. E. Kelley, M. A. Popovsky, M. T. Gladwin, D. B. Kim-Shapiro, H. G. Klein and C. Natanson (2014). "Washing older blood units before transfusion reduces plasma iron and improves outcomes in experimental canine pneumonia." Blood **123**(9): 1403-1411.

Cortese-Krott, M. M. and M. Kelm (2014). "Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocyte function?" Redox Biol **2**: 251-258.

Cortese-Krott, M. M., A. Rodriguez-Mateos, R. Sansone, G. G. Kuhnle, S. Thasian-Sivarajah, T. Krenz, P. Horn, C. Krisp, D. Wolters, C. Heiss, K. D. Kroncke, N. Hogg, M. Feelisch and M. Kelm (2012). "Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease." Blood **120**(20): 4229-4237.

Cosby, K., K. S. Partovi, J. H. Crawford, R. P. Patel, C. D. Reiter, S. Martyr, B. K. Yang, M. A. Waclawiw, G. Zalos, X. Xu, K. T. Huang, H. Shields, D. B. Kim-Shapiro, A. N. Schechter, R. O. Cannon, 3rd and M. T. Gladwin (2003). "Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation." Nat Med **9**(12): 1498-1505.

Craescu, C. T., C. Poyart, C. Schaeffer, M. C. Garel, J. Kister and Y. Beuzard (1986). "Covalent binding of glutathione to hemoglobin. II. Functional consequences and structural changes reflected in NMR spectra." J Biol Chem **261**(31): 14710-14716.

Crawford, J. H., T. S. Isbell, Z. Huang, S. Shiva, B. K. Chacko, A. N. Schechter, V. M. Darley-Usmar, J. D. Kerby, J. D. Lang, Jr., D. Kraus, C. Ho, M. T. Gladwin and R. P. Patel (2006). "Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation." Blood **107**(2): 566-574.

Cumming, R. C., R. Dargusch, W. H. Fischer and D. Schubert (2007). "Increase in expression levels and resistance to sulfhydryl oxidation of peroxiredoxin isoforms in amyloid beta-resistant nerve cells." J Biol Chem **282**(42): 30523-30534.

Chance, B. (1949). "The primary and secondary compounds of catalase and methyl or ethyl hydrogen peroxide; kinetics and activity." J Biol Chem **179**(3): 1341-1369.

Chance, B. (1949). "The primary and secondary compounds of catalase and methyl or ethyl hydrogen peroxide; reactions with hydrogen peroxide." J Biol Chem **180**(3): 947-959.

Chen, L. Y. and J. L. Mehta (1998). "Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function." J Cardiovasc Pharmacol **32**(1): 57-61.

Chen, X., H. Shang, X. Qiu, N. Fujiwara, L. Cui, X. M. Li, T. M. Gao and J. Kong (2012). "Oxidative modification of cysteine 111 promotes disulfide bond-independent aggregation of SOD1." Neurochem Res **37**(4): 835-845.

Chin-Yee, I., M. Keeney, L. Krueger, G. Dietz and G. Moses (1998). "Supernatant from stored red cells activates neutrophils." *Transfus Med* **8**(1): 49-56.

Chirico, E. N. and V. Pialoux (2012). "Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease." *IUBMB Life* **64**(1): 72-80.

Cho, C. S., G. J. Kato, S. H. Yang, S. W. Bae, J. S. Lee, M. T. Gladwin and S. G. Rhee (2010). "Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia." *Antioxid Redox Signal* **13**(1): 1-11.

Chu, H., A. Breite, P. Ciraolo, R. S. Franco and P. S. Low (2008). "Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties." *Blood* **111**(2): 932-938.

Chung, T. K., M. A. Funk and D. H. Baker (1990). "L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate as a cysteine precursor: efficacy for growth and hepatic glutathione synthesis in chicks and rats." *J Nutr* **120**(2): 158-165.

D'Alessandro, A., G. M. D'Amici, S. Vaglio and L. Zolla (2012). "Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: from metabolism to proteomics." *Haematologica* **97**(1): 107-115.

D'Alessandro, A., F. Gevi and L. Zolla (2013). "Red blood cell metabolism under prolonged anaerobic storage." *Mol Biosyst* **9**(6): 1196-1209.

D'Alessandro, A., G. Liunbruno, G. Grazzini and L. Zolla (2010). "Red blood cell storage: the story so far." *Blood Transfus* **8**(2): 82-88.

D'Alessandro, A., C. Mirasole and L. Zolla (2013). "Haemoglobin glycation (Hb1Ac) increases during red blood cell storage: a MALDI-TOF mass-spectrometry-based investigation." *Vox Sang* **105**(2): 177-180.

D'Alessandro, A., P. G. Righetti and L. Zolla (2010). "The red blood cell proteome and interactome: an update." *J Proteome Res* **9**(1): 144-163.

Daleke, D. L. (2008). "Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane." *Curr Opin Hematol* **15**(3): 191-195.

Dawson, R. B., R. T. Hershey, C. S. Myers and J. W. Eaton (1980). "Blood preservation XLIV. 2,3-DPG maintenance by dehydroascorbate better than D-ascorbic acid." *Transfusion* **20**(3): 321-323.

Dawson, R. B., R. T. Hershey, C. S. Myers and R. M. Miller (1981). "Blood preservation 35. Red cell 2,3-DPG and ATP maintained by DHA-ascorbate-phosphate." *Transfusion* **21**(2): 219-223.

Deisseroth, A. and A. L. Dounce (1970). "Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role." *Physiol Rev* **50**(3): 319-375.

Dejam, A., C. J. Hunter, M. M. Pelletier, L. L. Hsu, R. F. Machado, S. Shiva, G. G. Power, M. Kelm, M. T. Gladwin and A. N. Schechter (2005). "Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood." *Blood* **106**(2): 734-739.

Delcarte, J., P. Jacques, M. L. Fauconnier, P. Hoyaux, K. Matsui, M. Marlier and P. Thonart (2001). "The homolytic and heterolytic fatty acid hydroperoxide lyase-like activities of hematin." *Biochem Biophys Res Commun* **286**(1): 28-32.

Deliconstantinos, G., V. Villiotou, J. C. Stavrides, N. Salemes and J. Gogas (1995). "Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients." *Anticancer Res* **15**(4): 1435-1446.

Demehin, A. A., O. O. Abugo, R. Jayakumar, J. R. Lakowicz and J. M. Rifkind (2002). "Binding of hemoglobin to red cell membranes with eosin-5-maleimide-labeled band 3: analysis of centrifugation and fluorescence data." *Biochemistry* **41**(27): 8630-8637.

Deponte, M. (2013). "Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes." *Biochim Biophys Acta* **1830**(5): 3217-3266.

Devaux, P. F., A. Herrmann, N. Ohlwein and M. M. Kozlov (2008). "How lipid flippases can modulate membrane structure." Biochim Biophys Acta **1778**(7-8): 1591-1600.

Diaz, A., P. C. Loewen, I. Fita and X. Carpena (2012). "Thirty years of heme catalases structural biology." Arch Biochem Biophys **525**(2): 102-110.

Dimmeler, S., J. Haendeler, M. Nehls and A. M. Zeiher (1997). "Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases." J Exp Med **185**(4): 601-607.

Doyle, M. P., R. A. Pickering, T. M. DeWeert, J. W. Hoekstra and D. Pater (1981). "Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites." J Biol Chem **256**(23): 12393-12398.

Du, J., J. J. Cullen and G. R. Buettner (2012). "Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer." Biochim Biophys Acta **1826**(2): 443-457.

Dumaswala, U. J. and T. J. Greenwalt (1984). "Human erythrocytes shed exocytic vesicles in vivo." Transfusion **24**(6): 490-492.

Dumaswala, U. J., M. J. Wilson, Y. L. Wu, J. Wykle, L. Zhuo, L. M. Douglass and D. L. Daleke (2000). "Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage." Free Radic Res **33**(5): 517-529.

Dumaswala, U. J., L. Zhuo, S. Mahajan, P. N. Nair, H. G. Shertzer, P. Dibello and D. W. Jacobsen (2001). "Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs." Am J Physiol Cell Physiol **280**(4): C867-873.

Durantón, C., S. M. Huber and F. Lang (2002). "Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells." J Physiol **539**(Pt 3): 847-855.

Ellmerer, M., C. Pachler and J. Plank (2008). "Tight glycemic control in the hospital." J Diabetes Sci Technol **2**(4): 728-731.

Epp, O., R. Ladenstein and A. Wendel (1983). "The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution." Eur J Biochem **133**(1): 51-69.

Eroglu, S., D. Pandir, F. G. Uzun and H. Bas (2013). "Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro." Biol Res **46**(1): 33-38.

Fang, Y. Z., S. Yang and G. Wu (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition." Nutrition **18**(10): 872-879.

Felder, K. M., K. Hoelzle, M. Ritzmann, T. Kilchling, D. Schiele, K. Heinritzi, K. Groebel and L. E. Hoelzle (2011). "Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells." Cell Physiol Biochem **27**(5): 557-564.

Ferrer-Sueta, G., B. Manta, H. Botti, R. Radi, M. Trujillo and A. Denicola (2011). "Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction." Chem Res Toxicol **24**(4): 434-450.

Ferru, E., K. Giger, A. Pantaleo, E. Campanella, J. Grey, K. Ritchie, R. Vono, F. Turrini and P. S. Low (2011). "Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3." Blood **117**(22): 5998-6006.

Field, L. S., Y. Furukawa, T. V. O'Halloran and V. C. Culotta (2003). "Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria." J Biol Chem **278**(30): 28052-28059.

Fita, I. and M. G. Rossmann (1985). "The NADPH binding site on beef liver catalase." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(6): 1604-1608.

Flohe, L. and F. Ursini (2008). "Peroxidase: a term of many meanings." Antioxid Redox Signal **10**(9): 1485-1490.

Folz, R. J. and J. D. Crapo (1994). "Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene." Genomics **22**(1): 162-171.

Foller, M., D. Bobbala, S. Koka, S. M. Huber, E. Gulbins and F. Lang (2009). "Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria." Cell Physiol Biochem **24**(3-4): 133-140.

Foller, M., I. S. Harris, A. Elia, R. John, F. Lang, T. J. Kavanagh and T. W. Mak (2013). "Functional significance of glutamate-cysteine ligase modifier for erythrocyte survival in vitro and in vivo." Cell Death Differ **20**(10): 1350-1358.

Foller, M., S. M. Huber and F. Lang (2008). "Erythrocyte programmed cell death." IUBMB Life **60**(10): 661-668.

Foller, M., R. S. Kasinathan, S. Koka, C. Lang, E. Shumilina, L. Birnbaumer, F. Lang and S. M. Huber (2008). "TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes." Cell Physiol Biochem **21**(1-3): 183-192.

Foller, M., M. Sopjani, S. Koka, S. Gu, H. Mahmud, K. Wang, E. Floride, E. Schleicher, E. Schulz, T. Munzel and F. Lang (2009). "Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase." Faseb J **23**(4): 1072-1080.

Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-1714.

Franco, R. S. (2009). "The measurement and importance of red cell survival." Am J Hematol **84**(2): 109-114.

Fratelli, M., L. O. Goodwin, U. A. Orom, S. Lombardi, R. Tonelli, M. Mengozzi and P. Ghezzi (2005). "Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13998-14003.

Freikman, I., J. Amer, J. S. Cohen, I. Ringel and E. Fibach (2008). "Oxidative stress causes membrane phospholipid rearrangement and shedding from RBC membranes--an NMR study." Biochim Biophys Acta **1778**(10): 2388-2394.

Freikman, I., I. Ringel and E. Fibach (2011). "Oxidative stress-induced membrane shedding from RBCs is Ca flux-mediated and affects membrane lipid composition." J Membr Biol **240**(2): 73-82.

Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.

Gaetani, G. F., S. Galiano, L. Canepa, A. M. Ferraris and H. N. Kirkman (1989). "Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes." Blood **73**(1): 334-339.

Gallo, G. and G. Martino (2009). "Red blood cell glutathione peroxidase activity in female nulligravid and pregnant rats." Reprod Biol Endocrinol **7**: 7.

Gao, M., K. L. Cheung, I. P. Lau, W. S. Yu, K. P. Fung, B. Yu, J. F. Loo and S. K. Kong (2012). "Polyphyllin D induces apoptosis in human erythrocytes through Ca(2+)(+) rise and membrane permeabilization." Arch Toxicol **86**(5): 741-752.

Garel, M. C., Y. Beuzard, J. Thillet, C. Domenget, J. Martin, F. Galacteros and J. Rosa (1982). "Binding of 21 thiol reagents to human hemoglobin in solution and in intact cells." Eur J Biochem **123**(3): 513-519.

Garratty, G. (2005). "Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology." Semin Hematol **42**(3): 156-164.

George, A., S. Pushkaran, D. G. Konstantinidis, S. Koochaki, P. Malik, N. Mohandas, Y. Zheng, C. H. Joiner and T. A. Kalfa (2013). "Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease." Blood **121**(11): 2099-2107.

Gevi, F., A. D'Alessandro, S. Rinalducci and L. Zolla (2012). "Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM." J Proteomics **76 Spec No.:** 168-180.

Ghashghaieina, M., M. Toulany, M. Saki, D. Bobbala, B. Fehrenbacher, R. Rupec, H. P. Rodemann, K. Ghoreschi, M. Rocken, M. Schaller, F. Lang and T. Wieder (2011). "The NFkB pathway inhibitors Bay 11-7082 and parthenolide induce programmed cell death in anucleated Erythrocytes." Cell Physiol Biochem **27(1):** 45-54.

Ghezzi, P. (2005). "Regulation of protein function by glutathionylation." Free Radic Res **39(6):** 573-580.

Ghezzi, P. (2011). "Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung." Int J Gen Med **4:** 105-113.

Ghezzi, P. (2013). "Protein glutathionylation in health and disease." Biochim Biophys Acta **1830(5):** 3165-3172.

Giulivi, C. and K. J. Davies (1994). "Hydrogen peroxide-mediated ferrylhemoglobin generation in vitro and in red blood cells." Methods Enzymol **231:** 490-496.

Gladwin, M. T., J. R. Lancaster, Jr., B. A. Freeman and A. N. Schechter (2003). "Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm." Nat Med **9(5):** 496-500.

Glass, G. A. and D. Gershon (1984). "Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging." Biochem J **218(2):** 531-537.

Goodman, S. R., O. Daescu, D. G. Kakhniashvili and M. Zivanic (2013). "The proteomics and interactomics of human erythrocytes." Exp Biol Med (Maywood) **238(5):** 509-518.

Goth, L. and J. W. Eaton (2000). "Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes." Lancet **356(9244):** 1820-1821.

Govoni, M., E. A. Jansson, E. Weitzberg and J. O. Lundberg (2008). "The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash." Nitric Oxide **19(4):** 333-337.

Greenwalt, T. J. (2006). "The how and why of exocytic vesicles." Transfusion **46(1):** 143-152.

Greenwalt, T. J., D. J. Bryan and U. J. Dumaswala (1984). "Erythrocyte membrane vesiculation and changes in membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1." Vox Sang **47(4):** 261-270.

Greenwalt, T. J., E. A. Steane, F. O. Lau and K. Sweeney-Hammond (1980). "Aging of the human erythrocyte." Prog Clin Biol Res **43:** 195-212.

Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." Free Radic Biol Med **27(9-10):** 922-935.

Grzelak, A., M. Kruszewski, E. Macierzynska, L. Piotrowski, L. Pulaski, B. Rychlik and G. Bartosz (2009). "The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes." Cell Mol Biol Lett **14(1):** 23-34.

Guarino, M. P., R. A. Afonso, N. Raimundo, J. F. Raposo and M. P. Macedo (2003). "Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284(4):** G588-594.

Haendeler, J., J. Hoffmann, V. Tischler, B. C. Berk, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2002). "Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69." Nat Cell Biol **4(10):** 743-749.

Haendeler, J., J. Hoffmann, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2004). "Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins." Circulation **110(7):** 856-861.

Hall, A., P. A. Karplus and L. B. Poole (2009). "Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions." Febs J **276**(9): 2469-2477.

Hall, E. G., Arthur C (2011). Tratado de fisiología médica. España, Elsevier.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochem J **219**(1): 1-14.

Han, Y. H., S. U. Kim, T. H. Kwon, D. S. Lee, H. L. Ha, D. S. Park, E. J. Woo, S. H. Lee, J. M. Kim, H. B. Chae, S. Y. Lee, B. Y. Kim, Y. Yoon do, S. G. Rhee, E. Fibach and D. Y. Yu (2012). "Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability." Biochem Biophys Res Commun **426**(3): 427-432.

Hanschmann, E. M., J. R. Godoy, C. Berndt, C. Hudemann and C. H. Lillig (2013). "Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling." Antioxid Redox Signal **19**(13): 1539-1605.

Hargrove, M. S., E. W. Singleton, M. L. Quillin, L. A. Ortiz, G. N. Phillips, Jr., J. S. Olson and A. J. Mathews (1994). "His64(E7)-->Tyr apomyoglobin as a reagent for measuring rates of heme dissociation." J Biol Chem **269**(6): 4207-4214.

Harrison, M. L., C. C. Isaacson, D. L. Burg, R. L. Geahlen and P. S. Low (1994). "Phosphorylation of human erythrocyte band 3 by endogenous p72syk." J Biol Chem **269**(2): 955-959.

Heaton, W. A. (1992). "Evaluation of posttransfusion recovery and survival of transfused red cells." Transfus Med Rev **6**(3): 153-169.

Heim, W. G., D. Appleman and H. T. Pyfrom (1955). "Production of catalase changes in animals with 3-amino-1, 2, 4-triazole." Science **122**(3172): 693-694.

Helms, C. and D. B. Kim-Shapiro (2013). "Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling." Free Radic Biol Med **61**: 464-472.

Herold, S. (2004). "The outer-sphere oxidation of nitrosyliron(II)hemoglobin by peroxynitrite leads to the release of nitrogen monoxide." Inorg Chem **43**(13): 3783-3785.

Hess, J. R. (2006). "An update on solutions for red cell storage." Vox Sang **91**(1): 13-19.

Hess, J. R. (2010). "Red cell changes during storage." Transfus Apher Sci **43**(1): 51-59.

Hess, J. R. and T. G. Greenwalt (2002). "Storage of red blood cells: new approaches." Transfus Med Rev **16**(4): 283-295.

Hess, J. R., H. R. Hill, C. K. Oliver, L. E. Lippert and T. J. Greenwalt (2002). "Alkaline CPD and the preservation of RBC 2,3-DPG." Transfusion **42**(6): 747-752.

Hess, J. R., N. Rugg, A. D. Joines, J. F. Gormas, P. G. Pratt, E. B. Silberstein and T. J. Greenwalt (2006). "Buffering and dilution in red blood cell storage." Transfusion **46**(1): 50-54.

Hitchler, M. J. and F. E. Domann (2014). "Regulation of CuZnSOD and its redox signaling potential: implications for amyotrophic lateral sclerosis." Antioxid Redox Signal **20**(10): 1590-1598.

Ho, J., W. J. Sibbald and I. H. Chin-Yee (2003). "Effects of storage on efficacy of red cell transfusion: when is it not safe?" Crit Care Med **31**(12 Suppl): S687-697.

Hofmann, B., H. J. Hecht and L. Flohe (2002). "Peroxiredoxins." Biol Chem **383**(3-4): 347-364.

Hogman, C. F. and K. Hedlund (1985). "Storage of red cells in a CPD/SAGM system using Teruflex PVC." Vox Sang **49**(3): 177-180.

Hogman, C. F., K. Hedlund and H. Zetterstrom (1978). "Clinical usefulness of red cells preserved in protein-poor mediums." N Engl J Med **299**(25): 1377-1382.

Hogman, C. F. and H. T. Meryman (1999). "Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion." Transfus Med Rev **13**(4): 275-296.

Hovav, T., S. Yedgar, N. Manny and G. Barshtein (1999). "Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage." Transfusion **39**(3): 277-281.

Huisman, T. H. and A. M. Dozy (1962). "Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione." J Lab Clin Med **60**: 302-319.

Imanishi, H., T. Nakai, T. Abe and T. Takino (1985). "Glutathione metabolism in red cell aging." Mech Ageing Dev **32**(1): 57-62.

Imanishi, H., T. Nakai, T. Abe and T. Takino (1986). "Glutathione-linked enzyme activities in red cell aging." Clin Chim Acta **159**(1): 73-76.

Immenschuh, S. and E. Baumgart-Vogt (2005). "Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation." Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 768-777.

Indo, H. P., H. C. Yen, I. Nakanishi, K. Matsumoto, M. Tamura, Y. Nagano, H. Matsui, O. Gusev, R. Cornette, T. Okuda, Y. Minamiyama, H. Ichikawa, S. Suenaga, M. Oki, T. Sato, T. Ozawa, D. K. Clair and H. J. Majima (2015). "A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging." J Clin Biochem Nutr **56**(1): 1-7.

Ischiropoulos, H., L. Zhu, J. Chen, M. Tsai, J. C. Martin, C. D. Smith and J. S. Beckman (1992). "Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase." Arch Biochem Biophys **298**(2): 431-437.

Islam, K. N., Y. Kayanoki, H. Kaneto, K. Suzuki, M. Asahi, J. Fujii and N. Taniguchi (1997). "TGF-beta1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in HIT cells through accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and glutathione peroxidase." Free Radic Biol Med **22**(6): 1007-1017.

Iuchi, Y., F. Okada, R. Takamiya, N. Kibe, S. Tsunoda, O. Nakajima, K. Toyoda, R. Nagae, M. Suematsu, T. Soga, K. Uchida and J. Fujii (2009). "Rescue of anaemia and autoimmune responses in SOD1-deficient mice by transgenic expression of human SOD1 in erythrocytes." Biochem J **422**(2): 313-320.

Ivancich, A., H. M. Jouve, B. Sartor and J. Gaillard (1997). "EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates." Biochemistry **36**(31): 9356-9364.

Izzo, P., A. Manicone, A. Spagnuolo, V. M. Lauta, A. Di Pasquale and D. Di Monte (1999). "Erythrocytes stored in CPD SAG-mannitol: evaluation of their deformability." Clin Hemorheol Microcirc **21**(3-4): 335-339.

Jahoor, F., A. Jackson, B. Gazzard, G. Philips, D. Sharpstone, M. E. Frazer and W. Heird (1999). "Erythrocyte glutathione deficiency in symptom-free HIV infection is associated with decreased synthesis rate." Am J Physiol **276**(1 Pt 1): E205-211.

Jeney, V., J. Balla, A. Yachie, Z. Varga, G. M. Vercellotti, J. W. Eaton and G. Balla (2002). "Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme." Blood **100**(3): 879-887.

Jenkins, J. D., D. P. Madden and T. L. Steck (1984). "Association of phosphofructokinase and aldolase with the membrane of the intact erythrocyte." J Biol Chem **259**(15): 9374-9378.

Ji, P., M. Murata-Hori and H. F. Lodish (2011). "Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation." Trends Cell Biol **21**(7): 409-415.

Jia, L., C. Bonaventura, J. Bonaventura and J. S. Stamler (1996). "S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control." Nature **380**(6571): 221-226.

Jilani, K., A. Lupescu, M. Zbidah, M. Abed, N. Shaik and F. Lang (2012). "Enhanced apoptotic death of erythrocytes induced by the mycotoxin ochratoxin A." Kidney Blood Press Res **36**(1): 107-118.

Johansson, C., C. H. Lillig and A. Holmgren (2004). "Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase." J Biol Chem **279**(9): 7537-7543.

Johnson, R. M., G. Goyette, Jr., Y. Ravindranath and Y. S. Ho (2005). "Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes." Free Radic Biol Med **39**(11): 1407-1417.

Johnson, R. M., Y. S. Ho, D. Y. Yu, F. A. Kuypers, Y. Ravindranath and G. W. Goyette (2010). "The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism." Free Radic Biol Med **48**(4): 519-525.

Jonsson, T. J., M. S. Murray, L. C. Johnson and W. T. Lowther (2008). "Reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by sulfiredoxin proceeds directly through a sulfinic phosphoryl ester intermediate." J Biol Chem **283**(35): 23846-23851.

Kaestner, L. and I. Bernhardt (2002). "Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance." Bioelectrochemistry **55**(1-2): 71-74.

Kalinina, E. V., N. N. Chernov and M. D. Novichkova (2014). "Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes." Biochemistry (Mosc) **79**(13): 1562-1583.

Kang, S. W., S. G. Rhee, T. S. Chang, W. Jeong and M. H. Choi (2005). "2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications." Trends Mol Med **11**(12): 571-578.

Kannan, R., J. Yuan and P. S. Low (1991). "Isolation and partial characterization of antibody- and globin-enriched complexes from membranes of dense human erythrocytes." Biochem J **278** (Pt 1): 57-62.

Karon, B. S., C. M. van Buskirk, E. A. Jaben, J. D. Hoyer and D. D. Thomas (2012). "Temporal sequence of major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells." Blood Transfus **10**(4): 453-461.

Kay, M. (2005). "Immunoregulation of cellular life span." Ann N Y Acad Sci **1057**: 85-111.

Kay, M. M. (1984). "Localization of senescent cell antigen on band 3." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(18): 5753-5757.

Kay, M. M. (1993). "Generation of senescent cell antigen on old cells initiates IgG binding to a neoantigen." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **39**(2): 131-153.

Keszler, A., B. Piknova, A. N. Schechter and N. Hogg (2008). "The reaction between nitrite and oxyhemoglobin: a mechanistic study." J Biol Chem **283**(15): 9615-9622.

Kiefer, C. R. and L. M. Snyder (2000). "Oxidation and erythrocyte senescence." Curr Opin Hematol **7**(2): 113-116.

Kiefmann, R., J. M. Rifkind, E. Nagababu and J. Bhattacharya (2008). "Red blood cells induce hypoxic lung inflammation." Blood **111**(10): 5205-5214.

Kim, G. and R. L. Levine (2005). "Molecular determinants of S-glutathionylation of carbonic anhydrase 3." Antioxid Redox Signal **7**(7-8): 849-854.

Kim, K., M. Yu, S. Han, I. Oh, Y. J. Choi, S. Kim, K. Yoon, M. Jung and W. Choe (2009). "Expression of human peroxiredoxin isoforms in response to cervical carcinogenesis." Oncol Rep **21**(6): 1391-1396.

King, M. J., L. Garcon, J. D. Hoyer, A. Iolascon, V. Picard, G. Stewart, P. Bianchi, S. H. Lee and A. Zanella (2015). "ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders." Int J Lab Hematol.

King, M. J. and A. Zanella (2013). "Response to a letter from A. Huisman and R. van Wijk (Ektacytometry and Genetic Testing in Hereditary Red Cell Membrane Disorders)." Int J Lab Hematol.

Kirkpatrick, U. J., R. A. Adams, A. Lardi and C. N. McCollum (1998). "Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood." Br J Haematol **101**(2): 364-368.

Klarl, B. A., P. A. Lang, D. S. Kempe, O. M. Niemoeller, A. Akel, M. Sobiesiak, K. Eisele, M. Podolski, S. M. Huber, T. Wieder and F. Lang (2006). "Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion." Am J Physiol Cell Physiol **290**(1): C244-253.

Kleinbongard, P., R. Schulz, T. Rassaf, T. Lauer, A. Dejam, T. Jax, I. Kumara, P. Gharini, S. Kabanova, B. Ozuyaman, H. G. Schnurch, A. Godecke, A. A. Weber, M. Robenek, H. Robenek, W. Bloch, P. Rosen and M. Kelm (2006). "Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase." Blood **107**(7): 2943-2951.

Knight, J. A., R. P. Voorhees, L. Martin and H. Anstall (1992). "Lipid peroxidation in stored red cells." Transfusion **32**(4): 354-357.

Koch, C. G., L. Li, D. I. Sessler, P. Figueroa, G. A. Hoeltge, T. Mihaljevic and E. H. Blackstone (2008). "Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery." N Engl J Med **358**(12): 1229-1239.

Korell, J., C. V. Coulter and S. B. Duffull (2011). "A statistical model for red blood cell survival." J Theor Biol **268**(1): 39-49.

Kriebardis, A. G., M. H. Antonelou, K. E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L. H. Margaritis and I. S. Papassideri (2006). "Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 279-282.

Kriebardis, A. G., M. H. Antonelou, K. E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L. H. Margaritis and I. S. Papassideri (2007). "Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells." J Cell Mol Med **11**(1): 148-155.

Kristensen, P., D. E. Rasmussen and B. I. Kristensen (1999). "Properties of thiol-specific anti-oxidant protein or calpromotin in solution." Biochem Biophys Res Commun **262**(1): 127-131.

La Celle, P. L. (1969). "Alteration of deformability of the erythrocyte membrane in stored blood." Transfusion **9**(5): 238-245.

Lacroix, J., P. C. Hebert, D. A. Fergusson, A. Tinmouth, D. J. Cook, J. C. Marshall, L. Clayton, L. McIntyre, J. Callum, A. F. Turgeon, M. A. Blajchman, T. S. Walsh, S. J. Stanworth, H. Campbell, G. Capellier, P. Tiberghien, L. Bardiaux, L. van de Watering, N. J. van der Meer, E. Sabri, D. Vo, A. Investigators and G. Canadian Critical Care Trials (2015). "Age of transfused blood in critically ill adults." N Engl J Med **372**(15): 1410-1418.

Laczko, J., M. Szabolcs and I. Jona (1985). "Vesicle release from erythrocytes during storage and failure of rejuvenation to restore cell morphology." Haematologia (Budap) **18**(4): 233-248.

Lancaster, J. R., Jr. (1994). "Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8137-8141.

Lang, E., K. Jilani, C. Zelenak, V. Pasham, D. Bobbala, S. M. Qadri and F. Lang (2011). "Stimulation of suicidal erythrocyte death by benzethonium." Cell Physiol Biochem **28**(2): 347-354.

Lang, E., S. M. Qadri, K. Jilani, C. Zelenak, A. Lupescu, E. Schleicher and F. Lang (2012). "Carbon monoxide-sensitive apoptotic death of erythrocytes." Basic Clin Pharmacol Toxicol **111**(5): 348-355.

Lang, E., S. M. Qadri and F. Lang (2012). "Killing me softly - suicidal erythrocyte death." Int J Biochem Cell Biol **44**(8): 1236-1243.

Lang, E., S. M. Qadri, C. Zelenak, S. Gu, A. Rotte, A. Draeger and F. Lang (2011). "Inhibition of suicidal erythrocyte death by blebbistatin." Am J Physiol Cell Physiol **301**(2): C490-498.

Lang, F., G. L. Busch, M. Ritter, H. Volkl, S. Waldegger, E. Gulbins and D. Haussinger (1998). "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms." Physiol Rev **78**(1): 247-306.

Lang, F., E. Gulbins, H. Lerche, S. M. Huber, D. S. Kempe and M. Foller (2008). "Eryptosis, a window to systemic disease." Cell Physiol Biochem **22**(5-6): 373-380.

Lang, F., K. S. Lang, P. A. Lang, S. M. Huber and T. Wieder (2006). "Mechanisms and significance of eryptosis." Antioxid Redox Signal **8**(7-8): 1183-1192.

Lang, F. and S. M. Qadri (2012). "Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes." Blood Purif **33**(1-3): 125-130.

Lang, K. S., C. Duranton, H. Poehlmann, S. Myssina, C. Bauer, F. Lang, T. Wieder and S. M. Huber (2003). "Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes." Cell Death Differ **10**(2): 249-256.

Lang, K. S., P. A. Lang, C. Bauer, C. Duranton, T. Wieder, S. M. Huber and F. Lang (2005). "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." Cell Physiol Biochem **15**(5): 195-202.

Lang, K. S., B. Roll, S. Myssina, M. Schittenhelm, H. G. Scheel-Walter, L. Kanz, J. Fritz, F. Lang, S. M. Huber and T. Wieder (2002). "Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." Cell Physiol Biochem **12**(5-6): 365-372.

Lang, P. A., S. Kaiser, S. Myssina, T. Wieder, F. Lang and S. M. Huber (2003). "Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis." Am J Physiol Cell Physiol **285**(6): C1553-1560.

Lang, P. A., R. S. Kasinathan, V. B. Brand, C. Duranton, C. Lang, S. Koka, E. Shumilina, D. S. Kempe, V. Tanneur, A. Akel, K. S. Lang, M. Foller, J. F. Kun, P. G. Kremsner, S. Wesselborg, S. Laufer, C. S. Clemen, C. Herr, A. A. Noegel, T. Wieder, E. Gulbins, F. Lang and S. M. Huber (2009). "Accelerated clearance of Plasmodium-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency." Cell Physiol Biochem **24**(5-6): 415-428.

Lang, P. A., D. S. Kempe, S. Myssina, V. Tanneur, C. Birka, S. Laufer, F. Lang, T. Wieder and S. M. Huber (2005). "PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death." Cell Death Differ **12**(5): 415-428.

Larsen, F. L., S. Katz and B. D. Roufogalis (1981). "Calmodulin regulation of Ca²⁺ transport in human erythrocytes." Biochem J **200**(2): 185-191.

Lau, I. P., H. Chen, J. Wang, H. C. Ong, K. C. Leung, H. P. Ho and S. K. Kong (2012). "In vitro effect of CTAB- and PEG-coated gold nanorods on the induction of eryptosis/erythroptosis in human erythrocytes." Nanotoxicology **6**: 847-856.

Leal-Noval, S. R., I. Jara-Lopez, J. L. Garcia-Garmendia, A. Marin-Niebla, A. Herruzo-Aviles, P. Camacho-Larana and J. Loscertales (2003). "Influence of erythrocyte concentrate storage time on postsurgical morbidity in cardiac surgery patients." Anesthesiology **98**(4): 815-822.

Lee, K. W., D. J. Lee, J. Y. Lee, D. H. Kang, J. Kwon and S. W. Kang (2011). "Peroxiredoxin II restrains DNA damage-induced death in cancer cells by positively regulating JNK-dependent DNA repair." J Biol Chem **286**(10): 8394-8404.

Lee, S. C., Y. P. Na and J. B. Lee (2003). "Expression of peroxiredoxin II in vascular tumors of the skin: a novel vascular marker of endothelial cells." J Am Acad Dermatol **49**(3): 487-491.

Lee, T. H., S. U. Kim, S. L. Yu, S. H. Kim, D. S. Park, H. B. Moon, S. H. Dho, K. S. Kwon, H. J. Kwon, Y. H. Han, S. Jeong, S. W. Kang, H. S. Shin, K. K. Lee, S. G. Rhee and D. Y. Yu (2003). "Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice." Blood **101**(12): 5033-5038.

Lei, X. G. (2002). "In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice." Methods Enzymol **347**: 213-225.

Lewis, I. A., M. E. Campanella, J. L. Markley and P. S. Low (2009). "Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18515-18520.

Lillig, C. H., C. Berndt and A. Holmgren (2008). "Glutaredoxin systems." Biochim Biophys Acta **1780**(11): 1304-1317.

Lim, J. C., H. I. Choi, Y. S. Park, H. W. Nam, H. A. Woo, K. S. Kwon, Y. S. Kim, S. G. Rhee, K. Kim and H. Z. Chae (2008). "Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity." J Biol Chem **283**(43): 28873-28880.

Lion, N., D. Crettaz, O. Rubin and J. D. Tissot (2010). "Stored red blood cells: a changing universe waiting for its map(s)." J Proteomics **73**(3): 374-385.

Lonn, M. E., C. Hudemann, C. Berndt, V. Cherkasov, F. Capani, A. Holmgren and C. H. Lillig (2008). "Expression pattern of human glutaredoxin 2 isoforms: identification and characterization of two testis/cancer cell-specific isoforms." Antioxid Redox Signal **10**(3): 547-557.

Low, F. M., M. B. Hampton, A. V. Peskin and C. C. Winterbourn (2007). "Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte." Blood **109**(6): 2611-2617.

Low, F. M., M. B. Hampton and C. C. Winterbourn (2008). "Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte." Antioxid Redox Signal **10**(9): 1621-1630.

Low, P. S., P. Rathinavelu and M. L. Harrison (1993). "Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3." J Biol Chem **268**(20): 14627-14631.

Low, P. S., S. M. Waugh, K. Zinke and D. Drenckhahn (1985). "The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging." Science **227**(4686): 531-533.

Low, P. S., B. M. Willardson, N. Mohandas, M. Rossi and S. Shohet (1991). "Contribution of the band 3-ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability." Blood **77**(7): 1581-1586.

Lowther, W. T. and A. C. Haynes (2011). "Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin." Antioxid Redox Signal **15**(1): 99-109.

Lu, S. C. (2000). "Regulation of glutathione synthesis." Curr Top Cell Regul **36**: 95-116.

Lundberg, M., A. P. Fernandes, S. Kumar and A. Holmgren (2004). "Cellular and plasma levels of human glutaredoxin 1 and 2 detected by sensitive ELISA systems." Biochem Biophys Res Commun **319**(3): 801-809.

Lutz, H. U. (2004). "Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **50**(2): 107-116.

Lutz, H. U., F. Bussolino, R. Flepp, S. Fasler, P. Stammler, M. D. Kazatchkine and P. Arese (1987). "Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7368-7372.

Lutz, H. U., P. Stammler, S. Fasler, M. Ingold and J. Fehr (1992). "Density separation of human red blood cells on self forming Percoll gradients: correlation with cell age." Biochim Biophys Acta **1116**(1): 1-10.

Lyons, J., A. Rauh-Pfeiffer, Y. M. Yu, X. M. Lu, D. Zurakowski, R. G. Tompkins, A. M. Ajami, V. R. Young and L. Castillo (2000). "Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5071-5076.

Mabrouk, G. M., M. Jois and J. T. Brosnan (1998). "Cell signalling and the hormonal stimulation of the hepatic glycine cleavage enzyme system by glucagon." Biochem J **330 (Pt 2)**: 759-763.

Maellaro, E., S. Leoncini, D. Moretti, B. Del Bello, I. Tanganelli, C. De Felice and L. Ciccoli (2013). "Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients." Acta Diabetol **50**(4): 489-495.

Magnani, M., E. Piatti, N. Serafini, F. Palma, M. Dacha and G. Fornaini (1983). "The age-dependent metabolic decline of the red blood cell." Mech Ageing Dev **22**(3-4): 295-308.

Mahmud, H., S. M. Qadri, M. Foller and F. Lang (2010). "Inhibition of suicidal erythrocyte death by vitamin C." Nutrition **26**(6): 671-676.

Malik, S., M. Sami and A. Watts (1993). "A role for band 4.2 in human erythrocyte band 3 mediated anion transport." Biochemistry **32**(38): 10078-10084.

Manta, B., M. Hugo, C. Ortiz, G. Ferrer-Sueta, M. Trujillo and A. Denicola (2009). "The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2." Arch Biochem Biophys **484**(2): 146-154.

Margoliash, E. and A. Novogrodsky (1958). "A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1:2:4-triazole." Biochem J **68**(3): 468-475.

Margoliash, E., A. Novogrodsky and A. Schejter (1960). "Irreversible reaction of 3-amino-1:2:4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase." Biochem J **74**: 339-348.

Matte, A., M. Bertoldi, N. Mohandas, X. An, A. Bugatti, A. M. Brunati, M. Rusnati, E. Tibaldi, A. Siciliano, F. Turrini, S. Perrotta and L. De Franceschi (2013). "Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3." Free Radic Biol Med **55**: 27-35.

Matte, A., P. S. Low, F. Turrini, M. Bertoldi, M. E. Campanella, D. Spano, A. Pantaleo, A. Siciliano and L. De Franceschi (2010). "Peroxiredoxin-2 expression is increased in beta-thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress." Free Radic Biol Med **49**(3): 457-466.

Matte, A., A. Pantaleo, E. Ferru, F. Turrini, M. Bertoldi, F. Lupo, A. Siciliano, C. Ho Zoon and L. De Franceschi (2014). "The novel role of peroxiredoxin-2 in red cell membrane protein homeostasis and senescence." Free Radic Biol Med **76**: 80-88.

Mauri, P., L. Benazzi, L. Flohe, M. Maiorino, P. G. Pietta, S. Pilawa, A. Roveri and F. Ursini (2003). "Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS." Biol Chem **384**(4): 575-588.

Mawatari, S. and K. Murakami (2004). "Different types of glutathionylation of hemoglobin can exist in intact erythrocytes." Arch Biochem Biophys **421**(1): 108-114.

May, J. M. (1998). "Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte." Front Biosci **3**: d1-10.

May, J. M., Z. C. Qu and S. Mendiratta (1998). "Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid." Arch Biochem Biophys **349**(2): 281-289.

Mazor, D., E. Golan, V. Philip, M. Katz, A. Jafe, Z. Ben-Zvi and N. Meyerstein (1996). "Red blood cell permeability to thiol compounds following oxidative stress." Eur J Haematol **57**(3): 241-246.

McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-6055.

McDonagh, B. (2009). "Diagonal electrophoresis for detection of protein disulphide bridges." Methods Mol Biol **519**: 305-310.

Melino, G., F. Bernassola, R. A. Knight, M. T. Corasaniti, G. Nistico and A. Finazzi-Agro (1997). "S-nitrosylation regulates apoptosis." Nature **388**(6641): 432-433.

Mendiratta, S., Z. C. Qu and J. M. May (1998). "Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood." Free Radic Biol Med **24**(5): 789-797.

Metere, A., E. Iorio, G. Scorza, S. Camerini, M. Casella, M. Crescenzi, M. Minetti and D. Pietraforte (2014). "Carbon monoxide signaling in human red blood cells: evidence for pentose phosphate pathway activation and protein deglutathionylation." Antioxid Redox Signal **20**(3): 403-416.

Meyer, E. K., D. F. Dumont, S. Baker and L. J. Dumont (2011). "Rejuvenation capacity of red blood cells in additive solutions over long-term storage." Transfusion **51**(7): 1574-1579.

Michel, F. W. (1964). "The Occurrence of Blood-Group Specific Material in the Plasma and Serum of Stored Blood." Vox Sang **9**: 471-475.

Middelburg, R. A., L. M. van de Watering, E. Briet and J. G. van der Bom (2013). "Storage time of red blood cells and mortality of transfusion recipients." Transfus Med Rev **27**(1): 36-43.

Mihov, D., J. Vogel, M. Gassmann and A. Bogdanova (2009). "Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes." Am J Physiol Cell Physiol **297**(2): C378-388.

Miyamoto, T., M. Hayashi, A. Takeuchi, T. Okamoto, S. Kawashima, T. Takii, H. Hayashi and K. Onozaki (1996). "Identification of a novel growth-promoting factor with a wide target cell spectrum from various tumor cells as catalase." J Biochem **120**(4): 725-730.

Mock, D. M., J. A. Widness, P. Veng-Pedersen, R. G. Strauss, J. A. Cancelas, R. M. Cohen, C. J. Lindsell and R. S. Franco (2014). "Measurement of posttransfusion red cell survival with the biotin label." Transfus Med Rev **28**(3): 114-125.

Mohandas, N. and P. G. Gallagher (2008). "Red cell membrane: past, present, and future." Blood **112**(10): 3939-3948.

Mollison, P. L. (2005). "Survival of fetal red blood cells." Transfusion **45**(12): 1985; author reply 1985.

Moncada, S. (1997). "Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology." Ann N Y Acad Sci **811**: 60-67; discussion 67-69.

Moore, R. B., M. V. Mankad, S. K. Shriver, V. N. Mankad and G. A. Plishker (1991). "Reconstitution of Ca(2+)-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein." J Biol Chem **266**(28): 18964-18968.

Moore, R. B. and S. K. Shriver (1997). "Protein 7.2b of human erythrocyte membranes binds to calpromotin." Biochem Biophys Res Commun **232**(2): 294-297.

Moore, R. B., S. K. Shriver, L. D. Jenkins, V. N. Mankad, A. K. Shah and G. A. Plishker (1997). "Calpromotin, a cytoplasmic protein, is associated with the formation of dense cells in sickle cell anemia." Am J Hematol **56**(2): 100-106.

Moroff, G., S. Holme, T. Keegan and A. Heaton (1990). "Storage of ADSOL-preserved red cells at 2.5 and 5.5 degrees C: comparable retention of in vitro properties." Vox Sang **59**(3): 136-139.

Mozzarelli, A., L. Ronda, S. Faggiano, S. Bettati and S. Bruno (2010). "Haemoglobin-based oxygen carriers: research and reality towards an alternative to blood transfusions." Blood Transfus **8 Suppl 3**: s59-68.

Murphy, S. C., B. U. Samuel, T. Harrison, K. D. Speicher, D. W. Speicher, M. E. Reid, R. Prohaska, P. S. Low, M. J. Tanner, N. Mohandas and K. Haldar (2004). "Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection." Blood **103**(5): 1920-1928.

Murthy, S. N., T. Liu, R. K. Kaul, H. Kohler and T. L. Steck (1981). "The aldolase-binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH₂ terminus of band 3." J Biol Chem **256**(21): 11203-11208.

Nagababu, E., F. J. Chrest and J. M. Rifkind (2003). "Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase." Biochim Biophys Acta **1620**(1-3): 211-217.

Nagababu, E., M. E. Fabry, R. L. Nagel and J. M. Rifkind (2008). "Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease." Blood Cells Mol Dis **41**(1): 60-66.

Nagababu, E., S. Gulyani, C. J. Earley, R. G. Cutler, M. P. Mattson and J. M. Rifkind (2008). "Iron-deficiency anaemia enhances red blood cell oxidative stress." Free Radic Res **42**(9): 824-829.

Nagababu, E., J. G. Mohanty, S. Bhamidipaty, G. R. Oстера and J. M. Rifkind (2010). "Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells." Life Sci **86**(3-4): 133-138.

Nagababu, E., J. G. Mohanty, J. S. Friedman and J. M. Rifkind (2013). "Role of peroxiredoxin-2 in protecting RBCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress." Free Radic Res **47**(3): 164-171.

Nagababu, E., S. Ramasamy, D. R. Abernethy and J. M. Rifkind (2003). "Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction." J Biol Chem **278**(47): 46349-46356.

Nagababu, E., S. Ramasamy, J. M. Rifkind, Y. Jia and A. I. Alayash (2002). "Site-specific cross-linking of human and bovine hemoglobins differentially alters oxygen binding and redox side reactions producing rhombic heme and heme degradation." Biochemistry **41**(23): 7407-7415.

Nagababu, E. and J. M. Rifkind (1998). "Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide." Biochem Biophys Res Commun **247**(3): 592-596.

Nagababu, E. and J. M. Rifkind (2000). "Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin." Biochem Biophys Res Commun **273**(3): 839-845.

Nagababu, E. and J. M. Rifkind (2000). "Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation." Biochemistry **39**(40): 12503-12511.

Nagababu, E. and J. M. Rifkind (2004). "Heme degradation by reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **6**(6): 967-978.

Nagababu, E. and J. M. Rifkind (2007). "Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence without interference of S-, N-nitroso and nitrated species." Free Radic Biol Med **42**(8): 1146-1154.

Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." Nature **420**(6917): 846-852.

Necheles, T. F., M. H. Steinberg and D. Cameron (1970). "Erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency." Br J Haematol **19**(5): 605-612.

Nemoto, Y., T. Yamamoto, S. Takada, Y. Matsui and M. Obinata (1990). "Antisense RNA of the latent period gene (MER5) inhibits the differentiation of murine erythroleukemia cells." Gene **91**(2): 261-265.

Nicolay, J. P., G. Liebig, O. M. Niemoeller, S. Koka, M. Ghashghaeinia, T. Wieder, J. Haendeler, R. Busse and F. Lang (2008). "Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide." *Pflugers Arch* **456**(2): 293-305.

Nicolay, J. P., J. Schneider, O. M. Niemoeller, F. Artunc, M. Portero-Otin, G. Haik, Jr., P. J. Thornalley, E. Schleicher, T. Wieder and F. Lang (2006). "Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal." *Cell Physiol Biochem* **18**(4-5): 223-232.

Nohl, H. and K. Stolze (1998). "The effects of xenobiotics on erythrocytes." *Gen Pharmacol* **31**(3): 343-347.

Nur, E., D. P. Brandjes, T. Teerlink, H. M. Otten, R. P. Oude Elferink, F. Muskiet, L. M. Evers, H. ten Cate, B. J. Biemond, A. J. Duits and J. J. Schnog (2012). "N-acetylcysteine reduces oxidative stress in sickle cell patients." *Ann Hematol* **91**(7): 1097-1105.

Ogata, M., D. H. Wang and K. Ogino (2008). "Mammalian acatalasemia: the perspectives of bioinformatics and genetic toxicology." *Acta Med Okayama* **62**(6): 345-361.

Olejnicka, B. T., A. Andersson, B. Tyrberg, H. Dalen and U. T. Brunk (1999). "Beta-cells, oxidative stress, lysosomal stability, and apoptotic/necrotic cell death." *Antioxid Redox Signal* **1**(3): 305-315.

Ookhtens, M. and N. Kaplowitz (1998). "Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine." *Semin Liver Dis* **18**(4): 313-329.

Oreskovic, R. T., U. J. Dumaswala and T. J. Greenwalt (1992). "Expression of blood group antigens on red cell microvesicles." *Transfusion* **32**(9): 848-849.

Otani, T., K. Oki, M. Akino, S. Tamura, Y. Naito, C. Homma, H. Ikeda and S. Sumita (2012). "Effects of helicopter transport on red blood cell components." *Blood Transfus* **10**(1): 78-86.

Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." *Physiol Rev* **87**(1): 315-424.

Palmer, R. M., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* **327**(6122): 524-526.

Pallotta, V., A. D'Alessandro, S. Rinalducci and L. Zolla (2013). "Native protein complexes in the cytoplasm of red blood cells." *J Proteome Res* **12**(7): 3529-3546.

Pallotta, V., F. Gevi, A. D'Alessandro and L. Zolla (2014). "Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview." *Blood Transfus* **12**(3): 376-387.

Pallotta, V., F. Naro, F. Gevi, A. D'Alessandro and L. Zolla (2014). "Supplementation of anti-oxidants in leucofiltered erythrocyte concentrates: assessment of morphological changes through scanning electron microscopy." *Blood Transfus* **12**(3): 421-424.

Pandey, K. B. and S. I. Rizvi (2011). "Biomarkers of oxidative stress in red blood cells." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **155**(2): 131-136.

Pantaleo, A., G. Giribaldi, F. Mannu, P. Arese and F. Turrini (2008). "Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions." *Autoimmun Rev* **7**(6): 457-462.

Paoli, M., R. Liddington, J. Tame, A. Wilkinson and G. Dodson (1996). "Crystal structure of T state haemoglobin with oxygen bound at all four haems." *J Mol Biol* **256**(4): 775-792.

Park, J., S. Lee and S. W. Kang (2014). "2-cys peroxiredoxins: emerging hubs determining redox dependency of Mammalian signaling networks." *Int J Cell Biol* **2014**: 715867.

Pasini, E. M., M. Mann and A. W. Thomas (2010). "Red blood cell proteomics." Transfus Clin Biol **17**(3): 151-164.

Pastore, A., G. Federici, E. Bertini and F. Piemonte (2003). "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification." Clin Chim Acta **333**(1): 19-39.

Perkins, A., K. J. Nelson, J. R. Williams, D. Parsonage, L. B. Poole and P. A. Karplus (2013). "The sensitive balance between the fully folded and locally unfolded conformations of a model peroxiredoxin." Biochemistry **52**(48): 8708-8721.

Perrone, S., M. L. Tataranno, G. Stazzoni, A. Del Vecchio and G. Buonocore (2012). "Oxidative injury in neonatal erythrocytes." J Matern Fetal Neonatal Med **25**(Suppl 5): 104-108.

Peskin, A. V., F. M. Low, L. N. Paton, G. J. Maghzal, M. B. Hampton and C. C. Winterbourn (2007). "The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents." J Biol Chem **282**(16): 11885-11892.

Peskin, A. V., P. E. Pace, J. B. Behring, L. N. Paton, M. Soethoudt, M. M. Bachschmid and C. C. Winterbourn (2016). "Glutathionylation of the Active Site Cysteines of Peroxiredoxin 2 and Recycling by Glutaredoxin." J Biol Chem **291**(6): 3053-3062.

Pietraforte, D., A. M. Salzano, G. Scorza, G. Marino and M. Minetti (2001). "Mechanism of peroxynitrite interaction with ferric hemoglobin and identification of nitrated tyrosine residues. CO₂ inhibits heme-catalyzed scavenging and isomerization." Biochemistry **40**(50): 15300-15309.

Plishker, G. A., D. Chevalier, L. Seinsoth and R. B. Moore (1992). "Calcium-activated potassium transport and high molecular weight forms of calpromotin." J Biol Chem **267**(30): 21839-21843.

Polak-Jonkisz, D. and L. Purzyc (2012). "Ca²⁺ influx versus efflux during eryptosis in uremic erythrocytes." Blood Purif **34**(3-4): 209-210; author reply 210.

Poynton, R. A. and M. B. Hampton (2014). "Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress." Biochim Biophys Acta **1840**(2): 906-912.

Pradhan, D., M. Weiser, K. Lumley-Sapanski, D. Frazier, S. Kemper, P. Williamson and R. A. Schlegel (1990). "Peroxidation-induced perturbations of erythrocyte lipid organization." Biochim Biophys Acta **1023**(3): 398-404.

Putnam, C. D., A. S. Arvai, Y. Bourne and J. A. Tainer (2000). "Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism." J Mol Biol **296**(1): 295-309.

Qadri, S. M., Y. Kucherenko, C. Zelenak, K. Jilani, E. Lang and F. Lang (2011). "Dicoumarol activates Ca²⁺-permeable cation channels triggering erythrocyte cell membrane scrambling." Cell Physiol Biochem **28**(5): 857-864.

Raftos, J. E., S. Whillier and P. W. Kuchel (2010). "Glutathione synthesis and turnover in the human erythrocyte: alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data." J Biol Chem **285**(31): 23557-23567.

Randall, L., B. Manta, K. J. Nelson, J. Santos, L. B. Poole and A. Denicola (2016). "Structural changes upon peroxynitrite-mediated nitration of peroxiredoxin 2; nitrated Prx2 resembles its disulfide-oxidized form." Arch Biochem Biophys **590**: 101-108.

Randall, L. M., G. Ferrer-Sueta and A. Denicola (2013). "Peroxiredoxins as preferential targets in H₂O₂-induced signaling." Methods Enzymol **527**: 41-63.

Randall, L. M., B. Manta, M. Hugo, M. Gil, C. Batthyany, M. Trujillo, L. B. Poole and A. Denicola (2014). "Nitration transforms a sensitive peroxiredoxin 2 into a more active and robust peroxidase." J Biol Chem **289**(22): 15536-15543.

Rassaf, T., N. S. Bryan, R. E. Maloney, V. Specian, M. Kelm, B. Kalyanaraman, J. Rodriguez and M. Feelisch (2003). "NO adducts in mammalian red blood cells: too much or too little?" Nat Med **9**(5): 481-482; author reply 482-483.

Raval, J. S., J. Fontes, U. Banerjee, M. H. Yazer, E. Mank and A. F. Palmer (2013). "Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases haemolysis during red blood cell storage." Transfus Med **23**(2): 87-93.

Ray, R. and A. M. Shah (2005). "NADPH oxidase and endothelial cell function." Clin Sci (Lond) **109**(3): 217-226.

Redding, G. S., D. M. Record and B. U. Raess (1991). "Calcium-stressed erythrocyte membrane structure and function for assessing glipizide effects on transglutaminase activation." Proc Soc Exp Biol Med **196**(1): 76-82.

Reed, T. T., W. M. Pierce, Jr., D. M. Turner, W. R. Markesbery and D. A. Butterfield (2009). "Proteomic identification of nitrated brain proteins in early Alzheimer's disease inferior parietal lobule." J Cell Mol Med **13**(8B): 2019-2029.

Reeds, P. J., D. G. Burrin, B. Stoll, F. Jahoor, L. Wykes, J. Henry and M. E. Frazer (1997). "Enteral glutamate is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in fed piglets." Am J Physiol **273**(2 Pt 1): E408-415.

Regazzoni, L., A. Panusa, K. J. Yeum, M. Carini and G. Aldini (2009). "Hemoglobin glutathionylation can occur through cysteine sulfenic acid intermediate: electrospray ionization LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometry studies." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **877**(28): 3456-3461.

Reid, T. J., J. G. Babcock, C. P. Derse-Anthony, H. R. Hill, L. E. Lippert and J. R. Hess (1999). "The viability of autologous human red cells stored in additive solution 5 and exposed to 25 degrees C for 24 hours." Transfusion **39**(9): 991-997.

Rettig, M. P., P. S. Low, J. A. Gimm, N. Mohandas, J. Wang and J. A. Christian (1999). "Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocyte senescence in the dog." Blood **93**(1): 376-384.

Rhee, S. G., H. Z. Chae and K. Kim (2005). "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." Free Radic Biol Med **38**(12): 1543-1552.

Rhee, S. G. and H. A. Woo (2011). "Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones." Antioxid Redox Signal **15**(3): 781-794.

Richie, J. P., Jr., P. Abraham and Y. Leutzinger (1996). "Long-term stability of blood glutathione and cysteine in humans." Clin Chem **42**(7): 1100-1105.

Rifkind, J. M. and O. O. Abugo (1994). "Alterations in erythrocyte deformability under hypoxia: implications for impaired oxygen transport." Adv Exp Med Biol **361**: 345-351.

Rifkind, J. M. and E. Nagababu (2013). "Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging." Antioxid Redox Signal **18**(17): 2274-2283.

Rifkind, J. M., E. Nagababu and S. Ramasamy (2006). "Nitric oxide redox reactions and red cell biology." Antioxid Redox Signal **8**(7-8): 1193-1203.

Rifkind, J. M., E. Nagababu and S. Ramasamy (2011). "The quaternary hemoglobin conformation regulates the formation of the nitrite-induced bioactive intermediate and the dissociation of nitric oxide from this intermediate." Nitric Oxide **24**(2): 102-109.

Rifkind, J. M., M. T. Salgado and Z. Cao (2012). "Regulation of oxygen delivery by the reaction of nitrite with RBCs under hypoxic conditions." Adv Exp Med Biol **737**: 183-189.

Rifkind, J. M., L. Zhang, A. Levy and P. T. Manoharan (1991). "The hypoxic stress on erythrocytes associated with superoxide formation." Free Radic Res Commun **12-13 Pt 2**: 645-652.

Rinalducci, S., G. M. D'Amici, B. Blasi, S. Vaglio, G. Grazzini and L. Zolla (2011). "Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions." Transfusion **51**(7): 1439-1449.

Rinalducci, S., G. M. D'Amici, B. Blasi and L. Zolla (2011). "Oxidative stress-dependent oligomeric status of erythrocyte peroxiredoxin II (PrxII) during storage under standard blood banking conditions." Biochimie **93**(5): 845-853.

Rizvi, S. I., R. Jha and P. K. Maurya (2006). "Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging." Rejuvenation Res **9**(4): 470-474.

Rizvi, S. I., K. B. Pandey, R. Jha and P. K. Maurya (2009). "Ascorbate recycling by erythrocytes during aging in humans." Rejuvenation Res **12**(1): 3-6.

Rocha, S., E. Costa, S. Coimbra, H. Nascimento, C. Catarino, P. Rocha-Pereira, A. Quintanilha, L. Belo and A. Santos-Silva (2009). "Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress." Blood Cells Mol Dis **43**(1): 68-73.

Rocha, S., R. M. Vitorino, F. M. Lemos-Amado, E. B. Castro, P. Rocha-Pereira, J. Barbot, E. Cleto, F. Ferreira, A. Quintanilha, L. Belo and A. Santos-Silva (2008). "Presence of cytosolic peroxiredoxin 2 in the erythrocyte membrane of patients with hereditary spherocytosis." Blood Cells Mol Dis **41**(1): 5-9.

Rogalski, A. A., T. L. Steck and A. Waseem (1989). "Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the plasma membrane of the intact human red blood cell." J Biol Chem **264**(11): 6438-6446.

Rogers, S. C., A. Said, D. Corcuera, D. McLaughlin, P. Kell and A. Doctor (2009). "Hypoxia limits antioxidant capacity in red blood cells by altering glycolytic pathway dominance." Faseb J **23**(9): 3159-3170.

Romero, N., A. Denicola and R. Radi (2006). "Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite." IUBMB Life **58**(10): 572-580.

Romero, N. and R. Radi (2005). "Hemoglobin and red blood cells as tools for studying peroxynitrite biochemistry." Methods Enzymol **396**: 229-245.

Romero, N., R. Radi, E. Linares, O. Augusto, C. D. Detweiler, R. P. Mason and A. Denicola (2003). "Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals." J Biol Chem **278**(45): 44049-44057.

Rossig, L., B. Fichtlscherer, K. Breitschopf, J. Haendeler, A. M. Zeiher, A. Mulsch and S. Dimmeler (1999). "Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo." J Biol Chem **274**(11): 6823-6826.

Rubin, O., D. Crettaz, G. Canellini, J. D. Tissot and N. Lion (2008). "Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools." Vox Sang **95**(4): 288-297.

Rybicki, A. C., R. S. Schwartz, E. J. Hustedt and C. E. Cobb (1996). "Increased rotational mobility and extractability of band 3 from protein 4.2-deficient erythrocyte membranes: evidence of a role for protein 4.2 in strengthening the band 3-cytoskeleton linkage." Blood **88**(7): 2745-2753.

Safo, M. K., F. N. Musayev, S. H. Wu, D. J. Abraham and T. P. Ko (2001). "Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **57**(Pt 1): 1-7.

Saito, T., H. Shinzawa, H. Togashi, H. Wakabayashi, K. Ukai, T. Takahashi, M. Ishikawa, M. Dobashi and Y. Imai (1989). "Ultrastructural localization of Cu, Zn-SOD in hepatocytes of patients with various liver diseases." Histol Histopathol **4**(1): 1-6.

Sakakibara, T. and T. Juji (1986). "Post-transfusion graft-versus-host disease after open heart surgery." Lancet **2**(8515): 1099.

Salgado, M. T., E. Nagababu and J. M. Rifkind (2009). "Quantification of intermediates formed during the reduction of nitrite by deoxyhemoglobin." J Biol Chem **284**(19): 12710-12718.

Salgado, M. T., S. Ramasamy, A. Tsuneshige, P. T. Manoharan and J. M. Rifkind (2011). "A new paramagnetic intermediate formed during the reaction of nitrite with deoxyhemoglobin." J Am Chem Soc **133**(33): 13010-13022.

Salhany, J. M. and R. Cassoly (1989). "Kinetics of p-mercuribenzoate binding to sulfhydryl groups on the isolated cytoplasmic fragment of band 3 protein. Effect of hemoglobin binding on the conformation." J Biol Chem **264**(3): 1399-1404.

Salomao, M., X. Zhang, Y. Yang, S. Lee, J. H. Hartwig, J. A. Chasis, N. Mohandas and X. An (2008). "Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(23): 8026-8031.

Salzano, S., P. Checconi, E. M. Hanschmann, C. H. Lillig, L. D. Bowler, P. Chan, D. Vaudry, M. Mengozzi, L. Coppo, S. Sacre, K. R. Atkuri, B. Sahaf, L. A. Herzenberg, L. Mullen and P. Ghezzi (2014). "Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(33): 12157-12162.

Samaja, M., A. Rubinacci, R. Motterlini, A. De Ponti and N. Portinaro (1990). "Red cell aging and active calcium transport." Exp Gerontol **25**(3-4): 279-286.

Sanchez, S. A., M. A. Tricerri and E. Gratton (2012). "Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(19): 7314-7319.

Sandstrom, P. A. and T. M. Buttke (1993). "Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4708-4712.

Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med **30**(11): 1191-1212.

Schopfer, M. P., B. Mondal, D. H. Lee, A. A. Sarjeant and K. D. Karlin (2009). "Heme/O₂/*NO nitric oxide dioxygenase (NOD) reactivity: phenolic nitration via a putative heme-peroxynitrite intermediate." J Am Chem Soc **131**(32): 11304-11305.

Schroder, E., J. A. Littlechild, A. A. Lebedev, N. Errington, A. A. Vagin and M. N. Isupov (2000). "Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution." Structure **8**(6): 605-615.

Sen, C. K. (2000). "Cellular thiols and redox-regulated signal transduction." Curr Top Cell Regul **36**: 1-30.

Shaklai, N., N. Avissar, E. Rabizadeh and M. Shaklai (1986). "Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin." Biochem Int **13**(3): 467-477.

Shet, A. S., S. M. Pinto, G. Mitra and A. K. Mandal (2012). "Glutathionyl hemoglobin is elevated in iron deficiency anemia." Acta Haematol **127**(1): 26-30.

Shiva, S., X. Wang, L. A. Ringwood, X. Xu, S. Yuditskaya, V. Annavajjhala, H. Miyajima, N. Hogg, Z. L. Harris and M. T. Gladwin (2006). "Ceruleplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis." Nat Chem Biol **2**(9): 486-493.

Siekmeier, R., A. Bierlich and W. Jaross (2000). "Determination of reticulocytes: three methods compared." Clin Chem Lab Med **38**(3): 245-249.

Siems, W. G., O. Sommerburg and T. Grune (2000). "Erythrocyte free radical and energy metabolism." Clin Nephrol **53**(1 Suppl): S9-17.

Silliman, C. C., M. R. Kelher, S. Y. Khan, M. LaSarre, F. B. West, K. J. Land, B. Mish, L. Ceriano and S. Sowemimo-Coker (2014). "Experimental prestorage filtration removes antibodies and decreases lipids in RBC supernatants mitigating TRALI in vivo." Blood **123**(22): 3488-3495.

Smith-Pearson, P. S., M. Kooshki, D. R. Spitz, L. B. Poole, W. Zhao and M. E. Robbins (2008). "Decreasing peroxiredoxin II expression decreases glutathione, alters cell cycle distribution, and sensitizes glioma cells to ionizing radiation and H₂O₂." Free Radic Biol Med **45**(8): 1178-1189.

Snyder, L. M., N. L. Fortier, J. Trainor, J. Jacobs, L. Leb, B. Lubin, D. Chiu, S. Shohet and N. Mohandas (1985). "Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking." J Clin Invest **76**(5): 1971-1977.

Snyder, L. M., L. Leb, J. Piotrowski, N. Sauberman, S. C. Liu and N. L. Fortier (1983). "Irreversible spectrin-haemoglobin crosslinking in vivo: a marker for red cell senescence." Br J Haematol **53**(3): 379-384.

Sobotta, M. C., A. G. Barata, U. Schmidt, S. Mueller, G. Millonig and T. P. Dick (2013). "Exposing cells to H₂O₂: a quantitative comparison between continuous low-dose and one-time high-dose treatments." Free Radic Biol Med **60**: 325-335.

Solheim, B. G., O. Flesland, J. Seghatchian and F. Brosstad (2004). "Clinical implications of red blood cell and platelet storage lesions: an overview." Transfus Apher Sci **31**(3): 185-189.

Sparrow, R. L. (2012). "Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: a role for "omics" analyses." Blood Transfus **10 Suppl 2**: s7-11.

Sparrow, R. L., M. F. Veale, G. Healey and K. A. Payne (2007). "Red blood cell (RBC) age at collection and storage influences RBC membrane-associated carbohydrates and lectin binding." Transfusion **47**(6): 966-968.

Srnec, M., F. Aquilante, U. Ryde and L. Rulisek (2009). "Reaction mechanism of manganese superoxide dismutase studied by combined quantum and molecular mechanical calculations and multiconfigurational methods." J Phys Chem B **113**(17): 6074-6086.

Stacey, M. M., A. V. Peskin, M. C. Vissers and C. C. Winterbourn (2009). "Chloramines and hypochlorous acid oxidize erythrocyte peroxiredoxin 2." Free Radic Biol Med **47**(10): 1468-1476.

Stadler, I., C. A. Toumbis and J. L. Ambrus (1994). "Influence of cold storage altered red cell surface on the function of platelets." J Med **25**(6): 353-361.

Starzynski, R. R., F. Canonne-Hergaux, A. Willemetz, M. A. Gralak, J. Wolinski, A. Stys, J. Olszak and P. Lipinski (2009). "Haemolytic anaemia and alterations in hepatic iron metabolism in aged mice lacking Cu,Zn-superoxide dismutase." Biochem J **420**(3): 383-390.

Stowell, S. R., N. H. Smith, J. C. Zimring, X. Fu, A. F. Palmer, J. Fontes, U. Banerjee and M. H. Yazer (2013). "Addition of ascorbic acid solution to stored murine red blood cells increases posttransfusion recovery and decreases microparticles and alloimmunization." Transfusion **53**(10): 2248-2257.

Strange, R. W., S. V. Antonyuk, M. A. Hough, P. A. Doucette, J. S. Valentine and S. S. Hasnain (2006). "Variable metallation of human superoxide dismutase: atomic resolution crystal structures of Cu-Zn, Zn-Zn and as-isolated wild-type enzymes." J Mol Biol **356**(5): 1152-1162.

Stuehr, D. J. (2004). "Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway." J Nutr **134**(10 Suppl): 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S.

Stuhlmeier, K. M., J. J. Kao, P. Wallbrandt, M. Lindberg, B. Hammarstrom, H. Broell and B. Paigen (2003). "Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates." *Eur J Biochem* **270**(2): 334-341.

Suzuki, Y., N. Ohkubo, M. Aoto, N. Maeda, I. Cicha, T. Miki and N. Mitsuda (2007). "Participation of caspase-3-like protease in oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties." *Biorheology* **44**(3): 179-190.

Tapiero, H., G. Mathe, P. Couvreur and K. D. Tew (2002). "II. Glutamine and glutamate." *Biomed Pharmacother* **56**(9): 446-457.

Thomson, L., A. Denicola and R. Radi (2003). "The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity." *Arch Biochem Biophys* **412**(1): 55-64.

Ticozzi, N., C. Tiloca, C. Morelli, C. Colombrita, B. Poletti, A. Doretto, L. Maderna, S. Messina, A. Ratti and V. Silani (2011). "Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis." *Arch Ital Biol* **149**(1): 65-82.

Tinmouth, A. and I. Chin-Yee (2001). "The clinical consequences of the red cell storage lesion." *Transfus Med Rev* **15**(2): 91-107.

Tinmouth, A., D. Fergusson, I. C. Yee and P. C. Hebert (2006). "Clinical consequences of red cell storage in the critically ill." *Transfusion* **46**(11): 2014-2027.

Townsend, D. M., K. D. Tew and H. Tapiero (2003). "The importance of glutathione in human disease." *Biomed Pharmacother* **57**(3-4): 145-155.

Turell, L., H. Botti, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, J. M. Souza, R. Duran, B. A. Freeman, R. Radi and B. Alvarez (2008). "Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin." *Biochemistry* **47**(1): 358-367.

Valeri, C. R., J. J. Vecchione, L. E. Pivacek, G. B. Lowrie, R. M. Austin and C. P. Emerson (1980). "Viability and function of outdated human red blood cells after biochemical modification to improve oxygen transport function, freezing, thawing, washing, postthaw storage at 4 C, perfusion in vitro through a bubble oxygenator, and autotransfusion." *Transfusion* **20**(1): 39-46.

Valeri, C. R., C. G. Zaroulis, J. J. Vecchione, D. A. Valeri, J. Anastasi, L. E. Pivacek and C. P. Emerson (1980). "Therapeutic effectiveness and safety of outdated human red blood cells rejuvenated to improve oxygen transport function, frozen for about 1.5 years at 80 C, washed, and stored at 4 C for 24 hours prior to rapid infusion." *Transfusion* **20**(3): 263-276.

Vallance, P., J. Collier and S. Moncada (1989). "Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man." *Lancet* **2**(8670): 997-1000.

van 't Erve, T. J., C. M. Doskey, B. A. Wagner, J. R. Hess, B. W. Darbro, K. K. Ryckman, J. C. Murray, T. J. Raife and G. R. Buettner (2014). "Heritability of glutathione and related metabolites in stored red blood cells." *Free Radic Biol Med* **76**: 107-113.

van 't Erve, T. J., B. A. Wagner, K. K. Ryckman, T. J. Raife and G. R. Buettner (2013). "The concentration of glutathione in human erythrocytes is a heritable trait." *Free Radic Biol Med* **65**: 742-749.

van Wijk, R. and W. W. van Solinge (2005). "The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis." *Blood* **106**(13): 4034-4042.

Veale, M. F., G. Healey and R. L. Sparrow (2011). "Effect of additive solutions on red blood cell (RBC) membrane properties of stored RBCs prepared from whole blood held for 24 hours at room temperature." *Transfusion* **51 Suppl 1**: 25S-33S.

Vitturi, D. A., X. Teng, J. C. Toledo, S. Matalon, J. R. Lancaster, Jr. and R. P. Patel (2009). "Regulation of nitrite transport in red blood cells by hemoglobin oxygen fractional saturation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**(5): H1398-1407.

Vuillaume, M. (1987). "Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation." Mutat Res **186**(1): 43-72.

Wagner, B. A., J. R. Witmer, T. J. van 't Erve and G. R. Buettner (2013). "An Assay for the Rate of Removal of Extracellular Hydrogen Peroxide by Cells." Redox Biol **1**(1): 210-217.

Wagner, E., S. Luche, L. Penna, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner and T. Rabilloud (2002). "A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress." Biochem J **366**(Pt 3): 777-785.

Walder, J. A., R. Chatterjee, T. L. Steck, P. S. Low, G. F. Musso, E. T. Kaiser, P. H. Rogers and A. Arnone (1984). "The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane." J Biol Chem **259**(16): 10238-10246.

Walsh, M., R. J. Lutz, T. G. Cotter and R. O'Connor (2002). "Erythrocyte survival is promoted by plasma and suppressed by a Bak-derived BH3 peptide that interacts with membrane-associated Bcl-X(L)." Blood **99**(9): 3439-3448.

Wang, D., J. Sun, S. B. Solomon, H. G. Klein and C. Natanson (2012). "Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis." Transfusion **52**(6): 1184-1195.

Wang, X., L. Wang, X. Wang, F. Sun and C. C. Wang (2012). "Structural insights into the peroxidase activity and inactivation of human peroxiredoxin 4." Biochem J **441**(1): 113-118.

Waugh, R. E., M. Narla, C. W. Jackson, T. J. Mueller, T. Suzuki and G. L. Dale (1992). "Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age." Blood **79**(5): 1351-1358.

Waugh, S. M. and P. S. Low (1985). "Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane." Biochemistry **24**(1): 34-39.

Webb, A. J., A. B. Milsom, K. S. Rathod, W. L. Chu, S. Qureshi, M. J. Lovell, F. M. Lecomte, D. Perrett, C. Raimondo, E. Khoshbin, Z. Ahmed, R. Uppal, N. Benjamin, A. J. Hobbs and A. Ahluwalia (2008). "Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase." Circ Res **103**(9): 957-964.

Weiss, E., D. C. Rees and J. S. Gibson (2011). "Role of calcium in phosphatidylserine externalisation in red blood cells from sickle cell patients." Anemia **2011**: 379894.

Werre, J. M., F. L. Willekens, F. H. Bosch, L. D. de Haans, S. G. van der Vegt, A. G. van den Bos and G. J. Bosman (2004). "The red cell revisited--matters of life and death." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **50**(2): 139-145.

Willekens, F. L., B. Roerdinkholder-Stoelwinder, Y. A. Groenen-Dopp, H. J. Bos, G. J. Bosman, A. G. van den Bos, A. J. Verkleij and J. M. Werre (2003). "Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation." Blood **101**(2): 747-751.

Willekens, F. L., J. M. Werre, Y. A. Groenen-Dopp, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, B. de Pauw and G. J. Bosman (2008). "Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism?" Br J Haematol **141**(4): 549-556.

Williamson, L. M., J. R. Rider, I. D. Swann, M. A. Winter, F. Ali and D. H. Pamphilon (1999). "Evaluation of plasma and red cells obtained after leucocyte depletion of whole blood." Transfus Med **9**(1): 51-61.

Winterbourn, C. C. (1990). "Oxidative reactions of hemoglobin." Methods Enzymol **186**: 265-272.

Winterbourn, C. C. and M. B. Hampton (2008). "Thiol chemistry and specificity in redox signaling." Free Radic Biol Med **45**(5): 549-561.

Wolfe, L. C. (1985). "The membrane and the lesions of storage in preserved red cells." Transfusion **25**(3): 185-203.

Wolfe, L. C., A. M. Byrne and S. E. Lux (1986). "Molecular defect in the membrane skeleton of blood bank-stored red cells. Abnormal spectrin-protein 4.1-actin complex formation." J Clin Invest **78**(6): 1681-1686.

Wood, Z. A., L. B. Poole, R. R. Hantgan and P. A. Karplus (2002). "Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins." Biochemistry **41**(17): 5493-5504.

Wood, Z. A., L. B. Poole and P. A. Karplus (2003). "Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling." Science **300**(5619): 650-653.

Wood, Z. A., E. Schroder, J. Robin Harris and L. B. Poole (2003). "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins." Trends Biochem Sci **28**(1): 32-40.

Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton and N. D. Turner (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." J Nutr **134**(3): 489-492.

Wu, J., E. Shen, D. Shi, Z. Sun and T. Cai (2012). "Identification of a novel Cys146X mutation of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis by whole-exome sequencing." Genet Med **14**(9): 823-826.

Wyse, J. W. and D. A. Butterfield (1989). "Interaction of hemin with erythrocyte membranes: alterations in the physical state of the major sialoglycoprotein." Biochim Biophys Acta **979**(1): 121-126.

Xing, S., A. Lauri and S. Zachgo (2006). "Redox regulation and flower development: a novel function for glutaredoxins." Plant Biol (Stuttg) **8**(5): 547-555.

Yabuki, M., S. Kariya, R. Ishisaka, T. Yasuda, T. Yoshioka, A. A. Horton and K. Utsumi (1999). "Resistance to nitric oxide-mediated apoptosis in HL-60 variant cells is associated with increased activities of Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase." Free Radic Biol Med **26**(3-4): 325-332.

Yang, B. C., W. W. Nichols and J. L. Mehta (1996). "Cardioprotective Effects of Red Blood Cells on Ischemia and Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart: Release of Nitric Oxide as a Potential Mechanism." J Cardiovasc Pharmacol Ther **1**(4): 297-306.

Yang, H. Y., J. Kwon, H. I. Choi, S. H. Park, U. Yang, H. R. Park, L. Ren, K. J. Chung, Y. U. Kim, B. J. Park, S. H. Jeong and T. H. Lee (2012). "In-depth analysis of cysteine oxidation by the RBC proteome: advantage of peroxiredoxin II knockout mice." Proteomics **12**(1): 101-112.

Yang, J., A. T. Gonon, P. O. Sjoquist, J. O. Lundberg and J. Pernow (2013). "Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(37): 15049-15054.

Yoshida, T., J. P. AuBuchon, L. J. Dumont, J. D. Gorham, S. C. Gifford, K. Y. Foster and M. W. Bitensky (2008). "The effects of additive solution pH and metabolic rejuvenation on anaerobic storage of red cells." Transfusion **48**(10): 2096-2105.

Yoshida, T., J. P. AuBuchon, L. Tryzelaar, K. Y. Foster and M. W. Bitensky (2007). "Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions." Vox Sang **92**(1): 22-31.

Yoshida, Y., A. Yoshikawa, T. Kinumi, Y. Ogawa, Y. Saito, K. Ohara, H. Yamamoto, Y. Imai and E. Niki (2009). "Hydroxyoctadecadienoic acid and oxidatively modified peroxiredoxins in the blood of Alzheimer's disease patients and their potential as biomarkers." Neurobiol Aging **30**(2): 174-185.

Young, P. P., A. Uzieblo, E. Trulock, D. M. Lublin and L. T. Goodnough (2004). "Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia?" Transfusion **44**(1): 67-72.

Zafarullah, M., W. Q. Li, J. Sylvester and M. Ahmad (2003). "Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions." Cell Mol Life Sci **60**(1): 6-20.

Zallen, G., P. J. Offner, E. E. Moore, J. Blackwell, D. J. Ciesla, J. Gabriel, C. Denny and C. C. Silliman (1999). "Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure." Am J Surg **178**(6): 570-572.

Zbidah, M., A. Lupescu, K. Jilani and F. Lang (2013). "Stimulation of suicidal erythrocyte death by fumagillin." Basic Clin Pharmacol Toxicol **112**(5): 346-351.

Zelenak, C., V. Pasham, K. Jilani, P. M. Tripodi, L. Rosaclerio, G. Pathare, A. Lupescu, C. Faggio, S. M. Qadri and F. Lang (2012). "Tanshinone IIA stimulates erythrocyte phosphatidylserine exposure." Cell Physiol Biochem **30**(1): 282-294.

Zeuner, A., F. Martelli, S. Vaglio, G. Federici, C. Whitsett and A. R. Migliaccio (2012). "Concise review: stem cell-derived erythrocytes as upcoming players in blood transfusion." Stem Cells **30**(8): 1587-1596.

Zhang, D., A. Kiyatkin, J. T. Bolin and P. S. Low (2000). "Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3." Blood **96**(9): 2925-2933.

Zimrin, A. B. and J. R. Hess (2009). "Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells." Vox Sang **96**(2): 93-103.

Zipser, Y., A. Piade, A. Barbul, R. Korenstein and N. S. Kosower (2002). "Ca²⁺ promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3." Biochem J **368**(Pt 1): 137-144.

Zlatkovic, J. and D. Filipovic (2011). "Stress-induced alternations in CuZnSOD and MnSOD activity in cellular compartments of rat liver." Mol Cell Biochem **357**(1-2): 143-150.

Zolla, L., A. D'Alessandro, S. Rinalducci, M. D'Amici G, S. Pupella, S. Vaglio and G. Grazzini (2015). "Classic and alternative red blood cell storage strategies: seven years of "-omics" investigations." Blood Transfus **13**(1): 21-31.