

Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica Clínica
Laboratorio de Inmunohematología, Hemorreología e
Histocompatibilidad

Incidencia de la relación estructura-función del sistema de grupo sanguíneo MN y del receptor CD44 en la adhesión eritrocitaria.

**Tesis presentada como conclusión del
Doctorado por la**

Bioq. Mabel D'Arrigo

Directores de Tesis:

Profesora Dra. Juana Rosa Valverde - Profesor Dr. Rodolfo Basia

Mayo de 2000



T 616.1 D225
R 5540
F D. 6.10.00.

**Incidencia de la relación
estructura-función del sistema de
grupo sanguíneo MN y del receptor
CD44 en la adhesión eritrocitaria.**

**Tesis presentada como conclusión del
Doctorado por la**

Bioq. Mabel D'Arrigo

A mi esposo

A mis padres

A mis hijos Bruno, Brenda y Paula

Agradecimientos

A todas las personas que con su colaboración y su paciente apoyo hicieron posible la realización de este trabajo:

- A la Dra. Juana Valverde, por haber aceptado la dirección de esta tesis, por darme la valiosa posibilidad de trabajar a su lado, de corregir mis errores y formarme científicamente.

- Al Dr. Rodolfo Rasia por brindarme su dedicación invaluable y sus conocimientos en el desarrollo de este trabajo. Por su participación en el diseño, montaje de la cámara de adhesión y lectura crítica de este trabajo.

- A la Prof. Vanda Gatti quiero agradecer especialmente su apoyo incondicional, sus consejos, su tolerancia, su estímulo para mejorar mi formación profesional y docente día a día.

- A mi compañera, a mi amiga la Dra. Patricia Foresto, con la que compartí todo mi trabajo, sin ella habría sido imposible realizar y terminar esta tesis.

- A mis compañeras de Práctica Hospitalaria: Silvia, Adriana, Cachi, Esther e Inés por la comprensión, la paciencia y el compañerismo.

- Al Dr. Francisco Seta por la tolerancia y apoyo permanente, por sus consejos y sus conocimientos.

- A la Dra. Beatriz Tamagno y a mis compañeras de Química Analítica Clínica por la tolerancia y el compañerismo.

- A la Estadística Liliana Racca por su desinteresada colaboración en el análisis estadístico de los resultados experimentales.

- A la Dra. Bibiana Riquelme por brindarme sus conocimientos y sus consejos.

- A la Dra. Beatriz Farrugia por su experiencia y su ayuda en la puesta a punto del método de reparto.

- A la Tesismista Virginia Suarez Sala por su cálida colaboración.

- A la Dra Mónica Elías y al personal docente del Area de Farmacología por su colaboración desinteresada, por facilitarme instrumental necesario para la realización de las experiencias con la cámara de adhesión.

- A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, que me brindó la posibilidad de realizar mis estudios universitarios de Bioquímica y de este Doctorado.

- A Susana De Marco y María Mechaty, por su permanente disposición.

- A todos aquellos que aún en condición anónima contribuyeron de alguna manera en calidad de pacientes, tesimistas, profesionales en la realización de este trabajo.

- En especial a mis grandes amores: mi esposo Nelson, mi mamá Elsa, mis hijos Bruno, Brenda y Paula, por su cariño, por su inagotable paciencia y comprensión.

INDICE GENERAL

RESUMEN

PARTE PRIMERA

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN	3
1-1 LA MEMBRANA DEL GLOBULO ROJO	6
1-1-1 Funciones de la membrana del glóbulo rojo.	12
1-1-1-1 Rol en el equilibrio hidroelectrolítico.	12
1-1-1-2 Comportamiento reológico.	13
1-1-1-3 Funciones estructurales.	14
1-1-1-4 Función de soporte. Los antígenos de membrana.	16
1-1-2 Grupos sanguíneos. Relación Estructura - Función.	17
1-2 Sistema MNSs	22
1-2-1 Sialoglicoproteínas	22
1-2-1-1 Función	22
1-2-1-2 Ubicación	23
1-2-2 Glicoforina A	26
1-2-3 Glicoforina B	29
1-2-4 Bioquímica del MNSs	29
1-2-5 Fenotipos Nulos	30
1-2-6 Papel fisiológico de las glicoforinas	31
1-3 Sistema Lutheran	33
1-3-1 Antígenos proteicos regulados por el In(Lu)	33
1-3-2 El fenotipo Lu(a-b-)	34
1-3-3 Bioquímica de los Antígenos Lutheran.	35
1-3-4 Función	36
1-3-5 Antígenos no-Lutheran afectados por el gen Lu: CD44	38
1-3-5-1 Bioquímica del CD44	38
1-3-5-2 AnWj	39
1-3-6 Futuras direcciones	40

CAPÍTULO 2

2- ADHESION ERITROCITARIA

49

Bibliografía del Cap. 2

55

PARTE SEGUNDA

CAPÍTULO 1

1 MEMBRANA Y CARGA ERITROCITARIA

58

La membrana y su potencial electrocinético.

1-1 Nociones generales concernientes a la carga superficial

58

1-2 Papel de la carga superficial.

63

1-3 Principales técnicas para estudiar las variaciones de carga superficial eritrocitaria

65

1-4 Modelización in vitro de alteraciones de carga superficial

65

1-4-1 Tratamiento enzimático

65

1-4-1-1 Neuraminidasa

65

1-4-1-2 Tripsina-Bromelina

66

1-4-2 Acción de fijación de anticuerpos

66

1-4-3 Acción de lectinas

66

Bibliografía del Cap. 1

68

CAPÍTULO 2

2-1 ESTUDIO DE LA CARGA ELECTRICA SUPERFICIAL ERITROCITARIA UTILIZANDO COMO HERRAMIENTA EL REPARTO EN SISTEMAS BIFASICOS ACUOSOS.

71

2-1-1 Características de los sistemas bifásicos acuosos.	71
2-1-2 Diagrama de fase	73
2-1-3 Propiedades de los sistemas de reparto bifásicos acuosos.	75
2-1-4 Teoría de reparto en sistemas bifásicos acuosos de Dx/PEG	81
2-2 Reparto en sistema bifasico acuoso Dx/PEG	86
2-3 Materiales	86
2-3-1 Reactivos	86
2-3-2 Material biológico	87
2-4 Metodología	87
2-4-1 Preparación del sistema bifásico acuoso Dx/PEG	87
2-4-1-1 Preparación de las soluciones de polímeros y sales	88
2-4-1-2 Procedimiento de preparación del sistema bifásico	89
2-4-2-A- Reparto de GR sin tratar	89
2-4-2-A-1 Preparación de los GR	89
2-4-2-A-2 Procedimiento	90
2-4-2-B Estudio comparativo del reparto de GR tratados con enzimas proteolíticas	92
2-4-2-B-1 Fundamento	92
2-4-2-B-2 Tratamiento enzimático de los GR	92
2-4-2-B-3 Dosaje de ácido siálico	92
2-4-2-B-4 Reparto-Procedimiento	93
2-4-2-C Estudio comparativo del reparto de GR tratados con tripsina a distintos tiempos de incubación	94
2-4-2-C-1 Tratamiento de los GR	94
2-4-2-D Estudio comparativo del reparto de GR tratados con antisuero anti-M	94
2-4-2-D-1 Fundamento	94
2-4-2-D-2 Preparación de los GR	94
2-4-2-D-3 Reparto-Procedimiento	95
2-4-2-E Estudio comparativo del reparto de GR distintas especies	95
2-4-2-E-1 Fundamento	95
2-4-2-E-2 Preparación de los GR	95
2-4-2-E-3 Reparto-Procedimiento	95
2-4-2-F Estudio comparativo del reparto de GR sometidos a conservación en condiciones standard de Banco de Sangre	96
2-4-2-F-1 Fundamento	96
2-4-2-F-2 Preparación de los GR	96
2-4-2-F-3 Procedimiento	96
2-5 Resultados	97
2-5-A Reparto de GR sin tratar	97
2-5-B Estudio comparativo del reparto de GR tratados con diferentes enzimas	98

2-5-B-1 Resultados	98
2-5-B-2 Análisis estadístico	99
2-5-B-3 Discusión de los resultados	100
2-5-C Estudio comparativo del reparto de GR incubados a distintos tiempos con tripsina	101
2-5-C-1 Resultados	101
2-5-C-2 Análisis estadístico	102
2-5-C-3 Discusión de los resultados	103
2-5-D Estudio comparativo del reparto de GR modificados por acción del anticuerpo anti-M	103
2-5-D-1 Resultados	103
2-5-D-2 Análisis estadístico	104
2-5-D-3 Discusión de los resultados	104
2-5-E Estudio comparativo del reparto de GR distintas especies	105
2-5-E-1 Resultados	105
2-5-E-2 Análisis estadístico	106
2-5-E-3 Discusión de los resultados	106
2-5-F Reparto de GR sometidos a conservación en condiciones standard de Banco de Sangre	106
2-5-F-1 Resultados	106
2-5-F-2 Análisis estadístico	107
2-5-F-3 Discusión de los resultados	107
Bibliografía del Cap. 3	108

CAPÍTULO 3

3- METODOS PARA ESTUDIAR LA AGREGACION ERITROCITARIA

	112
3-1 Técnicas para estudiar la agregación eritrocitaria.	113
3-1-1 Velocidad de eritrosedimentación	113
3-1-2 Análisis de imagen microscópicas.	114
3-1-3 Transmisión y retrodifusión de la luz	116
3-1-4 Eco - ultrasónico.	117
3-2 Estimación cuantitativa de la morfología de los agregados eritrocitarios	117
3-2-1 ASP	118
3-2-2 Objetivos	119
3-2-3 Materiales	119
3-2-3-1 Reactivos	119
3-2-3-2 Material biológico	119
3-2-3-3 Instrumental	120
3-2-4- Método	120

3-2-4-A Estudio de la morfología de los agregados de GR sin tratamiento previo.	120
3-2-4-B Estudio de la morfología de los agregados de GR tratados con enzimas.	121
3-2-4-B-1 Tratamiento enzimático de los GR. Procedimiento.	121
3-2-4-C Estudio de la morfología de los agregados de GR glicosilados.	122
3-2-4-C-1 Glicosilación de los GR. Procedimiento.	122
3-2-4-D Estudio de la morfología de los agregados de GR de diabéticos.	122
3-2-4-E Estudio de la morfología de los agregados de GR de hipertensos	123
3-2-5- Resultados	123
3-2-5-A Estudio de la morfología de los agregados de GR sin tratamiento previo	123
3-2-5-B Estudio de la morfología de los agregados de GR tripsinados	124
3-2-5-B-1 Resultados	124
3-2-5-B-2 Análisis estadístico	126
3-2-5-B-3 Discusión de los resultados	126
3-2-5-C Estudio de la morfología de los agregados de GR glicosilados	126
3-2-5-C-1 Resultados	126
3-2-5-C-2 Análisis estadístico	127
3-2-5-C-3 Discusión de los resultados	127
3-2-5-D Estudio de la morfología de los agregados de GR de diabéticos	127
3-2-5-D-1 Resultados	127
3-2-5-D-2 Análisis estadístico	128
3-2-5-D-3 Discusión de los resultados	129
3-2-5-E Estudio de la morfología de los agregados de GR de hipertensos	129
3-2-5-E-1 Resultados	129
3-2-5-E-2 Análisis estadístico	129
3-2-5-E-3 Discusión de los resultados	129
Bibliografía del Cap. 3	131

CAPÍTULO 4

4 EL FENOMENO DE ADHESION CELULAR	
4-1 ESTUDIO DE LA ADHESION ERITROCITARIA EN CONDICIONES ESTATICAS	136
4-1-1 Técnica de adhesión (aglutinación) directa.	144

4-1-1-1 Estandarización de las condiciones óptimas de trabajo: temperatura, tiempo de incubación y medio de reacción	145
4-1-1-1-A Materiales	145
4-1-1-1-A-1 Reactivos	145
4-1-1-1-A-2 Material biológico	145
4-1-1-1-B Procedimiento-Prueba cualitativa	146
4-1-1-1-C Interpretación de los resultados	146
4-1-1-1-D Resultados	147
4-1-1-2 Investigación de la expresión del receptor de hialuronato (CD44) en GR de adulto y cordón	148
4-1-1-2-A Procedimiento	148
4-1-1-2-B Resultados	148
4-1-1-2-C Discusión de los resultados	149
4-1-1-3 Aplicación	149
4-1-1-3-1 Discusión de los resultados	149
4-1-2-Test de inhibición de la adhesión (aglutinación)	150
4-1-2-1 Estandarización de las condiciones de trabajo	150
4-1-2-1-A Materiales	151
4-1-2-1-A-1 Reactivos	151
4-1-2-1-A-2 Material biológico	151
4-1-2-1-B Método	152
4-1-2-1-C Resultados	152
4-1-2-2 Técnica de cuantificación de la inhibición de la adhesión (aglutinación)	153
4-1-2-2-A Materiales	153
4-1-2-2-B Método	154
4-1-2-2-C Resultados	154
4-1-2-2-D Discusión de los resultados	154
4-2 ESTUDIO DE LA ADHESION ERITROCITARIA EN CONDICIONES DINAMICAS	
Determinación de la energía específica de adhesión por hialuronato empleando una cámara de flujo controlado	155
4-2-1 Materiales	155
4-2-1-A Reactivos	155
4-2-1-B Material biológico	155
4-2-1-C Instrumental-Diseño de la cámara de adhesión	155
4-2-2 Método	158
4-2-3 Cálculo de la energía de adhesión	158
4-2-4 Resultados	158
4-2-5 Discusión de los resultados	162
Bibliografía del Cap. 4	165
CONCLUSIONES FINALES	166
	168

GR	Glóbulos-rojos
L	Leucocitos
Pq	Plaquetas
FL	Fosfolípidos
AG	Acidos grasos
HC	Hidrocarbonadas
aa	Aminoácidos
Hb	Hemoglobina
NaCl	Cloruro de sodio
SGP	Sialoglicoproteínas
GP	Glicoforinas
NeuAc	Acido N-acetil neuramínico
AS	Acido siálico
Hto	Hematocrito
PBS	Buffer fosfato salino
CE	Célula endotelial
CESE	Carga eléctrica superficial eritrocitaria
Dx	Dextrano
PEG	Polietilenglicol
E	Escore
P	Coeficiente de partición
G	Razón de reparto
ASP	RBC aggregate shape parameter
PAS	Acido peryodico de Schiff
SS	Shear stress
SR	Shear rate
D	Constante dieléctrica del medio
Q	Caudal
E	Energía
F	Fuerza
W	Trabajo
u.e.s.	Unidades electrostáticas
σ	Densidad de carga superficial
ζ	Potencial Zeta
α	Parámetro de sensibilidad
μ	Fuerza iónica del medio
γ_d	Energía específica de adhesión
ϕ	Fracción de superficie parcialmente separada
τ	Tensión de corte
η	Viscosidad

RESUMEN

El objetivo general de la presente tesis es estudiar las alteraciones de propiedades superficiales eritrocitarias y su incidencia en la agregación y la adhesión. Este objetivo fue desarrollado en 4 etapas:

1. Comparar las variaciones de la CESE inducidas por diversos mecanismos, utilizando como herramienta el reparto en sistema acuoso bifásico Dx/PEG. Se trabajó con GR sin tratar y GR con variaciones de la CESE por distintos mecanismos: a)-tratados con distintas enzimas proteolíticas; b)-tripsinados a distintos tiempos; c)-tratados con anticuerpos; d)-sometidos a conservación en condiciones standard de Banco de Sangre y e)- GR de distintas especies. A través del P se pudo poner en evidencia variaciones significativas entre GR tratados y no tratados. De esta manera resulta el P una herramienta útil para el estudio comparativo de las variaciones de la CESE.
2. Estudiar por visualización microscópica directa, la morfología de los agregados de GR. Se estudió la morfología de los agregados de GR sin tratar; tratados (tripsinados a distintos tiempos y glicosilados) y de pacientes diabéticos e hipertensos. Por medio del ASP se mostraron diferencias significativas de la morfología de los agregados de GR sin tratar y tratados. Se observaron diferencias significativas de la morfología de GR normales y de diabéticos e hipertensos. El ASP da una estimación cuantitativa de la morfología de los agregados eritrocitarios y de las desviaciones de la misma.
3. Estudiar la adhesión bajo condiciones estáticas utilizando como modelo el sistema receptor de hialuronato(CD44) -hialuronato observando macroscópicamente, el fenómeno por adhesión (aglutinación) eritrocitaria. Se investigó el receptor de hialuronato en la membrana de GR de adulto, de cordón umbilical y de diabéticos. Se observó una diferencia estadísticamente

significativa en la adhesión de GR de adulto y de cordón y también de diabéticos y de adultos normales.

Se determinó el receptor de hialuronato(CD44) soluble en suero por inhibición de la adhesión(aglutinación). Se trabajó con suero de dadores normales y de recién nacidos. La sensibilidad de esta técnica no permitió demostrar la presencia de receptores de hialuronato solubles en el suero de neonatos, a diferencia de lo que ocurre en el adulto donde se observó poder inhibitorio.

4. En la última etapa de esta tesis se alcanzó el objetivo propuesto, desarrollar una técnica por análisis de imágenes digitalizadas en cámara de flujo para estimar la energía de adhesión del receptor de hialuronato y su ligando. De acuerdo a las energías calculadas el método es aceptable y puede ser aplicado en otros tipos de interacción celular.

PARTE PRIMERA

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN.

LA MEMBRANA DEL GLOBULO ROJO.

INTRODUCCIÓN

La membrana del glóbulo rojo (GR) es un excelente modelo biológico de membrana celular apta para el estudio de la relación de estructuras y función de las proteínas membranales.

Los GR son portadores de los antígenos de grupos sanguíneos, importantes en medicina transfusional, marcadores en genética humana y, actualmente, relevantes en el estudio de su relación con diversas patologías.

Es necesario alcanzar un mejor conocimiento de las bases moleculares de los antígenos de grupos sanguíneos, para establecer una relación entre la estructura y la función de las proteínas membranales, lo cual permitiría comprender su rol biológico. Está claro que la expresión, de numerosos antígenos de grupos sanguíneos, no está limitada sólo a los eritrocitos, sino que está presente en otros tejidos, sugiriendo que estas estructuras pueden ser funcionalmente importantes no sólo en el GR, sino también en otras células del organismo.

Los conocimientos estructurales actuales muestran que la naturaleza química de los antígenos de grupo sanguíneo, está repartida entre diferentes especies moleculares.

Los polipéptidos de los GR, que aportan antígenos de grupos sanguíneos, pertenecen a dos grupos de moléculas: las glicoproteínas hidrofóbicas, con uno ó varios dominios transmembranales, y las proteínas membranales, unidas a la superficie celular por un glucosil-fosfatidil-inositol.

Existe un gran número de procesos biológicos que están relacionados con cambios en las propiedades reológicas de células y fluidos.

En el curso de los últimos años, se ha investigado sobre el papel que juegan los factores reológicos en la comprensión de mecanismos biológicos y clínicos, en particular la relación reología-estructura y la relación reología-actividad celular.

El ácido siálico, responsable de la carga negativa distribuida sobre la membrana celular, constituye uno de los componentes terminales de las glicoforinas, contribuyendo significativamente a las propiedades estructurales de estas moléculas. Esta carga negativa tiene significancia hemorreológica y hemodinámica. Cualquier disminución del contenido de ácido siálico en la membrana, implica una disminución de la repulsión electrostática intercelular normal, favoreciendo consecuentemente la agregación eritrocitaria y la formación de rouleaux. Se puede observar, entonces, un aumento de la viscosidad que entorpece el flujo sanguíneo.

Por otra parte, la disminución del contenido de ácido siálico, también incrementa la interacción eritrocitaria con el endotelio vascular.

La adhesión de células sanguíneas a la superficie endotelial vascular, en condiciones de flujo, depende de numerosos factores reológicos: el tiempo de contacto entre receptor y ligando, la velocidad de corte que contribuye a destruir las uniones formadas y los mecanismos celulares que influyen en la superficie de contacto.

La interacción entre superficies celulares es un importante fenómeno en la microcirculación. La formación de "rouleaux" causa detención del flujo; la agregación de plaquetas es la responsable de la trombosis y la interacción de eritrocitos y leucocitos con el endotelio vascular tiene influencias importantes sobre el flujo circulatorio en la salud y en la enfermedad.

En algunas patologías, los eritrocitos u otras células circulantes, pueden manifestar una adherencia incrementada al endotelio, incidiendo en las complicaciones vasculares. Los estudios in vitro sobre asociación receptor-ligando, en diferentes condiciones físicas, pueden contribuir a una descripción más completa de las formas posibles de adhesión in vivo.

En conclusión, se puede predecir que habrán de encontrarse mayor número de patologías con alteraciones en la agregación y en la adherencia celular como consecuencia de la modificación de receptores o moléculas de adhesión, o bien, por desialización de proteínas de membrana portadoras de carga.

Desde que se descubrió que el suero de una especie animal, aglutina los hematíes de otra y se demostró un fenómeno análogo entre diferentes individuos de la misma especie, se sabe que los hematíes poseen receptores antigénicos y que en el suero u otros líquidos corporales pueden encontrarse los anticuerpos correspondientes. De hecho, existen una gran cantidad de ese tipo de receptores, que varían en su capacidad para estimular la formación de anticuerpos (inmunogenicidad) y en su comportamiento serológico in vitro. Como los antígenos permanecen prácticamente inmutables, en los hematíes de un individuo a lo largo de su vida, hacen posible esa clasificación tan individual de la sangre, conocida como grupos sanguíneos.

1-1- LA MEMBRANA DEL GLÓBULO ROJO

- En 1972, Singer y Nicholson propusieron el modelo de "Mosaico fluido" para la membrana biológica. Estos autores plantearon la membrana como una solución bidimensional, donde los lípidos actúan como solventes fluidos para las proteínas que son moléculas globulares, parcial o totalmente insertadas en la capa lipídica.

Las propiedades reológicas del GR son un reflejo de su estructura, porque presenta un comportamiento sólido dado por el citoesqueleto que le otorga propiedades elastoplásticas y un comportamiento líquido dado por la bicapa lipídica que obliga que los cambios de forma se den sin variación de área .

- **Lípidos:** Las proteínas y lípidos de la membrana biológica están íntimamente relacionados. Una parte lipídica fluida es necesaria para que la actividad proteica se desarrolle bajo condiciones óptimas. Los lípidos constituyen el 45% del peso seco de la membrana eritrocitaria.

Su composición es la siguiente:

- glicoproteínas 55%,
- fosfolípidos 28%,
- colesterol 13%,
- ácidos grasos libres 1% y
- glicolípidos 3%.

Todas las moléculas fosfolipídicas son anfipáticas.¹ con una cabeza polar hidrofílica y dos colas extremadamente hidrofóbicas constituidas por ácidos grasos (AG) de longitud y grado de insaturación

variable, unidas a un eje de glicerol². Colocados en un medio acuoso, forman espontáneamente una bicapa enterrando sus colas y dejando la cabeza expuesta al agua.

Los glicolípidos están intercalados entre los fosfolípidos (FL), con sus ejes mayores perpendiculares al plano de la bicapa. Están localizados íntegramente en la mitad externa de la misma, con su porción hidrocarbonada (HC) extendiéndose hacia la fase acuosa³.

Químicamente constituyen una ceramida, con un grupo polar que consiste en una gran variedad de polisacáridos complejos. Estas cadenas HC aportan los antígenos A, B, H, Le^a, Le^b y P⁽⁴⁾. La ubicación del colesterol es menos cierta. Estaría localizado en el centro hidrofóbico de la bicapa. Tiene un papel modulador del estado de fluidez de la bicapa lipídica.

Los lípidos y las proteínas de la membrana eritrocitaria no están distribuidos en forma fortuita ni equilibrada, sino que presentan una importante asimetría, con relación al plano medio de la bicapa (transasimetría). Los (FL) catiónicos (esfingomielina y fosfatidilcolina) se ubican, en mayor concentración, en la cara externa de la membrana, mientras que los amino-fosfolípidos aniónicos [fosfatidil-serina (PS) y fosfatidil-inositol (PI)] y los inosítidos son los principales constituyentes de la capa interna. La enzima aminofosfolípido-traslocasa o flipasa, transporta activamente el PS y PI de la capa externa a la interna (*flip*). La asimetría resulta del balance entre este transporte activo y el *flip-flop* pasivo, movimiento lento y bidireccional de los FL de una capa a la otra.⁵ La asimetría también está regulada por interacciones del citoesqueleto con la membrana y por la concentración intracelular de calcio (Ca⁺⁺).

Las anexinas, familia de proteínas sensibles al Ca^{++} , llamadas también calelectrinas, calpactin, endonexinas, sinexinas, p70, y calcimedinas, se unen en forma Ca^{++} dependiente, tanto a los FL de membrana como a elementos del citoesqueleto, como la actina.

El aumento de Ca^{++} intracelular, conduciría a la traslocación de la calcimedina, desde el citoplasma a la membrana, alterando la asimetría⁶. Los componentes lipídicos de la membrana eritrocitaria se mueven constantemente.

Los FL exhiben una discreta transición del estado líquido cristalino al de gel, dependiente de la longitud y grado de saturación de sus AG. El colesterol tiende a abolir la transición creando una condición intermedia fluida en la que el extremo proximal de las cadenas está extendido y relativamente rígido y el extremo distal desordenado y fluido.

Muchas funciones de la membrana eritrocitaria, fundamentalmente el transporte, dependen críticamente de la habilidad de la célula de mantener sus cadenas laterales de AG en estado fluido.

- **Proteínas:** El contenido proteico de la membrana eritrocitaria constituye el 55% de su peso. Según su grado de asociación con la bicapa lipídica, las proteínas se dividen en *integrales* o *periféricas*.

✓ ***Las proteínas integrales*** (integrinas) penetran la bicapa lipídica e interaccionan con el centro hidrofóbico¹⁹.

La mayoría de ellas tiene:

- Un dominio extracelular, generalmente glicosilado, que en algunos casos soporta los constituyentes de ciertos grupos sanguíneos.

□ Un dominio intramembranal, que puede incluir cadenas de aminoácidos (aa) con múltiples ondas, que atraviesan la membrana eritrocitaria varias veces. Esta región, es generalmente rica en aa hidrofóbicos, que contribuyen al comportamiento global hidrofóbico de la proteína entera.

□ Un dominio citoplasmático de gran importancia estructural, ya que es el sitio de fijación del citoesqueleto a la membrana.

Las integrinas son: Banda 3, Glicoforinas, Banda 4.5, Bomba de sodio (Na^+), Bomba de Ca^{++} , DAF, MRL, HRL, Estomatina, Polipéptido Rh, Proteína Duffy, Proteína L^x, proteína Kell.

✓ **Las proteínas periféricas** laminan la cara interna de la membrana eritrocitaria, en forma de malla proteica, compuesta principalmente por Espectrina, Ankirina, Miosina, Tropomiosina, Banda 6, Actina y Proteínas 4.1, 4.2 y 4.9. Constituyen el citoesqueleto, soporte mecánico de la membrana eritrocitaria⁷⁻⁸.

En la figura 1-1 se presenta un modelo de la membrana del GR.

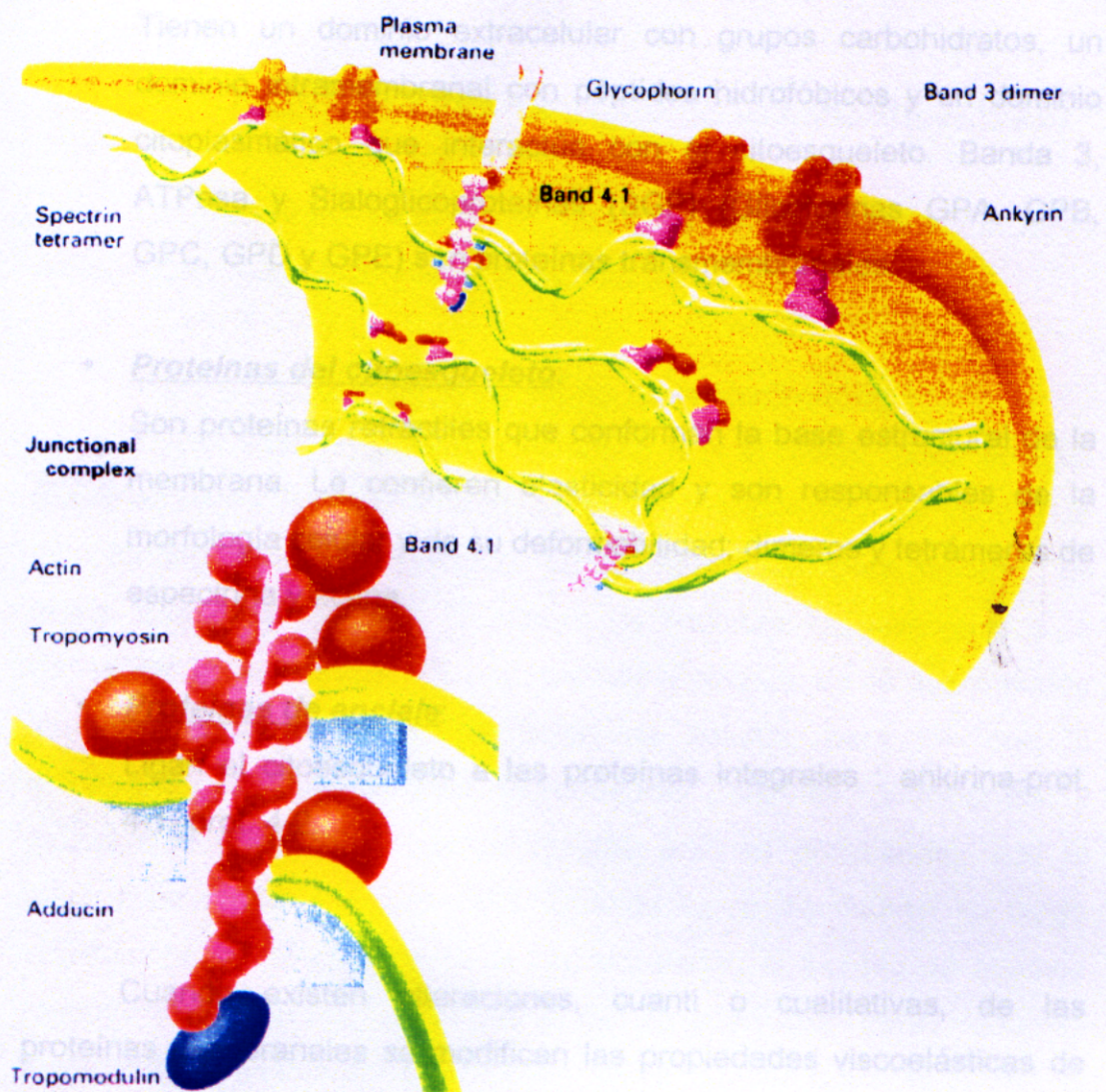


FIGURA 1-1. LA MEMBRANA DEL GLÓBULO ROJO

Otra clasificación de las proteínas de membrana es en base a su intervención en el mantenimiento de la morfología celular y en la capacidad de deformación de la célula.

- **Proteínas transmembranales:** están total ó parcialmente sumergidas en la doble capa lipídica.

Tienen un dominio extracelular con grupos carbohidratos, un dominio intramembranal con péptidos hidrofóbicos y un dominio citoplasmático que interactúa con el citoesqueleto. Banda 3, ATPasa y Sialoglicoproteínas (SGP) (Glicoforinas GPA, GPB, GPC, GPD y GPE) son proteínas transmembranales.

- **Proteínas del citoesqueleto:**

Son proteínas retráctiles que conforman la base estructural de la membrana. Le confieren elasticidad y son responsables de la morfología celular y de su deformabilidad; dímeros y tetrameros de espectrina y actina.

- **Proteínas de anclaje:**

Ligan el citoesqueleto a las proteínas integrales : ankirina-prot. 4-1- prot. 4-2.

Cuando existen alteraciones, cuanti o cualitativas, de las proteínas membranales se modifican las propiedades viscoelásticas de la membrana, el eritrocito puede cambiar su forma o introducir cambios en la deformabilidad.

1-1-1. FUNCIONES DE LA MEMBRANA DEL GLÓBULO ROJO

La membrana desarrolla múltiples e imbricadas funciones metabólicas, hidroelectrolíticas y estructurales⁹.

1-1-1-1. Función en el equilibrio hidroelectrolítico

El GR está en equilibrio osmótico con el medio, pues el agua puede atravesar libremente la membrana, en respuesta a cambios en la osmolaridad intra o extracelular. La permeabilidad, para aniones, es mayor que para cationes. El cloruro se equilibra en milisegundos, a través de la membrana. El principal determinante de la osmolaridad intraeritrocitaria es la concentración de solutos, para los que la membrana es relativamente impermeable: aniones polivalentes y cationes monovalentes. Los principales aniones polivalentes son la hemoglobina (Hb) y el 2-3 DPG. Cuando éstos disminuyen su carga aniónica (ej: al desoxigenarse la Hb) ocasionan el ingreso de aniones monovalentes y agua, con lo que el GR se edematiza. Estas variables fisiológicas, bien toleradas por GR normales, pueden acentuar la lisis de GR con deformabilidad disminuida. Las variaciones del contenido de cationes monovalentes también se acompañan de movimientos rápidos de aniones monovalentes.

La función de las bombas de Na^+ y Ca^{++} , por su parte, requiere de ATP y de una adecuada fluidez de los lípidos de membrana. La falla de la bomba de Na^+ se caracteriza por ganancia de Na^+ , aumento de la osmolaridad intracelular, entrada de agua y edema del GR.

La exclusión de Ca^{++} es crítica para la célula, pues su elevación inicia una variedad de respuestas celulares, que incluye: cambio de forma con evaginación de la membrana y desprendimiento de pequeñas vesículas.

Ello implica la fusión entre segmentos opuestos de la membrana, que puede asociarse a alteraciones locales de la asimetría de FL. Puede estimular también la proteólisis de la ankirina, de la proteína 4.1 y de la banda 3 por acción de la calpaina.

Niveles mayores inducen la absorción de proteínas citoplasmáticas a la membrana, y activan la transglutaminasa citoplasmática. Este proceso entrecruza irreversiblemente las proteínas de membrana, lo que endurece la membrana eritrocitaria y genera esferoequinocitos, lo que determina la muerte celular por sobrecarga de Ca^{++} .

1-1-1-2. Comportamiento reológico

Dentro de los vasos el flujo circulatorio es laminar. Los GR se desplazan por el eje central de los vasos, a máxima velocidad y menor viscosidad y el resto de los componentes lo hace en capas periféricas (Efecto Fahraeus-Lindqvist).

Se denomina viscosidad a la resistencia intrínseca de un líquido a circular, y está relacionada con la fricción entre las capas adyacentes que se mueven a distintas velocidades. La tensión de cizallamiento (*shear stress*) es necesaria para vencer esa fricción e iniciar el movimiento (flujo). La velocidad de corte (*shear rate*) es la diferencia de velocidad entre capas contiguas. La viscosidad resulta del cociente entre la tensión de cizallamiento y la velocidad de corte.

La bicapa lipídica confiere al GR las propiedades viscosas y el citoesqueleto aporta resistencia mecánica y elasticidad. Por su parte, las SGP soportan las cargas electronegativas, e inducen la repulsión electrostática intereritrocitaria.

El mantenimiento de la organización fosfolipídica, durante la marcada deformabilidad por deslizamiento y durante la movilidad en *"tank treading"* (rueda de tanque) de la membrana, es atribuible predominantemente al efecto estabilizador pasivo de las proteínas de membrana, lo que fortalece el concepto de unidad estructural de membrana caracterizada por una íntima asociación entre lípidos y proteínas¹⁰. En cualquier condición de circulación, arterial, venosa o capilar, el eritrocito sometido a las tensiones cortantes del flujo, se deforma de manera de ofrecer la menor resistencia hidrodinámica, al tiempo que su membrana adopta un movimiento de rotación sobre sí misma como lo hace la oruga de un tanque. A este movimiento, que reduce la viscosidad de la sangre, se lo denominó *"tank - treading motion"*¹¹.

El adecuado comportamiento reológico de los eritrocitos depende, entonces, del correcto funcionamiento de cada uno de sus componentes y de todos ellos en conjunto.

1-1-1-3. Funciones estructurales

El control de la forma del GR es un complejo procedimiento en el que intervienen, activa o pasivamente, la mayoría de los componentes de la membrana eritrocitaria.

Los GR recuperan rápidamente su forma basal cuando son sometidos a una deformación transitoria; pero si ésta se mantiene por un tiempo la deformación por mayor tiempo; esto se debería al realineamiento de las interacciones dinámicas del esqueleto en respuesta a la fuerza de distorsión. El citoesqueleto provee estabilidad a la membrana y se lo considera el mayor determinante de la forma, deformabilidad e integridad estructural.

Su capacidad resistente estabiliza la bicapa lipídica contra distorsiones y su elasticidad ayuda a restablecer, rápidamente, la forma celular. Además, restringe la movilidad lateral de algunas de las proteínas integrales de membrana, para proveer una distribución homogénea de las mismas, evitando zonas desnudas de proteínas, que de esa manera podrían fusionarse con muchas de las demás células, con las que el GR contacta durante su vida.

La adecuada composición lipídica de la membrana, también es fundamental para el mantenimiento de la forma. Un elemento capital es la asimetría fosfolipídica; un desbalance causa bucles hacia afuera (equinocito), si se intercala una molécula anfipática en la cara externa o hacia adentro (estomatocito), si un FL catiónico se incorpora a la capa interna¹².

El papel de las proteínas integrales de membrana es esencial en el mantenimiento del volumen y del estado de hidratación de la célula.

1-1-1-4. Función de soporte: los antígenos de membrana

La siguiente figura, presenta un modelo de la membrana del glóbulo rojo, donde se ubican algunos antígenos de distintos grupos sanguíneos, en distintas estructuras de este modelo de membrana biológica.

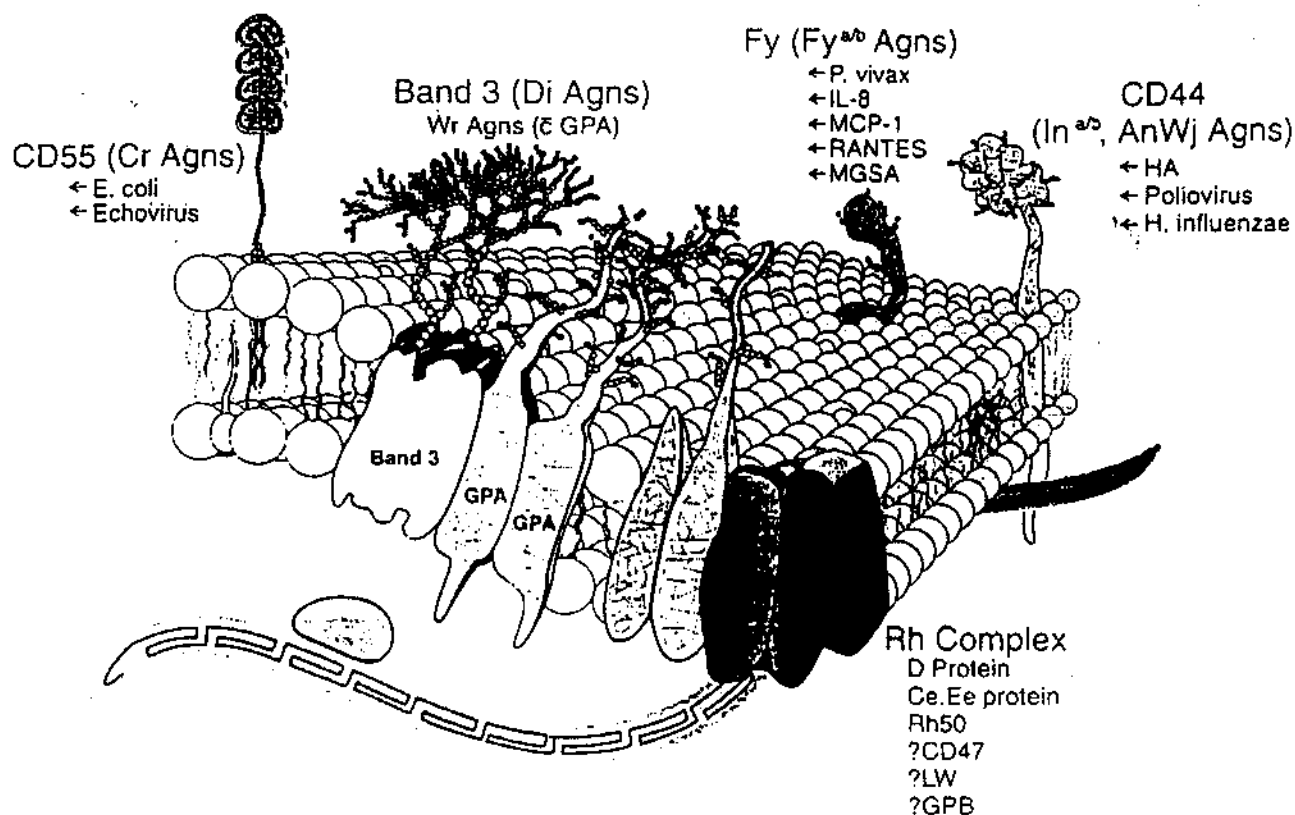


Figura 1-1-1-4. Modelo de la membrana eritrocitaria. Varias proteínas de membrana sirven de receptores para moléculas y organismos infectantes.

De esta manera, las proteínas de membrana del GR sirven de receptores para moléculas y organismos infectantes. También se observa, como algunas proteínas forman complejos heteronuméricos en la misma.

En algunos casos el componente de membrana relacionado, está profundamente estudiado y reconocido, como así también la naturaleza química de los antígenos. En otros casos, a pesar de los recientes avances en el conocimiento de los componentes de membrana relacionados, queda aún mucho por dilucidar.

1-1-2 GRUPOS SANGUÍNEOS.**RELACIÓN ESTRUCTURA - FUNCIÓN.** ^{13-14-15-16-17-18.}

Los antígenos de grupos sanguíneos no representan una entidad biológica homogénea, porque son muy diferentes a nivel de su química y de sus soportes moleculares.

Sobre la base del conocimiento estructural actual, esas estructuras pueden ser clasificadas en cinco grupos:

- 1) Receptores y Ligandos**
- 2) Moléculas de adhesión**
- 3) Transportadores y canales**
- 4) Enzimas**
- 5) Proteínas estructurales.**

Clasificación funcional de los principales genes de grupos sanguíneos

Clase molecular	Proteína o Lípido	Cromosoma	Función biológica
Transportador o canal	Banda 3	17q21	Intercambiador de aniones
	AQP-1	7p14	Canal de hidrógeno
	Kidd	17q11-q12	Transportador de urea
	Rh	1p34-p36	Transportador
	Kx	Xp21.1	Transportador
Receptor	DARC	1q22-q23	R. P. vivax y citoquinas
	CR1	1q32	R. P. falciparum C3b, c4b
	GPA/B	4q28-q31	R. P. falciparum / bacterias / virus
	DAF	1q32	R. E. Coli / enterovirus
	Globósido	22q11-qter	R. Parvovirus B 19
Adhesión	CD44	11p13	Ligando: hialurónico
	ICAM-4	19p13-cen	Ligando: LFA-1, MAC-1
	LwB-CAM	19q12-q13	Ligando: laminina
	Xga	Xp22-p32	Ligando
Enzima	Glicosiltransferasa	9q34-q34.2	3-D-GalNAc / Gal - transferasa
	Ibid	19q13	2-a -L- fucosiltransferasa(FUT 1)
	Ibid	19q13	2-a-L- fucosiltransferasa(FUT 2)
	Cartwright	19q13	3/4a-L- fucosiltransferasa(FUT 3)
	Kell	7q22.1-q22.3	Acetilcolinesterasa
		7q32-q36	Metaloproteinasa a zinc
Estructura	GPC/D	2q14-q21	Propiedades mecánicas/elásticas de la membrana

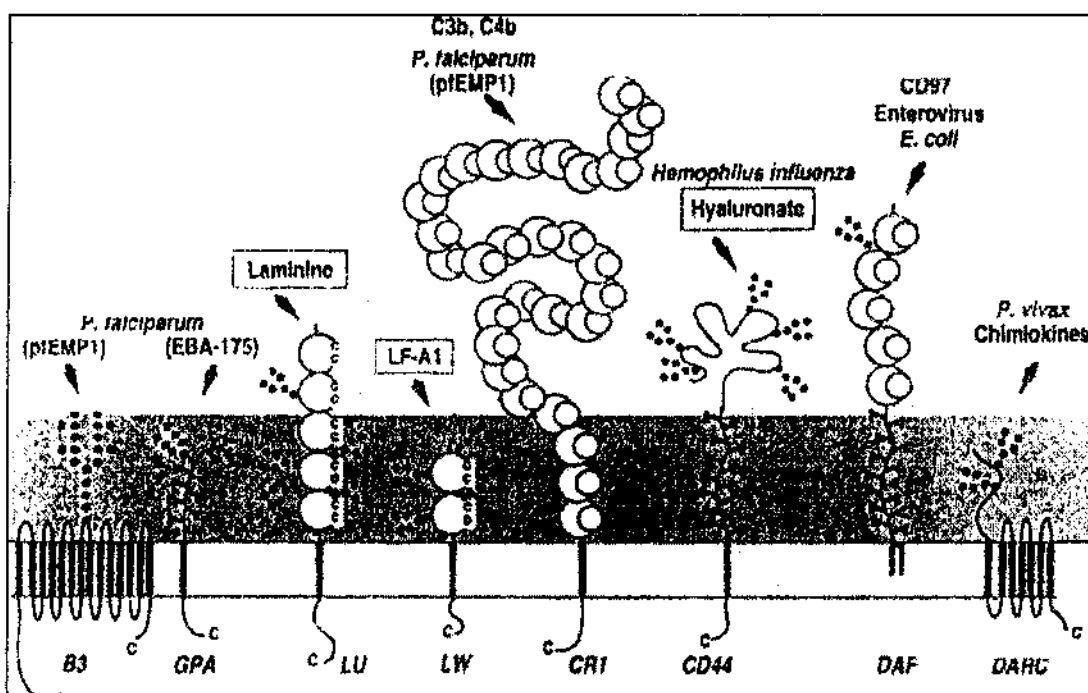


Figura 1-1-2-1- Representación esquemática de las proteínas de la membrana eritrocitaria con funciones de adhesión (CD44, LW, LU), receptores de microorganismos (banda 3, GPA, CR1, CD44, DAF, Fy) y de ligandos (Fy).

1) Receptores y Ligandos: Son los componentes de la membrana capaces de fijar bacterias y sus toxinas, virus, parásitos y proteínas exógenas²⁵, como se representa en la figura 1-1-2-1-. Comprende las proteínas de grupo sanguíneo Duffy (Fy) recientemente reconocida como receptor de quimoquina, que se une a los péptidos proinflamatorios y pueden estar implicados en el "clearance" de los mismos, fuera de la circulación sanguínea. La glicoforina A, soporte de los antígenos de grupo sanguíneo MN²², representa el principal ligando de ciertos tipos de *Plasmodium*, y es portadora de la carga neta negativa de membrana, que juega un rol importante en la agregación celular. El Le(b) es el principal ligando del *Helicobacter pylori*.

2) Moléculas de adhesión: Comprende el CD44, portador de los grupos sanguíneos Indian y An Wj. El CD44 es una glicoproteína transmembranal, que está implicada en la adhesión celular y es funcionalmente idéntica a los receptores de hialuronato. La glicoproteína Lu y B-CAM (molécula basal de adhesión celular) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y ejercen su acción en la interacción célula - célula²⁴.

3) Transportadores y canales :

-Banda 3 y Sistema Diego, ambos implicados en el envejecimiento celular y la patogénesis del paludismo.

-El canal hídrico y el sistema Colton, implicados en el mecanismo de entrada y salida de agua de las células.

-El transportador de urea, el sistema Kidd y

-Los transportadores potenciales o proteínas Rh y Kx cuyo papel no están aún formalmente definidos.

4) Enzimas : Los productos primarios de los genes de grupos sanguíneos ABO, H, Se y Le son glicosiltransferasas responsables de la síntesis de antígenos glucídicos ABO, Hh, Lewis y Secretor. En la membrana de los eritrocitos una sola proteína expresa un antígeno de grupo sanguíneo que posee una función enzimática bien caracterizada: ésta es la acetilcolinesterasa que lleva los antígenos Cartwright y que está implicada en la transmisión colinérgica del influjo nervioso.

La proteína Kell podría ser definida como una metaloproteínasa capaz de fijar zinc. Estas enzimas clivan los péptidos implicados en los procesos fisiológicos del dolor, de la presión arterial, de la respuesta inflamatoria. Pero se ignora todavía, si la proteína Kell posee una actividad catalítica. Su sustrato potencial no ha sido, aún, identificado.

5) Proteínas estructurales: Son las proteínas que contribuyen a la estabilización de la arquitectura membranal como la banda 3 y la Proteína Rh. La GPA contribuiría a la rigidez membranal, mientras que las GPC y GPD, parecen jugar un papel en la elasticidad y deformabilidad de los eritrocitos. Numerosos estudios, ponen en evidencia la contribución esencial de estas proteínas de estructura, en las propiedades mecánicas de la membrana eritrocitaria²¹.

- ***Sistemas de Grupos Sanguíneos elegidos para el desarrollo de esta Tesis:***

- ✓ **Sistema MNSs**

- ✓ **Sistema Lutheran**

1-2- SISTEMA MNSs:

1-2-1 Sialoglicoproteínas

Llamadas también glicoforinas son glicoproteínas ricas en ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico=NeuNAc). El NeuNAc de las GP es el principal determinante de la **carga negativa** de la superficie del GR. La repulsión electrostática resultante de estas cargas, reduce la agregación eritrocitaria.

1-2-1-1- Función

Se supone que la función de las GP, es la de llevar Hidratos de Carbono que atraen agua hacia la membrana eritrocitaria, para protegerla de los golpes que recibe durante la circulación²⁰, y para prevenir la adhesión de las células entre sí.²³ Se las consideró como posibles conductoras de señales transmembranales, pues al unirse a anticuerpos específicos en su porción externa, la fase interna se une al citoesqueleto alterando su deformabilidad.

Son potentes inhibidores de la hemaglutinación por virus de la influenza, receptores para la invasión de merozoítos de *Plasmodium falciparum* y podrían ser el sitio de unión de algunas cepas de *Escherichia coli*, con propiedades adherentes²⁴⁻²⁵.

Los alelos S y s están íntimamente ligados a M y N. Es posible cualquier combinación de M ó N con S ó con s, la que se transmite, sin modificación, de generación en generación.

1-2-1-2- Ubicación²⁶⁻²⁷.

Las GP son proteínas integrales transmembranales. Estas proteínas penetran la bicapa lipídica e interaccionan con el centro hidrofóbico. La mayoría tiene un dominio extracelular generalmente glicosilado que en algunos casos sustenta los constituyentes de ciertos grupos sanguíneos; un dominio intramembranoso rico en aa hidrofóbicos, que contribuyen al comportamiento global hidrofóbico de la proteína entera; y un dominio citoplasmático, de gran importancia estructural, ya que es el sitio de fijación del citoesqueleto a la membrana.

La membrana del glóbulo rojo contiene 5 tipos de GP: GPA- GPB- GPC- GPD y GPE²⁸.

Las GPA y GPB son altamente glicosiladas, codificadas en el cromosoma 4 por genes homólogos y cercanos²⁹⁻³⁰⁻³⁷.

La GPA lleva la especificidad M y N en su porción N-terminal.

M	aa N° 4 Ser	aa N°5 Gly
N	aa N°1 Leu	aa N° 5 GLu

Aunque para un buen reconocimiento del anticuerpo debe también existir una glicosilación apropiada del aa 2 al 4.

La GPB lleva la especificidad S y s, relacionada con el aa 29, metionina en S y treonina en s.

Las GP juegan un papel estructural en la preservación de la forma del GR. Esto está ligado a la gran cantidad de ácido siálico (AS) que contienen, el que confiere al eritrocito, una carga negativa fuerte que tiende a separarlos. Ellas también sirven como ligandos para virus, bacterias y parásitos. Las GP son detectadas por la coloración de ácido peryodico de Schiff (PAS), luego de la separación de membranas eritrocitarias, con electroforesis en gel de sulfato dodecyl sódico poliacrilamina (SDS-PAGE). Estas proteínas representan alrededor del 2% del total de proteínas de la membrana eritrocitaria, y sus propiedades figuran en la tabla (1-2-1). Las GPA y GPB representan el 85% y el 10%, respectivamente, del material PAS positivo de la membrana eritrocitaria, mientras que GPC y GPD representan sólo el 4% y el 1%. La GPE es indetectable por este método. Este dato se correlaciona con el número de copias de cada glicoproteína que ostenta rangos, de contenido por célula de 10^6 para GPA, 1×10^5 para GPB, 0.5×10^5 a 1×10^5 para GPC y 2×10^4 para GPD. Esto puede ser comparado con las 1×10^6 copias para banda 3 y 5×10^5 , 4×10^5 , 1×10^5 y 2×10^5 copias por célula para las proteínas del citoesqueleto, actina, espectrina, ankirina y proteína 4.1, respectivamente³¹⁻³²⁻³⁶. Las GP de membrana también difieren en su masa molecular, aparente estimada sobre SDS gel, por la composición de sus cadenas carbohidratadas y su extractibilidad con detergentes no iónicos, como Triton X-100. Estas moléculas son portadoras de antígenos de grupo sanguíneo, como: MN para GPA, Ss para GPB y Gerbich (Ge) para GPC y GPD³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰⁻⁴¹⁻⁴⁸. Muchas variantes de estos antígenos son reconocidas como significativas en medicina transfusional (Tabla 1-2-2).

Tabla 1-2-1 Nomenclatura y propiedades de las Glicoforinas de membrana del GR

Propiedades	GPA	GPB	GPC	GPD	GPE
Sinonimias	PAS-1 MN SGP GP a	PAS-3 Ss SGP GP d	PAS-2 Comp D GPb	Comp E Gpg	
Antígeno de grupo sanguíneo	MN	Ss	Ge:3,4	Ge:2,3,4	M
Material PAS- positivo (%)	85	10	4	1	no detectable
Masa molecular aparente (kd)	36	20	32	23	17
Copias por célula (x103)	500 a 900	100 a 300	50 a 100	20	?
Cadena polipeptida (res)	131	72	128	107	59
Cadena azúcar O-linked	15	11	12	6	?
Cadena azúcar N-linked	1	0	1	0	0

Tabla 1-2-2. El sistema de grupo sanguíneo MNSS

Reacciones con anti					Frecuencia(%)		
M	N	S	s	U	Fenotipo	Blancos	Negros
+	O				MM	28	26
+	+				MN	50	44
O	+				NN	22	30
		+	O	+	SS	11	3
		+	+	+	Ss	44	28
		O	+	+	ss	45	69
		O	O	O	SS	0	raro

1-2-2 Glicoforina A³³⁻³⁴⁻⁴¹

En la figura 1-2 se representa la GPA.

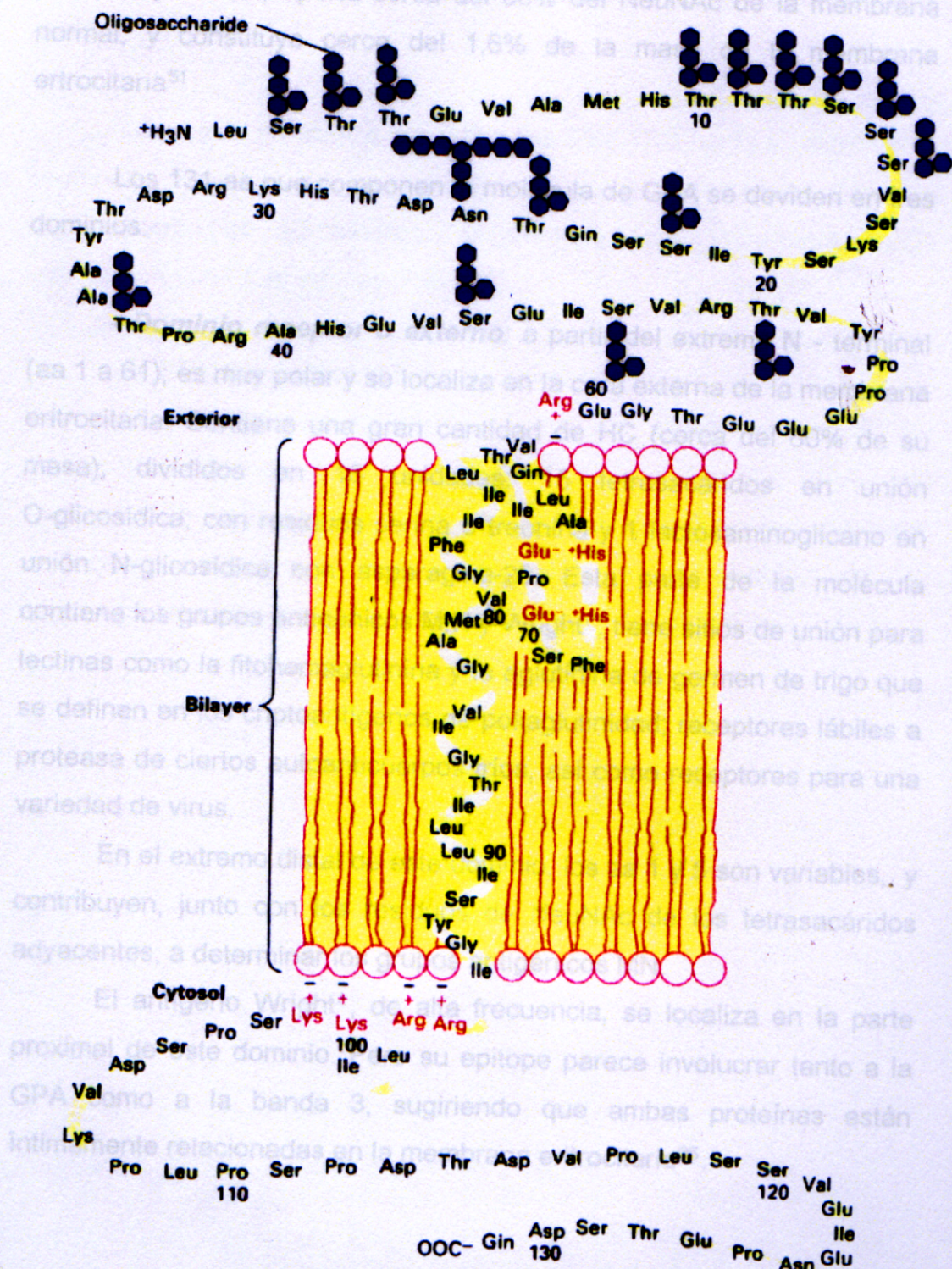


FIGURA 1-2. GLICOFORINA A.

La GPA es el paradigma de las proteínas integrales de membrana. Es la mayor SGP; aporta cerca del 60% del NeuNAc de la membrana normal, y constituye cerca del 1,6% de la masa de la membrana eritrocitaria⁵¹.

Los 131 aa que componen la molécula de GPA se dividen en tres dominios:

- **Dominio receptor o externo:** a partir del extremo N - terminal (aa 1 a 61); es muy polar y se localiza en la cara externa de la membrana eritrocitaria. Contiene una gran cantidad de HC (cerca del 60% de su masa); divididos en 16 unidades: 15 tetrasacáridos en unión O-glicosídica, con residuos serina o treonina y 1 lactosaminoglicano en unión N-glicosídica con asparagina-26. Esta parte de la molécula contiene los grupos antigénicos M,N y Wright^b; tiene sitios de unión para lectinas como la fitohemaglutinina y la aglutinina de germen de trigo que se definen en los criptoantígenos de poliaglutinidad; receptores lábiles a proteasa de ciertos autoanticuerpos fríos, así como receptores para una variedad de virus.

En el extremo distal de este dominio, los aa 1 y 5 son variables, y contribuyen, junto con los residuos de NeuNAc de los tetrasacáridos adyacentes, a determinar los grupos antigénicos MN.

El antígeno Wright^b, de alta frecuencia, se localiza en la parte proximal de este dominio. Pero su epitope parece involucrar tanto a la GPA como a la banda 3, sugiriendo que ambas proteínas están íntimamente relacionadas en la membrana eritrocitaria³⁵.

-**Dominio intramembranoso** (aa 62 a 95). Es muy hidrofóbico y se extendería a través de la membrana como una hélice única. Este dominio se une a FL .

- **Dominio intracitoplasmático** (aa 96 a 131; hasta su extremo C-terminal). También es muy polar. su función es incierta pero un agrupamiento de aa básicos (aa 96-101) sería importante en la interacción con FL aniónicos (PG o PI).

La GPA existe probablemente como un dímero en la membrana, asociada no-covalentemente en su dominio intramembranoso. Su interacción dimerica es fuerte y difícil de disociar. La GPA está restringida a la línea eritroidea, de la que constituye un marcador específico. El grado de O-glicosilación y la madurez de los oligosacáridos aumentan durante la diferenciación del GR.

1-2-3 Glicoforina B³⁷

La GPB no está tan bien caracterizada como la GPA. Carecería de segmento intracitoplasmático, resultando más corta. Vehiculiza la actividad U, "N" y los antígenos S y s. El extremo C-terminal estaría embebido en la membrana lipídica.

La composición aminoterminal de la GPB es idéntica, en su secuencia aminoácida, a la GPA y al antígeno N, hasta el aa 26, que carece del complejo lactosaminoglicano. Esta identidad explica la presencia de un antígeno similar a N, "N críptico" o "N intrínseco", en casi todos los eritrocitos, independientemente de su tipo MN. Los residuos 27-35 son semejantes a los residuos 56-64 de la GPA, y los residuos 46-71, a los 75-100 de la GPA. La porción hidrofóbica (residuos 36-66) es mucho más larga que en otras glicoforinas.

1-2-4 Bioquímica del MNSs:^{41-44.}

La GPA es portadora de los antígenos M y N. Estos antígenos dependen de un par de polimorfismos en el primer y quinto aminoácido del GPA, como se muestra en la siguiente tabla:

<i>aminoácido</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
tipo M	Ser	Ser	Thr	Thr	Gly	Val	Ala	Met
tipo N	Leu	Ser	Thr	Thr	Glu	Val	Ala	Met

El antígeno N se produce por una vía bioquímica, muy compleja, y luego lo hace el antígeno M.

La GPB tiene actividad antigénica 'N', pero no M. La GPB también expresa los antígenos S, y s que tiene una sustitución de aminoácido residuo 29 (Met por S).

<i>aminoácido</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
tipo 'N'	Leu	Ser	Thr	Thr	Glu	Val	Ala	Met

Los alelos S y s están íntimamente ligados a M y N.

Ambas GP son codificadas por separado, pero por genes muy ligados.

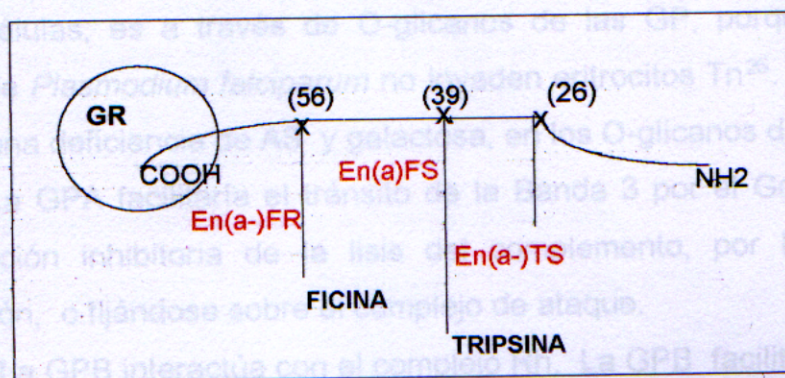
1-2-5 Fenotipos nulos ^{43-45-46-49-50.}

Dentro del sistema MNSs, han sido descritos fenotipos nulos. Las personas cuyas células carecen de GPA pero expresan GPB son designadas En(a-).

El fenotipo En(a-) es extremadamente raro, entre las variantes genéticas asociadas con el sistema de grupo sanguíneo MNSs. Fue descrito por primera vez en 1965 por Darnborough⁴². Está bien establecido que, los GR En(a-), carecen de la mayor SGP, la GPA, la cual conlleva las determinantes del grupo sanguíneo MN. La membrana de las células En(a-) contienen cantidades considerablemente menores de AS. ⁴⁹.

Los antígenos reconocidos por el suero anti-En(a-) son clasificados en tres tipos: En(a-)FR, En(a-)FS y En(a-)TS. Sobre células intactas la tripsina cliva en la posición de los residuos aa 30 y 39, mientras que la ficina lo hace en la posición del residuo aa 56. La proteína entra en la membrana en el residuo aa 70.

Los tres epitopos pueden ser definidos por su resistencia a la degradación a la tripsina y a la ficina⁴⁶. El En(a)-TS reside en la parte clivada por tripsina (entre los residuos 26 y 39). El En(a)-FS está localizado entre los sitios de clivaje de la tripsina y la ficina y el En(a)-FR reside entre el sitio de clivaje de ficina (y la papaína) y el punto en el cual la proteína entra en la membrana. (Esquema 1-2)



Esquema 1-2. En(a) y sitios de clivaje de enzimas proteolíticas.

1-2-6- Papel fisiológico de las glicoforinas

Las GPA y GPB parecen tener significativas interacciones con otras estructuras de membrana. La GPA interacciona con componentes del citoesqueleto y con banda 3 y esta interacción es suficiente para la expresión del antígeno Wright (Wr)

La GPB interactúa con el complejo Rh.

La GPA y GPB proveen la carga negativa superficial de los GR, debido a la gran cantidad de AS que contienen.

Ambas GP están fuertemente glicosiladas, con numerosos O-glicanos, los más predominantes son: disialotetrasacáridos en un 75%, 17% monosialotrisacáridos, y 5% trisialopentasacáridos.

Las funciones de las GPA y GPB no son muy claras, pero hay ejemplos de microorganismos, que utilizan el ácido siálico asociado con estas sialoglicoproteínas, como receptores in vitro²⁴⁻⁴⁰⁻⁴⁷. *Influenza virus*, *Encephalomyeloma virus*, *arbo-paramyxovirus-reovirus-piconavirus* y *Escherichia coli* IH11165, se unen a GPA. Variantes genéticas, carentes de GPA y/o GPB, son refractarias a la invasión por *Plasmodium falciparum*, y esto evidencia que la interacción del parásito malario con estas células, es a través de O-glicanos de las GP, porque algunas cepas de *Plasmodium falciparum* no invaden eritrocitos Tn²⁵. Los GR^{Tn} tienen una deficiencia de AS y galactosa, en los O-glicanos de las GP.

La GPA facilitaría el tránsito de la Banda 3 por el Golgi, tendría una acción inhibitoria de la lisis del complemento, por bloquear la formación, o fijándose sobre el complejo de ataque.

La GPB interactúa con el complejo Rh. La GPB facilita el tránsito de la glicoproteína Rh50, a través del retículo endoplasmático.

1- 3- SISTEMA LUTHERAN:

1-3-1 Antígenos proteicos regulados por In(Lu)^{52-53-54-55.}

El sistema Lutheran fue descubierto por Callender y col. en 1946.

El sistema consta de 18 Ag Lutheran relacionados (Tabla 1-3-1). Los dos primeros antígenos que se descubrieron fueron Lu(a) de frecuencia baja (0.005) y Lu(b) de frecuencia alta (0.94), como se muestra en la tabla 1-3-1 y dependen de un par de alelos codominantes del cromosoma 19.

Tabla 1-3-1- Antígenos en el sistema de Grupo Sanguíneo Lutheran.

Símbolo tradicional	Símbolo alfanumérico	Frecuencia
Lu(a)	Lu(1)	baja
Lu(b)	Lu(2)	alta
Mull	Lu(9)	baja
Jan	Lu(6)	alta
Hof	Lu(14)	baja
M.T.	Lu(8)	alta
Au(a)	Lu(18)	alta
Au(b)	Lu(19)	baja

Luego del Sistema RH y Kell, es el Sistema que presenta más grupos de antígenos.

Los designados como Ag Lu han demostrado claramente estar ligados a la expresión de otros Ag Lu. Los Ag "para Lu" son aquellos Ag que son suprimidos por el gen de regulación In(Lu), pero que no están ligados al locus Lutheran^{64-65.}

El gen Lu, se halla ligado a los locus de: C3, LDL-R(receptor de lipoproteínas de baja densidad), LW(grupo sanguíneo) y APO2 (apolipoproteína C-II). El gen Lu se transcribe en numerosos tejidos: corazón, riñón, placenta, hígado, cerebro, pero los mecanismos para expresarse son diferentes en los distintos tejidos.

Los anticuerpos a antígenos Lu raramente causan destrucción acelerada de GR, y cuando ocurre, la hemólisis es relativamente baja.

Los antígenos Lu están poco desarrollados en GR fetales, por lo cual es poco común la enfermedad hemolítica del recién nacido a anticuerpos Lu. Los antígenos Lu aparecen, durante el desarrollo del recién nacido, sobre residuos no determinados⁵².

La digestión de membranas eritrocitarias con endoglicosidasa F y sialidasa, muestran que estas enzimas cambian la migración de la proteína Lu en gel de poliacrilamida (SDS), demostrando la presencia de grupos N- y O- oligosacáridos unidos. La proteína Lu no parece interaccionar significativamente con el citoesqueleto del GR.

1-3-2- El fenotipo Lu (a-b-)

Puede resultar de la presencia homocigota de un gen Lu "mudo" (XS2) localizado en el Cr X ó por un gen supresor dominante In (Lu)⁵³ que afecta la expresión de todos los genes del locus Lu- (tabla 1-3). Se ha comprobado que este inhibidor no radica en el locus Lu y también inhibe los antígenos: P₁, i, CD44 (In, AnWj), Mer2, Knops y McCoy. A este inhibidor se lo denomina In(Lu) y se encuentra en un cromosoma autosómico. La incidencia de este gen es alta (1 en 3000). Se ha demostrado que las personas con fenotipo In(Lu) tienen 500 sitios antigénicos por célula, comparado a los 2000-3000 sitios en individuos normales.

Los eritrocitos In(Lu) Lu(a-b-) presentan anomalías morfológicas (acantocitos, algunos poiquilocitos) y fisiológicas (una disminución de la fragilidad osmótica).⁶⁷

Tabla 1-3. Fenotipos Lutheran negativos

Genotipo	Fenotipo	anti-Luth adsorbido y eluido	Expresión de otros Ag
LuLu recesivo	Lu(a-b-)	No	no afectado
In(Lu) dominante	Lu(a-b-)	Si	Pi reducido, AnWj e Inb
X ligado recesivo	Lu(a-b-)	S	AnWj e Inb no afectados

1-3-3- Bioquímica de los antígenos Lu:

Los antígenos Lu(a) y Lu(b) son transportados por dos glicoproteínas de 78 y 85 KDa respectivamente⁵⁴. Estas dos glicoproteínas están estrechamente relacionadas por puentes disulfuro entre cadenas. La diferencia antigénica entre Lu(a) y Lu(b) es una pequeña variación en la secuencia de aminoácidos⁵³.

En 1994 (Pearson et al. 1994)⁶⁰ se estudió el ADNc, que codifica la glicoproteína Lutheran: ésta contiene 597 aa, tiene un dominio intracitoplasmático en el que se encuentra un grupo SH2 implicado en la interacción proteína-proteína en el reconocimiento celular, una región transmembranal de sólo 20 residuos aa y un largo dominio extracelular con cinco sitios de N-glicosilación.

La glicoproteína Lutheran tiene dos particularidades:

- ✓ Pertenece a la *Superfamilia de Inmunoglobulinas*: La proteína Lu posee cinco dominios de la superfamilia de Ig.
- ✓ Es homóloga a un Ag de superficie de células cancerosas: B-CAM (Molécula de adhesión basal), ésta última representa la forma recortada con 40 aa menos en el dominio C-terminal.

1-3-4- Función

Al tener dominios *Ig-like* se deduciría una función de reconocimiento por lo que se supone que existe un ligando para la proteína Lu y esta proteína podría estar implicada en los fenómenos de interacción celular, quizás como molécula de adhesión ⁵⁸⁻⁶¹⁻⁶⁰.

La expresión de los antígenos Lu puede ser suprimida por la presencia del gen *In(Lu)* ⁶⁴⁻⁶⁵. Este gen fue descrito como la causa del fenotipo Lu(a-b-) y es autosómico dominante. Es el único gen relacionado a Sistemas de Grupos Sanguíneos con un rol inhibitorio dominante. El alelo normal del *In(Lu)* ha sido designado *in(Lu)*. El *In(Lu)* afecta la expresión de antígenos, genética y bioquímicamente no relacionados a los antígenos Lu. Esto incluye al antígeno polisacárido P e i, al antígeno proteico *Ina/Inb* (el cual reside sobre la molécula de CD44) y el antígeno *AnWj* (el cual une al *Haemófilus influenzae*) ⁵⁹⁻⁶⁶.

El gen *In(Lu)* también afecta la expresión de los antígenos Knops/Mac Coy.

1-3-5- Antígenos no Lu afectados por el gen Lu: CD44

La proteína de membrana, ahora llamada CD44(Fig.1-3-1), fue la primera proteína conocida, regulada por el In(Lu).

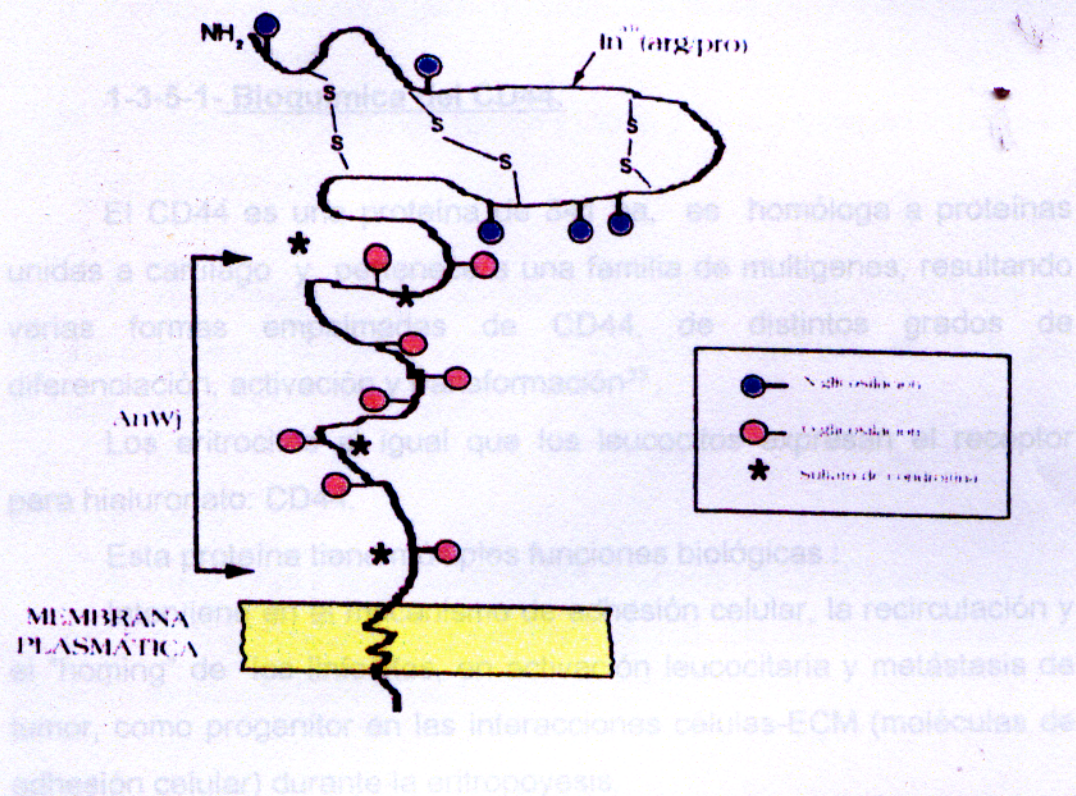


Figura 1-3-1- Representación esquemática del CD44 y la localización de los antígenos In y AnWj. El segmento N-terminal del CD44 contiene al epítipo In que es altamente homólogo a otra proteína unida a cartílago.

1-3-5- Antígenos no Lu afectados por el gen Lu: CD44

La glicoproteína CD44 está ampliamente expresada en muchos tejidos humanos. El CD44 de eritrocito ha sido primeramente descrito en 1983 por Telen y Col., quienes demostraron, que está relacionado a In(Lu)p80. La expresión del CD44 está claramente regulada por el gen In(Lu) ⁵²⁻⁶¹

1-3-5-1- Bioquímica del CD44.

El CD44 es una proteína de 341 aa, es homóloga a proteínas unidas a cartílago y pertenece a una familia de multigenes, resultando varias formas empalmadas de CD44, de distintos grados de diferenciación, activación y transformación⁵⁵.

Los eritrocitos al igual que los leucocitos expresan el receptor para hialuronato: CD44.

Esta proteína tiene múltiples funciones biológicas :

Interviene en el mecanismo de adhesión celular, la recirculación y el "homing" de los linfocitos, en activación leucocitaria y metástasis de tumor, como progenitor en las interacciones células-ECM (moléculas de adhesión celular) durante la eritropoyesis.

La molécula de CD44 es una molécula de adhesión, capaz de unir componentes de la matriz extracelular, hialuronato, fibronectina, heparin sulfato y colágeno tipo I y VI⁵⁸⁻⁶².

Algunos grupos sanguíneos se asocian con la molécula CD44 (Ina, Inb, AnWy.).⁵²⁻⁵⁷ Comprende un dominio intracitoplasmático de 72 aa y uno extracitoplasmático de 248 aa.

El dominio extracelular está dividido en dos partes:

1° parte:

- A. Situada en el extremo N-terminal con 135 aa, análoga a la proteína de unión al cartílago, es una estructura globular mantenida por puentes disulfuro.
- B. Contiene al receptor de hialuronato (38 al 46 aa).
- C. Contiene una segunda región (150 al 162 aa) también importante en la unión con hialuronato.

El polimorfismo de los antígenos de grupos sanguíneos Ina e Inb resulta del cambio pro-arg en posición 46 en el primer sitio de unión con el hialuronato.

2° parte:

Situada junto a la membrana contiene una región rica en ser y treó (sitios de N-glicosilación) y es donde se sitúan las variaciones específicas para la CD44E (epitelial) y la CD44M (forma tumoral).

El antígeno AnWj dependería del dominio cercano a la membrana.

1-3-5-2- AnWj

El antígeno AnWj es también afectado por el gen In(Lu). Este antígeno sirve de receptor del *Haemófilus influenzae* ⁵⁹.

Presenta diferencias con el antígeno In. El AnWj es resistente al clivaje proteolítico, con una variedad de enzimas que inhiben la actividad del antígeno In.

También, las células de cordón expresan los antígenos In, pero no los antígenos AnWj sugiriendo que los antígenos son expresados de manera muy rápida, haciendo que los glóbulos rojos circulantes pasen de An- a An+ en pocos días⁵²⁻⁶⁶. Esto es posible solamente, si el antígeno es "manufacturado" sobre la superficie celular, sobre un sustrato previo, existente en las células en circulación, o puede ser absorbido desde el plasma. Debe aún determinarse, si el antígeno AnWj es expresado solamente por un pequeño subset de moléculas de CD44, o si la expresión del AnWj requiere la coexpresión de una segunda molécula.

1-3-6- Futuras direcciones

Dada la importancia histórica del sistema del Grupo Sanguíneo Lutheran y de sus genes reguladores, debe aún delinearse la función de las proteína Lutheran y el mecanismo de acción de sus genes reguladores.

Hace pocos años las moléculas de adhesión celular (CAM) involucradas en la adhesión eritrocitos-endotelio no estaban bien descritas. Ahora se sabe que el CD44 interviene en este proceso.

Experiencias in vitro demostraban que los eritrocitos de pacientes diabéticos (DBT) presentaban una mayor tendencia a adherirse a células endoteliales de cordón umbilical lo cual estaría relacionado con la severidad de las complicaciones vasculares. Productos finales de glicosilación avanzada (AGE proteínas) interaccionan con el endotelio y perturban la función celular endotelial. La anormal glicosilación de las proteínas de la membrana del GR conduce a la formación de AGE sobre la membrana eritrocitaria, la cual media la interacción con los receptores de AGE (RAGE), presentes en las células endoteliales.

La interacción AGE-cél endotelial da como resultado un aumento de la permeabilidad de la monocapa, representada por la formación de aberturas, lo cual provee una vía de escape de moléculas intravasculares hacia el interior de la pared del vaso⁶⁸.

Bibliografía del capítulo1:

- 1- Brown P. H. Basic red cell membrane structure. In: Biochemistry for Blood Bankers. AABB, Arlington (VA), 1987.
- 2- Smith B. L., Agre P. The erythrocyte membrana akeleton: site of the molecular defects of congenital anemias and the Rh antige, In: Moore SB (ed) Progress in Inmunohematology. AABB, Arlington, 1988.
- 3- Lux S. E: Disorders of red cell membrane In: Nathan D. G., Oski F.A: Hematology of Infancy and Childhood (3° ed) W.B. Saunders Co, 1987.
- 4- Rolih S. Red cell antigen structure in Biochemistry foor Blood Bankers AABB, Arlintton (VA) 1983.
- 5- Darh W. Inmunochemistry of sialoglycoproteins in human red blood cell membranes In: Vengelen-Tyler V., Judd WJ (eds) Recent Advances in Blood Group Biochemistry. AABB Arlington (VA) 1986.
- 6- Fujimagari M, Williamson PL, Schlegel RA. Ca++ dependent membrane-binding proteinsin normal erythrocytes from patients withchronic myelogenous leukemia. Blood 75 (6): 1337-1345, 1990
- 7- Liu SC, Derick LH, Agre P, Palek J. Alteration of the erythrocyte membrane skeletal ultrastructure in hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis Blood 76 (1) 198-205, 1990.
- 8- Conboy JG, Shitamoto R, Parra M., Winardi R, Kabra A, Smith J., Mohandas N., Hereditary elliptocytosis due to both qualitative and quantitative defects in membrane skeletal protein 4.1. Blood 78 (9) : 2438-2443, 1991
- 9- Delfino S. Estructura y función de la membrana eritrocitaria. Rev. Arg. Transf Vol. XIX, N° 1, 5-23, 1993
- 10- Sugiharat T., Sugihara K., Hebbel RP, Phospholipid asymmetry during erythrocyte deformation: maintenance of the unit membrane. Biochem Biophys Acta 1103 (2): 303-306, 1992.
- 11- Fischer T.M., Stohr-Liesen M., Schmid-Schönbein H. The red cells as a fluid droplet: Tank tread like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. science 202. 894-896. 1978
- 12- Schrier S.L., Zachoeski A., Devau P.F. Mechanisms of amphipath - induced stomacytosis in human erythrocytes Blood, 79 (3) 782-786, 1992

- 13- Anstee D.J. Blood Group-active surface molecules of the human red blood cell. *Vox Sang.* 58: 1-20 . 1990
- 14- Chien S. & Sung L. Molecular biology of erythrocyte membrane proteins *Biorheology* 29, 1-4. 1992
- 15- Contreras M. Reducción de los riesgos de la transfusión de sangre periférica *Revista Argentina de Transfusión* Vol. XXL N° 3 1995.
- 16- Ph Rouger, P Y Le Pennec The future of blood groups and other markers in reference laboratories *TBC* 4, 329-334 . 1995.
- 17- Telen M. J. Erythrocyte Blood Groups Antigen Not so simple after all *Blood* 85, N| 2 299-305. 1995
- 18- Lutz P., Dzick WH. Molecular biology of red cells blood group genes. *Transfusion* 32 (5): 467-483. 1992.
- 19- Berk DA., Hochmuth RM., Lateral mobility of integral proteins in red blood cell tethers *Biophys J.* 61 (1): 9-18, 1992.
- 20- Foresto P. Estudios fundamentales de la interacción antígeno-anticuerpo. Desarrollo y modelización in vitro de métodos ópticos e inmunológicos. Tesis doctoral. 1995
- 21- Messmann R., Gannon S. Mechanical properties of sickle cell membranes. *Blood* 75 (8): 1711-1717, 1990.
- 22- Frotkiewski H., Duk M., Syper D., Lis H., Sharon N., Lisowska E. Blood group MN-dependent difference in degree of galactosylation of O-glycans of glycophorin A is restricted to the GalNAc residues located on amino acid residues 2-4 of the glycophorin polypeptide chain . *FEBS Letters* 406 296-300. 1997
- 23- Fox A., Morgan SL., and Gilbert L. Analysis of Carbohydrates by GLC and MS 1990 pp87-117 CRC Press Boston MA. Biermann CJ and McGinnis GD eds.
- 24- Wise GE Identification and funtion of transmembrane glycoproteins. The red cell model . *Tissue Cell* 16:665-676. 1984.
- 25- Burnnes ATH. Glycophorin and sialyated componentents as receptor for viruses, in Lomberg-Holm K and Philipson L. (eds) *Virus Receptors, Part 2 Receptors and Recognition*. London, England, Chapman & Hall 1981 pp63-84.

- 26- Gahmberg CG., Autero M., Hermonen J: Major O-glycosylated sialoglycoproteins of human hematopoietic cells. Differentiation antigens with poorly understood functions *J. Cell Biochem.* 37:91-105. 1988.
- 27- Dahr W. Immunochemistry of sialoglycoproteins in human red blood cell membranes, in Vengelen-tyler V and Judd WJ, (eds) *Recent Advances in Blood Group Biochemistry* Arlington, VA Am Assoc. Blood Bancks, 1986. pp 23-65.
- 28- Kudo S., Fukudaaa M., Identification of a novel human glycophorin, glycophorin E, by isolation of genomic clones and complementary DNA clones utilizing polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 265:1102-1110. 1990.
- 29- Vignal A., Rahuel C., LondonJ., et al A novel gene member of the human glycophorin A and b genen family Molecular cloning and expression. *Eur J. Biochem* 191:619-625 1990.
- 30- Anstee D.J., Blood group MNSs-active sialoglycoproteins of the human erythrocyte membrane, in Sandler SG, Nusbacher J., Schanfield MS (eds) . *Immunology of the Erythrocyte* (vol 43) pp 67-98, Alan R. Liss, New York, NY, Liss, pp 67-98. 1980
- 31- Blanchard D. Human red cell glycophorins. Biochemical and antigenic properties. *Transfus. med Rev.* 4:170-186, 1990
- 32- Cartron J. P. Colin Y., Kudo S et al. Molecular genetics of human erythrocyte sialoglycoproteins, sialoglycophorin A, B, C and D in Harris J.R., (ed) *Blood Cell Biochemistry* (vol 1) new York NY, Plenum. pp 299-335.1991
- 33- Irimura T., Tszy T., Togami K., et al Structure of a Complex-type sugar chain of human glycophorin A. *Biochemistry* 20:560-566. 1981.
- 34- Gardner B., Parsons S. F., Merry A. H., et al. Epitopes on sialoglycoprotein A. Evidence for heterogeniity in the molecule. *immunol.* 68:283-289. 1989.
- 35- Telem M. J., Chasis JA., Relation ship of the human erythrocyte Wrb antigen to an interaction between glycophorin A and band 3 *Blood* 76:842-848. 1990.
- 36- Anstee D. J. The nature and abundance of human red cell surface glycoproteins. *J. Immunogenet* 17:219-225, 1990

- 37- Kudo S., Chagnovich D., Rearden A., et al Molecular analysis of a hybrid gene encoding human glycophorin variant Miltenberger V like molecule . J. Biol. Chem. 265:13825-13829, 1990.
- 38- Vignal A., London J., Rahuel C., et al . Promoter sequence and chromosomal organisation of the genes encoding glycophorins A, B, and E. gene 95:289-293. 1990.
- 39- Telen MJ, Le Van Kim C. Chung A et al . Molecular basis for elliptocytosis associated with glycoprotein C deficiency in the Leach phenotype Blood 78:1603-1606. 1991.
- 40- Cartron JP., Rahuel C. Human erythrocyte glycophorins Protein and gene structure analyses. Transfusion Medicine Reviews vol.VI, N° 2 pp 63-92. 1992.
- 41- Dahr W. Immunochemistry of sialoglycoproteins in human red blood cell membranes. In: Vengelen-Tyler V, Judd W J (eds): Recent Advances in Blood Group Biochemistry. AABB, Arlington (VA), 1986.
- 42- Darnborough J. Dunsford y and J. A Wallace. The En factor. A genetical modifications of human red cells affecting their blood grouping reactions. British society for Haematology Annual General Meeting Sheffield, 1965
- 43- Gahmberg C. G, Myllyla G., Likola J., and Nording S. Absence of the major sialoglycoprotein in the membrane of human En(a-) red blood cells and increased glycosilation of band 3. J. Biol. Chem. 251 6108-6116. 1976
- 44- Mollison PL, Engelfriet CP and Contreras m. The MNSs System. Blood Transfusion in Clinical Medicine 8th edn, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), pp 383-393. 1987.
- 45- Shinozuka T, Miyata N, Kuroda N, Takei S, Kurihara K and Yanagida J. Serological and biochemical studie on En(a-) human red blood cells in a Japanese family Jpn J. Legal Med , 46 , 301-309. 1992
- 46- Tanner MJA, and Anstee DJ . The membrane change in En(a-) human red cells. Absence of the major red blood cell sialoglycoprotein. Biochem. J. 153 , 271-277. 1976
- 47- Nagel RL. Red cell cytoskeletal abnormalities, Implications for malaria. N. Engl J Med 323:1558-1559. 1990

- 48- Nash GB, Parmar J., Reid ME. Effects of deficiencies of glycoporphins C and D on the physical properties of the red cell. *Br J. Haematol* 76:282-287. 1990.
- 49- Furuhielm U., Myllyla G., Nevanlinna HR., et al. The red cell phenotype En(a-) and anti En(a-) serological and phisyochemical aspects. *Vox Sang.* 1969; 17:256-278. 1969.
- 50- Furuhielm U., Myllyla G., Nevanlinna HR., et al A second Finnish En(a-) propositus wuth anti-En(a). *Vox Sang.* 1973. 24:245-249. 1973.
- 51- Krotklenwski H., Duk M., Syper D., Lisowska Z. Blood group MN dependt difference in degree of galactosylation of O-glicans of glycophorin A is restritrd to the Gal-N-Ac resides located on aminoacid residues. *FEBS Letters* 406 , 296-300. 1997.
- 52- Telen M. j.. Lutheran antigen, CD44- related antigen, and Lutheran regulatory genes *TCB1995*, 4:291-301. 1995
- 53- Anstee DJ., Mallinson G., Yendle JE., Holmes C., Tanner MJA. Evidence for the ocurrence of Lu(b) active glycoproteins in human erythrocytes, kidney and liver (Abstrac) *Proc. XXth Congre. Int. Soc. Blood Transfus. Manchester British Blood Transfusion Society* p, 263. 1988
- 54- Tippet P. , Regulator genes affecting red cell antigen. *Trans Med Rev* 4, 56-68.1990.
- 55- Pearsons S.F, Mawby W.J. Anstee D.J. Lutheran blood group glycoprotein is a new member of the immunoglobulin superfamily of proteins *Vox Sang.* (Suppl 2) 67, 1. 1994.
- 56- Cobourn S., Licker JK., Kurtzberg, Telen MJ. Expresion of CD44 isoforms during erythroid differentiation *Clin Res* 42 131 A .1994.
- 57- Spring FA., Dalcav R., Daviels GL., Mallison G., Judson PA., Parsons SF Anstee DJ. The Ina and Inb blood group antigen are located on a glicoprotein of 80.000 MW (The CD44 glycoprotein whose expression is influenced by the In(Lu) gene *Immunology* 64, 37-43. 1988.
- 58- Verfaillie C.M., Benis A., Iida J., Mc Glave P.B, McCarthy J.B. Adhesion of committed human progenitors of synyetic peptides from the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin and cooperation between the integriti alpha e beta and the CD44 adhesion receptor *Blood* 84 1802-1811. 1994.

- 59- Poolee J., van Alphen I. Haemophilus influenzae receptor and the AnWj antigen transfusion 28, 289 (ltr). 1988.
- 60- Underhill C.B., Gren S.J. and Tarone G. The hyaluronate receptor is identical to a glycoprotein of M 850000 (gp85) as shown by monoclonal antibody that interferes with binding activity. J. Biol. Chem. 262: 13142-13146. 1994
- 61- Picher LJ de los Hoyos J., Telen MJ., Haynes BF., Butcher EC. Monoclonal antibodies against CD44 In(Lu) related p80 Pgp-1. and the Hermes class of lymphocyte receptors bind to the same molecule J. immunology 145, 2046-2051. 1989.
- 62- Aruffo A., Stamenkovic y., Melnick M., Underhill CB., Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate Cell 61, 1303-1313. 1990.
- 63- Daniels G. Evidence that the Auberger blood group antigens are located on the Lutheran glycoproteins. Vox Sang. 58, 56-60. 1990.
- 64- Daniels G., Khaild G. Identification, by immunoblotting of the structures carrying Lutheran and para-Lutheran blood group antigens. Vox Sang. 57, 137-141. 1989.
- 65- Daniels G.L., Shaw M.A., Lomas C.G., Leak M.R., Tippet P. The effect of In(Lu) on some high incidence antigens . Transfusion 26. 171-172. 1986.
- 66- Poole J., Giles CM. Observations on the Anton antigen and antibody. Vox sang. 43, 220-222. 1982.
- 67- Udden M.M. New abnormalities in the morphology cell surface receptor and electrolyte metabolism of In(Lu) Blood 69, 52-57. 1987
- 68- Schmidt A.M., Vianna M. Gerlach M., Brett J., Ryan J. and Stern D. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end product from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. The Journal o Biological Chemistry Vol. 267, N°21, pp14987-14997. 1992

CAPÍTULO 2

ADHESION ERITROCITARIA

2- ADHESION ERITROCITARIA

Las interacciones entre células de la sangre ocurren tanto en condiciones normales como en patológicas.

La agregación de GR y Plaquetas (Pq), la adhesión de GR , Pq y leucocitos (L) y la hemaglutinación son ejemplos de interacciones entre células sanguíneas. La agregación eritrocitaria es un parámetro fundamental en la reología sanguínea. Un gran número de parámetros controlan la agregación (shear rate local, propiedades fisicoquímicas del medio de suspensión, hematocrito, propiedades mecánicas de los GR, entre otras). Una excesiva agregación determina la formación de agregados patológicos⁷⁰.

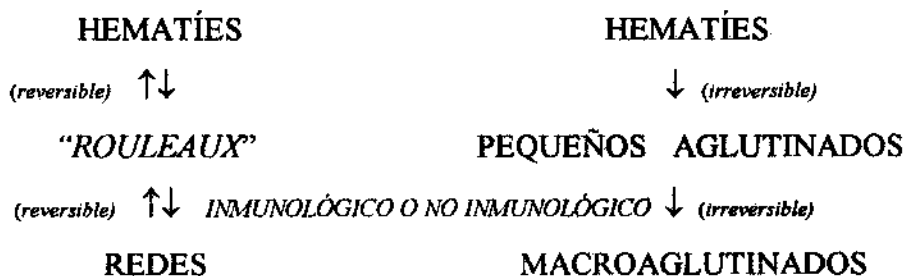
Es importante definir, el término **agregación** y distinguirlo del término **aglutinación**, ya que muchas veces son equivocadamente intercambiados

La **agregación** puede ser definida como la **adhesión intercelular** de característica reversible, en tanto que, la **aglutinación** es la **adhesión intercelular** de característica irreversible. Entre ambas, puede establecerse una diferencia más cuantitativa, relacionándola con la energía disipada durante el proceso de adhesión, que es mayor en el caso de la aglutinación, A. L. Copley⁶⁹.

AGREGACIÓN: adhesión celular reversible.

AGLUTINACION: adhesión celular irreversible.

Esquema 2-1. Agrupamiento intravascular de elementos figurados.



En general los agregados, estructuras normales en individuos sanos, comienzan con la forma de "rouleaux" (apilamiento de discocitos bicóncavos) que, al enlazarse lateralmente, se convierten en redes filamentosas más o menos reticuladas. Este tipo de agregados puede aparecer fisiológicamente, y según Fahraeus, pueden llegar a facilitar el flujo sanguíneo. La formación de "clusters" (agrupamiento de hematíes adheridos desordenadamente, adoptando formas irregulares, esferoidales e irreversibles), pueden ser encontrados en muchas enfermedades. La forma irregular, de los agregados, refleja una anormal interacción célula-célula.

Por el contrario, los aglutinados adoptan formas esferoidales o planas más o menos redondeadas, de tamaños diferentes, según la potencia de la reacción de aglutinación, las cuales se mantienen separadas entre sí.

Es de notar que tanto los agregados como los aglutinados pueden ser formados por vías inmunológicas como no inmunológicas.

La agregación reversible de los GR juega un papel importante en la determinación de las propiedades de circulación de la sangre. Esta agregación se origina por la creación de puentes entre las células adyacentes, por las proteínas plasmáticas específicas (fibrinógeno, globulinas IgG-IgM) absorbidas a la superficie celular, pero también pueden ser inducidas por macromoléculas como el Dextran.⁷⁰ En la figura 2-1 se representa el modelo de agregación de GR por la formación de puentes entre los eritrocitos.

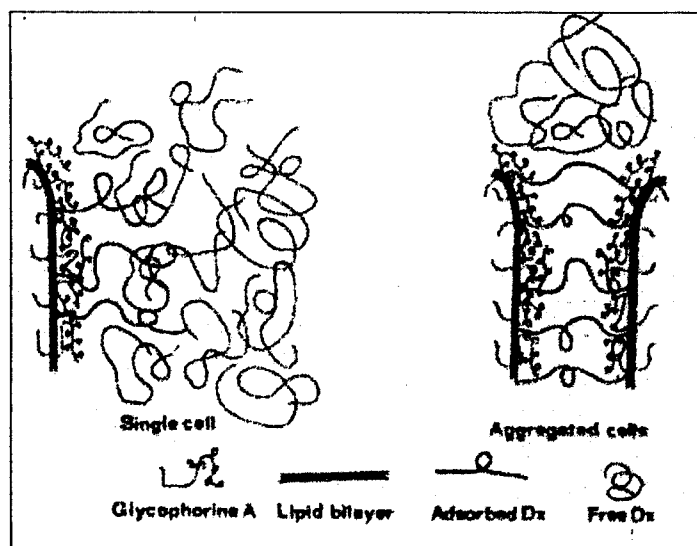


Figura 2-1- . Modelo de agregación de GR. Las macromoléculas fibrinógeno o Dextrán están adsorbidas sobre la membrana eritrocitaria y forman puentes entre las células adheridas.⁷²

La agregación de los GR es un proceso dinámico y representa por esa razón un equilibrio entre:

- ✓ **las fuerzas de agregación**, (siendo de gran importancia las fuerzas de atracción de Van der Waals) debido a la adsorción de macromoléculas y la creación de puentes entre los eritrocitos, y
- ✓ **las fuerzas de desagregación**, (por ej., fuerzas de cisallamiento mecánico, repulsión electrostática entre la superficie de células adyacentes, debidas a las cargas superficiales de la membrana eritrocitaria, la tensión superficial y la resistencia de las células a la deformación durante la formación de los agregados.

La agregación eritrocitaria puede ser considerada como un estado de equilibrio, entre la interacción de una energía adhesiva superficial y la energía elástica almacenada por la deformación celular.

La energía adhesiva superficial específica equivale al trabajo requerido para separar una unidad de área adherida desde una posición de equilibrio. Es la resultante de fuerzas de adhesión, debida a moléculas de anclaje entre células adyacentes y a las fuerzas de Van der Waals, y de las fuerzas repulsivas electrostáticas, consecuencia de las cargas superficiales de la membrana.

El proceso de agregación depende de las propiedades de los hematíes, así también de las propiedades del medio externo. Es previsible que la interacción célula-célula sea influenciada por modificaciones de las propiedades reológicas celulares (sea superficie celular, volumen y forma de la célula, viscosidad interna y viscoelasticidad de la membrana)

La agregación de GR ocurre cuando las fuerzas de agregación superan a las de desagregación. Las interacciones que ocurren entre GR, originando agregados, son características a bajas velocidades de corte.

Los factores esenciales para la agregación son:

- **Propiedades reológicas de los GR:** cantidad de células, deformabilidad, morfología, hematocrito.
- **Propiedades de las macromoléculas que determinan puentes entre células adyacentes:** PM, conformación, carga.
- **Carga superficial eritrocitaria.**
- **Propiedades del medio de suspensión:** pH, T°, osmoralidad, fuerza iónica.

Los estudios concernientes a la agregación de los hematíes han sido focalizados en la influencia del medio de suspensión y del rol que juegan las propiedades celulares y principalmente las propiedades reológicas eritrocitarias.

La propiedad de deformarse que tienen los eritrocitos, combinada con la rotación de la membrana alrededor del citoplasma (movimiento de oruga de tanque- "*tank-treading motion*")⁷¹⁻⁷²⁻⁷³, le confieren al hematíe la capacidad de participar activamente en el flujo vascular.

La agregación juega un importante papel en el fluido de la sangre, particularmente en el sistema microvascular y refleja un delicado balance entre las fuerzas de adhesión celular y el efecto de dispersión de la fuerza de corte externa dada por el flujo sanguíneo.

La perfusión tisular es realizada por el pasaje de GR individuales a través del sistema capilar. Así una falla de dispersión sobre agregados de GR resulta en la obstrucción de capilares o microvasos, dependiendo del tamaño y forma del agregado. Se ha encontrado que la agregación eritrocitaria está alterada en varios estados patológicos: diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares degenerativas (infarto de miocardio, arteriopatías, insuficiencia vascular cerebral, etc.) y en accidentes tromboembólicos arteriales o venosos.

En el mecanismo de agregación⁷⁴, como ya se mencionó anteriormente, el fibrinógeno tiene un rol determinante en la cohesión y en la estructura de los "*rouleaux*", ya que actúa como molécula de unión entre los eritrocitos. Un papel similar, aunque en menor grado, desempeñan las globulinas plasmáticas, mientras que la albúmina ejerce un efecto contrario.

Bibliografía del capítulo 2:

- 69- Copley A. L. On red blood cell filterability, presentado en 1958 por Robin Farhraeus, su controversia respecto al "*blood sludge*" y el concepto de Copley sobre "*Blood cellular clumpin*". Clinical Hemorheology. 1. pp219. 1981.
- 70- Stoltz J. F., Game L. Rasia R., Valverde J. Red blood cell aggregation and hemorheology: an overview. Russian Journal of Bioqmechanics, N° 1 43-53, 1997.
- 71- Maeda N., Kon. Imaizumi K., and Shiga T. Alteration of rheological properties of human erythrocytes by crosslinking of membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta 776: 151-158. 1984
- 72- Chien S.; L. Sung: Molecular basis of red cell membrane rheology. Biorheology 27, 327-337. 1989.
- 73- Brooks, D.; Greig, R.; and Janzan J., Mechanisms of erythrocyte aggregation. Erythrocyte mechanics and blood flow, pp. 119-140, 1980.
- 74- Maeda N., Seike M., Kume S. Takaku T. and Shiga T. Fibrinogen-induced erythrocyte aggregation. erythrocyt-binding site in the fibrinogen molecule. Biochim. Biophys. Acta 904: 81-91. 1987

PARTE SEGUNDA

Objetivo:

Estudiar las alteraciones de propiedades superficiales eritrocitarias y su incidencia en la agregación y la adhesión.

CAPÍTULO 1

MEMBRANA Y CARGA ERITROCITARIA.

La membrana y su potencial electrocinético.

1- MEMBRANA Y CARGA ERITROCITARIA.

La membrana y su potencial electrocinético

1-1- NOCIONES GENERALES CONCERNIENTES A LA CARGA SUPERFICIAL.

Una suspensión de GR en medio fisiológico constituye un estado estable o metaestable que se puede esquematizar como la resultante de la acción de dos tipos de fuerzas opuestas: las fuerzas de cohesión que tienden a atraer las partículas y las fuerzas de repulsión que tienden a separarlas ⁷⁵⁻⁷⁸.

Estudios de migración electroforética, demuestran que los GR, se comportan como partículas cargadas eléctricamente, con características aniónicas. El origen de esta carga está ligado principalmente a la presencia en la superficie de grupos carboxílicos de los AS unidos a las glicoproteínas de membrana ⁸¹. Todos los hematíes son portadores de la misma carga, lo que genera en suspensión salina una fuerte repulsión interglobular. El origen de las fuerzas de repulsión de las partículas en un medio líquido de suspensión, en un medio líquido, es bien conocido.

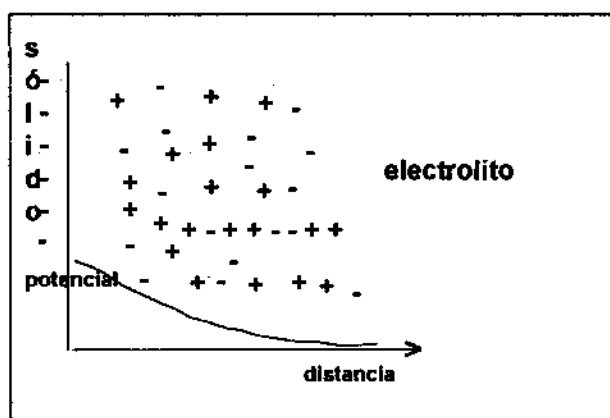
En tal sistema, a nivel de la interface sólido-líquido, existe una fase de contacto caracterizada por la presencia de moléculas ionizadas en la que los efectos son modulados por movimientos brownianos. Una de las primeras representaciones teóricas de la doble capa iónica fue propuesta por Gouy-Chapman⁷⁶.

Otro modelo, propuesto por Stern⁷⁵, permite explicar el papel que juegan los iones. Los iones se distribuyen en dos regiones que rodean al eritrocito, llamadas por eso, doble capa eléctrica:

- ✓ capa compacta constituida por iones absorbidos específicamente.
- ✓ capa difusa.

La frontera externa de la capa compacta de Stern constituye la superficie de cizallamiento.

Una suspensión de hematíes en medio fisiológico, constituye un estado estable o metaestable⁷⁶. En presencia de electrolitos, cada glóbulo rojo es rodeado por una nube de iones positivos. A nivel de las interfaces sólido-líquido, se forman dos capas de contraiones (doble capa iónica) rodeando la partícula, una que se mueve solidariamente con ella, denominada capa de Stern, y otra más difusa cuya densidad disminuye hacia el seno de la solución⁷⁹.

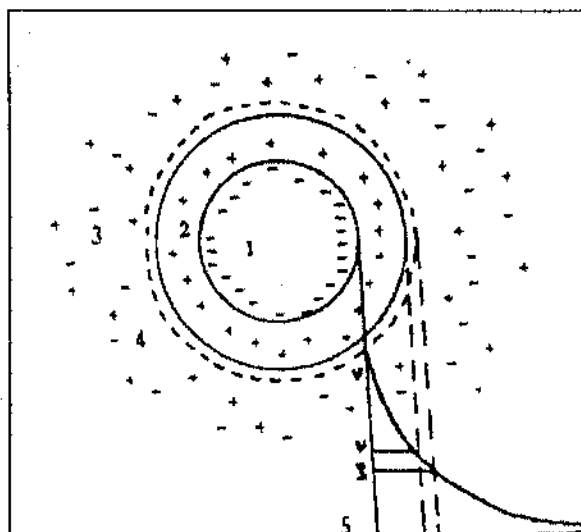


Esquema 1-1-1. Doble capa de contraiones alrededor de la partícula cargada.(Gouy-Chapman)

Se crea entonces una diferencia de potencial entre el medio y la nube de contraiones que rodea al eritrocito denominado potencial Zeta (ζ), como se representa en el Esquema 1-1-2. ^{78-80.}

Pollak⁷⁷ ha desarrollado una fórmula del ζ haciendo intervenir la densidad de carga superficial del hematíe (σ), la fuerza iónica del medio (μ), el radio de curvatura del contraíón (α) y la constante dieléctrica del medio (D), según la siguiente ecuación:

$$\zeta = \frac{4.44 \cdot 10^{-8} \cdot \sigma}{\sqrt{D \cdot \mu}} + \frac{12.59 \cdot \sigma \cdot a}{D} \quad (\text{Ecuac.1-1})$$



1-célula, 2-capa de Stern, 3-superficie de cizallamiento, 4-segunda capa iónica, 5-curva de potencial eléctrico en función de la distancia.

1-1-2. Representación esquemática del potencial Zeta. Distribución de iones alrededor de la célula.

Los fenómenos de superficie que intervienen en la estabilidad de las suspensiones son particularmente importantes en la formación de *rouleaux*⁸².

- **Nociones generales para la estabilidad de una suspensión de partículas**

La estabilidad de una suspensión eritrocitaria se atribuye a dos fuerzas antagónicas.

- ✓ ***Las fuerzas de atracción:***

Su intensidad varía con la inversa de la distancia entre las partículas. Se deben a fuerzas de Van der Waals.

- ✓ ***Las fuerzas de repulsión:***

Son exclusivamente electrostáticas. Varían con la inversa de la distancia intermolecular. Los hematíes están cargados electronegativamente. Esta carga se ubica principalmente, a nivel de los grupos carboxílicos (COO^-) del ácido siálico, que forman parte de las sialoglicoproteínas de la membrana eritrocitaria.

La agregación de los eritrocitos es un evento esencial para la comprensión de las propiedades reológicas de la sangre⁸⁰⁻⁸¹. En el estudio general del fenómeno de agregación, el factor fundamental que debe ser considerado es, sin duda, la distancia media que separa las partículas en suspensión. Esta distancia puede ser modificada en diversas circunstancias, a veces por procesos inmunológicos y otras veces, por alteraciones de naturaleza puramente fisicoquímica. La suma de estos acontecimientos es lo que determinaría la formación de los agregados.

Una suspensión estable de eritrocitos es la suma de dos fuerzas antagónicas, como se mencionó anteriormente, las fuerzas de repulsión ligadas a la carga electrostática del GR y las fuerzas de cohesión ligadas a la tensión superficial entre los eritrocitos.

La agregación, que es reversible, requiere para producirse, la presencia de factores extracelulares e intracelulares. Una modificación en cualquiera de estos factores lleva a una modificación del ζ y en consecuencia un cambio en el patrón de agregación.

La agregabilidad de un sistema es tanto más probable cuanto más débil sea el potencial ζ . Este potencial puede disminuir en 3 circunstancias expresadas por la ecuación de Pollack (Ecuac.1-1):

- ✓ Si la carga del hematíe disminuye (σ).
- ✓ Si la constante dieléctrica del sistema aumenta (D).
- ✓ Si la fuerza iónica del medio aumenta (μ).

Desde un punto de vista netamente teórico, habría dos maneras de modificar el ζ de un sistema ^{81-82.} :

1. **Reducción de la carga eléctrica.** Se ordenan en esta categoría los efectos debidos a la fijación de anticuerpos o al tratamiento de los hematíes por las enzimas proteolíticas.
2. **Variación de la fuerza iónica del medio de reacción.** Estos efectos se basan sobre todo en la modificación de la composición iónica del medio.

3. **Modificación de la constante dieléctrica del medio de suspensión**, la que puede introducirse por modificación del contenido de macromoléculas.

Basado en estos argumentos es posible modelizar las reacciones de agregación y modificarlas artificialmente.

1-2. PAPEL DE LA CARGA SUPERFICIAL

En la última década, la reología eritrocitaria como factor dominante del flujo intra y extravascular se ha constituido en un tema angular de la inmunohematología y la hemodinamia. Numerosos procesos biológicos caen bajo la influencia de modificaciones de las propiedades reológicas. En el curso de los últimos años se ha investigado el papel que juegan los factores reológicos en la comprensión de mecanismos biológicos y clínicos.

Si bien, los hematíes han sido considerados células inertes, portadoras de hemoglobina, estudios actuales sugieren que numerosas moléculas de superficie, tienen participación activa en una variedad de procesos fisiológicos (agregación, interacción célula-célula, intercambio gaseoso y metabólico). Las GP, por su AS terminal aseguran la carga eléctrica del GR y lo mantienen monodisperso. El AS aporta cargas negativas a la célula y es responsable de las fuerzas electrostáticas de repulsión que se establece entre los hematíes, es decir, reduce la agregación eritrocitaria. En los hematíes normales esta carga negativa es de 10^4 unidades electrostáticas(u.e.s) / cm^2 y el ζ es de aproximadamente 23 mV. Si el ζ desciende por debajo de 7 mV, las células se agregan en forma casi irreversible. Además, por repulsión electrostática, estas cargas negativas, favorecen la distribución uniforme de las proteínas del glucocálix sobre la superficie de la membrana, manteniendo la equidistancia entre ellas⁹⁰.

De esto se deduce que un menor contenido de AS entraña una perturbación en las propiedades reológicas de la membrana y una mayor y más desordenada agregación. En efecto, se ha observado en patologías con déficit de AS de membrana, que la agregación eritrocitaria es más fuerte y aparecen grandes agregados esferoidales y desordenados.

Los GR normales en flujo lento ó en estasis forman *rouleaux*, mientras los eritrocitos anormales, forman agregados amorfos⁹⁰. Este último tipo de estructura refleja una anormal interacción célula-célula. Tales anomalías son inducidas por: factores celulares (disminución del AS de la membrana), o factores extracelulares (inmunoglobulinas, fibrinógeno, y el medio extracelular).

La disminución de la carga neta superficial, al favorecer la agregación celular que en condiciones normales es reversible, juega un papel importante en el flujo sanguíneo.

Por otra parte, la interacción de células endoteliales con Pq, L, y más recientemente GR son actualmente reconocidos como importantes eventos fisiológicos en la microcirculación. La unión del GR al endotelio puede ser aumentada por cambios endoteliales inducidos por la isquemia, por lo tanto la interacción de endotelio-eritrocito es un mecanismo potencial que podría propagar la injuria isquémica en la microcirculación por la obstrucción de vasos pequeños o promoviendo la formación de trombos en las arterias coronarias, en áreas de baja turbulencia o endotelios dañados⁹¹⁻⁹².

Los eritrocitos en su paso por la microcirculación, se ven sometidos normalmente a un importante efecto mecánico que en ciertas condiciones patológicas puede producir su rotura. Nuestro interés está dirigido hacia las vasculopatías, especialmente las microangiopatías (diabetes), donde la fuerza de cizallamiento ejercida por una presión sanguínea aumentada sobre los hematíes próximos al endotelio vascular produce lesiones en la membrana eritrocitaria.

1-3- PRINCIPALES TÉCNICAS PARA ESTUDIAR LAS VARIACIONES DE CARGA SUPERFICIAL ERITROCITARIA. ^{84-85-86-87-88-89.} ;

- Movilidad por electroforesis en fase líquida.
- Movilidad por velocimetría óptica.
- Movilidad por velocimetría por efecto Laser-Doppler.
- Reparto en un sistema acuoso bifásico.

De todas estas técnicas trataremos, en lo que sigue, sólo la última puesto que fue la utilizada en esta tesis.

1-4-MODELIZACIÓN IN VITRO DE ALTERACIONES DE CARGA SUPERFICIAL:

1-4-1- TRATAMIENTO ENZIMÁTICO. ^{93-96-97.}

Este tratamiento tiene por objeto provocar una modificación de membrana a través de desialización. Las enzimas proteolíticas (Bromelina, Tripsina y Neuraminidasa) remueven el AS de la membrana llevando a una reducción de la carga neta superficial disminuyendo la repulsión intercelular y favoreciendo la formación de agregados celulares. Esto dependerá de la capacidad hidrolítica de cada una de ellas. Estas enzimas proteolíticas, pueden ser de origen plasmático, pancreático o granulocitario.

1-4-1-1- Neuraminidasa

La neuraminidasa es la enzima más comúnmente usada pues remueve el 80% de la carga negativa de la membrana. Ataca el AS de

las porciones proteínoglicanos del glicocálix. La neuraminidasa es específica para el NeuAc.

1-4-1-2- Tripsina - Bromelina

Estas enzimas hidrolizan uniones en proteínas y péptidos que tienen grupos carboxilo de Lisina o Argirina asociados a amidas y ésteres y así remueven porciones de proteínas del glicocálix, y por lo tanto parte de la carga electronegativa del GR. Afectan el tamaño celular y la deformabilidad, llevando a una reducción de la repulsión celular.

Al remover partes del glucocálix también reducen los efectos estéricos y remueven algunos sitios de adhesión de moléculas agregantes (polímeros de alto peso molecular).

1-4-2- ACCION DE FIJACION DE ANTICUERPOS:⁹⁴

Trabajos previos basados en el estudio de la formación de *rouleaux* se concentraron en la investigación de la influencia de los factores extrínsecos, tales como proteínas plasmáticas (fibrinógeno e inmunoglobulinas) y otras macromoléculas (Dx, Polivinil pirrolidona, etc.).

La unión de anticuerpos entraña una modificación de los componentes estructurales de la membrana (glicocálix, bicapa lipídica, proteínas transmembranales). Estas modificaciones varían según el anticuerpo implicado y el nivel de localización de las determinantes antigénicas.

Los antígenos M y N resultan de interés por su localización sobre la GPA asociada con la carga eléctrica superficial eritrocitaria (CESE).

1-4-3- ACCION DE LECTINAS⁹⁵

Las lectinas, son extractos de origen animal, vegetal o microbiológico, que presentan sitios de unión a carbohidratos de

membrana selectivos y reversibles. El uso de distintas lectinas vegetales (*Ulex europaeus*, *Dolichus biflorus*, *Amarantus sp.*) permitirá provocar modificaciones puntuales en la membrana eritrocitaria que pueden ó no estar relacionadas con la carga eléctrica de membrana.

Bibliografía del capítulo 1:

- 75- Stoltz J. F., Streif F., Larcan A. Effects électrocinétiques dans la suspension sanguine. 1ère partie: aspects théoriques élémentaires Rev. Franc. Transf., 12, 409. 1969
- 76- Ruhenstroth-Bauer G., The electric charge of blood cells in: Biophysical mechanisms in vascular homeostasis and intravascular thrombosis De. by PN Nawyer Meredith Publ. CO, New York, 42. 1965
- 77- Pollack W., Hager M. J., Recker R. A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. Tranfusion 5, 158-163. 1965
- 78- Larcan A., Stolf J. F., Streiff F. La charge électrique des éléments figurés du sang Doin De 1 vol pp 170. 1974
- 79- Gramhame D. C. The electrical double layer and the theory of electrocapilarity Chem. Rev. , 41, 441. 1947.
- 80- Stratton F., Rawlison U. I. The rol of zeta potential Vox Sang 24, 273-278. 1973
- 81- Chien S., Sung L. A. Bases physico-chimiques et implications cliniques de l'agrégaion des globules rouges. In: Hemorheologie et agregation érythrocytaire 1° Symposium International Lavoisier De. pp 176. 1986
- 82- Van Oss C. J., Mohn J. F. , Cunningham R. K. Influence of varius physicochemical factors on hemagglutination Vox Sang 34,351-357.1978
- 83- Chien S., Jan K. M. Ultrastructure basis of the mechanism of rouleaux formation Microvas. Res., 5, 155. 1973
- 84- Streichman S., segal E., Tatarky y., Marmur A. Movin Boundary electrophoresis and sialic acidcontent of normal and polycythaemic red blood cells. Britsh Journal of Haematology 48, 273-279. 1981
- 85- Robbins JC & Nicholosos GL Surface of normal and transformed cells. Cancer (ed. by FF Becker) Vol 4, pp 3-54. Plenun Press. New York.1975
- 86- Tisosn RP. Accurate electrophoresis analysis of concentrated suspensions (electrophoresis of concentrates) Journal of Colloid and Interface Science, 60, 519-528.1977.

- 87- Fairbanks G., Steck TL., & Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane *Biochemistry*, 10, 2606-2617. 1971
- 88- Vaugier G. L'électrophorese des cellules sanguines IMMESE , p1567. 1970.
- 89- Malher E., Duvivier C., Stoltz JF Les techniques d'électrophorese de cellules en suspension: revue générale. *Innov. Tech. Biol. Med.*, 1, 50. 1980
- 90- Rasia R. J. Reología eritrocitaria estudio en pacientes diabéticos. Diabetes, hemorreología y microcirculación. Bregni C., Salama Benarroch y., Rubinstein de Salama S. (Ed. Arkadia) Cap. 4 pp 69-77. 1996.
- 91- Demiroglu H. The importance of erythrocyte aggregation in blood rheology: considerations on the pathophysiology of trombotic disorders *Blood Vol* 89, N° 11 . pp 4236-4242. 1997.
- 92- Demiroglu H Erythrocyte aggregability in patients with coronary heart disease. *Clin Haemorheol.* 16: 313; 1996.
- 93- Landaw S.A., Tenforde T. & Schooley J.C. Decreased surface charge and accelerated senescence of red cells following neuraminidase treatment *Journal of Lab. and clinical Med.* 89, 581-591. 1977.
- 94- Anstee D.J. The blood group MNSs active sialoglycoproteins. *Sem Hematol.* 18:13-31. 1981
- 95- Crocker P.R., Clark E.A., Le Douarin N. Siglecs a family of sialic acid binding lectins. *Glycobiology*, Feb, 8:2, v . 1998.
- 96- Kelm S., Schauer R. Sialic acid in molecular and cellular interactions *Rev. Cytol* 175, 137-240. 1997.
- 97- Ertan N. Z., Rampling M.W., Pearson M.J. Time dependent effects of trypsin treatment of human red cells. *Clinical Hemorhology.* Vol 13, N° 4. pp 473-479. 1993

CAPÍTULO 2

**ESTUDIO DE LA CARGA ELECTRICA SUPERFICIAL
ERITROCITARIA UTILIZANDO COMO HERRAMIENTA LA
PARTICIÓN EN SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS.**

2-1 ESTUDIO DE LA CARGA ELECTRICA SUPERFICIAL ERITROCITARIA UTILIZANDO COMO HERRAMIENTA EL REPARTO EN SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS.

2-1-1- Características de los sistemas bifásicos acuosos

Un método de separación versátil y sensible, es el basado en el reparto de macromoléculas y partículas biológicas, en sistemas bifásicos líquido- líquido, obtenidos a partir de disoluciones acuosas de diferentes polímeros. Esta técnica fue introducida a mediados de los años 50 por Albertsson⁹⁸⁻⁹⁹. Su descubrimiento fue casual, al mezclar un polímero sintético como el polietilenglicol con una solución concentrada de fosfato de sodio, ambos solutos, que son altamente solubles en medio acuoso, al ser mezclados, producían un medio turbio y, después de unos minutos, se formaban dos fases totalmente homogéneas. Se aplicó a la separación de células y proteínas. Desde entonces se ha extendido a un gran número de materiales diferentes: células animales y vegetales, microorganismos, virus, cloroplastos, mitocondrias, vesículas de membrana, proteínas, ácidos nucleicos, etc¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁻¹⁰⁸⁻¹⁰⁹.

La tabla 2-1 muestra los polímeros más frecuentemente empleados en los sistemas bifásicos acuosos. Si bien los sistemas más utilizados son los de polietilenglicol-dextrano y polietilenglicol-sal, pueden emplearse otros sistemas no tradicionales. En ellos el polietilenglicol es reemplazado por polivinilalcohol o polivinilpirrolidona y el dextrano por dextrina, maltodextrina, hidroxipropilalmidón y etilhidroxietilcelulosa. Todos estos polímeros son menos costosos, lo que los hace potencialmente útiles para operaciones a gran escala.

A- Sistemas formados por:	
Polímero no iónico (Componente 1)	Polímero no iónico - agua (Componente 2)
Polipropilenglicol	Metoxipolietilenglicol Polietilenglicol Polivinilalcohol Dextrano
Polietilenglicol	Polivinilalcohol Polivinilpirrolidona Dextrano Ficoll
Metilcelulosa	Hidroxipropildextrano Dextrano
Ficoll	Dextrano
B- Sistemas formados por:	
Polielectrolito (Componente 1)	Polímero no iónico - agua (Componente 2)
Dextrán sulfato de sodio	Polipropilenglicol Polietilenglicol NaCl Metilcelulosa NaCl Dextrano NaCl
Dietilaminoetil dextran HCl	Polipropilenglicol NaCl Polietilenglicol Li_2SO_4 Metilcelulosa
Carboximetildextran de sodio	Hidroxipropildextran NaCl Polietilenglicol NaCl
Carboximetilcelulosa de sodio	Polietilenglicol NaCl Metilcelulosa NaCl
C- Sistemas formados por:	
Polielectrolito (Componente 1)	Polielectrolito - agua (Componente 2)
Dextran sulfato de sodio	Carboximetildextran de sodio Carboximetilcelulosa de sodio
Carboximetildextran de sodio	Carboximetilcelulosa de sodio
D- Sistemas formados por:	
Polímero (Componente 1)	Componente de bajo peso molecular - agua (Componente 2)
Polipropilenglicol	Fosfato de potasio Glicerol
Polietilenglicol	Sales inorgánicas tales como: $\text{K}^+(\text{Na}^+, \text{Li}^+, \text{NH}_4^+, \text{etc})\text{PO}_4^{3-}, \text{SO}_4^{2-}$, Glucosa, Maltosa, Celobiosa, etc
Dextrano	Alcohol Propílico

Tabla 2-1

La partición de cualquier material, en un sistema bifásico, está determinado principalmente por las propiedades de los polímeros presentes. Las interacciones físico-químicas, entre los polímeros, con las sales o con el solvente, determinan el equilibrio de distribución de todos los componentes del sistema. Estas distribuciones determinan el volumen de las fases, la tensión interfacial y la diferencia de potencial electrostático entre las fases.

2-1-2- Diagrama de fase

La composición de los sistemas bifásicos se puede representar sobre un diagrama binodial como se muestra en la Figura 2-1-2. Las cantidades requeridas de los polímeros para formar sistemas bifásicos acuosos pueden ser encontradas en los diagramas de fase pertinentes; tomando por ejemplo el correspondiente al sistema polietilenglicol-dextrano. A concentraciones por debajo de la *curva binodial* se obtiene una solución homogénea y a concentraciones por encima de la *curva binodial* ocurre la separación de fase. El punto A representa la concentración total inicial del sistema bifásico (porcentaje de la masa de dextrano o polietilenglicol respecto de la masa total de la mezcla). Las concentraciones de equilibrio de ambos polímeros en la fase superior, rica en polietilenglicol e inferior, rica en dextrano, están dadas por los puntos C y B respectivamente. De igual manera, un sistema con composición total inicial A' tendrá en el equilibrio, una composición C' en la fase superior y B' en la inferior, y así sucesivamente ocurrirá con los sistemas A'', A''', Aⁿ.

El conjunto de puntos C, C', C'', C''', ..., Cⁿ y B, B', B'', B''', ..., Bⁿ que representan las concentraciones de las fases de cada sistema en el equilibrio, pertenecen y delimitan a la *curva binodial*. Un par de puntos tales como B y C se llaman *nodos* y las líneas entre ambos, *líneas de unión*. Se debe notar particularmente que las mezclas de diferentes composiciones iniciales totales, representadas por diferentes puntos

sobre una *línea de unión*, dan origen a sistemas bifásicos con composiciones idénticas en concentración de polímero en ambas fases en el equilibrio, si se mantienen las condiciones experimentales constantes (presión, temperatura, buffer, sales neutras, etc.) aunque con diferentes volúmenes de las fases coexistentes.

Esto es lógico, ya que desde el punto de vista termodinámico son equilibrios que partiendo de diferentes condiciones iniciales llegan al mismo estado final de equilibrio. A medida que la concentración inicial del sistema disminuye, por ej. en la dirección A, A', A'', ..., Aⁿ o D, D', D'', D''', ..., Dⁿ, las concentraciones de las fases en equilibrio se hacen cada vez menores, y similares entre sí, llegándose al *punto crítico* (Aⁿ o Dⁿ), que corresponde al caso teórico en el cual la composición y volúmenes de ambas fases en equilibrio son iguales. El *punto crítico* es una característica particular para cada sistema bifásico. Otra característica importante de los diagramas de fase es el llamado *punto umbral*, el cual se define como aquel donde la línea recta que corta a los ejes en segmentos iguales, es tangencial a la curva binodial. Cuando los *puntos umbral* y *crítico* coinciden, se dice que el diagrama es simétrico. Este es el caso en que no hay interacciones importantes entre los polímeros y el solvente comportándose las soluciones como ideales¹⁰⁰.

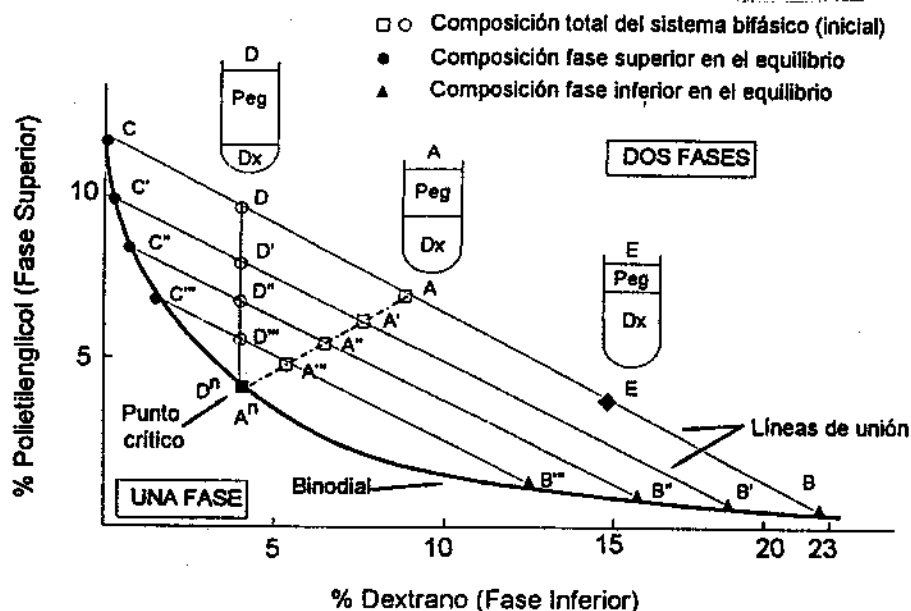


Figura 2-1-2. Diagrama de fase

Cabe destacar que se hace necesario un buen conocimiento del diagrama binodial de un sistema bifásico ya que esto permite elegir las proporciones iniciales de los polímeros y buffer a ser mezclados y por lo tanto la de polímero en ambas fases, luego de alcanzado el equilibrio¹⁰¹.

2-1-3- Propiedades de los sistemas de reparto bifásicos acuosos

El mecanismo de reparto es desconocido. Cualitativamente, se puede describir como una compleja interacción entre la partícula suspendida en una de las fases y las moléculas que hay a su alrededor. Esto implica, principalmente, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, y efectos estéricos. Por tanto, es de esperar que el reparto dependa del peso molecular y propiedades químicas de los polímeros que forman las fases, y también del tamaño y de las propiedades químicas de las sustancias o partículas sometidas a reparto. Así, el reparto viene determinado por el tamaño, hidrofobicidad, carga de superficie y, probablemente también, por la conformación de la partícula o macromolécula, que a su vez dependen del tipo y número de grupos expuestos. Por lo tanto, *el reparto es un fenómeno dependiente de las propiedades de superficie*.¹⁰¹.

Las propiedades¹⁰²⁻¹¹³ de los sistemas bifásicos acuosos dependen:

✓ ***Tipo y peso molecular de los polímeros.***

Se necesita una mayor concentración de polímeros, para conseguir la separación de las fases, cuando es menor el peso molecular y viceversa, menor concentración cuando éste aumenta.

✓ ***Presencia de sales neutras.***

Diferencia de potencial electrostático entre las fases.

En ausencia de moléculas cargadas, cuando las dos fases de un sistema están en equilibrio, el potencial químico de cualquier componente es el mismo en ambas fases.

Cuando se someten a reparto partículas o macromoléculas con carga eléctrica neta, en sistemas bifásicos que contienen además otros iones, se puede crear un potencial eléctrico entre las fases, como consecuencia de la diferente afinidad de los distintos iones por las fases del sistema (efecto Donnan).

Una sal cuyo dos iones tengan distinta afinidad química por las dos fases, generará una mayor diferencia de potencial eléctrico entre las fases, que una sal cuyos iones tengan afinidad similar por ambas fases.

A partir de los datos sobre reparto de sales, realizados por Johansson¹⁰⁹⁻¹¹⁰, se dedujo que la diferencia de potencial eléctrico entre las fases, creada por una sal de las comunmente añadidas a los sistemas bifásicos, sería del orden de unos pocos milivoltios(mV). Ello ha sido confirmado experimentalmente por otros autores¹⁰⁷⁻¹¹¹⁻¹¹².

Aunque una diferencia de potencial eléctrico de tal magnitud, se podría considerar pequeña, puede tener una profunda influencia en el reparto de macromoléculas cargadas¹⁰⁵.

La consecuencia más importante de las diferencias de afinidad de las sales por las dos fases, en sistemas de Dextrano/Polietilenglicol, es que se crea una diferencia de potencial electrostático entre las fases, quedando la fase inferior, rica en Dextrano, cargada negativamente respecto de la superior, rica en Polietilenglicol. Cuando las sales tienen igual afinidad por las dos fases (por ejemplo cloruro de sodio), la diferencia de potencial eléctrico es prácticamente 0mV. En general las sales de polianiones como fosfato, presentan en sistemas Polietilenglicol / Dextrano mayor preferencia por Dextrano.

Si se añaden fosfato y cloruro de sodio en diferentes proporciones a los sistemas, se obtienen, para el caso de un sistema bifásico compuesto por 5% Dextrano (T-500) / 4% Polietilenglicol-8000,

diferencias de potencial eléctrico (fase superior positiva) que oscilan desde unos pocos mV (entre 2.8 mV y 1.07 mV) para 0.11 M fosfato; es decir, presencia exclusiva de fosfato, hasta 0mV, para 0.01M fosfato, es decir, únicamente con cloruro de sodio.¹⁰⁴⁻¹¹⁰⁻¹¹²⁻¹¹³

✓ **Temperatura:**

El efecto de la temperatura es indirecto, ya que se ejerce a través de su influencia sobre la composición del sistema. Cerca del punto crítico, una pequeña variación de temperatura puede afectar, en forma considerable, la concentración de polímeros en las fases y, por lo tanto, también el reparto de cualquier sustancia. Dicho efecto es menor en sistemas alejados al punto crítico.

Concretamente, los sistemas Dextrano/Polietilenglicol forman bifases, más fácilmente, a bajas que a altas temperaturas, pudiéndose utilizar éstos en un amplio rango de temperaturas, desde 0°C hasta por lo menos 100°C. El aumento de la temperatura destruye el agua ordenada en el entorno de la molécula de polímero, aumentando la solubilidad mutua entre estos.

✓ **Tiempo de separación de las fases.**

Es el tiempo requerido, después de la agitación inicial del sistema, para la formación de dos fases nítidamente separadas por una interfase. En el caso particular de los eritrocitos, que se reparten entre fase superior e interfase, la técnica de microscopía de contraste de fases, ha revelado que la mayoría de las células se encuentran adsorbidas a la superficie externa de las gotitas de Dextrano, que persisten en la fase rica en Polietilenglicol algún tiempo después de la aparición de la interfase horizontal, entre las dos fases. Aunque al principio, la razón de reparto sea alta, con el tiempo disminuye hasta llegar a hacerse prácticamente cero, cuando todas las células llegan,

finalmente, a la interfase horizontal. Ello se debe a que los complejos, células-gotitas de Dextrano, van sedimentando hasta llegar a fusionarse con la interfase. En ese momento, las gotitas de Dextrano se incorporan a la fase inferior, quedando las células adsorbidas a la interfase horizontal¹⁰².

En general, cuando se mezclan soluciones de dos polímeros diferentes, se pueden observar tres fenómenos alternativos:

- A. *Incompatibilidad.* Se produce separación de fases, con los polímeros situados en fases diferentes. Este es el caso de una mezcla de Dextrano y Polietilenglicol disueltos en agua. Por encima de ciertas concentraciones de ambos polímeros la mezcla se hace turbia y al dejar reposar, se forman dos fases líquidas en equilibrio. La fase superior es rica en Polietilenglicol, mientras que la fase inferior lo es en Dextrano¹¹⁰. Aunque ambas fases son acuosas (el Dextrano y el Polietilenglicol son solubles en agua) los polímeros son incompatibles y se separan en dos fases. Este caso no es único, sino un fenómeno muy común, hasta el punto de que la miscibilidad es una excepción más que una regla.
- B. *Complejos de coacervación.* Se produce separación de fases, con los polímeros localizados juntos en una de las fases, mientras que la otra está formada, casi en su totalidad por el disolvente, o es relativamente pobre en polímeros. Suele darse cuando hay atracción entre los polímeros, por ejemplo, entre derivados de Dextrano cargados de distinto signo.
- C. *Completa miscibilidad.* Se obtiene una solución homogénea y, como ya se ha mencionado, es una excepción más que una regla.

- La principal etapa, en todo experimento de reparto, es la elección del sistema bifásico.

De todos los sistemas posibles elegimos el sistema bifásico acuoso formado por dextrano y polietilenglicol.¹⁰²

Es necesario destacar:

- ✓ *La protección natural del sistema Dextrano-Polietilenglicol.*
- ✓ *La extrema sensibilidad del método.*

En cuanto a la protección natural del sistema, para partículas biológicas, las fases del sistema deben ser suaves, esto es, no deben alterar sus propiedades. Por tanto, ha de considerarse en los sistemas su contenido en agua, composición iónica, presión osmótica y efectos desnaturalizantes. Por ejemplo mientras que una proteína puede tolerar amplios rangos de pH o fuerza iónica, una célula, como el eritrocito, puede tener requerimientos más estrictos.

La experiencia hasta el momento demuestra que, los polímeros estabilizan las estructuras de las partículas y las actividades biológicas¹⁰¹.

Dextrano (Dx): es un polímero de glucosa, concretamente es un poli (1,6 α -D- glucopiranosil). Su cadena principal está constituida por residuos de α -D- glucopiranosil unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1\text{---}6)$, la cual además posee ramificaciones (5%) del mismo residuo anterior unidas a la cadena principal, por medio de enlaces glucosilo $\alpha(1\text{---}3)$ y $\alpha(1\text{---}4)$. Estas ramas son cortas, y aproximadamente el 85% de las mismas sólo tienen dos residuos. El resto tiene una longitud media de 33 (máximo 50) residuos.

Se obtiene comercialmente a partir de cultivos de *Leuconostoc mesenteroides* cuando crece en medio que contenga sacarosa como sustrato. Una vez aislado y efectuada una hidrólisis ácida parcial, se obtienen distintas fracciones por precipitación alcohólica diferencial que una vez aisladas se caracterizan por el número de viscosidad limitante y el peso molecular (PM).

El Dx T-500 comercial contiene aproximadamente 10 % de agua, por tanto, se hace necesario comprobar la concentración de sus soluciones por polarimetría. Los distintos lotes pueden variar en contaminantes, polidispersidad, PM y ramificaciones, pudiendo ocasionar diferencias en el comportamiento frente al reparto por afectar a las propiedades físicas (por ejemplo tensión interfacial) en sistemas de idéntica concentración en polímeros pero distinto lote.

Polietilenglicol (PEG): El PEG es un polímero lineal sintético de fórmula general: $H(OCH_2-CH_2)_nOH$, siendo $n > 4$.

El PEG se obtiene por polimerización del óxido de etileno con catalizadores ácidos y básicos solubles. Es bastante estable en solución, en polvo seco, o en forma de "copo". Su almacenamiento puede ser a temperatura ambiente, para el PEG seco, aunque a 4°C se retrasaría la lenta oxidación de los antioxidantes añadidos. Dicha oxidación puede cambiar el color del PEG de blanco a amarillo-marrón y puede originar la presencia de grupos finales ácidos, detectables por la disminución del pH de la solución. A diferencia de las soluciones de Dx, no es higroscópico y al igual que éstas, las soluciones de PEG se pueden mantener estables a 4°C, siendo dichas soluciones, menos viscosas que las de Dx, por lo que este polímero se encuentra en la fase superior de los sistemas bifásicos.

2-1-4- Teoría del reparto en sistemas bifásicos acuosos de Dx/PEG.

En general, el reparto en sistemas bifásicos acuosos viene caracterizado por el coeficiente de reparto (P), que se define como el cociente entre la concentración de sustancia en fase superior y la concentración de sustancia en fase inferior. P es función, principalmente de la propiedades de las dos fases, de la sustancia (partícula) sometida a reparto y de la temperatura.

A efecto del reparto, también se debe considerar, en ocasiones, la interfase entre las fases, ya que ésta presenta una cierta capacidad para adsorber sustancias sometidas a reparto. Esta adsorción, que no es muy importante en reparto de sustancias solubles, adquiere gran significado para partículas en suspensión (como células), que pueden adsorberse en gran cantidad a la interfase. En general, la adsorción a la interfase es mayor cuando aumenta el tamaño de la partícula y la tensión superficial. También está favorecida al aumentar la similitud, en afinidad, de las partículas por las dos fases, la cual a su vez, depende de muchos factores: tipo y peso molecular de los polímeros, composición iónica, etc. Tanto que, en este caso, hay que considerar de hecho, tres fases: fase superior, interfase y fase inferior.

Los métodos de fraccionamiento o separación en sistemas acuosos bifásicos Dx/PEG, se basan en el principio de reparto selectivo de sustancias, entre las dos fases líquidas del sistema (cuando se trata de moléculas solubles, por ejemplo proteínas, ácidos nucleicos, etc) o entre una de las fases y la interfase (cuando se trata de partículas en suspensión, por ejemplo orgánulos subcelulares o células).¹⁰¹

En cualquiera de los dos casos, el reparto se expresa mediante la denominada "razón de reparto", G , que se define como el cociente

entre la cantidad de sustancia o partículas en fase superior, p , y la cantidad en la fase inferior, q .

Puesto que en el caso de partículas, el reparto se realiza entre la fase superior e interfase, la razón de reparto, G^{108} , vendrá dada por:

$$G = \frac{p}{t-p} \quad (2.1.4.1)$$

En consecuencia, es la cantidad de partículas en fase superior, el parámetro experimental que siempre define el reparto, una vez conocida la cantidad total (t), inicialmente añadida al sistema.

Si se considera igual a 1 la cantidad total de una sustancia o partículas añadidas al sistema, es decir $p + q = 1$, los valores de p y q representan el "tanto por uno", de sustancia o partículas en fase superior e inferior (o interfase), respectivamente. De igual manera, si se considera $p + q = 100$, p y q , equivalen al "tanto por cien" en fase superior e inferior(o interfase) respectivamente. Por ello, y a efectos prácticos, cuando se trata de partículas (que se reparten entre fase superior e interfase) se suele expresar el reparto, como % de partículas en fase superior respecto al total añadido (100%).

Esta expresión práctica de la razón de reparto, G , se denomina P

$$P = (\text{cantidad fase superior} / \text{cantidad total}) \times 100 \quad (2.1.4.2)$$

En realidad esta expresión es válida tanto para partículas como para sustancias solubles. Sin embargo, sólo se utiliza para partículas.

Puesto que G expresa la relación entre cantidad de sustancia o partículas en cada fase, puede también expresarse en función del volumen y concentración correspondiente.

$$G = p / q = V_s C_s / V_i C_i \quad (2.1.4.3)$$

Donde V_s , C_s , V_i y C_i son el volumen y concentración de sustancia o partículas en fase superior e inferior (o interfase), respectivamente.

En el caso de que los volúmenes de fases del sistema sean iguales. $V_s = V_i$, la razón de reparto, G , será:

$$G = p / q = V_s C_s / V_i C_i = C_s / C_i = K \quad (2.1.4.4)$$

Siendo K un nuevo parámetro denominado "coeficiente de reparto" que, a diferencia de G , expresa la relación existente entre concentración de sustancia o partículas en fase superior e inferior (o interfase).

Cuando los volúmenes de las fases del sistema no son iguales,

$$V_s \neq G = p / q = V_s C_s / V_i C_i \quad (2.1.4.5)$$

y, es evidente que la razón de reparto, G , es :

$$G = p / q = V_s C_s / V_i C_i = V_s / V_i K \quad (2.1.4.6)$$

y llamando L a la razón de volúmenes V_s / V_i

$$G = L K \quad (2.1.4.7)$$

En resumen, la razón de reparto G , es igual al coeficiente de reparto K , sólo cuando los volúmenes de las fases son idénticos. En caso contrario, G depende del coeficiente de reparto de la sustancia o partícula K , y de la relación de volúmenes de fases, L .

El método de partición nos da información sobre ¹⁰⁵

- ✓ Tamaño (volumen y área superficial),
- ✓ Cambios de forma,
- ✓ Carga superficial,
- ✓ Estructura de membrana, incluyendo composición lipídica y proteica,
- ✓ Modificaciones de las propiedades superficiales de la membrana eritrocitaria.

2-2- REPARTO EN SISTEMA BIFASICO ACUOSO Dx/PEG.

El método de partición en sistema bifásico acuoso Dx/PEG nos da información acerca de la carga eléctrica superficial eritrocitaria (CESE).

Nuestro objetivo fue comparar variaciones de la CESE inducidas por diversos mecanismos, utilizando como herramienta el reparto en sistema bifásico acuoso Dx/PEG.

Se estudiaron para ello GR en distintas condiciones:

- A- Controles sin tratar
- B- Tratados con enzimas proteolíticas
- C- Tratados con tripsina a distintos tiempos de tratamiento enzimático
- D- Tratados con anticuerpo
- E- GR de distintas especies
- F- Sometidos a conservación en condiciones estandar de Banco de Sangre

2-3 MATERIALES

2-3-1- Reactivos

- *Dextrán 500* (Sigma lot. 18H1173)
- *PEG 6000-8000* (Sigma lot 57H0145)
- *Buffer fosfato sódico (PBS) 0.2 M pH 6.8*
- *Cloruro de sodio 1M*
- *Tripsina* de pancreas porcino, 11,3U/10ml (Sigma Lot.70H0439, actividad 1.130 BAEE unit/mg sólido)

- **Bromelina** 8,5U/10 ml (Sigma Lot. 6040168, actividad 1870 U/g sólido)
- **Neuraminidasa** 0,01U/250ml (*Clostridium perfringens*, Sigma N-2876 Lot. 77F-8065, actividad 1.3 U/mg sólido, sustrato NAN-lactosa)
- **Antisuero anti-M** (OTC lot MM536A)
- **4-dimetil-aminobenzaldehído**,
(Merk Art.103058, Lot.002596112498)
- **Testigo de NeuAc.** (Sigma A 25001 N-acetil-neuramínico de huevo tipoll PM 309.3)
- **Rvo de cianmetahemoglobina**

2-3-2- Material biológico

- **Sangre de dadores normales** provenientes del Banco de Sangre del Hosp. Prov. del Centenario, anticoagulada con EDTA.
- **Sangre de dadores normales** provenientes del Banco de Sangre del Hosp. Prov. del Centenario conservada con citrato-fosfato dextrosa (CPD)-Adenina.
- **Sangre de conejo** anticoagulada con heparina
- **Sangre de carnero** anticoagulada con alsever
- **Sangre de rata** anticoagulada con heparina

2-4- METODOLOGIA

2-4-1- Preparación del sistema bifásico acuoso de Dx/PEG

Los sistemas bifásicos acuosos de Dx/PEG se prepararon a partir de soluciones iniciales concentradas de ambos polímeros y de las distintas sales añadidas al sistema. Con el fin de conseguir la mayor uniformidad posible en los experimentos, se prepararon cantidades suficientemente grandes tanto de las soluciones como de los sistemas.

2-4-1-1- Preparación de las soluciones de polímeros y sales.

-Solución inicial de Dx: se partió de una solución inicial de Dx del 20% (p/p) en agua. Puesto que el Dx 500 utilizado en este trabajo se encontraba hidratado (5-10%), es necesario preparar una solución más concentrada (22%) y determinar su concentración por polarimetría. Para ello, en un erlenmeyer previamente tarado se pesó la cantidad correspondiente de Dx y agua. La mezcla se calentó bajo agitación continua hasta la aparición de las primeras burbujas de ebullición, con el fin de facilitar la rápida disolución del Dx; se tapó y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la concentración por polarimetría. Para ello, se pesaron, en un matraz de 25 ml, 5g de la solución concentrada de Dx y se completó a 25 ml con agua destilada (dilución 1:5 p/v). Esta mezcla se llevó al polarímetro para medir la rotación óptica. Una vez conocida la concentración exacta del Dx, se diluyó la solución con agua destilada y por pesada, hasta el 20% (p/p).

-Solución inicial de PEG: se partió de una solución inicial de PEG del 40% (p/p) en agua. Este polímero no requiere condiciones especiales de preparación ya que no es higroscópico. Se prepararon las soluciones por dilución del polímero en agua, con agitación y a temperatura ambiente. Es importante controlar el número de lote para evitar variaciones en el peso molecular que pueden afectar al reparto.

Estas soluciones de polímeros pueden conservarse aproximadamente un mes a 4°C.

2-4-1-2- Procedimiento de preparación del sistema bifásico.

En este trabajo de tesis se ha utilizado un sistema bifásico acuoso 5% Dx / 4% PEG, 0.09 M fosfato de sodio, pH 6.8 / 0.03 M NaCl.

Para la realización de estos experimentos se prepararon con 40g de cada uno de los sistemas empleados, por pesada de la cantidad conveniente de las soluciones iniciales de polímeros y sales. Los distintos componentes se añadieron en orden de densidad decreciente: Dx, PEG, sales y agua. En la tabla adjunta se detalla tanto la cantidad (g) necesaria de las soluciones iniciales de polímeros y sales, como la concentración final de los mismos. El peso del sistema, una vez añadidos los polímeros y sales, se ajustó añadiendo agua destilada hasta 40g.

CANTIDADES (g)					CONCENTRACION FINAL			
Dx	PEG	PBS	NaCl	AGUA	Dx	PEG	PBS	NaCl
20%	40%	0.2M	1M		%	%	M	M
10	4	18	1.2	6.8	5	4	0.09	0.03

Una vez pesados los polímeros, sales y agua, los tubos se mezclaron y se dejaron a 4°C. A continuación, se agitaron nuevamente y se centrifugaron (1700g, 10min.) con el fin de facilitar la separación de fases.

Finalmente, se recogieron las dos fases por separado, desechando la interfase y conservando a 4°C durante 1-2 meses.

2-4-2- A- Reparto de GR controles sin tratar.**2-4-2-A-1- Preparación de los GR.**

Se trabajó con hematíes, provenientes de sangre de donadores, lavados 3 veces con PBS y resuspendidos, en el mismo medio, a un hematocrito del 20 %.

El P es independiente de la concentración de células entre 1×10^5 a 1×10^7 cél/ml de sistema. Las células fueron contadas con contador hematológico.

2-4-2-A-2- Procedimiento

Los experimentos se llevaron a cabo en tubos graduados de 10 ml de capacidad. Para ello, se prepararon sistemas bifásicos por pesada de 2g de fase inferior y 2g de fase superior, obtenidas según se describe en 2-4-1-2.

El procedimiento experimental se esquematiza en la Fig.2-4-2-A.

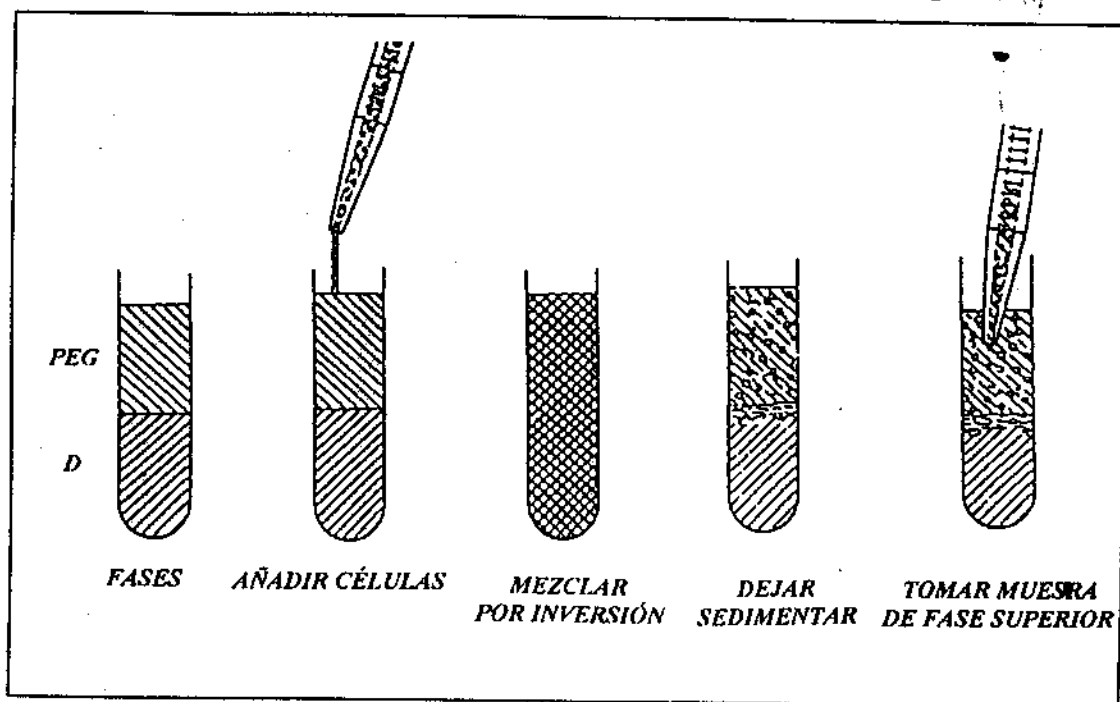


Figura 2-4-2-A- Procedimiento experimental de reparto celular.

Diagrama del método de partición.

PEG, fase rica en polyetilenglicol; D, fase rica en dextrán

- Para determinar el **total de GR** agregados al sistema, en primer lugar, se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de una suspensión de GR a estudiar a un hematocrito al 20%. Las células y fases se mezclaron por inversión suave del tubo 60 veces. Se midió el volumen total del sistema en el tubo graduado, se tomaron alícuotas de $100 \mu\text{l}$, por duplicado, y se determinó la concentración de hemoglobina por el

método de la cianmetahemoglobina. [Método de Van Kampen y Zijlstra. La hemoglobina es transformada en cianmetahemoglobina por efecto de un compuesto oxidante de cianuro (ferricianuro de potasio). La cianmetahemoglobina formada se lee a 540 nm.]

- **El reparto** se realizó en tubos calibrados, por duplicado. Se adicionó al sistema 100µl de la suspensión de GR con un Hto al 20%, se mezcló 60 veces por inversión suave y se dejó en reposo por 20 min. a 4°C para que se produzca la separación de la fases y el correspondiente reparto celular. Los GR con carga negativa, se movieron hacia la fase superior, cargada positivamente, rica en polietilenglicol. Una vez transcurrido el tiempo de sedimentación, se midió el volumen de la fase superior y el volumen total del sistema. Se tomaron alícuotas (100µl) por triplicado de la zona media de la fase superior. La concentración de hemoglobina fue medida por el método de la cianmetahemoglobina.

El coeficiente de partición P fue calculado como el porcentaje de hemoglobina en la fase superior y el total de hemoglobina adicionado al sistema.

El coeficiente de reparto (P) se define como la cantidad de células en la fase superior respecto del total de células adicionadas.

2-4-2-B- Estudio comparativo del reparto de GR tratados con enzimas proteolíticas.¹¹⁷⁻¹²⁴

2-4-2-B-1- Fundamento

Las enzimas proteolíticas (tripsina - bromelina - neuraminidasa) remueven porciones de membrana portadoras de ácido siálico, responsable de la carga superficial.

2-4-2-B-2- Tratamiento enzimático de los GR :

Procedimiento:

Los GR normales se lavaron 3 veces con PBS y separaron en 4 alícuotas para someterlos a distintos tratamientos:

1-Tripsina: volúmenes iguales de tripsina y culot de GR. Se incubaron 15 min. a 37°C.

2-Bromelina: 1 ½ volumen de bromelina y 1 volumen de culot. Se incubaron 15 min. a 37 °C.

3-Neuraminidasa: 2 volúmenes de neuraminidasa y 1 volumen de culot. Se incubaron 30 min. a 37°C.

4- Control sin tratar: volúmenes iguales de PBS y culot de GR.

Luego de la incubación se separaron inmediatamente los sobrenadantes para dosar el ác. siálico liberado en el tratamiento enzimático. Los GR fueron luego lavados 3 veces con PBS y resuspendidos a un Hto al 20% para su estudio.

2-4-2-B-3- Dosaje de ácido siálico¹¹⁸⁻¹¹⁹⁻¹²² :

El dosaje de ácido siálico se determinó por la técnica de Erlich's modificada.

Reactivo de Erlich's: 4-dimetil-aminobenzaldehído, solución al 5% en ácido clorhídrico al 50% con agua destilada.

Procedimiento:

A una alícuota de 0.4 ml de cada sobrenadante, se le adicionó 1 ml de reactivo de Erlich's. Se calentó por 30 min en un baño de agua hirviente. La solución coloreada se enfrió en agua helada y se separó el sobrenadante, por una corta y rápida centrifugación. La intensidad del color se midió a 546nm en un espectrofotómetro contra blanco de reactivo.

El cálculo de la concentración se efectuó procesando de la misma manera, un testigo de NeuAc de concentración conocida.

2-4-2-B-4- Reparto**Procedimiento**

El reparto se realizó según las especificaciones del ítem 2-4-2-A-2.

- Para determinar el **total de GR** agregados al sistema bifásico, se prepararon cuatro series de tubos y se adicionaron a cada una de las mismas 100µl de una suspensión a un Hto al 20% de:

Serie 1: GR tripsinados.

Serie 2: GR bromelinizados.

Serie 3: GR tratados con neuraminidasa.

Serie 4: GR sin tratar.

- **El reparto** se realizó en cuatro series de tubos a las cuales se adicionó 100µl de suspensión al 20% de Hto de:

Serie 1: GR tripsinados

Serie 2: GR bromelinizados

Serie 3: GR tratados con neuraminidasa

Serie 4: GR sin tratar

El coeficiente de partición P fue calculado como se indicó en 2-4-2-A-2.

2-4-2-C- Estudio comparativo del reparto de GR tratados con tripsina a distintos tiempos de incubación.

2-4-2-C-1- Tratamiento de los GR

La suspensión de GR fue dividida en 4 alícuotas. Una de ellas quedó sin tratar y fue tomada como muestra control. A las otras 3 alícuotas, se adicionó tripsina a una concentración de 5 mg/ml de células rojas y se incubó a 37°C durante 15, 30 y 60 min. Luego de la incubación, cada alícuota fue inmediatamente centrifugada 5 min., los sobrenadantes fueron removidos y las células rojas lavadas 3 veces para obtener una suspensión libre de tripsina. Luego se realizó el reparto de la misma manera que en 2-4-2-A-2 y el dosaje de ácido siálico en los sobrenadantes como se realizó en 2-4-2-B-3.

2-4-2-D- Estudio comparativo del reparto de GR tratados con antisuero anti -M¹²⁰⁻¹²⁶

2-4-2-D-1- Fundamento

Los antígenos M y N son α -sialoglicoproteínas localizadas sobre la glicoforina A y están sociadas con la carga superficial eritrocitaria.

El propósito de esta investigación fue el estudio del efecto del antisuero anti-M, sobre GR de adulto, que tienen fenotipos MM, MN y NN.

2-4-2-D-2- Preparación de los GR :

Los GR fueron lavados tres veces con PBS e incubados (15 min, 25°C) con *antisuero anti-M*.

2-4-2-D-3- Reparto**Procedimiento**

El reparto se realizó según las especificaciones del ítem 2-4-2-A-2.

2-4-2-E- Estudio comparativo del reparto de GR de distintas especies¹²³**2-4-2-E-1- Fundamento**

Los eritrocitos de un gran número de especies tienen algunas propiedades de membrana similares, constituyendo el material de elección para estudios comparativos e interpretación de fenómenos de carga superficial.

2-4-2-E-2- Preparación de los GR de distintas especies

Se trabajó con hematíes de distintas especies (rata- carnero- conejo) y eritrocitos humanos como control lavados 3 veces con PBS y resuspendidos en el mismo medio a un Hto del 20%.

2-4-2-E-3- Reparto**Procedimiento**

La partición se realizó con el procedimiento descrito en 2-4-2-A-2.

2-4-2-F- Estudio comparativo del reparto de GR sometidos a conservación en condiciones estándar de Banco de Sangre.

106-114-115-116-121-125

2-4-2-F-1 Fundamento

En el curso de la conservación, en las condiciones standard de Bco de Sangre, los GR sufren alteraciones de sus propiedades bioquímicas (disminución de ATP y 2,3 difosfoglicerato), fisicoquímicas (aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno) y reológicas (aumento de la viscosidad y disminución de la deformabilidad eritrocitaria). Las modificaciones reológicas están estrechamente relacionadas con los cambios en la morfología y en la capacidad de agregación de los eritrocitos conservados.

2-4-2-F-2- Preparación de los GR conservados

Se utilizaron 3 muestras de sangre de donadores adultos, sanos, de sexo masculino, anticoaguladas con CPD-Adenina, almacenadas en bolsas plásticas y conservadas a 4°C, en forma de sangre entera. De cada bolsa se extrajeron 5 alícuotas, una por semana (0, 7, 14, 21, y 28 días), durante el período de conservación, a través de una puerta estéril. Los GR se lavaron 3 veces en PBS y se resuspendieron al 20%.

2-4-2-F-3- Reparto

Procedimiento.

El reparto se realizó como en 2-4-2-A-2.

2-5- RESULTADOS

2-5-A- Reparto de GR sin tratar

La tabla 2-5-A muestra los valores de concentración de hemoglobina en la fase superior, la hemoglobina total y el coeficiente de partición.

Muestras	HT	HTP	P
1	8.1	6.9	86
2	7.8	6.9	88
3	7.6	6.9	91
4	7.8	7.0	90
5	7.5	7.0	93
6	7.9	7.1	90
7	8.0	7.1	89
8	7.8	7.0	91
9	8.1	7.3	90
10	7.8	6.9	89

Tabla 2-5-A- Valores de concentración de hemoglobina (g/dl) en la fase superior (HTP), hemoglobina total (HT), y coeficiente de partición (P) en GR humanos normales (control)

Los estudios han sido evaluados sobre 10 determinaciones, resultando el valor de P (media $\pm$ 1 SD) de 90 ± 1.89 .

2-5-B- Estudio comparativo del reparto de GR tratados con diferentes enzimas.

2-5-B-1 Resultados

Los resultados se presentan en las siguientes tablas:

Muestras	Enzimas											
	Tripsina			Bromelina			Neuraminidasa			Sin tratar		
	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P
1	7.6	1.9	25	8.0	1.2	15	8.1	0.4	5	8.1	6.9	86
2	7.6	2.0	26	7.8	1.1	14	7.8	0.3	4	7.8	6.9	88
3	7.7	2.1	27	7.9	0.9	12	7.6	0.5	6	7.6	6.9	91
4	8.0	1.9	24	7.9	1.1	14	8.1	0.4	5	7.8	7.0	90
5	7.1	1.6	23	8.1	1.3	16	7.1	0.4	5	7.5	7.0	93

Tabla 2-5-B-1. Valores de concentración de hemoglobina (g/dl) en la fase superior (HTP), hemoglobina total (HT), y coeficiente de partición (P) de los GR sin tratar y tratados con tripsina, bromelina y neuraminidasa.

ENZIMA	P (coef de reparto)	Ac. Siálico (μmol/l)
Tripsina	25 ± 1.58	2.5 ± 0.45
Bromelina	14 ± 1.48	7.5 ± 0.65
Neuraminidasa	5 ± 0.71	15 ± 1.20
GR sin tratar	89 ± 2.70	

Tabla 2-5-B-2 Valores de P y de NeuAc en sobrenadantes de GR tratados con distintas enzimas proteolíticas y sin tratar.

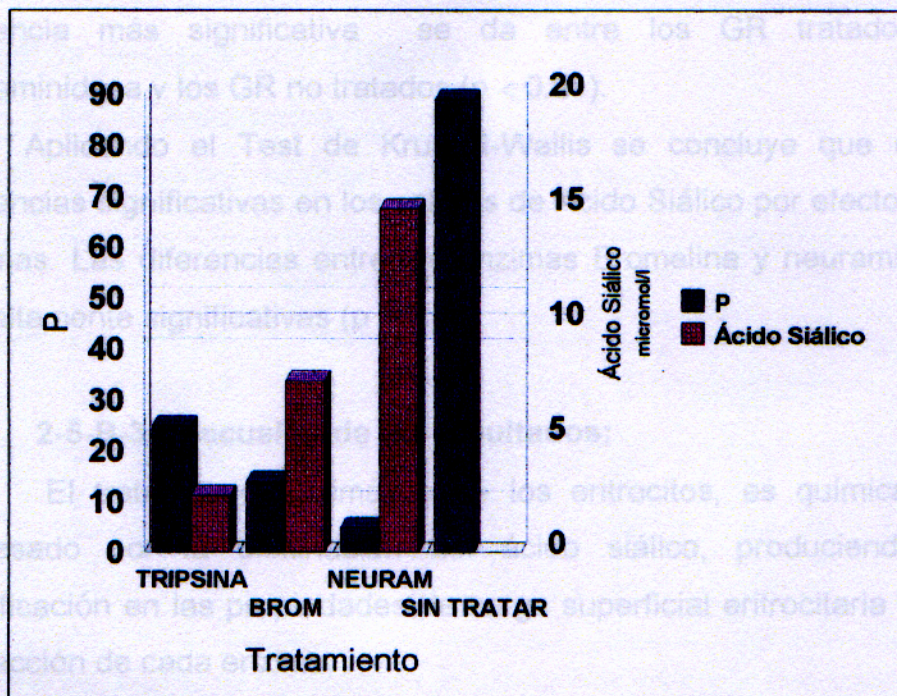


Gráfico 2-5-B-3- Efecto de las distintas enzimas proteolíticas sobre el P y el contenido de AS en los sobrenadantes de GR tratados y sin tratar.

Los valores de P disminuyen en los GR tratados con las distintas enzimas respecto de los no tratados. El decaimiento de P es más marcado en los GR tratados con neuraminidasa que con bromelina y tripsina. Se observa un incremento del contenido de ácido siálico, en los sobrenadantes de los eritrocitos tratados con las diferentes enzimas, comparado con los controles sin tratar.

2-5-B-2- Análisis estadístico

Aplicando el test a libre distribución de Kruskal-Wallis (K-W) se concluye que existen diferencias en los valores de P de los GR sometidos a distinto tratamiento enzimático con un valor de estadística de 10.38 y una probabilidad asociada de 0.015. Para estudiar las diferencias o equivalencias entre los efectos de las distintas enzimas

sobre el coeficiente de reparto, P, se aplicó el test de comparaciones múltiples basado en las sumas de rangos de Kruskal-Wallis. La diferencia más significativa se da entre los GR tratados con neuraminidasa y los GR no tratados ($p < 0.01$).

Aplicando el Test de Kruskal-Wallis se concluye que existen diferencias significativas en los valores de Acido Siálico por efecto de las enzimas. Las diferencias entre las enzimas Bromelina y neuraminidasa son altamente significativas ($p < 0.01$).

2-5-B-3- Discusión de los resultados:

El tratamiento enzimático de los eritrocitos, es químicamente expresado por la eliminación del ácido siálico, produciendo una modificación en las propiedades de carga superficial eritrocitaria acorde a la acción de cada enzima.

Una disminución en el P, por degradación del contenido de ácido siálico de la membrana, es observado en los eritrocitos tratados con las diferentes enzimas, comparados con los controles no tratados. Concomitantemente un aumento del AS liberado se observa en los sobrenadantes.

Comparando los valores de P y de AS, se observa una estricta correlación inversa entre ambos parámetros que se interpretan como una disminución de la carga en la membrana.

Esta disminución del P refleja:

- ✓ variaciones a nivel del glicocáliz de las células rojas y
- ✓ la remoción de una porción de ácido siálico de la membrana.

2-5-C- Estudio comparativo del reparto de GR incubados a distintos tiempos con tripsina

2-5-C-1- Resultados:

Los resultados se expresan en las siguientes tablas:

Duración del tratamiento con Tripsina												
Muestras	sin tratar			15min.			30 min.			60min		
	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P
1	7.9	7.1	90	7.6	5.8	76	8.0	2.0	25	8.1	0.9	11
2	7.8	7.1	91	8.0	6.2	78	7.8	1.9	24	7.8	0.8	10
3	7.7	7.0	92	8.1	6.1	75	7.9	2.0	26	7.6	0.9	12
4	8.0	7.1	89	7.9	5.8	74	7.5	1.7	23	7.9	0.7	9
5	7.8	6.9	88	8.1	6.2	76	7.7	1.9	25	8.0	0.8	10

Tabla 2-5-C-1. Valores de concentración de hemoglobina (g/dl) en la fase superior(HTP) hemoglobina total (HT), y coeficiente de partición (P) de GR sin tratar y tratados con tripsina a distinto tiempo de incubación.

Eritrocitos tratados con tripsina	Coef. de Reparto (P)	Ac. Siálico (μ mol/l)
15 minutos	76 ± 1.48	0.5 ± 0.10
30 minutos	25 ± 1.15	2.5 ± 0.45
60 minutos	10 ± 1.14	5.5 ± 0.85
sin tratar	90 ± 1.58	—

Tabla 2-5-C-2- Valores de P y de AS liberado de GR sin tratar y tratados con tripsina a distintos tiempos de incubación.

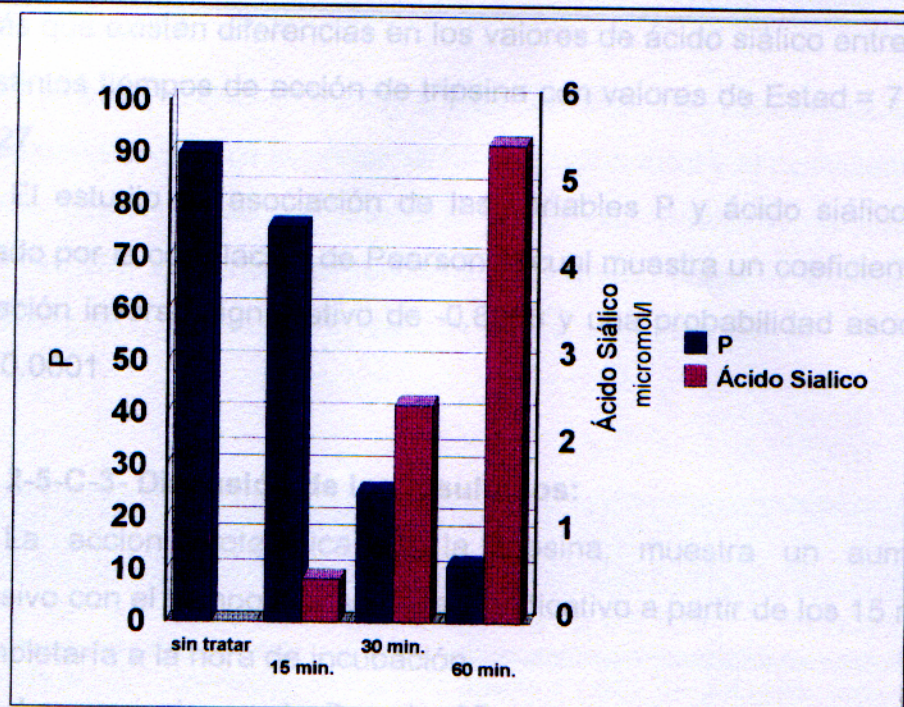


Gráfico 2-5-C. Representación del ácido siálico y del P en función de la duración del tratamiento enzimático.

Se observa un incremento del contenido de ácido siálico en los sobrenadantes de los eritrocitos tratados con tripsina, comparado con los controles sin tratar. Los eritrocitos tratados 15 min. no muestran cambios significativos comparados con el control sin tratar. Se observa un progresivo incremento en el contenido de ácido siálico debido al tratamiento con tripsina, el cual es efectivamente completo a la hora de incubación.

2-5-C-2- Análisis estadístico

Aplicando el test de Kruskal-Wallis, se concluye que existen diferencias significativas entre los valores de P, para los distintos tiempos de incubación, y el grupo control con valores de estadística de 10.38 y p de 0.015.

Para identificar los tiempos que ocasionan diferencias, se aplicó el test de comparaciones múltiples, basado en las sumas de rangos de Kruskal-Wallis, observando que las diferencias en los valores de P, para 60min. y sin tratar, son altamente significativas $p < 0.01$. Se concluye

además que existen diferencias en los valores de ácido siálico entre ante los distintos tiempos de acción de tripsina con valores de Estad.= 7.2 y $p=0.027$.

El estudio de asociación de las variables P y ácido siálico, fue realizado por la correlación de Pearson la cual muestra un coeficiente de correlación inverso significativo de -0.8958 y una probabilidad asociada de $p +0.0001$.

2-5-C-3- Discusión de los resultados:

La acción proteolítica de la tripsina, muestra un aumento progresivo con el tiempo que se hace significativo a partir de los 15 min y se completaría a la hora de incubación.

Las variaciones de P y de AS se correlacionan inversamente (coef. de correlac. inverso significativo de -0.8958 y una $p +0.0001$), de forma tal que al aumentar el AS liberado con el tiempo de acción de la enzima, los valores de P decrecen.

2-5-D- Estudio comparativo del reparto de GR modificados por acción del anticuerpo anti-M

2-5-D-1- Resultados

Los resultados se expresan en las siguientes tablas:

Muestras	Fenotipos								
	MM			MN			NN		
	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P
1	7.6	2.7	36	8.0	4.5	56	8.1	6.9	89
2	7.6	2.9	38	7.8	3.5	45	7.8	6.9	89
3	8.4	2.5	30	7.9	3.9	49	7.6	6.9	85
4	8.4	2.6	37	7.9	4.3	54	8.1	5.5	78
5	7.1	2.6	37	8.1	4.5	56	7.1	5.5	78

Tabla 2-5-D-1. Valores de concentración de hemoglobina (g/dl) en la fase top (HTP), hemoglobina total (HT), y coeficiente de partición (P) de GR de fenotipos MM, MN, y NN, tratados con anti-M

La tabla 2-5-D-1 muestra, los valores de concentración de hemoglobina en la fase superior, la hemoglobina total y el coeficiente de partición. Esto ha sido evaluado 5 veces con muestras de los tres fenotipos (MN; MM; NN). El fenotipo NN ha sido considerado como el control negativo, dado que no reacciona con antisuero anti-M.

Fenotipos de GR	MM	MN	NN
P	34.00 ± 4.18	49.20 ± 5.89	81.90±5.00

Tabla 2-5-D-2 Coeficiente de Partición (media ± 1 SD) de eritrocitos tratados con anti M.

Los valores de coeficiente de Partición son marcadamente menores para los fenotipos MM y MN que para el fenotipo NN.

2-5-D-2- Análisis estadístico

Las medias de los valores y las desviaciones standard del coeficiente de partición se describen en la Tabla 2-5-D-2.

Por aplicación del test de Kruskal-Wallis, se han encontrado diferencias significativas entre los coeficientes de partición de cada fenotipo ($p=0.0019$). Usando la comparación múltiple, basada en la suma de rangos del test de Kruskal-Wallis, se puede concluir que las diferencias entre los fenotipos MM y NN, son altamente significativas (0.05), pero las diferencias son moderadamente significativas, cuando el fenotipo MN es comparado con los otros dos fenotipos (MN y NN) ($p < 0.10$).

2-5-D-3- Discusión de los resultados:

El antisuero disminuye el coeficiente de partición de las células MM y MN con respecto al control (células NN).

Estos resultados muestran que la partición en un sistema bifásico de polímeros, distingue poblaciones de eritrocitos modificados y no modificados. Esto podría interpretarse como consecuencia de una reducción en la carga de los eritrocitos que tienen antígeno M por unión del anticuerpo específico.

La diferencia del P entre los GR portadores del antígeno M con distinto fenotipo, podría atribuirse a un efecto de densidad antigénica M.

2-5-E- Estudio comparativo del reparto de GR de distintas especies

2-5-E-1- Resultados

Los resultados obtenidos se expresan en las siguientes tablas:

ESPECIE de GR												
Muestras	HUMANO			RATA			CARNERO			CONEJO		
	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P
1	7.8	7.1	91	8.2	7.9	96	8.1	6.6	82	8.0	4.9	61
2	7.7	6.9	90	7.8	7.3	94	7.8	6.5	83	7.9	4.7	60
3	8.1	7.3	90	7.9	7.5	95	7.6	6.5	85	7.8	4.8	62
4	8.4	7.7	92	7.9	7.7	98	8.1	6.4	79	8.2	4.8	59
5	7.9	7.2	91	8.0	7.7	96	7.5	5.8	78	8.1	5.1	63

Tabla 2-5-E-1. Valores de concentración de hemoglobina (g/dl) en la fase top (HTP), hemoglobina total (HT) y coeficiente de partición (P) para GR de distintas especies.

ESPECIE de GR	HUMANO	RATA	CARNERO	CONEJO
P	90.8±0.83	95.8±1.48	81.4±2.88	61±1.58

Tabla 2-5-E-2- Valores de P para eritrocitos de distintas especies.

Los resultados muestran diferencias en la carga superficial eritrocitaria de las distintas especies estudiadas, podemos observar que los eritrocitos de carnero y conejo tienen una carga superficial menor que los eritrocitos humanos, siendo levemente superior para los GR de rata.

2-5-E-2- Análisis estadístico

Para ver si existen diferencias en los valores de P, para eritrocitos de distintas especies se aplicó el test de Kruskal-Wallis, obteniéndose una Estad. de 10.38 con una $p=0.015$, por lo tanto, se concluye que existen diferencias significativas. Aplicando el test de comparaciones múltiples, basado en las sumas de rangos, la mayor diferencia se da entre ratas y conejos $p < 0.01$.

2-5-E-3- Discusión de los resultados

Se obtuvieron valores de P significativamente diferentes para las distintas especies estudiadas con respecto a los GR humanos. Tales diferencias podrían atribuirse a variaciones en la carga superficial de la membrana eritrocitaria.

2-5-F-Estudio comparativo del reparto de GR conservados.

2-5-F-1- Resultados

Los resultados se presentan en las siguientes tablas:

M	TIEMPO DE CONSERVACION (DIAS)											
	0			7			14			21		
	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P	HT	HTP	P
1	7.5	7.0	93	7.5	5.7	76	8.0	5.3	66	8.1	3.7	46
2	7.8	7.0	90	7.8	6.0	78	7.8	5.1	65	7.8	3.5	45
3	7.6	6.9	91	8.4	6.3	75	7.9	5.0	64	7.6	3.3	44
4	7.8	6.9	88	8.3	6.0	73	7.9	4.9	62	8.1	3.8	47
5	8.1	6.9	86	7.8	5.7	73	8.1	5.1	63	7.1	3.4	48
										8.1	2.9	37

Tabla 2-5-F-1. Valores de concentración de hemoglobina (g/dl) en la fase top (HTP), hemoglobina total (HT), y coeficiente de partición (P) de GR de muestras de uso transfusional a distintos tiempos de conservación.

Se observa una disminución de los valores de P al transcurrir el tiempo de conservación, indicando cambios en las propiedades de carga superficial de la membrana eritrocitaria.

Tiempo de conservación (DIAS)	0	7	14	21	28
P	89.6 ± 2.70	75 ± 2.12	64 ± 1.58	46 ± 1.58	39.2 ± 1.48

Tabla 2-5-F-2- Valores de P de GR de muestras de uso transfusional a distintos tiempos de conservación.

2-5-F-2- Análisis estadístico

Para estudiar el efecto del tiempo de conservación sobre el valor de P se aplicó el test de Kruskal-Wallis. El valor de la estadística es 10.38 y su probabilidad asociada 0.015. Se concluye que existen diferencias significativas.

Aplicando el test de comparaciones múltiples, basado en la suma de rangos de P, se concluye que las diferencias entre 7 y 28 días son altamente significativas $p < 0.01$.

2-5-F-3- Discusión de los resultados

En el curso de la conservación los GR sufren modificaciones en sus propiedades bioquímicas y reológicas.

Se obtuvo una disminución progresiva y significativa en los valores de P con el transcurso del tiempo de conservación. Estos resultados ponen de manifiesto alteraciones de membrana relacionadas con la carga.

Bibliografía del cap 2:

98- Albertsson P. A. Particle fractionation in liquid two-phase systems. the composition of some systems and the behaviour of some model particles in them. Application to the isolation of cell walls for microorganisms Biochim. Biophys. Acta 27, 378-395. 1958.

99- Albertsson P. A., Baird G. D. Countercurrent distribution of cells. Exp. cell Res. 28., 296-322. 1962

100- Zaslavsky B.Y Bioanalytical applications of partitioning in aqueous polymer two - phase systems. Analytical Chemistry 64 765-773. 1992

101- Albertsson P. A. Partition of Cell Particles and Macromolecules 2nd edition. Edited by Wiley. Interscience Division, John Wiley and Sons, Inc. New York pp 50-165. 1971

102- Walter H., Brooks D., Fisher D. Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses and applications to Biotechnology. Surface Properties of cells reflected by partitioning: Red Blood Cells as a model. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Javanovich, Publishers. Cap 10. pp 327-375. 1985.

103- Reithman and col. Electromotive phenomena in partition of erythrocytes in aqueous polymer two phase systems. Biochem. Biophys Acta 297, 193-202, 1973.

104- Gascoine P. S. and Fisher D., The dependence of cell partition in two-polymer aqueous phases systems on the electrostatic potential between the phases. Biochem. Soc. Trans. 12, 1085-1086, 1984.

105- Walter, H. Membrane surface properties reflected by cell partition in two-polymer aqueous phases. Clases of beef erythrocytes having different membrane lipid, charge and affinity for a ligand FEBS Lett. 78, 105-108. 1977.

106- Walter H., Krob E. J. and Ascher G. S. Aging of erythrocytes results in altered red cell surface properties. Studies by partitioning in two-polymer aqueous phase systems. Biochim. Biophys. Acta 641, 202-215. 1981

107- Walter H., Krob E. J. Surface difference between erythrocytes from arbitrarily chosen individuals detected by cell partitioning Biochim. Biophys. Res. Commun. 120, 250-255, 1984

108- Fisher D. The separation of cell and organelles by partitioning in two-polymer aqueous phases. Biochem. J. 196, 1-10. 1981.

- 109- Johansson G. Studies on aqueous dextran - polyethylene glycol. Partition of albumins Biochim. Biophys. Acta 222, 381-389. 1970
- 110- Johanson G. Partition of salts and their effects on partition in a dextran-polyethylenglycol-water two phase system Biochim. Biophys. Acta 221, 387-390. 1970.
- 111- Reitherman y col. Electromotive phenomena in partition of erythrocytes in aqueous two phase systems Biochim. Biophys. Acta 297, 193-202. 1973.
- 112- Gascoine y Fisher. The dependence of cell partition in two polymer aqueous phase systems on the electrostatic potential between the phases. Biochim. Soc. Trans. 12, 1085-1086. 1984.
- 113- Ballard and col. Cells partition. A study of parameters affecting the partition phenomemon Biochim. Biophys. Acta 582, 89-101. 1979.
- 114- Walter H., Krob EJ., Seaman GVF. Surface alterations of erythrocytes with cell age. Rat red cell is not a model for human cell. Biochem biophys Res. commun. 97, 107-113. 1980.
- 115- Walter H., Selby F.W. and Braaake JM. The separation of young and old red blood cells an addendum. Biochem biophys Res. commun. 15, 497-501. 1980.
- 116- Walter H., Garza R., and Selby FW. Partition of frech and stored erythrocytes in an aqueous dextran-PEG two phases system exp. cell res. 49, 679-681. 1980.
- 117- Bholer T., Linderkamp O. Effects of neuraminidase and tripsin on surface charge and aggregation of red blood cells. Clin. Hemoreol, 13, 775-778, 1993.
- 118- Denny P., Alerton S. Determination of sialic acid using 2-thiobarbituric acid in the absence of hazardous sodium arsenite. Clinica Chimica Acta 131 pp 333-336. 1983.
- 119- Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of NANA an their application to hidroly sates of sialomucoides . Biochem. J. Vol 81, pp 384-391. 1961
- 120- Van der Merwe PA., Crocker PR., Kelm S. Localitation of the putative sialic acid binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule. Medical Research Council cellular Immnology Unit J. Biol. Chem, Apr, 271:16, 9273-80. 1996.

121- Mazzanti L., rabini R., Martarelli D., Curatola G. Sialic acid, diabetes and aging a study on the erythrocyte membrane. *Metabolism*, vol 46, N° 1 (Jan) pp59-61. 1997.

122- Lipovak V., Gavell M., Crnek S., Rubinjoni Z., Erythrocytes sialic acid and filterability in type 2 diabetics patients *Clin. Hemorh.* 10. 5. 477-483 1990

123- Eylar E., Brody O., Oncley O.V. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. *The Journal of Biological* vol 23 N° 8 pp 1992-2000. 1962

124- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. Alteraciones de membrana eritrocitaria detectadas por coeficiente de partición. *Revista Argentina de Tranfusión* vol XXI N°4 pp 344. 1995.

125- Foresto P., Riquelme B., D'Arrigo M., Valverde J., Rasia R. Estudio de las propiedades reológicas de la sangre durante la conservación. *Revista Argentina de Tranfusión* vol XXV N°2 pp 103110. 1999

126- Foresto P., D'Arrigo M., Racca L. Valverde J. Effects of anti-M antiserum on surface charge of red cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 20 pp141-143. 1999.

CAPITULO 3

METODOS PARA ESTUDIAR LA AGREGACION ERITROCITARIA.

3- METODOS PARA ESTUDIAR **LA AGREGACION ERITROCITARIA**

- La formación de agregados es influenciada por:
 - ✓ ***factores asociados a las células***
 - disminución del nivel de ácido siálico de la membrana - carga superficial
 - deformabilidad
 - ✓ ***factores extracelulares***
 - aumento de inmunoglobulinas, de fibrinógeno
 - altos niveles de globulinas plasmáticas sobre la superficie celular
 - temperatura
 - pH
 - osmolaridad
 - fuerza ionica del medio extracelular

El flujo en pequeños vasos es sensible al tamaño y forma de los agregados. Las estructuras agregadas influyen sobre la resistencia microvascular al flujo sanguíneo. Cuando el agregado es de tamaño comparable al diámetro del microvaso, se crea una situación de flujo complicada. Así, la morfología de los agregados definen el papel de la agregación en la microcirculación.

La forma de los agregados está relacionada a la deformabilidad de los GR.

Cuando dos eritrocitos colisionan, en el punto de unión de los mismos, se desarrolla un contacto superficie-superficie por rotación de la membrana sobre sí misma y movimiento de giro de las células unidas, formándose un "rouleaux".

Cuando la deformabilidad de las células unidas es reducida, la colisión intercelular se altera, y se forma un agregado irregular. La morfología del agregado refleja la deformabilidad celular y la interacción celular. Su cuantificación da otra característica de agregabilidad de los GR¹⁴⁰⁻¹⁴²⁻¹⁴⁴⁻¹⁴⁵⁻¹⁶².

3-1- TECNICAS PARA ESTUDIAR

LA AGREGACION ERITROCITARIA.

Varias técnicas han sido desarrolladas para detectar y cuantificar la agregación eritrocitaria¹²⁷. Algunas de los métodos, basados en diferentes principios, son presentados en este capítulo.

3-1-1 Velocidad de eritrosedimentación.

La velocidad de eritrosedimentación es uno de los primeros métodos utilizados para la cuantificación de la agregación eritrocitaria.

Según Fahraeus¹²⁸, la causa del incremento de la sedimentación es la adhesión reversible de los GR. El proceso de sedimentación depende de factores plasmáticos y celulares.

El método de referencia usado para esta determinación, es la técnica de Westergren¹²⁹. Este proceso consiste en colocar sangre anticoagulada en un tubo de diámetro standard, y medir, a distintos intervalos de tiempo, la altura del plasma sobrenadante.

3-1-2 Análisis de imágenes microscópicas.

- El grado de la agregación eritrocitaria es determinado por comparación de las microfotografías registradas de una suspensión de eritrocitos en plasma y una suspensión de eritrocitos en una solución de Ringer-albúmina a un Hto del 1%.

El índice microscópico de agregación (MAI) es calculado por la siguiente relación:

$$\text{MAI} = \frac{\text{número de células en solución Ringer-albúmina}}{\text{número de agregados en plasma u otro medio agregante.}}$$

En ausencia de agregación, MAI es igual a 1.

- Shiga y Maeda¹³¹, determinan la agregación de GR utilizando un reoscopio, instrumento diseñado por Schmid-Schönbein¹³⁰⁻¹⁴²⁻¹⁴³. El reoscopio, representado en la Fig. 2-1-2-A, consiste en un viscosímetro cono-plato transparente de escaso espesor, montado en un microscopio invertido. El cono y el plato giran a la misma velocidad pero en sentido opuesto, generando, en la bisectriz del ángulo cono-plato, un campo de tensiones de corte sobre la célula, sin desplazamiento, lo que permite la observación directa del proceso. Dependiendo de las condiciones de trabajo, fijando una velocidad de corte (shear rate, SR) dada, el instrumento proporciona datos de agregación, analizando las imágenes registradas.

Este método permitió descubrir el movimiento de "*tank treading*", el que ha sido documentado por Schmid Schönbein and col¹⁴².

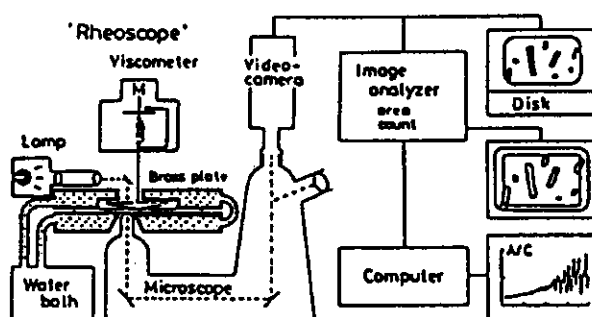


Figura 2-1-2-A. Diagrama esquemático del reoscopio¹³¹

- Chen y col¹³² desarrollaron un sistema para la observación directa de GR bajo condiciones de flujo controlado, en una cámara termostatzada, similar a la que se utilizó en nuestros trabajos experimentales. El sistema se representa en la Fig. 2-1-2-B.

El flujo a través de la cámara es inducido aplicando una diferencia de presión, que produce una tensión de corte (shear stress, SS) que varía desde cero a 2 dyn/cm^2 . Bajo estas condiciones las células forman una capa de "rouleaux", los cuales ruedan de manera tal que su eje más largo se orienta perpendicularmente a la dirección del flujo. La cinética de formación del agregado se estudia *monitoriando* el proceso.

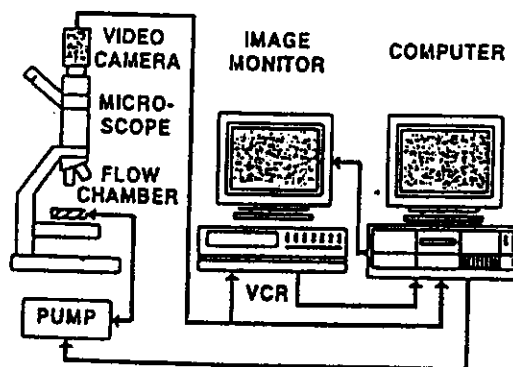


Figura 2-1-2-B. Diagrama esquemático del sistema computarizado para determinar la agregación¹³²

3-1-3 Transmisión y retrodifusión de la luz^{133-134.}

La transmisión de la luz a través de suspensiones de GR varía de acuerdo al gradiente de deformación (SR). En la ausencia de agregados el cambio en el componente lumínico transmitido se debe a la orientación y deformación celular. La agregación de eritrocitos influye significativamente este fenómeno. Varias técnicas basadas en este principio han sido desarrolladas, entre ellas el agregómetro fotométrico Myrenne. Este consiste en un viscosímetro cono-plato transparente que aplica un alto SR a una suspensión de eritrocitos. La rotación es detenida súbitamente y un dispositivo fotoeléctrico registra la intensidad de un haz láser transmitida por la suspensión. El instrumento integra la curva de intensidad de luz transmitida durante los 10 segundos posteriores al detenimiento y calcula un índice conocido como Índice de Agregación.

También han sido desarrollados varios instrumentos automáticos para medir la agregación eritrocitaria por retrodifusión láser, el Eritroagregómetro Regulest, el L.O.R.C.A. (Analizador celular rotacional

óptico láser), entre otros. El LO.R.C.A permite medir automáticamente la agregación eritrocitaria por difracción láser. El haz láser atraviesa la suspensión de GR y la intensidad de la luz retrodifundida (back scattered) es medida por sensores fotoeléctricos.

3-1-4 Eco-ultrasónico^{135-136-137.}

Una de las dificultades asociadas con la intensidad lumínica transmitida, es que puede ser sólo aplicada a muestras de sangre con Hto normal o bajo, por la alta absorción de luz inducida por la sangre. En contraste con esto, la técnica basada en eco-ultrasónico puede ser aplicada a grandes suspensiones de muestra y con varios Htos. La señal de esparramiento ultrasónica para la sangre es una función de la frecuencia del haz ultrasónico incidente, del volumen de células, de la densidad de GR y plasma, del Hto y de un factor de compactación el cual depende de la interacción entre las células.

3-2 ESTIMACION CUANTITATIVA DE LA MORFOLOGIA DE LOS AGREGADOS ERITROCITARIOS.

Un alto número de intentos fueron hechos para evaluar la morfología de los agregados de GR, directa ó indirectamente¹⁴⁶.

Entre los distintos métodos utilizados para estudiar la agregación eritrocitaria, hemos elegido para este trabajo de tesis, la determinación del **ASP** (*RBC aggregate shape parameter*) .

3-2-1- ASP:

Parámetro de la forma de los agregados de los glóbulos rojos.

La morfología de los agregados es caracterizada por un parámetro adimensional definido por la siguiente ecuación:

$$ASP = 4 \cdot \pi \cdot A / P^2$$

Donde:

- A es el área proyectada del agregado
- P es el perímetro proyectado del agregado

Donde un círculo tiene la máxima relación Área / Perímetro. Los valores de ASP varían de 0 a 1.

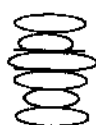
ASP=0.68

GR sólo



ASP=0.25

Rouleaux



ASP= 0.4

Cluster



Figura 3-2-1-1- Representación esquemática del "rouleaux" y del "cluster"

Como se muestra en la Figura 3-2-1-1, un agregado globular tiene un ASP aproximado a 1, cuanto más largo es el agregado, más bajo es el ASP. La agregación de GR, es un parámetro fundamental para la comprensión de las propiedades reológicas de la sangre¹⁴⁷.

3-2-2- OBJETIVOS

Estudiar por visualización microscópica directa, la morfología de los agregados de GR:

- *A- Sin tratar*
- *B- Tratados con enzimas*
- *C- Glicosilados*
- *D- de diabéticos*
- *E- de hipertensos*

3-2-3- MATERIALES

3-2-3-1- REACTIVOS

-Buffer fosfato (PBS) pH 7.4:

$\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}.12\text{H}_2\text{O}$ 27.21 g/l $\text{Na}_2\text{PO}_4. 2\text{H}_2\text{O}$ 2.43 g

- Glucosa Cicarelli PM 198.17 Lote 161

-Tripsina de pancreas porcino Sigma Lot. 70H0439, actividad 1.130 BAEE unit/mg sólido (11,3U/10ml),

-2-4 dimetil amino benzaldehído (Merk Art. 103058, lot. 002596112498)

3-2-3-2- MATERIAL BIOLÓGICO

Se trabajó con muestras de sangre provenientes de:

- 40 dadores normales del Servicio de Hemoterapia,
- 36 pacientes diabéticos insulino-dependientes y no insulino-dependientes, con microangiopatía diabética, derivados del Servicio de Oftalmología del Hospital Provincial del Centenario y
- 20 pacientes con hipertensión esencial provenientes del Servicio de Clínica Médica del Hospital Provincial del Centenario.

La sangre, fue extraída por punción venosa, anticoagulada con EDTA y centrifugada para separar los GR del plasma. Los hematíes separados, fueron resuspendidos al 2% en plasma autólogo.

3-2-3-3- INSTRUMENTAL

El estudio de la morfología de los agregados se realizó por **análisis de imágenes digitalizadas.**

Las poblaciones de GR fueron visualizadas por un microscopio óptico invertido (Union Optical Tokyo) (aumento 10 x40). Las imágenes fueron registradas por una vídeo cámara (Sony) y digitalizadas por un equipo computarizado con un procesador de imagen con software IPP PLUS 2.1.

Se trazó el perímetro y área proyectada de los agregados, se almacenaron los datos en la PC, se procesaron numéricamente y por último se calculó el valor de redondez de cada agregado analizado.

3-2-4- METODO

3-2-4-A- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

DE LOS AGREGADOS DE GR SIN TRATAMIENTO PREVIO

La suspensión de GR preparada en un tubo, fue suavemente homogeneizada, mediante 30 inversiones lentas, e inmediatamente, colocada en el portaobjetos excavado. El porta fue colocado sobre la platina del microscopio invertido. Luego de 2 minutos de reposo, fueron tomadas las microfotografías de los agregados eritrocitarios. El agregado fue analizado por tamaño, redondez, área y perímetro proyectado.

Los valores de ASP resultan del promedio correspondiente a los agregados observados en 5 campos distintos.

3-2-4-B ESTUDIO DE LA MORFOLOGIA

DE LOS AGREGADOS DE GR TRATADOS CON ENZIMAS¹⁶³

En condiciones anormales, los GR forman agregados irregulares. Tales alteraciones pueden surgir de factores celulares o extracelulares.

El estudio de factores celulares que inciden en la agregación eritrocitaria, fue modelizado a través de la digestión del glicocálix con tripsina a distintos tiempos de incubación.

3-2-4-B-1-Tratamiento enzimático de los GR¹⁴¹

Procedimiento

Las suspensiones de GR fueron fraccionadas en 4 alícuotas. Una de ellas sin tratar fue tomada como muestra control. Se adicionó tripsina a una concentración de 5 mg/ml de células rojas, a las otras 3 alícuotas y se incubaron a 37°C por 15, 30 y 60 min. Luego de la incubación, cada alícuota fue inmediatamente centrifugada por 5 min., los sobrenadantes fueron removidos y las células rojas lavadas 3 veces con PBS para obtener una suspensión libre de tripsina.

Se prepararon suspensiones de GR al 2% en plasma autólogo.

Luego se realizó la observación microscópica y el estudio de los agregados de la misma manera que en 3-2-4-A.

En los sobrenadantes de las muestras tratadas se determinó el ácido siálico por la técnica de Erlich, descrita en el capítulo anterior (2-2-2-B-3).

3-2-4-C- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

DE LOS AGREGADOS DE GR GLICOSILADOS

El proceso de glicosilación no-enzimática de proteínas involucra también a proteínas de la membrana eritrocitaria. Altos niveles de glicosilación de proteínas membranales son encontrados en diabéticos. Las proteínas más glicosiladas son glicoforina A y Banda 3 ¹⁴⁹⁻¹⁵⁰.

En la incubación in vitro fueron usadas concentraciones de glucosa no fisiológicas (5%-10%), éstas fueron elegidas para acelerar la glicosilación no-enzimática que depende del tiempo de exposición con glucosa. Largos tiempos de incubación ó altas concentraciones de glucosa pueden alterar la integridad y fluidez de la membrana eritrocitaria y como consecuencia sus propiedades hemorreológicas ¹³⁸.

3-2-4-C-1- Glicosilación de GR

Procedimiento

Los GR empaquetados se lavaron tres veces con PBS. Luego fueron separados y divididos en tres alícuotas. Una se tomó como control y las otras dos, fueron diluidas al 10% e incubadas 2 hs a 37°C con soluciones de glucosa en PBS al 5% P/V, 10% P/V, respectivamente.

El estudio de los agregados se realizó de la misma manera que en 3-2-4-A.

3-2-4-D- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

DE LOS AGREGADOS DE GR DE DIABETICOS ¹⁶⁴⁻¹⁶⁵⁻¹⁶⁶

La patogénesis de la microangiopatía diabética ha sido estrechamente vinculada con anormalidades del flujo sanguíneo por hiperviscosidad e hiperagregación eritrocitaria ¹⁴⁸⁻¹⁵¹⁻¹⁵²⁻¹⁵³⁻¹⁵⁴⁻¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁻¹⁵⁸

Con el objeto de investigar la agregación eritrocitaria se estudiaron 36 pacientes diabéticos aplicando para ello el ASP.

Las muestras se procesaron de la misma manera que en las experiencias anteriores (3-2-4-A).

3-2-4-E- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

DE LOS AGREGADOS DE GR DE HIPERTENSOS.

Durante la hipertensión arterial esencial y secundaria, es posible observar cambios en la microcirculación, asociados con una reducción en la oxigenación tisular debido en parte a cambios hemorreológicos como incremento de la viscosidad sanguínea, hiperagregación, entre otros¹⁵⁶⁻¹⁵⁹⁻¹⁶⁰⁻¹⁶¹.

Con el objetivo de investigar la agregación eritrocitaria, se estudiaron 20 pacientes con hipertensión esencial, aplicando para ello el ASP. Las muestras se procesaron de la misma manera que en las experiencias anteriores (3-2-4-A).

3-2-5- RESULTADOS

3-2-5-A- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

DE LOS AGREGADOS DE GR SIN TRATAMIENTO PREVIO.

Los valores de ASP han sido evaluados sobre un $n = 40$, resultando el valor de media = 0.25 y 0.05 el desvío standard.

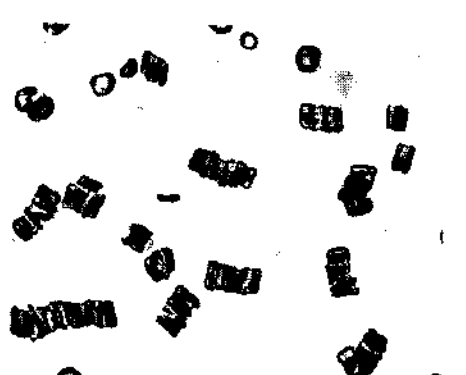
Nº	A	P	ASP	Nº	A	P	ASP	Nº	A	P	ASP	Nº	A	P	ASP
1	847	206	0.25	11	828	200	0.26	21	718	190	0.25	31	708	185	0.26
2	635	163	0.3	12	836	205	0.25	22	749	198	0.24	32	617	202	0.19
3	939	202	0.37	13	650	165	0.3	23	706	178	0.28	33	626	209	0.18
4	556	178	0.22	14	919	203	0.28	24	635	135	0.3	34	882	189	0.31
5	494	168	0.22	15	811	206	0.24	25	939	256	0.18	35	497	204	0.15
6	961	204	0.29	16	492	178	0.22	26	845	202	0.26	36	933	201	0.29
7	836	205	0.25	17	711	189	0.25	27	436	151	0.24	37	694	199	0.22
8	616	214	0.12	18	387	156	0.2	28	933	201	0.29	38	772	201	0.24
9	772	197	0.25	19	989	197	0.32	29	984	203	0.3	39	845	206	0.25
10	860	200	0.27	20	997	201	0.31	30	473	187	0.17	40	828	200	0.26

Tabla 3-2-5-A. Valores de área ($A \mu m^2$), perímetro ($P \mu m$) y ASP de agregados de GR sin tratar para $n=40$

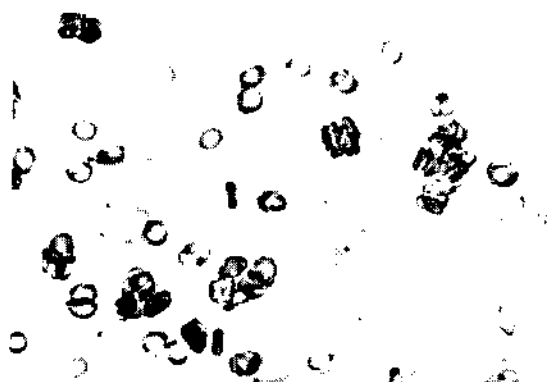
3-2-5-B- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LOS AGREGADOS DE GR TRIPSINADOS.

3-2-5-B-1- Resultados

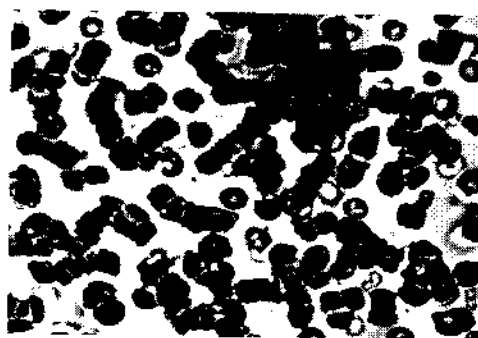
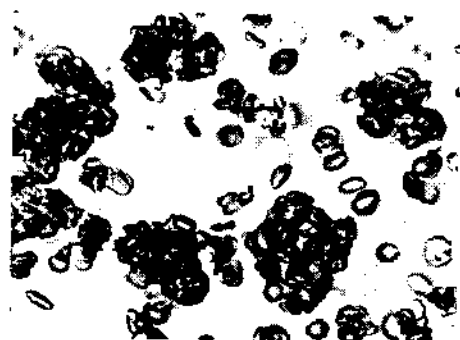
En la figura 3-2-5-B, se presentan las microfotografías de las imágenes correspondientes a los GR sin tratar y tripsinados a distintos tiempos de incubación.



GR sin tratar resusp. en plasma autólogo.



GR tripsinados 15 min. resusp. en plasma autólogo.



GR tripsinados 30 min resusp. en plasma autólogo. GR tripsinados 60 min.resusp. en plasma autólogo.

Figura 3-2-5-B. Microfotografía de los agregados de GR tripsinados a distintos tiempos de incubación

Los resultados de ASP de los agregados de GR sin tratar y tripsinados a distintos tiempos de incubación y el AS liberado, se presentan en la siguiente tabla:

Glóbulos rojos	Ac siálico ($\mu\text{mol/l}$)	ASP
sin tratar	—	0.25 ± 0.05
tripsinados 15 min	0.5 ± 0.08	0.45 ± 0.04
tripsinados 30 min	2.5 ± 0.21	0.60 ± 0.06
tripsinados 60 min	5.5 ± 0.49	0.70 ± 0.08

Tabla 3-2-5-B. Valores de ASP y AS liberado de GR sin tratar y tripsinados a distintos tiempos de incubación.

En la Tabla 3-2-5-B se observa un aumento progresivo en ambos parámetros con el tiempo de incubación.

Graficando (Gráf. 3-2-5-B) los valores de AS y ASP con respecto a los tiempos de tratamiento enzimático, se observa un aumento progresivo en ambos parámetros.

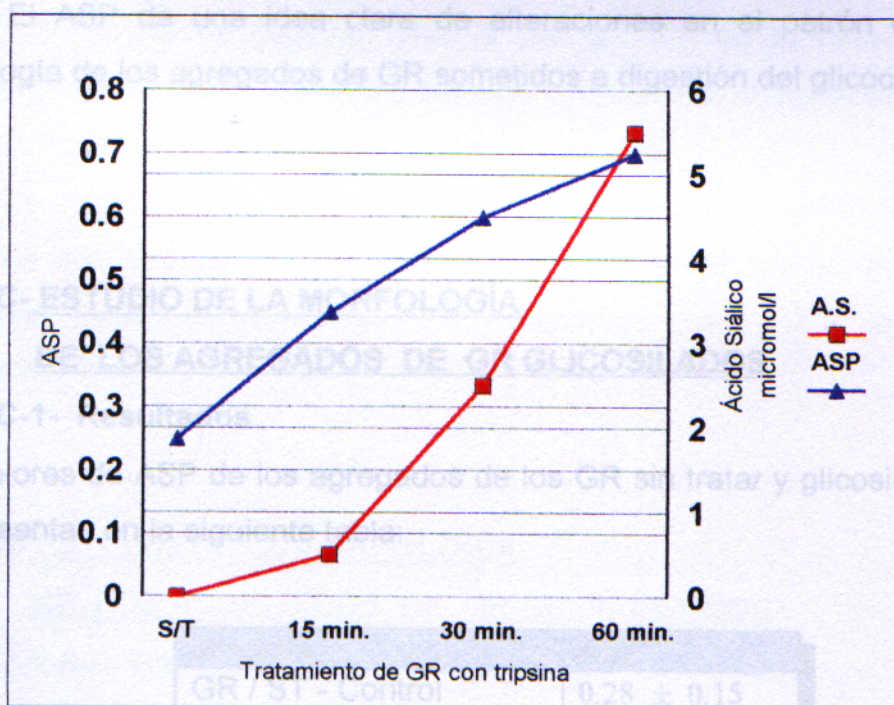


Gráfico 3-2-5-B. Representación de ASP y Acido Siálico (AS) según el tiempo de tripsinación de GR.

Tabla 3-2-5-C. Valores de ASP de suspensiones de GR sin tratar y glicosilados.

3-2-5-B-2- Análisis estadístico

El estudio de asociación de ambos parámetros (AS y ASP) fue realizado por el coeficiente de correlación de Pearson el cual muestra un valor de correlación directo fuertemente significativo de 0.8830 y una probabilidad asociada de $p+0.0001$.

3-2-5-B- Discusión de los resultados:

El ASP es una medida cuantitativa de la morfología de los agregados eritrocitarios.

Al aumentar el tiempo de incubación de la tripsina con los GR se produce una desialización progresiva de la membrana evidenciada por el aumento del AS liberado. Como consecuencia de ello se observa la formación de *clusters* que llevan a valores progresivamente aumentados del ASP.

La morfología del agregado es característica del agente agregante y de las propiedades estructurales celulares.

El ASP da una idea clara de alteraciones en el patrón de la morfología de los agregados de GR sometidos a digestión del glicocáliz.

3-2-5-C- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

DE LOS AGREGADOS DE GR GLICOSILADOS

3-2-5-C-1- Resultados

Los valores de ASP de los agregados de los GR sin tratar y glicosilados se presentan en la siguiente tabla:

Muestra	ASP
GR / ST - Control	0.28 ± 0.15
GR glicosilados al 5%	0.55 ± 0.14
GR glicosilados al 10%	0.72 ± 0.16

Tabla 3-2-5-C. Valores de ASP de suspensiones de GR sin tratar y glicosilados.

Los resultados muestran valores de ASP aumentados para los GR glicosilados respecto de los controles.

3-2-5-C-2- Análisis estadístico.

Los valores de ASP son marcadamente mayores para los GR glicosilados al 5% (0.55) y 10% (0.72) que para los controles sin tratar (0.28).

Usando el test de comparaciones múltiples, basado en la suma de rangos del test de Kruskal-Wallis se puede concluir que las diferencias entre control sin tratar y glicosilados al 10% son altamente significativas ($p < 0.00001$), pero las diferencias son moderadamente significativas cuando los controles sin tratar son comparados con los GR glicosilados al 5%.

3-2-5-C-3- Discusión de los resultados

Los resultados sugieren que la glicosilación de la membrana determina un aumento de la agregación eritrocitaria relacionado con cambios en la estructura y propiedades de la misma.

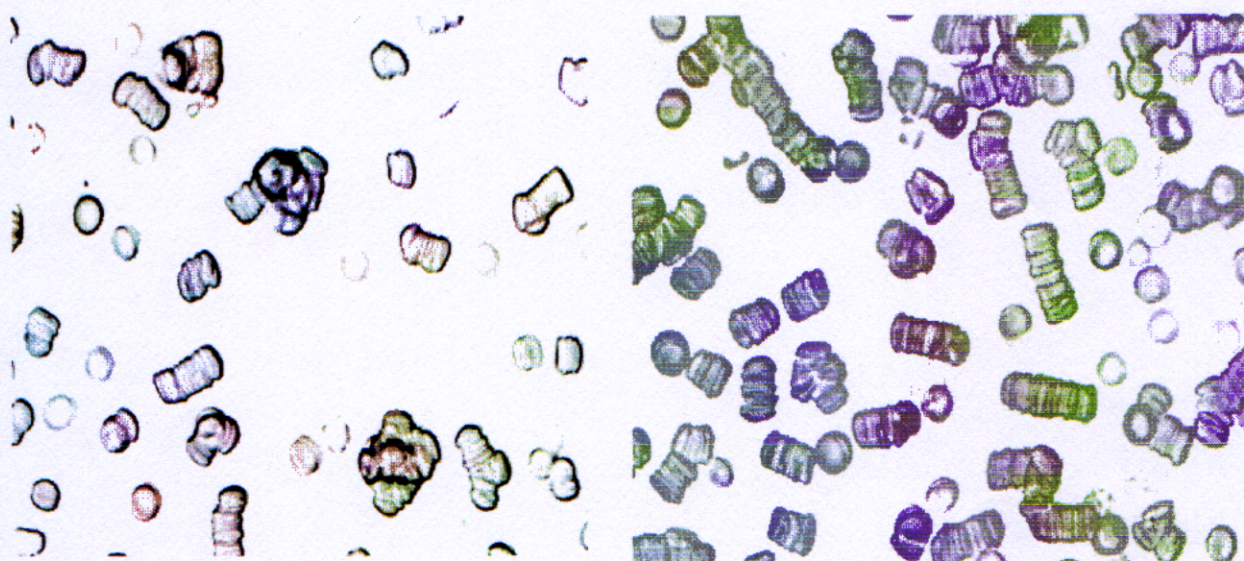
La glicosilación no-enzimática puede ayudar a dilucidar la hipótesis que explica parcialmente la alteración de los parámetros hemorreológicos característicos de diabéticos bajo mal control metabólico¹⁵⁰⁻¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

3-2-5-D- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

DE LOS AGREGADOS DE GR DE DIABETICOS

3-2-5-D-1- Resultados

En la figura 3-2-5-D se muestran las imágenes digitalizadas de los agregados eritrocitarios de un paciente diabético y un individuo normal.



Agregados de GR de diabético

Agregados de GR normales

Figura 3-2-5-D. En la imagen digitalizada correspondiente a los agregados de GR del paciente diabético (imagen de la izquierda) aparecen formas esferoidales, mientras que en el sujeto sano, predominan los agregados de GR cilíndricos típicos que conforman el rouleaux.

Los valores de ASP de GR normales y de diabéticos se presentan en la siguiente tabla:

Muestra	ASP
GR Normales	0.28 ± 0.15
GR Diabeticos	0.65 ± 0.18

Tabla 3-2-5-D- Valores de ASP de GR de pacientes normales y diabéticos.

3-2-5-D-2- Análisis estadístico

Los estudios estadísticos fueron realizados aplicando el test de Mann-Whitney.

Los valores de ASP resultaron significativamente mayores en pacientes diabéticos que en individuos normales con $p < 0.00001$.

3-2-5-D-3- Discusión de los resultados

El incremento de la agregación en diabéticos podría atribuirse a la desialización de la GPA, portadora de la carga mayoritaria de la membrana del GR. La glicosilación no-enzimática de proteínas de membrana de GR podría ser otro factor responsable de la hiperagregabilidad eritrocitaria en diabéticos.

Este parámetro ha demostrado ser una herramienta útil para medir desviaciones en la morfología de los agregados en estados de enfermedad.

3-2-5-E- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

DE LOS AGREGADOS DE GR DE HIPERTENSOS¹⁵⁶

3-2-5-E-1- Resultados

Los resultados de ASP de GR de pacientes normales e hipertensos se presentan en la siguiente tabla.

Muestra	ASP
GR Normales	0.28 ± 0.15
GR Hipertensos	0.69 ± 0.19

Tabla 3-2-5-2- Valores de ASP de GR de pacientes normales e hipertensos.

3-2-5-E-2- Análisis estadístico

Se hicieron ensayos de comparación de dos muestras independientes usando la estadística t de student.

Los pacientes hipertensos presentaron valores de ASP significativamente mayores que los individuos normales ($p < 0.00001$).

3-2-5-E-3- Discusión de los resultados

El aumento de la agregación de los GR de los pacientes hipertensos puede deberse a factores celulares (desialización de la

membrana eritrocitaria) ó bien a factores plasmáticos (aumento de fibrinógeno ó de inmunoglobulinas)¹⁵⁹⁻¹⁶⁰.

La determinación de ASP en pacientes con hipertensión arterial aportan datos acerca del patrón de agregación en esta patología.

Bibliografía del Cap. 3:

- 127- Stoltz J. F. Hemorheology in practice. Measurements of Rheological Properties. IOS Pres ISSN09296743. 1998
- 128- Fahraeus R. The suspension stability of blood. *Physiol. Rev.* 9 241-274.1929
- 129- Chien S. Biophysical behaviour of red cells in suspensions. In: D. M. Surgenor (ed), *The Red Blood Cells* Vol 2. Academic Press New York pp1031-1133. 1975
- 130- Schmid-Schonbein H., Gaehtgens and Hirsch. On the shear rate dependence of red cell aggregation in vitro. *J. Clin. Invest.* 47 1447-1454. 1968.
- 131- Shiga T and Maeda N. Kinetic study on aggregation of red blood cells by successive analysis of moving video images. In: Stolz JF, Donner M and Copley (eds) *Hemorheologie et agregationerythrocytaire* Vol 3 E.M. Inter, Paris, pp 38-45.1991
- 132- Chen, S., Barshtein G and Yedgar S. Monitoring of red blood cell aggregability in a flow chamber by computerised image analysis. *Clin Hemorheol.* 14, 497-508. 1994
- 133- Chabanel A. and Samana M. Evaluation of method to assess red blood cell aggregation, *Biorheology* 6, 785-797. 1989
- 134- Hardeman M.R., Goedhart P.T., Dobbe J.G.G. and Lettinga K.P., Laser -assisted optical rotational cell analyser: A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters, *Clin. Hemorheol* 14, 605-618. 1994
- 135- Sennaoui A., Boynard M. and Pautou C., Characterisation of red cell aggregate formation using an analytical model of ultrasonic back-scattering coefficient, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 44 585-591.1997
- 136- Hammi H., Perrotin P and Bonard M. Determination of red cell aggregation in young and elderly subjects evaluated by ultrasound. Influence of dihydroergocryptine mesylate. *Clin. Hemorheol.* 14 117-126. 1994
- 137- Coutier G., Shung K.K. Study of red cell aggregation in pulsatile flow from ultrasonic Doppler power measurements. *Biorheology* 30 443-461. 1993

- 138- Zavodnik Y., Piasecka A., Scand J. Human red blood cells membrane potential and fluidity in glucosa solutions. *J. Clin. Lab. Invest.* 57:59-63. 1997
- 139- Kelm S., Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.* 175: 137-240. 1997
- 140- Stolz J.F., Paulus F. and Donner M. Experimental approaches to erythrocyte aggregation. *Clin.Hemorheol.* 7: 109-118. 1987
- 141- Suyama K., Goldstein J., Enzimatic evidence within the red cell membrane. *Blood* 75 (1): 255-260, 1990.
- 142- Schmid-Schönbein H. and at. The red cells as a fluid droplet: tank treading motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science* 202. 894-896-1978
- 143- Schmid-Schönbein H. and at. A counter-rotating rheoscope chamber for the study of the microrheology f blood. *Microvasc. Res.* 6 355-376 . 1973
- 144- Chien S.; Sung L.: Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clinical Hemorheology* 7, 71-91. 1987.
- 145- Riha P. The influence of RBC aggregation on the flow in large vessels In Stitz (ed) *Hémorhéologie et agrégation érythrocytaire*. Vol 3 E.M. Inter Paris. pp 173-180 . 1991
- 146- Chen S., Gavish B., Zhang S., Mahler Y., and Yerdgar S. Monitoring of erythrocyte aggregate morphology under flow by computerized image analysis. *Biorheology* Vol 32, N°4, pp 487-496, 1995.
- 147- Chen S., Gavish B. and Yerdgar S. Red blood cell aggregability *European Journal of Clinical Investigation* pp 747-754. 1996.
- 148- Lapolla A., Calabro A., Gerhardinger C. Dal Frá M. G. Crepaldi G. Glicated erythrocyte membrane proteins and haemorheological parameters in insulin dependent diabetic subjets. *Clinical Hemorreology* Vol. 11 N° 5, pp 405-415. 1991.
- 149- Miller J.A.; Gravallesse, E.; Bunn F. H. Nonenzymatic glycosylation of erythrcyte membrane proteins *J. Clin. Invest.* 65: 896-901, 1980.
- 150- Schleicher, E.; Sheller L.; Wieland O. H. Quantitative investigation of nonenzymatic glucosylation of erythrocyte membrane from normal and diabetic persons *Horm. Metab. Res. suppl.* 11: 95-97, 1981.

- 151- Mc Millan D. E. Plasma protein changes , blood viscosity and diabetic microangiopathy . Diabetes 25 (supl.2): 858-864, 1983.
- 152- Mazzanti L., Faloia E., et al Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process Clin. Biochem. 25:41-46, 1992.
- 153- Mazzanti I. Rabini R., Curatola G. Sialic acid, Diabetes and aging: A study on the erythrocyte membrane Metabolism Vol 46 N°1 pp 59-61. 1997.
- 154- Crook MA., Tutt P., Simpson H., et al. Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus. Clin. Chim. Acta 219:131-138, 1993.
- 155- Yokoyama H., Jensen JS., et al. Serum sialic acid concentration is elevated in IDDM especially in early diabetic nephropathy J. Intern. med. 237:519-523. 1995
- 156- Lindberg G., Eklund GA., et al. Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality. Br. Med. J. 302:143-146, 1991.
- 157- Rogers ME, Williams DT, Niththyananthan R, Rampling MW, Heslop KE, Johnston DG. Decrease in erythrocyte glycoprotein sialic acid content is associated with increased erythrocyte aggregation in human diabetes. Clin. Sci 82 (3): 309-313, 1992.
- 158- Crook M.A., Tutt P. et al. Elevated serum sialic acid concentration in NIDDM and its relationship to blood pressure and retinopathy. Diabetes Care. 16:57-60. 1993.
- 159- Chabanel A., Klaren J., Andreu G., Samara M. In spite of elevated plasma fibrinogen, red blood cell aggregation is not increased in smokers. Clin.Hemorheol. 12:455-460, 1992.
- 160- Donner M., Mills P., Stolz JF. Influence of plasma proteins on erythrocyte aggregation. Clin. Hemorheology 9:715-721. 1989.
- 161- Izumida Y., Seiyama A., Shiga T. Erythrocyte aggregation brought by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. Biochim. Biophys Acta 1067:221-226. 1991.
- 162- Skalak R., Zarda PR., Jan KM., Chien S. Mechanic of rouleaux formation. Biophys J. 35:771-776, 1981.

163- Plá L., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. y Rasia R. Effect of sialic acid digestion by trypsin on the morphology of erythrocyte aggregates. *Biorheology* ISSN 0006-355X Vol 36 N° 1 pp 186. 1999

164- D'Arrigo M., Foresto P., Carrera L., Etchepare Cuezio R., Racca L., Valverde J. y Rasia R. Agregación eritrocitaria y diabetes. *Medicina* Vol. 59 N° 5/2 pp. 602. 1999.

165- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J., Rasia R Microscopic image analysis of aggregate morphology applied to the diagnostic of vascular diseases. *Medical diagnostic techniques and procedures* Editors Megha Singh, Patl K.M., Radhakrishnan S., Reddy M.R.S. Narosa Publishing House ISBN 81-7319-350-9 pp 488-491. 1999

166- Plá L., Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J., Rasia R. Morphology in human erythrocyte aggregate diabetes. *Clinical chemistry and Laboratory Medicine* ISSN 1437-8523 Vol 37 pp124. 1999

167- Plá L., D'Arrigo M., Foresto P., Carrera L., Etchepare Cuezio R., Racca L., Valverde J. y Rasia R. Abnormal morphology of erythrocyte aggregates in diabetes by processing digitized microscopic images. *Biorheology* ISSN 0006-355X Vol 36 N° 1 pp 185. 1999

CAPÍTULO 4

ADHESIÓN CELULAR

4- EL FENOMENO DE ADHESIÓN CELULAR:

La adhesión celular está involucrada en varios procesos, tales como:

- ✓ desarrollo celular
- ✓ respuesta inmune (transplante)
- ✓ *homing* de linfocitos
- ✓ cáncer
- ✓ enfermedad inflamatoria
- ✓ reparación de lesiones, etc.

Todas las células de la sangre son capaces de adherirse a las células endoteliales: por ej. GR, L y Pq. Sólomente el mecanismo de adhesión de L está precisamente identificado, donde el mismo aparece como un paso obligado para el tránsito leucocitario. Las citoquinas (inflamación) y derivados del oxígeno libre (hipoxia e isquemia) son los factores disparadores de este proceso. La adhesión inestable, dada por selectinas y PAF, es el primer paso, seguido por la adhesión estable, ligada a las familias de moléculas de adhesión ICAM, VECAM.

Recientemente se demostró que las plaquetas son atraídas por PECAM y P-selectinas sobre las células endoteliales, en condiciones especiales.

Es poco conocido el mecanismo de la adhesión de GR a las células endoteliales, donde están involucradas las moléculas de adhesión VLA-4 y VECAM para las células jóvenes y productos glicosilados o neoestructuras de membrana en condiciones patológicas.

Las moléculas de adhesión expresadas sobre la superficie de las células endoteliales (en vénulas poscapilares), L, Pq y GR sirven para comprender ordenadamente la secuencia de las interacciones célula-célula.

Estas interacciones de adhesión son reguladas por la activación secuencial de diferentes familias de moléculas de adhesión expresadas sobre la superficie de L, Pq, GR y células endoteliales.

Las moléculas de superficie celular involucradas en la adhesión pueden pertenecer a uno de los 6 grupos siguientes y cada uno tiene funciones especializadas:

1. **Selectinas.**
2. **Integrinas.**
3. **Miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas**
(IGSF: Immunoglobulin superfamily)
4. **Metaloproteinasas de la matriz (MMPs: Matrix metalloproteinases)**
5. **Cadherinas**
6. **Moléculas de CD44**

1. **Selectinas:** Las selectinas, designadas como L-, P-, y E-selectinas, representan una familia de receptores expresados sobre leucocitos (L), plaquetas (P) y células endoteliales o células endoteliales solamente (E). Las E-selectinas son expresadas en respuesta a endotoxinas y citoquinas IL-1 y TNF. Las P-selectinas están conservadas en gránulos de células endoteliales y plaquetas y son movilizadas hacia la superficie celular en respuesta a trombina, histamina y citoquinas. Estas glicoproteínas son una familia simple porque ellas tienen una estructura mosaico consistente en una cadena hidrocarbonada con un grupo-NH₂ terminal, un factor dominante epidérmico, una serie de dos a nueve secuencias proteicas repetidas similares que unen complemento, un dominio transmembranal y un pequeño dominio C- terminal citoplasmático.

Estudios usando selectinas quiméricas indican que tanto, la cadena hidrocarbonada como el factor epidérmico dominante, están directamente involucrados en la adhesión celular y deben determinar la especificidad de la unión del ligando. El mayor ligando para la tres selectinas son los tetrasacáridos sializados Lewis X y Lewis A.

2. **Integrinas:** Las integrinas son proteínas heterodímeras formadas por subunidades α y β asociadas covalentemente. Se encuentran predominantemente sobre la superficie de L y también en las Pq. Las integrinas se activan por medio de un cambio en su conformación. Hasta el presente son conocidas 15 cadenas α y 8 cadenas β . Los L pueden expresar 13 formas de integrinas diferentes, formando subfamilias b1, b2 ,b7, actuando como importantes moduladores de la adhesión celular.

Las integrinas de la subfamilia b2 están constituidas por una subunidad común β (CD18) unida a una de tres subunidades α inmunológicamente distintas, designadas CD11a, CD11b y CD11c.

CD11a y CD18 están expresadas sobre la superficie de leucocitos, los cuales interactúan con moléculas de adhesión celular (ICAM)-1 e ICAM-2 sobre células endoteliales, para promover la adhesión leucocitaria.

3. **Superfamilia de inmunoglobulinas:** se denomina así a un conjunto de moléculas superficiales que poseen unidades o dominios (regiones globulares estabilizadas por puentes disulfuros intracatenarios) con homología estructural a las porciones V (variable) y C (constante) de las inmunoglobulinas.

Estos dominios poseen 70-110 aa, usualmente con un puente disulfuro intracatenario entre cisteínas separadas 55-75 residuos. La mayoría son proteínas integrales de membrana, con un segmento hidrofóbico transmembranal. Esta homología estructural no implica que estas moléculas estén relacionadas funcionalmente¹⁷¹.

Las moléculas de esta familia están involucrados en interacciones:

-Leucocitos-célula endotelial: N-CAM (CD56), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (CD106)

-Molécula de adhesión plaqueta-célula endotelial PECAM-1 (CD31)

4. **Metaloproteinasas de la matriz (MMPs)**: pueden dividirse en 4 grupos: colagenasas, gelatinasas, estromalisina y membranal. Mmp8 y Mmp9 están conservadas dentro de los gránulos de neutrófilos, mientras que otras MMPs se producen en respuesta a la estimulación de células por agentes tales como, citoquinas y hormonas. Las MMPs son secretadas como proenzimas inactivas, su activación se produce por proteólisis o tratamiento con compuestos mercuriales que remueven el fragmento terminal de 10kD, contiene zinc en su sitio activo y es inhibida por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Son enzimas que clivan componentes de la matriz celular.

5. **Cadherinas**: Existen diferentes cadherinas: N-cadherina (neuronal), P-cadherina (placentaria) y E-cadherin (epitelial). Interactúan de una manera sub-clase específica sobre el lado

extracelular. Del lado citoplasmático, las moléculas de cadherinas, interactúan con cateninas.

6. **CD44:** Esta molécula, llamada CD44 por el Third International Workshop and Conference on Leukocyte Differentiation Antigen 1994, es codificado por un pequeño locus del cromosoma 11. Es sintetizado como una molécula precursora de 76 kDa que es glicosilada y pasa a formas de 80 y 90 kDa o a formas de 180 - 200 kDa cuando adiciona condroitin sulfato. La expresión del CD44, como se refirió en capítulos anteriores, es controlada por un gen *In(Lu)* dominante⁵².

El gen CD44 consiste en 20 exones, de los cuales 10, son expresados normalmente en la forma que codifica CD44H. Los otros exones (términos V1-V10) codifican la región extracelular, pueden expresarse por empalmes alternativos del RNA nuclear. El CD44H está distribuido en muchos tejidos, mientras las variantes isomorfas son vistas de manera más restricta encontrándose predominantemente en células tumorales¹⁸².

La molécula de p80 CD44 de L, la molécula *pgp-1*, el receptor tipo III de la matriz de fibroblastos, la proteína *In(Lu)* de GR de PM 80, son todas la misma molécula¹⁷³⁻¹⁷⁶.

Esta glicoproteína ha sido estudiada por diferentes autores en distintos trabajos, ha sido referida como *Pgp-1*, *Ly-24*, *ECMMRIII*, *gp90* y *H-CAM*.

Estudios posteriores han demostrado que esta proteína está fuertemente relacionada o es idéntica a otra y representa el CD44, uno de los "cluster" de diferenciación antigénicos en L y GR. La proteína CD44 media la interacción entre L y células endoteliales altas durante el *homing* de linfocitos. También está implicada en otros eventos incluyendo interacciones de células endoteliales con eritrocitos.

El CD44 parece intervenir en la interacción entre las células del estroma y las células eritropoyéticas de la médula ósea, las cuales involucran hialuronato.

El receptor de hialuronato, una glicoproteína de 85 kD, es el responsable de la adhesión de células a hialuronato y condroitín sulfato en la matriz extracelular¹⁸⁴⁻¹⁸⁵.

Este receptor está presente sobre una variedad de células incluyendo macrófagos, células epiteliales y algunas neuronas.

El receptor de hialuronato parece estar asociado con filamentos de actina¹⁷⁹, una característica que debe permitir medir señales transmembranales entre la matriz extracelular y el citoesqueleto. Se lo encuentra asociado a ciertos estados patológicos como la hipertensión arterial¹⁷².

El CD44, glicoproteína de membrana involucrada en la adhesión celular, es similar al receptor de hialuronato con respecto a su peso molecular, punto isoelectrico, presencia de grupos fosfatos, distribución tisular y asociación con filamentos de actina.

La conexión entre el receptor de hialuronato y CD44 fue inicialmente sugerido por los estudios de Goldstein et al¹⁷⁴ y Stamenkovic et al.¹⁷⁵ Estos trabajos reportaron que el dominio extracelular de CD44 es homólogo a la región que une hialuronato de la proteína unida al cartílago. Estos hallazgos sugieren que el CD44 es capaz de unir hialurónico, y así semejarse fuertemente al receptor de hialuronato.^{176-177-178.}

El CD44 es capaz de unir tres ligandos diferentes:

- hialuronato,
- colágeno tipo I- VI y
- adhesina de mucosa vascular, una proteína presente sobre células endoteliales altas especializadas .

La habilidad del CD44 de unir a más de un ligando se da, por ser miembro de una super familia de proteínas unidas al cartílago¹⁸⁶. La proteína unida al cartílago, por sí, es capaz de unir a tres ligandos: hialuronato, la proteína core de cartílago y colágeno.

La interacción de CD44 con diferentes ligandos parece ser mediada por distintos tipos de adhesión celular. Por ejemplo la interacción de CD44 con hialuronato, media la agregación independiente de catión divalente de macrófagos y fibroblastos. La secuencia de CD44 revela que el dominio extracelular NH₂- terminal, es homólogo a la proteína unida al cartílago, sugiriendo que el sitio de unión del hialuronato está localizado sobre la región distal de la molécula.

El hialuronato está ampliamente distribuido en la matriz extracelular e interviene en muchos fenómenos biológicos, incluyendo adhesión célula-célula, migración celular, desarrollo embrionario y patogénesis¹⁷⁴⁻¹⁸³.

Muchas investigaciones han sido realizadas para dilucidar las interacciones de células sanguíneas-células vasculares. Estas han estado dirigidas a estudiar reacciones entre plaquetas-pared vascular y más recientemente a interacciones leucocitos-célula endotelial. Mayores desarrollos han sido posibles luego de la identificación de las bases moleculares de estos procesos.

Desde la descripción de una anormal interacción de eritrocitos con el endotelio en ciertas patologías como anemia "*sickle cell*", diabetes mellitus, hipertensión, vasculopatías y malaria, las bases moleculares de la anormal adhesión de eritrocitos a las células endoteliales han sido de

interés en estos últimos años. Diferentes propuestas han sido usadas para determinar las interacciones eritrocitos-endotelio¹⁷²⁻¹⁸⁷.

La adhesión fue estudiada, en este trabajo de Tesis, bajo condiciones estáticas y dinámicas:

- **En condiciones estáticas**, se utilizó como modelo el sistema Receptor de Hialuronato (CD44) - Hialuronato, observando macroscópicamente, el fenómeno por adhesión (aglutinación) eritrocitaria.
- **En condiciones dinámicas**, se midió la energía intercambiada en la reacción de adhesión eritrocito-hialuronato, empleando una cámara de flujo controlado.

4-1- ESTUDIO DE LA ADHESIÓN ERITROCITARIA EN CONDICIONES ESTÁTICAS.

Sistema Receptor de Hialuronato (CD44) - Hialuronato

Para este modelo se desarrollaron dos técnicas:

a- Técnica de Adhesión (aglutinación) Directa.

Donde investigamos al receptor de Hialuronato (CD44) en la membrana eritrocitaria.

b- Test de Inhibición de la Adhesión (aglutinación).

Donde se determina el Receptor de Hialuronato (CD44) soluble en suero.

4-1-1- TÉCNICA DE ADHESIÓN (aglutinación) DIRECTA.

La prueba de adhesión (aglutinación) directa, es la clásica reacción de agregación de células mediada entre un receptor y su ligando específico. La mayor aplicación de estas reacciones está dirigida a la tipificación de antígenos eritrocitarios y a la determinación de sus anticuerpos específicos. Cuando el fenómeno de adhesión no es visualizado, se hace necesario modificar el medio de reacción o la membrana eritrocitaria. La estrategia se basa en disminuir el potencial ζ por distintos mecanismos:

1. **Medio macromolecular:** el uso de albúmina u otras macromoléculas como el dextrán o polietilenglicol aumentan la μ y disminuyen el potencial ζ .
2. **Medio enzimático:** el uso de enzimas proteolíticas: tripsina, bromelina, quimotripsina, papaína, pronasa, entre otras, alteran la membrana eritrocitaria, disminuyendo el contenido de AS de la membrana, la carga de la membrana eritrocitaria y el potencial ζ .

Con el objeto de estandarizar las condiciones óptimas de trabajo, se desarrolló la técnica de adhesión (aglutinación) en distintas condiciones de tiempo, temperatura y medio de reacción.

4-1-1-1- Estandarización de las condiciones óptimas de trabajo: temperatura, tiempo de incubación y medio de reacción.

4-1-1-1-A MATERIALES

4-1-1-1-A-1- Reactivos

-PBS

-Bromelina

-Albúmina

-Hialuronato. (Hyaluronic acid sodium salt from human umbilical cord. H1876. Lot 77H0544. Sigma.)

Preparación de la solución de trabajo:

La solución de trabajo se preparó disolviendo 5 mg de hialuronato en 1ml de PBS. La mezcla se fraccionó y conservó a -20°C. Las soluciones de trabajo una vez descongeladas y usadas fueron descartadas

4-1-1-1-A-2- Material biológico

-Eritrocitos y plasma:

Para investigar el Receptor de Hialuronato (CD44) eritrocitario, se trabajó con GR "O" y plasma.

El plasma aporta proteínas y cationes divalentes, requeridos para la adherencia¹⁸⁸.

Se utilizó sangre, extraída por punción venosa anticoagulada con EDTA proveniente de 30 dadores del Servicio de Hemoterapia del Hospital Provincial del Centenario de Rosario y sangre de cordón umbilical de 30 recién nacidos de la Sala de Maternidad del mismo Hospital.

4-1-1-1-B- PROCEDIMIENTO**Prueba cualitativa.**

En un tubo se colocaron volúmenes iguales de:

- suspensión de GR al 2% en PBS
- solución de trabajo de hialuronato
- plasma autólogo
- medio de reacción: solución fisiológica, bromelina o albúmina

Las pruebas se realizaron en paralelo con GR de adulto y de recién nacido.

Se trabajó en distintas condiciones de reacción:

- **temperatura:** 4°C, 20°C y 37°C.

- **tiempo:** 1 Hs, 2Hs y 12 Hs.

- **medio de reacción:**

- Medio salino: solución fisiológica
- Medio enzimático: bromelina
- Medio macromolecular: albúmina

Las células se resuspendieron por agitación suave observando adhesión (aglutinación) macroscópica sin centrifugación.

4-1-1-1-C- Interpretación de los resultados:

Los resultados son expresados por medio del score, tal como lo señalan Goudeman y Marsalet¹⁶⁸, según la siguiente escala:

Escore

10	(++++)	1 aglutinado único
8	(+++)	2 a 3 aglutinados no fragmentados
5	(++)	una decena de aglutinados
2	(+)	microaglutinados
0	(-)	ausencia de aglutinados

4-1-1-1-D- Resultados:

Los resultados obtenidos se expresan en las siguientes tablas:

Temperatura	4°C	20°C	37°C
GR adultos	+++	-	-
GR cordones	++	-	-
Testigos	-	-	-

Tabla 4-1-1-1-1 Escore en cruces de la adhesión mediada por el hialuronato, a distintas temperaturas de incubación para GR de adulto y recién nacido.

Tiempo de incubación	1 Hs	2Hs	12Hs
GR adultos	-	-	+++
GR cordones	-	-	++
Testigos	-	-	-

Tabla 4-1-1-1-2 Escore en cruces de la adhesión mediada por el hialuronato, a distintos tiempos de incubación para GR de adulto y recién nacido.

Medio de reacción	SALINO	MACROMOL.	ENZIMATICO
GR adultos	+	+	+++
GR cordones	-	-	++
Testigos	-	-	-

Tabla 4-1-1-1-3 Escore en cruces de la adhesión mediada por el hialuronato, en distintos medios de reacción para GR de adulto y recién nacido.

Se seleccionaron las condiciones de trabajo que dieron el máximo escore. De acuerdo a las experiencias realizadas y a los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de trabajo fueron 4°C, 12 Hs de incubación y medio enzimático (bromelina)¹⁷⁰.

4-1-1-2- Investigación de la expresión del receptor de hialuronato (CD44) en glóbulos rojos de adulto y de cordón.

4-1-1-2-A- PROCEDIMIENTO

Se prepararon diluciones de la solución de Hialuronato en PBS, en progresión geométrica (1 a 512).

En una serie de 11 tubos, se agregó 1 volumen de *suspensión de GR al 2%* en PBS, 1 volumen de cada una de las *diluciones de hialuronato*, 1 volumen de *plasma autólogo* y un volumen *bromelina* se incubó 12Hs a 4°C.

Se trabajó en paralelo con GR de adulto y de recién nacido.

Las células se resuspendieron por agitación suave observando adhesión (aglutinación) macroscópica.

4-1-1-2-B- RESULTADOS

Para expresar numéricamente los resultados se utilizó una expresión matemática empírica llamada Parámetro de Sensibilidad (α)¹⁶⁹

($\alpha = \sum \frac{E_i}{D_i} \times 10^{-3}$, donde E= escore correspondiente a la dilución D (dilución considerada o inversa del título).

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

GLOBULOS ROJOS	Escore	α (10^{-3})
GR de ADULTO	15 $\pm$ 5	26 $\pm$ 8
GR de CORDON	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1

Tabla 4-1-1-2: E y α de la adhesión mediada por el hialuronato frente a GR de adulto y recién nacido.

4-1-1-2-C- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre la adhesión de adulto y de cordón ($p < 0.05$). Esta diferencia podría ser atribuida a una inmadurez en la expresión de receptores de Hialuronato (CD44) en el neonato.⁵²

combinación. Esto puede ser homologado a la reacción Receptor de Hialuronato(CD44) - Hialuronato

En estas reacciones, se combina primero el ligando con el receptor. La adhesión (aglutinación) indirecta de células.

4-1-1-3- APLICACIÓN

Se utilizó la técnica propuesta para estudiar la expresión del Receptor de Hialuronato (CD44) en pacientes diabéticos. Para ello se trabajó con muestras ($n=10$) de pacientes diabéticos y normales.

4-1-2-1- Estandarización de las condiciones de trabajo.

Los resultados obtenidos se expresan en la siguiente tabla:

GLOBULOS ROJOS	Escore	α (10^{-3})
GR de ADULTO	12 ± 4	23 ± 12
GR de DIABETICO	25 ± 10	92 ± 27

Tabla 4-1-1-3. E y α de la adhesión mediada por el hialuronato frente a GR de adulto y diabético.

4-1-1-3-1- DISCUSION DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó un aumento significativo entre la adhesión de GR de diabéticos y adultos normales ($p < 0.05$). Esto se podría interpretar como una mayor exposición de los receptores de Hialuronato (CD44) en los pacientes diabéticos como consecuencia de alteraciones en la membrana eritrocitaria propias de esta patología, tales como desialización.

estandarizó la expresión de resultados

4-1-2- TEST DE INHIBICION DE LA ADHESIÓN **(aglutinación).**

En las reacciones de inhibición de la aglutinación, la estimación de especificidad y título de anticuerpo se realiza en base a la competencia entre antígenos particulados y solubles por los sitios de combinación. Esto puede ser homologado a la reacción Receptor de Hialuronato(CD44) - Hialuronato.

En estas reacciones, se combina primero el ligando con el receptor soluble, inhibiendo luego la adhesión (aglutinación) indirecta de células indicadoras.

4-1-2-1- Estandarización de las condiciones de trabajo.

Podemos esquematizar el desarrollo del test de inhibición sobre el Receptor de Hialuronato (CD44) en dos etapas:

1.Etapa de inhibición: donde se conjuga el Hialuronato con su receptor (CD44). Constituyendo el sistema principal. Para ello se emplea suero, donde se desea investigar el Receptor de Hialuronato (CD44) soluble y una solución de Hialuronato.

2.Etapa de revelado: donde se manifiesta el efecto de adhesión del hialuronato remanente sobre las células indicadoras. (Sistema Secundario, constituido por eritrocitos "O" portadores de receptores de membrana para el Hialuronato).

Se determinó la dosis subaglutinante del ligando (hialuronato) y se estandarizó la expresión de resultados.

4-1-2-1-A- MATERIALES**4-1-2-1-A-1- Reactivos**

-Bromelina

-PBS

-Hialuronato. La solución de trabajo de hialuronato se preparó de la misma manera que en 4-1-1-1-A.

4-1-2-1-A-2- Material biológico

Suero (donde se investigó los niveles de Receptor de Hialuronato (CD44) soluble)

Se utilizó sangre, extraída sin anticoagulante, proveniente de:

- 30 dadores de sangre normales del Servicio de Hemoterapia del Hospital Provincial del Centenario de Rosario,
- 30 recién nacidos de la Sala de Obstetricia y Neonatología del mismo Hospital.

La sangre se dejó coagular durante una hora a temperatura ambiente y el suero fue separado por centrifugación y posteriormente congelado para su conservación hasta el momento de ser efectuada la prueba.

-Células indicadoras:

Se trabajó con Eritrocitos "O" bromelinizados y sin tratar.

-Eritrocitos "O" bromelinizados: se adicionó un volumen y medio de bromelina de concentración 5mg/ml, a un volumen de "coulot" de GR, se incubó 15 min. a 37°C. Luego los GR fueron lavados 3 veces en PBS y se suspendieron al 2% en el mismo medio.

4-1-2-1-B- METODO

Evaluación de la actividad de la solución de trabajo del Hialuronato. Determinación de la dosis subaglutinante del Hialuronato.

Con el objeto de evaluar la actividad del Hialuronato se desarrolló el test de aglutinación en medio enzimático en un tiempo.

Procedimiento:

Se utilizaron diluciones de la solución de Hialuronato en PBS, en progresión geométrica (1 a 512).

Se prepararon dos series de 11 tubos:

Serie 1: se agregó 1 volumen de cada una de las *diluciones de hialuronato*, 1 volumen de *suero* y 1 volumen de *GR "O"*.

Serie 2: se agregó 1 volumen de cada una de las *diluciones de hialuronato*, 1 volumen de *suero* y 1 volumen de *GR "O" bromelinizados*

Se incubó a distintas temperaturas: 4°C, 20°C y 37°C. y a distintos tiempos de incubación (1Hs, 2Hs, 12Hs)

Se resuspendieron las células por agitación suave observando adhesión (aglutinación) macroscópica. La reacción de adhesión (aglutinación) fue cuantificada en E en cruces.

4-1-2-1-C RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos la temperatura óptima de trabajo fue de 4°C., siendo el tiempo adecuado de incubación 12 Hs.

Los resultados se expresan en la siguiente tabla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	T
H	1: 0	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128	1: 256	1: 512	1: 1024	
GR	2(+)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GR _{BR}	4(+)	3(+)	3(+)	3(+)	3(+)	2(+)	+	+	+	+	-	-

H= diluciones de hialuronato, GR=eritrocitos "O" sin tratar, GR_{BR}=eritrocitos "O" bromelinizado, T= testigo negativo

Tabla 4-1-2-1. E en cruces de la adhesión mediada por hialuronato frente a GR bromelinizados y no bromelinizados.

El mejor score se obtuvo con GR bromelinizados. La dilución de hialuronato optima (subaglutinante) correspondió a 1:256 que se eligió como solución de trabajo en la técnica de cuantificación de la inhibición de la adhesión.

4-1-2-2- Técnica de cuantificación de la inhibición de la adhesión (aglutinación).

4-1-2-2-A- MATERIALES

Se emplearon para el Sistema Principal:

-Solución de Hialuronato en dosis óptima (1:256)

-Suero de recién nacidos y de adultos normales.

-Sistema revelador: *Pool* de eritrocitos "O" bromelinizados suspendidos al 2% en PBS.

4-2- -Testigo positivo para la adhesión: solución de Hialuronato en dosis óptima + PBS + Sistema revelador.

- Testigo negativo: PBS + Sistema revelador

4-1-2-2-B- METODO

En la primer etapa se enfrentaron volúmenes iguales de hialuronato en dosis subaglutinante, con suero de adulto y de cordón en diluciones geométricas y se incubó 12 Hs a 4°C.

Luego se midió la actividad del hialuronato no neutralizado a través de su acción adherente (aglutinante) sobre el sistema revelador.

4-1-2-2-C- RESULTADOS

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Suero	E	α
SUERO de ADULTO	33 ± 9	1.07 ± 0.35
SUERO de RECIEN NACIDO	17 ± 5	0.45 ± 0.15

Tabla 4-1-2-2. E y α de la adhesión mediada por el hialuronato frente a suero de adulto y recién nacido.

4-1-2-2-D- DISCUSION DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a la tabla 4-1-2-2-C- la sensibilidad de esta técnica no permite demostrar la presencia de receptores de Hialuronato solubles en el suero de neonatos, a diferencia de lo que ocurre en el adulto en donde se observa un poder inhibitorio. Estos resultados indicarían ausencia de CD44 en suero de recién nacido pudiéndose atribuir a una escasa o nula liberación de este receptor a nivel de la membrana eritrocitaria.

4-2-1-C- INSTRUMENTAL DISEÑO DE LA CAMARA DE ADHESION

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una cámara de adhesión o cámara de flujo controlado diseñada y construida sobre la base de la cámara propuesta por Frangos J.A. y col 109-100

4-2- ESTUDIO DE LA ADHESION ERITROCITARIA EN CONDICIONES DINÁMICAS.

DETERMINACION DE LA ENERGIA ESPECIFICA DE ADHESION POR HIALURONATO EMPLEANDO UNA CAMARA DE FLUJO CONTROLADO

Como en todo proceso de interacción celular, la adhesión eritrocito - hialuronato se produce con intercambio energético¹⁸⁰⁻¹⁸¹. Es por ello que resulta importante poder determinar la energía intercambiada en la reacción, puesto que este valor suministra una estimación de la potencia de la misma.

4-2-1- MATERIALES

4-2-1-A- Reactivos

- *PBS*

- *Hialuronato.*

La solución de trabajo de hialuronato se preparó de la misma manera que en 4-1-1-1-A.

4-2-1-A- Material biológico

- *Eritrocitos.*

Se trabajó con glóbulos rojos "O".

Se utilizó sangre, extraída con anticoagulante (EDTA), proveniente de dadores de sangre del Servicio de Hemoterapia del Hospital Provincial del Centenario de Rosario.

4-2-1-C- INSTRUMENTAL DISEÑO DE LA CAMARA DE ADHESION.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una cámara de adhesión o cámara de flujo controlado diseñada y construída sobre la base de la cámara propuesta por Frangos J.A. y col ¹⁸⁹⁻¹⁹⁰

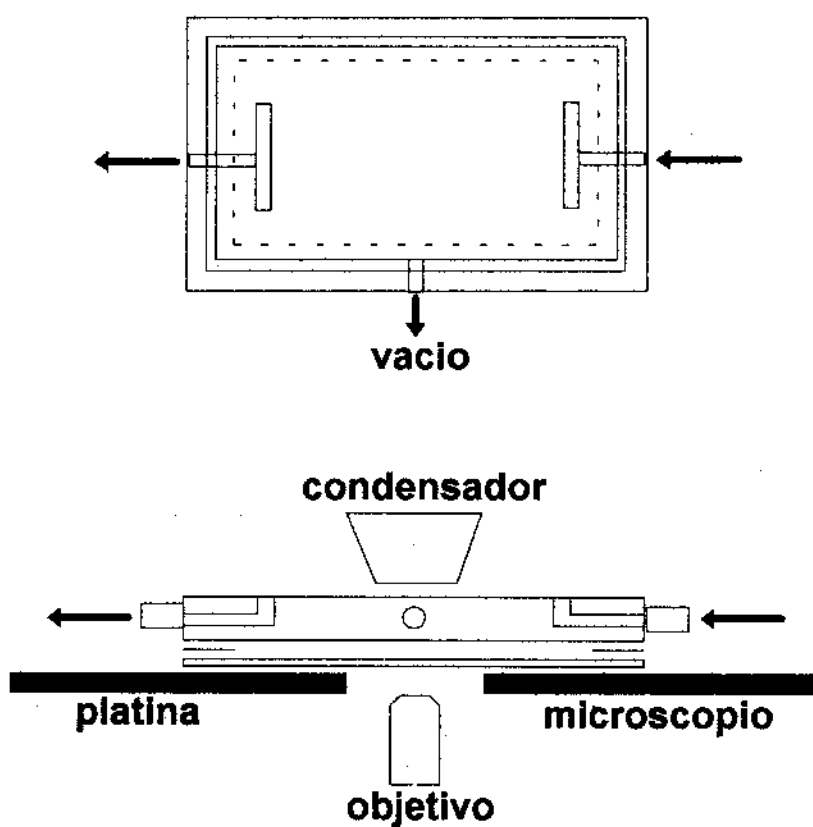


Figura 4-2-1. Esquema de la cámara de flujo controlado.

La cámara de flujo está constituida por una lámina de hule de silicona de 0.25 mm de espesor, intercalada entre una placa de acrílico transparente de 12 mm de espesor, cuyas dimensiones eran 67 x 43 mm y un cubreobjeto de vidrio del mismo tamaño. En la lámina de hule se ha practicado un corte rectangular de 45 x 18 mm que constituye el canal de flujo. En la base de acrílico, en los extremos del canal de flujo, se han frezado dos aberturas rectangulares verticales de 3 x 16 mm, dispuesta para el ingreso y egreso del flujo líquido. La placa de acrílico presenta una hendidura perimetral conectada exteriormente a una **bomba de vacío**, la que produce succión entre la placa, el hule y el cubreobjetos, de manera que sella herméticamente el canal de flujo (Fig 4-2-1). En el cuadro de hule se han practicado una serie de orificios de 2.5 mm de diámetro, alineados con la hendidura perimetral con la finalidad de

establecer una comunicación de la bomba de vacío conectada al techo de acrílico con la lámina cubreobjetos que constituye el piso del canal de flujo.

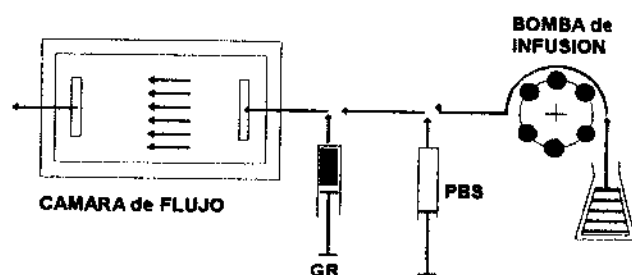


Figura 4-2-2. Esquema representativo de la cámara de flujo controlado

La cámara así montada se coloca, con el cubreobjetos hacia abajo, en la platina de un **microscopio óptico invertido**, de manera que pasa a constituir el piso del canal. Una **bomba de infusión** hace circular el fluido (PBS) a lo largo del microcanal a velocidades de flujo controladas, de manera de aplicar sobre las paredes tensiones de corte crecientes por escalones (Fig. 4-2-2). En el tubo ocular del microscopio se ha adaptado una pequeña **cámara CCD** conectada a un **Procesador Digital de Imágenes (PDI)** (Fig. 4-2-3). El PDI está constituido por el "frame grabber" y el monitor de alta resolución conectado "on line" a una PC la cual comanda todo el procesamiento de las imágenes digitalizadas por medio del programa IPPLUS (*Image Pro Plus*).

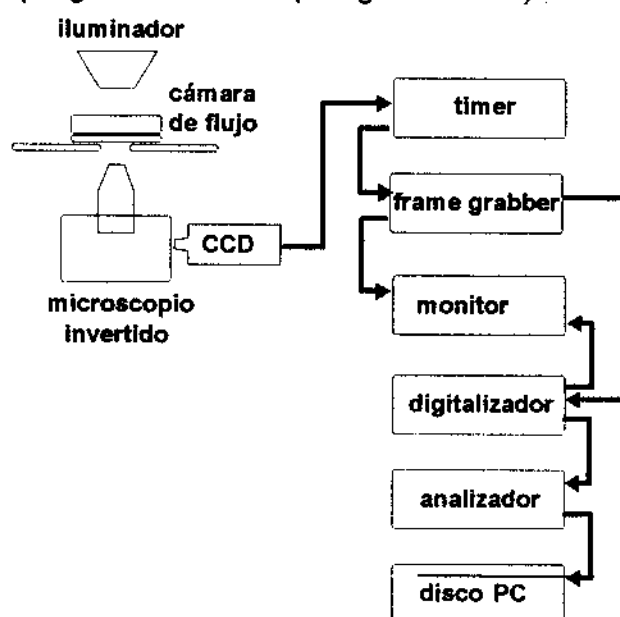


Figura 4-2-3. Cámara de adhesión-Procesador digital de imágenes

4-2-2- METODO

Los eritrocitos fueron lavados tres veces con PBS. Los GR fueron resuspendidos en PBS al 2% e incubados con hialuronato 30 minutos.

Las suspensiones de GR y hialuronato fueron introducidas en el canal de flujo y dejadas en reposo 10 minutos para permitir la sedimentación y adhesión de las células al piso del microcanal, previamente recubierto con hialuronato. A cada nivel de la tensión de corte se registró la imagen de un campo seleccionado. Se tuvo cuidado de evitar cualquier desplazamiento de este campo para poder comparar y analizar el movimiento de las células entre las imágenes registradas a distintas tensiones de corte.

4-2-3- CALCULO DE LA ENERGIA DE ADHESION

En el canal rectangular, la Tensión de corte (τ) está definida en régimen laminar, como:

$$\tau = \frac{6 \cdot \eta_0 \cdot Q}{h^2 \cdot a} \quad (\text{Ecuac. 4-2-1})$$

donde:

h = altura del canal

a = ancho del canal

Q = caudal, medido en la bomba de infusión

η = viscosidad media del fluido (PBS) determinada en un viscosímetro cono-placa Brookfield LDII7

Considerando que la fuerza (F) ejercida sobre las células adheridas es:

$$F = \tau \times A_0 \quad (\text{Ecuac. 4-2-2})$$

donde A_0 = área de la superficie del GR expuesta al cizallamiento fluido.

Resulta el trabajo (W)

$$W = F \cdot \delta \quad (\text{Ecuac 4-2-3})$$

Donde δ = desplazamiento de la célula desde su posición inicial.

En el caso de la adhesión celular esta última expresión, puede dar lugar a una interpretación incorrecta pues más fácilmente se desplaza la célula ante la misma fuerza, significa mayor W y mayor energía de adherencia.

Si la célula se separa por "*peeling*" (equivalente a despegar una cinta adhesiva) y esta separación es nula para $\tau=0$, podemos asumir que la energía es igual al W medio de separación:

$$E = \langle W \rangle = \int_0^{\delta} F \cdot d\delta \quad (\text{Ecuac. 4-2-4})$$

Suponiendo que el desplazamiento es función lineal de la fuerza, resulta que alcanzado un desplazamiento D_0 predeterminado, es decir $\delta = D_0$, la energía será igual al área del triángulo subtendido entre la recta que representa la fuerza en función del desplazamiento (Gráf. 4-2-1) y el eje de abscisas:

$$\langle W \rangle = E_i = \frac{F_i D_0}{2} \quad (\text{Ecuac. 4-2-5})$$

Y de esta manera la célula que se desplaza más fácilmente, lo hace bajo una fuerza menor y requiere menos energía para realizar el mismo δ .

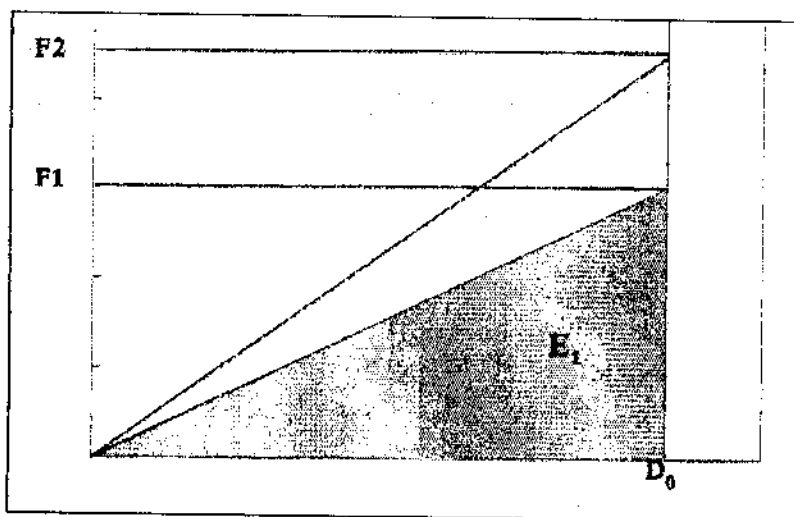


Gráfico 4-2-1. Representación gráfica de la fuerza en función del desplazamiento.

DEDUCCION DE LA ENERGIA ESPECIFICA DE SEPARACION.

El W medio de separación es, según la Ecuac.4-2-5 :

$$\langle W \rangle = \frac{F \cdot D_0}{2} \quad (\text{Ecuac. 4-2-5})$$

Combinando las ecuaciones 4-2-1 y 4-2-5 se obtiene la expresión de la F :

$$F = \tau \times A_0 = \frac{6 \cdot \eta_0 \cdot Q \cdot A_0}{2 \cdot h^2 \cdot a} \quad (\text{Ecuac. 4-2-6})$$

Aplicando la Ecuac. 4-2-5 nos permite calcular la energía media $\langle W \rangle$:

$$\langle W \rangle = \frac{6 \cdot \eta_0 \cdot Q \cdot A_0 \cdot D_0}{2 \cdot h^2 \cdot a} \quad (\text{Ecuac. 4-2-7})$$

Esta energía puede evaluarse como el producto de la energía específica por unidad de área superficial adherida (γ_d) por el área (A_i) de la membrana que ha sido despegada

$$\langle W \rangle = \gamma_d \cdot A_i \quad (\text{Ecuac. 4-2-8})$$

Igualando las ecuaciones 4-2-7 y 4-2-8 γ_d es:

$$\gamma_d = \frac{3 \cdot \eta_0 \cdot Q \cdot A_0 \cdot D_0}{h^2 \cdot a \cdot A_i} \quad (\text{Ecuac 4-2-9})$$

Designamos con ϕ la fracción de superficie parcialmente separada $\phi = A_i/A_0$

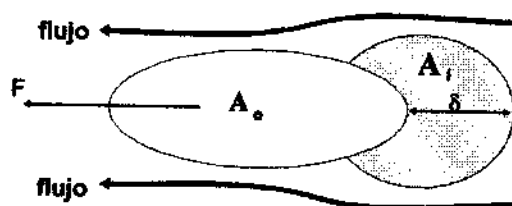


Figura 4-2-4. Desplazamiento del GR en la dirección del flujo.

4-2-4- RESULTADOS

En la figura 4-2-5 se presentan imágenes digitalizadas de GR adheridos mostrando el desplazamiento impuesto por $Q=400 \text{ mm}^3/\text{min}$.

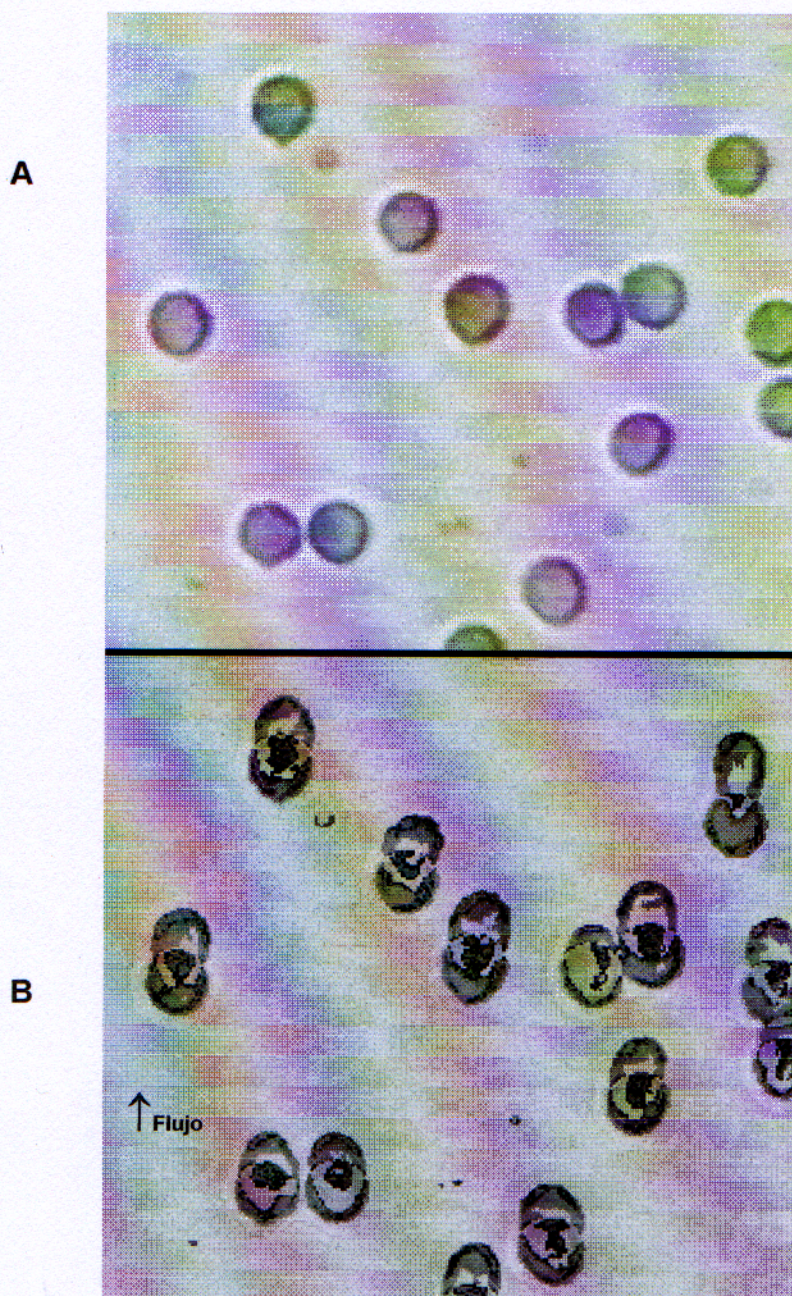


Figura 4-2-5. Registro de imágenes digitalizadas de la adhesión de GR a hialuronato .
A- Imagen a $Q=0 \text{ mm}^3/\text{min}$ B- Superposición de la imagen A con la imagen correspondiente a $Q=400 \text{ mm}^3/\text{min}$. Se observa el desplazamiento de los GR en la dirección del flujo.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Q mm^3 /min	A_0 μm^2	A_i μm^2	δ μm	$\varphi = \frac{A_i}{A_0}$	$\tau \left(\frac{\text{dina}}{\text{cm}^2} \cdot 10^{-3} \right)$	$\gamma_d \left(\frac{\mu\text{erg}}{\text{cm}^2} \right)$
0	51.13 ± 1.27	0	0	0	0	0
30	52.59 ± 1.33	23.74 ± 0.75	2.66 ± 0.95	0.45 ± 0.95	0.02 ± 0.005	0.08 ± 0.03
60	51.39 ± 1.28	23.62 ± 0.81	2.88 ± 0.82	0.46 ± 0.89	0.05 ± 0.015	0.12 ± 0.15
100	51.89 ± 1.34	24.38 ± 0.89	2.97 ± 0.49	0.47 ± 1.02	0.09 ± 0.025	0.27 ± 0.09
150	48.74 ± 0.97	23.71 ± 1.52	3.09 ± 0.52	0.48 ± 1.15	1.37 ± 0.14	0.43 ± 0.15
200	51.82 ± 1.33	31.71 ± 1.69	3.42 ± 1.12	0.61 ± 1.45	1.83 ± 0.52	0.58 ± 0.35
400	52.24 ± 1.97	37.52 ± 0.65	5.34 ± 0.98	0.71 ± 1.62	3.67 ± 0.75	1.37 ± 0.46
800	50.98 ± 1.99	38.61 ± 1.21	5.25 ± 0.46	0.75 ± 1.63	7.33 ± 0.35	2.54 ± 0.52

Tabla 4-2: Tabla de resultados.

En el Gráfico 4-2-1 se observa un aumento progresivo del δ de los GR adheridos y de φ a medida que el Q aumenta, pero este aumento parece no tener una tendencia definida.

Gráfico 4-2-2. Representación gráfica de la energía específica por unidad de área superficial adherida (γ_d) en función del fracción de superficie parcialmente separada φ

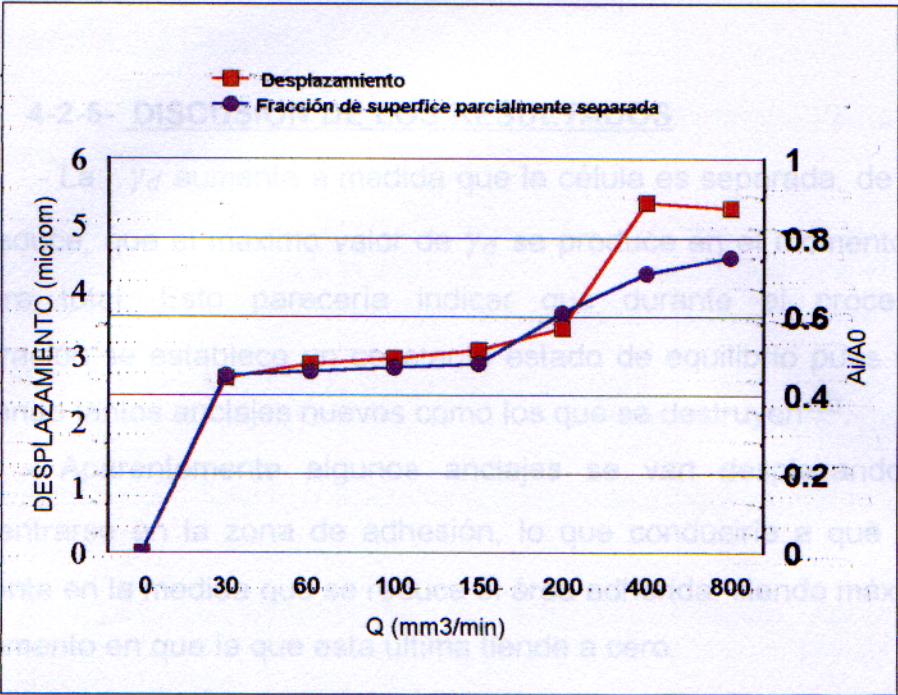


Gráfico 4-2-1. Representación gráfica de la variación del desplazamiento y de la fracción de superficie parcialmente separada en función del caudal.

En el Gráfico 4-2-2 se observa el aumento progresivo de la γ_d a medida que ϕ crece, en otras palabras cuando se reduce el área adherida.

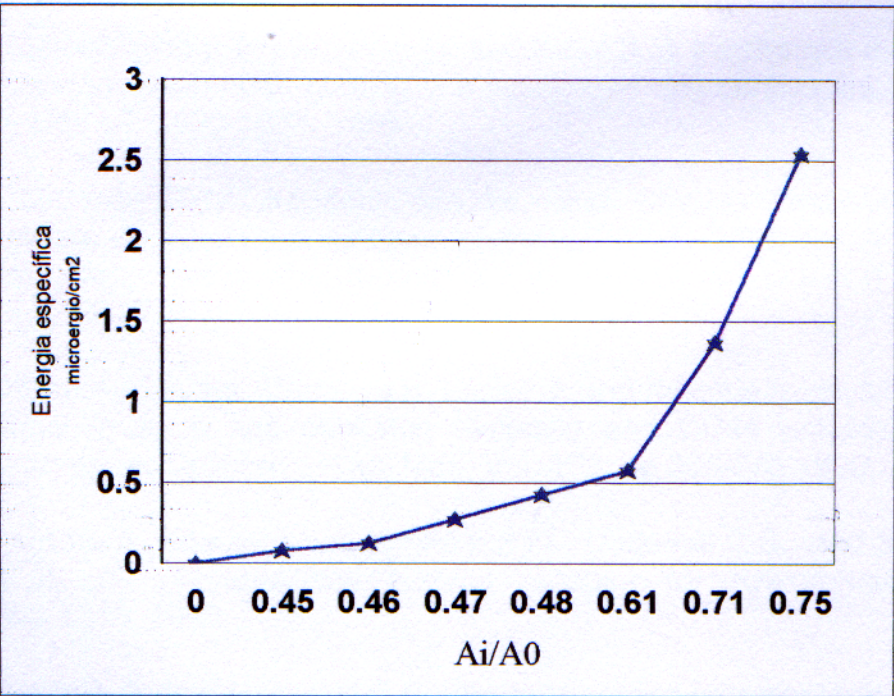


Gráfico 4-2-2. Representación gráfica de la energía específica por unidad de área superficial adherida (γ_d) en función del fracción de superficie parcialmente separada ϕ

4-2-5- DISCUSION DE LOS RESULTADOS

- La γ_d aumenta a medida que la célula es separada, de lo que se deduce, que el máximo valor de γ_d se produce en el momento de la ruptura total. Esto parecería indicar que durante el proceso de separación se establece un constante estado de equilibrio pues se van formando tantos anclajes nuevos como los que se destruyen¹⁹⁰.

- Aparentemente algunos anclajes se van desplazando para concentrarse en la zona de adhesión, lo que conduciría a que la γ_d aumenta en la medida que se reduce el área adherida, siendo máxima en el momento en que la que esta última tiende a cero.

- La γ_d calculadas están dentro de los valores determinados para otros tipos de adhesión celular (aglutinación por lectinas y por anticuerpos específicos)¹⁹¹. Esto parece indicar que el método de determinación de γ_d por análisis de imágenes digitalizadas obtenidos en la cámara de flujo es muy aceptable y puede ser aplicado en otros tipos de interacción celular.

Bibliografía del Capítulo 4:

- 168- Goudermand M., Marsalet Y.D. Elements d'immuno-hématologie. Ed. Med. Flammarion, 1° ed., París. 1967
- 169- Valverde J., Rasia R. Soluciones de baja fuerza iónica en las pruebas de Coombs para la detección de anticuerpos anti-Rh. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Vol XVI, N° 2, 297-305. 1982.
- 170- Hale P.H. and Barton H Bromelain treatment of cells removes CD44, CD45. The Journal of Immunology N° 12, Vol. 149, 3809-3816. 1992
- 171- Fainboim L., Satz L. Introducción a la Inmunología Humana. 3° Edic. 1995
- 172- Chappey O., Wautier M. P., and J.L. Wautier Adhesion of erythrocytes to endothelium in pathological situations a review article Nouv Rev Fr Hematol 36:281-288. 1994
- 173- Cartron J. P., Vers une approche moleculaire de la structure, du polymorphisme et de la fonction des groupes sanguins. TCB, 3, 181-210 1996.
- 174- Goldstein L. A., Zhou L., Picker C., Mintyr. and Butcher E. A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. Cell. 56: 1063-1072. 1989
- 175- Stamenkovic y. M., Amiot J. M. and Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. Cell 56: 1059-1062. 1989.
- 176- Martine Culty, Kensuke Miyake, and Charles Underhill. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. The Journal of Cell Biology Vol 111 N°6 Pt1 pp 2765 - 2774. 1990
- 177- Kensuke Miyake, Underhill B. Lesley J. and Kincade P.. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in Hyaluronate recognition. J. Exp. Med. Vol. 172, pp 069-075. 1990.
- 178- Arruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C.B., and Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 61:1303-1313. 1990
- 179- Lacy B. E. and Underhill C.B. The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. J. Cell Biol 105:1395-1404. 1987.

- 180- Xia Z., Goldsmith HL., Van de Ven TGM. Kinetic of specific and non specific adhesion of red blood cells on glass. *Biophys J.* 65:1073-1083. 1993.
- 181- Lavalie P., Stoltz JP., Senger B., Voegel JC. Red blood cell adhesion on a solid-liquid interface *proc Natl. Acad. Sci.* 1997.
- 182- Kittl EM., Haberhauer G., Ruskser R., Selleny S., Bauer K. Serum levels of soluble CD44 variant isoforms. *Rheumatol Int.* 16:5, 181-6. 1997
- 183- Nemec R. E., Toole B.P., Knudson W. The cell surface hyaluronate binding sites of invasive human bladder carcinoma cells. *Biochem. Biophys. res. Commun.* 147:249-257.
- 184- Ghosh P. The rol of hyaluronic acid. *Clin. Exp. Rheumatol.* 12:1, 75-82. 1994.
- 185- Wolff E.A. Generation of artificial proteoglycan *J. Biol. Chem.* 274:4, 2518-24. 1999.
- 186- Greenfield B and col. Characterization of the heparin sulfate and condroitin sulfate *J. Biol. Chem.* 274:4, 2511-7. 1999.
- 187- Lokeshwar V.B. and col. Ankyrin-binding domain of CD44. *J. Cell Biol.* 126:4, 1090-1099. 1994.
- 188- Smith B.D., Thomas J.L. Abnormal erythrocyte endotelial adherence in ischemic heart disease. *Clinical hemorheology*, Vol. 10, pp 241-253, 1990.
- 189- Frangos J.A., Eskin S.G., McIntire L.V. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endotelial cells. *Science* 227 pp1277. 1981
- 190- Patrick Ch.W.(Jr), Rangarajan S., Mc Intire L.V. (Ch110) Fluid shear stress effects on cellular function en the *Biomedical Engineering Hanbook*(J.D. Bronzino Ed.) CRC Press and IEEE Press pp 1636-1655. 1995
- 191- Rasia R. Análisis cinético y termodinámico de la aglutinación eritrocitaria inmunologica mediante técnicas y metodologías hemorreológicas. Tesis doctoral . 1999.

CONCLUSIONES FINALES

Se estudió la carga eléctrica superficial eritrocitaria utilizando como herramienta el reparto de GR, en un sistema bifásico acuoso Dx/PEG. Nuestro objetivo fue comparar variaciones de la CESE inducidas por diversos mecanismos. Se estudiaron para ello, GR en distintas condiciones: a)-sin tratar; b)-tratados con distintas enzimas proteolíticas; c)-tripsinados a distintos tiempos; d)-tratados con anticuerpos, e)-sometidos a conservación en condiciones standard de Banco de Sangre y f)-GR de distintas especies.

El tratamiento enzimático de los GR, está químicamente evidenciado por la eliminación de ácido siálico de la membrana eritrocitaria, lo que conduce a una disminución de la carga superficial celular.

Aplicando este método de reparto, se observa una diferencia significativa del coeficiente de reparto de los GR tratados con enzimas y los GR sin tratar, siendo máxima esta diferencia para los GR tratados con neuraminidasa ($p < 0.01$). Por otra parte el ácido siálico medido en los sobrenadantes de los GR tratados, se correlacionó con la actividad proteolítica de las distintas enzimas utilizadas (tripsina, bromelina y neuraminidasa).

Para poder evaluar el efecto del tiempo de tratamiento enzimático de la tripsina, sobre la membrana eritrocitaria, se compararon los valores de P y ácido siálico de los sobrenadantes de los GR tripsinados a diferentes tiempos de incubación y sin tratar.

Las variaciones de P y de ácido siálico se correlacionan inversamente (Coef. de correl. inverso de -0.8958 y una $p < 0.0001$), de forma tal que al aumentar el ácido siálico liberado con el tiempo de acción de la enzima, los valores de P decrecen.

La unión de anticuerpos anti-M a la membrana eritrocitaria, produce una disminución progresiva y significativa ($p < 0.05$), en los valores de P según los fenotipos estudiados MM, MN, respecto de los controles de fenotipo NN.

El sistema MN está ubicado sobre la glicoforina A, portadora de la carga mayoritaria de la membrana celular. El bloqueo de epitopes M, por su anticuerpo específico, lleva a una modificación en la carga superficial puesta en evidencia por el método de reparto.

Si bien los eritrocitos de distintas especies, presentan el mismo patrón estructural, diferencias constitutivas pueden modificar sus propiedades reológicas. Aplicando el método de reparto, se obtuvieron valores de P diferentes para las distintas especies estudiadas con respecto a los eritrocitos humanos. Tales diferencias podrían atribuirse a variaciones en la carga superficial de membrana eritrocitaria.

En el curso de la conservación, la sangre sufre alteraciones de sus propiedades bioquímicas y reológicas.

El estudio del deterioro de la membrana eritrocitaria, con el tiempo de conservación in vitro en las condiciones standard de Banco de Sangre, mostró una disminución progresiva y significativa en los valores de P ($p < 0.01$).

Estos resultados, ponen de manifiesto alteraciones de membrana relacionadas con la carga resultando el reparto una herramienta útil para el estudio comparativo de las variaciones de CESE.

En una segunda etapa experimental se estudió la incidencia de las alteraciones de la CESE en la agregación eritrocitaria.

La morfología del agregado eritrocitario depende de la deformabilidad, de la interacción celular y de las características de carga superficial entre otros factores. Nuestro objetivo fue estudiar la morfología de los agregados de GR sin tratar, con alteraciones: tripsinados a distintos tiempos, glicosilados y GR de pacientes diabéticos

e hipertensos. Para estudiar la morfología de los agregados eritrocitarios, hemos elegido para este trabajo de tesis, la determinación del ASP.

El estudio de los agregados se realizó con un microscopio invertido conectado a un analizador de imagen computarizado.

Al aumentar el tiempo de tripsinación de los GR se produce una desialización de la membrana evidenciada por el aumento de ácido siálico liberado. Como consecuencia de ello se observa la formación de clusters que llevan a valores progresivamente aumentados del ASP. Se observa una correlación directa fuertemente significativa (0.8830) entre ASP y ácido siálico. El ASP da una idea clara de alteraciones en el patrón de la morfología de los agregados eritrocitarios sometidos a digestión enzimática del glicocáliz.

El proceso de glicosilación no-enzimática de proteínas involucra también a proteínas de la membrana eritrocitaria siendo las más glicosiladas glicoforina A y banda 3.

Los resultados obtenidos sugieren que la glicosilación de la membrana determina un aumento de la agregación eritrocitaria relacionado probablemente con cambios en la estructura y propiedades de la misma.

La glicosilación no-enzimática puede ayudar a dilucidar la hipótesis que explica parcialmente la alteración de los parámetros hemorreológicos característicos de diabéticos bajo mal control metabólico.

Uno de los principales retos de la ciencia médica moderna es la integración de los adelantos básicos de la inmunoquímica y la inmunobiología en procedimientos de diagnóstico y terapéutica que serán de utilidad en la práctica de la medicina clínica.

La metodología propuesta para evidenciar el déficit de carga superficial eritrocitaria, permite hacerlo de una manera simple reproducible, rápida y no convencional.

Trabajos de otros autores han demostrado que la agregación está muy aumentada en desórdenes cardiovasculares, nuestro método puede ser un parámetro de utilidad para el estudio de pacientes de riesgo como diabéticos, hipertensos, obesos, etc.

Las experiencias realizadas por el método propuesto han puesto en evidencia un incremento de la agregación en diabéticos, los valores de ASP resultaron significativamente mayores que en normales ($p < 0.00001$). Esto podría atribuirse a la desialización de la GPA, portadora de la carga mayoritaria de la membrana del GR. La glicosilación no enzimática de proteínas de membrana de GR podría ser otro factor responsable de la hiperagregabilidad eritrocitaria en diabéticos.

Las experiencias realizadas en pacientes hipertensos muestran diferencias significativas ($p < 0.00001$) en los valores de ASP comparados con normales. Los estudios de ASP en pacientes hipertensos aportan datos acerca del patrón de morfología atípica de los agregados, como la que se observa frecuentemente en este tipo de patología.

Los estudios de la morfología de los agregados, permitieron poner en evidencia alteraciones in vitro por desialización enzimática y glicosilación de la membrana eritrocitaria. Por otra parte estos estudios permitieron detectar anomalías en el patrón de agregación en patologías con complicaciones vasculares como la diabetes y la hipertensión arterial.

La determinación de ASP resultó una herramienta útil para cuantificar las anomalías de la agregación eritrocitaria, marcadas por la morfología atípica de los agregados.

En una tercera etapa experimental se estudió la adhesión eritrocitaria utilizando como modelo el sistema receptor de hialuronato(CD44)-Hialuronato.

Se realizó la técnica de adhesión(aglutinación) directa donde, se trabajó con GR de adultos, recién nacidos y de diabéticos. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa una diferencia estadísticamente significativa en la adhesión de GR de adulto y de cordón ($p<0.05$). Esta diferencia podría ser atribuida a una inmadurez en la expresión de receptores de Hialuronato (CD44) en el neonato.⁵²

En el estudio de los pacientes diabéticos se observó un aumento significativo de la adhesión de GR comparada con adultos normales ($p<0.05$). Esto se podría interpretar como una mayor exposición de los receptores de Hialuronato (CD44) en los pacientes diabéticos como consecuencia de alteraciones de membrana eritrocitarias propias de esta patología.

En la reacción de inhibición de la aglutinación, la sensibilidad de esta técnica no permite demostrar la presencia de receptores de Hialuronato solubles en el suero de neonatos, a diferencia de lo que ocurre en el adulto en donde se observa un poder inhibitorio. Estos resultados indicarían concentraciones muy bajas de CD44 en suero de recién nacido pudiéndose atribuir a una escasa o nula liberación de este receptor.

En la última parte de este trabajo de tesis se alcanzó el objetivo propuesto, desarrollar una técnica por análisis de imágenes digitalizadas, empleando una cámara de flujo controlado, con el correspondiente algoritmo numérico, para estimar la energía de adhesión del receptor de hialuronato y su ligando.

Al lograr establecer la variación de área específica adherida y aplicarla a la ecuación de conservación de la energía, se pudo estimar la energía específica de adhesión (γ_d), lo cual puede ofrecer una

significativa ayuda en la comprensión de numerosos fenómenos fisiológicos y patológicos muy importantes.

La γ_d aumenta a medida que la célula es separada, de donde se deduce, que el máximo valor de γ_d debe producirse en el momento de la ruptura total. Esto parecería indicar que, durante el proceso de separación, se establece un constante estado de equilibrio pues se van formando tantos anclajes nuevos como los que se destruyen¹⁸⁹.

La γ_d calculadas se hallan dentro de los valores determinados para otros tipos de adhesión celular (aglutinación por lectinas y por anticuerpos específicos)¹⁹¹. Esto parece indicar que el método de determinación de γ_d por análisis de imágenes digitalizadas obtenidos en la cámara de flujo es muy aceptable y puede ser aplicado en otros tipos de interacción celular.

ANEXO UNICO

**Trabajos publicados
sobre el tema de la tesis**

Trabajos publicados

1- Publicaciones en revistas internacionales

1- Foresto P., Filipini F., D'Arrigo M., Racca L., Gallo R., Valverde J. Hipertensión arterial y marcadores de grupo sanguíneo Asociación con el polimorfismo MN. Acta Bioquímica Latino Americana Vol XXXII N°1, 49-53, 1998.

2- Foresto P, D'Arrigo M., Racca L. and Valverde J. Effects of antiserum on surface charge of red cells. Clinical Hemorheology and Microcirculation 20, 141-143, 1999.

3- Riquelme B., Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J., Rasia R. Estudio de las propiedades reológicas de la sangre durante la conservación. Revista Argentina de Transfusión XXV (3): 103-110. 1999

4- Foresto P., D'Arrigo M., Carreras L., Etchepare Cuezco R., Valverde J., Rasia R. An approach of red cells aggregation by computerized image analysis in diabetes. Medicina. Aceptado para su publicación en marzo de 2000.

5- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. Rasia R. Enzymatic degradation of red surface. Effects on aggregation. Clinical and Laboratory Haematology. En etapa de evaluación.

6- Foresto P., D'Arrigo M., Gallo R., Filipini F., Valverde J. Rasia R. Evaluation of red cells aggregate morphology by computerized image analysis in hypertension. Clinical Hemorheology and Microcirculation. En etapa de evaluación

2- Capítulo de libro

- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. and Rasia R. Microscopic image analysis of aggregate morphology applied to the diagnostic of vascular diseases. Medical diagnostic techniques and procedures. ISBN 81-7319-350-9. Narosa Publishing House. Editors Megha Singh, Radhakrishnan S. Patil K. M. and Reddy M.R.S. pp 488-491. 1999

3- Resúmenes publicados en Revistas - Proceeding de Congresos

3-1 Internacionales

1- D'Arrigo M, Foresto P, Valverde J. -Use of red cell no glycophorin a to recognize non agglutinating antibodies. Comunicaciones Biológicas Vol 10 (4): 1992

2- D'Arrigo M, Foresto P, Valverde J. "Influence of trypsin in erythrocytic fragility". Comunicaciones Biológicas; 11 (2):149; 1993

-
- 3- P. Foresto, M. D'Arrigo, J. Valverde "The partition coefficient. A new parameter to detect surface properties of modified erythrocytes." *Comunicaciones Biológicas* ; 11 (2):129; 1994.
 - 4- D'Arrigo, M, Foresto P, Racca L, Valverde J. -Aggregation parameters indicator of haemorheological alterations. *Comunicaciones Biológicas* 13 (4): 457. 1995
 - 5-Gatti V., D Arrigo M., Bouvet B., Volpintesta R., Valverde J., Rasia R. Comparative biorheological analysis carried out between synovial fluid and hyaluronate solutions. Libro de resúmenes 1er Simposio Franco Argentino de Biorreología y Microcirculación 1996,(11).
 - 6- D'Arrigo M., Foresto P., Racca L., Valverde J -Un nuevo parametro de agregacion para detectar anomalías hemorreológicas. Libro de resúmenes 1er Simposio Franco Argentino de Biorreología y Microcirculación 1996 (20)
 - 7- Foresto P., D 'Arrigo M., Farrugia B, Valverde J. Efecto de un antisuero anti-M sobre la carga de superficie de los globulos rojos. Libro de Resúmenes 1er Simposio Franco Argentino de Biorreología y Microcirculación 1996 (35).
 - 8- D 'Arrigo M., Foresto P., Farrugia B., Valverde J. Modificación de la carga eritrocitaria por acción de anticuerpos. *Comunicaciones Biológicas* 1996.
 - 9- D'Arrigo M., Foresto P., Farugia B., Valverde J. Comportamiento de eritrocitos de distintas especies en sistemas bifasicos carga sensible. *Comunicaciones Biológicas* 1996.
 - 10- D'Arrigo M., Foresto P., Farugia B., Valverde J. Participación del ácido sialico en la carga superficial eritrocitaria. *Biocell* , pp 88 vol 22 ,nº 1, abril 1998.
 - 11- D'Arrigo M., Foresto P, Ballone C., Valverde J. Trypsin effects on erythrocyte aggregation. *Biocell* 23 (1) pp 86 . 1999
 - 12- Plá L., Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. and Rasia R. Morphology in human erythrocyte aggregate diabetes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 37:124. 1999
 - 13- Plá L., Foresto P., D'Arrigo M., Carreras L., Etchepare Cuezio R., Valverde J. and Rasia R. Abnormal morphology of erythrocyte aggregates in diabetes by processing digitalized microscopic Biorheology Vol 36 N°1/2 pp185. 1999

14- Pla L., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J., Rasia R. Effects of sialic acid digestion by trypsin on the morphology of erythrocyte aggregates. *Biorheology* Vol 36 N°1/2 pp186. 1999.

15- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J., Rasia R. Evaluación de la energía de adhesión de hematíes humanos mediadas por molécula de adhesión. Libro de resúmenes del 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. pp50 1999

16- D'Arrigo M., Foresto P., Carreras L., Etchepare Cuezso R., Valverde J and Rasia R. Red blood cells aggregation in diabetes. Libro de resúmenes del 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. pp 37 1999

17- D'Arrigo M., Foresto P., Racca L., Valverde J. Enzymatic degradation of red cell surface. Effects on aggregation. Libro de resúmenes del 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. pp 56 1999

18- D'Arrigo M., Foresto P., Carreras L., Etchepare Cuezso R., Di Tulio L., Alet A., Valverde J. and Rasia R. Implicancia hemorreológicas y microcirculatorias en la diabetes. Libro de resúmenes del 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. pp 42 1999

19- Ballone C., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. Estudio del ácido siálico sérico en pacientes diabéticos. Libro de resúmenes del 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. pp 38 1999

20- Alet A., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. and Rasia R. Erythrocyte aggregation measurement by relative viscosity. Libro de resúmenes del 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. pp 52 1999

21- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. and Rasia R. Rol de la reología en la regulación de la Presión sanguínea. Libro de resúmenes del 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. pp 58 1999

22- Suarez Sala V., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. Adhesión CD44 - Hialuronato. Libro de resúmenes del 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. pp 55 1999

3-2 Nacionales

- 1-Forestó P, D'Arrigo M., Valverde J. "Alteraciones de membrana eritrocitaria detectadas por coeficiente de partición. Revista Argentina de Transfusión, XXI (4): 344, 1995.
- 2- D'Arrigo M., Forestó P., Farrugia B., Valverde J. -Alteraciones superficiales eritrocitarias detectadas por el método de reparto. Libro de resúmenes del Congreso Nacional de Bioquímica CUBRA 1997 68; pag 45 1997
- 3- D'Arrigo M., Forestó P., Valverde J. Sistema INDIAN(CD44) y adhesión de eritrocitos. Bioquímica y Patología Clínica Vol 62- N° 2- pp 249 1998.
- 4- Forestó P., D'Arrigo M., Valverde J. Alteraciones inmunológicas detectadas por el coeficiente de reparto. Bioquímica y Patología Clínica Vol 62- N° 2- pp 251 1998.
- 5- Forestó P., D'Arrigo M., Valverde J. gregación eritrocitaria y diabetes. Medicina Vol 59 N°5/2 pp 602. 1999

4- Presentación de Trabajos en Congresos

4-1 Internacionales.

- 1er Simposio Internacional Franco Argentino de Biorreología & Microcirculación. Rosario, 9 al 11 de setiembre de 1996.
 - D'Arrigo M., P. Forestó, B. Farrugia, J. Valverde Acción de un antisuero anti-M sobre la carga superficial de hematíes de distintos fenotipos
 - Gatti V., D'Arrigo M., Bouvet B., Valverde J., Rasia R. Analisis Biorreologico comparativo entre liquido sinovial y soluciones de hialuronato.
 - D'Arrigo M., Forestó P., Farrugia B., Valverde J. Un nuevo parametro de agregacion para detectar anomalias hemorreologicas.
- Asociacion Argentina de Hemoterapia: Medicina Transfusional: VII Congreso Iberoamericano. VI Congreso Argentino. Buenos Aires, 10 al 13 de junio de 1997.
 - D'Arrigo M., Forestó P., Farrugia B., Valverde J. Estudio de un suero monoclonal antiM por el método de reparto.
- IFCC- World Lab'99 XVII International Congress of Clinical Chemistry and XIII European Congress of Clinical chemistry and Laboratory Medicine. Firenze, Italy, 6-11, June 1999.
 - Plá L., Forestó P., D'Arrigo M., Valverde J. and Rasia R. Morphology in human erythrocyte aggregate diabetes. Clinical Chemistry and Laboratory medicine

- 10 th International Congress of Biorheology. 3er International Conference on Clinical Hemorheology. July 18-22 1999. Pécs, Hungary.
 - Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. and Rasia R. Effect of sialic acid digestion by trypsin on the morphology of erythrocyte aggregates.
 - Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. and Rasia R. Abnormal morphology of erythrocyte aggregates in diabetes by processing digitized microscopic images.
- 1er Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología. Buenos Aires 21-22 de octubre de 1999
 - Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J., Rasia R. Evaluación de la energía de adhesión de hematíes humanos mediadas por molécula de adhesión.
 - D'Arrigo M., Foresto P., Carreras L., Etchepare Cuezso R., Valverde J and Rasia R. Red blood cells aggregation in diabetes.
 - D'Arrigo M., Foresto P., Racca L., Valverde J. Enzymatic degradation of red cell surface. Effects on aggregation.
 - D'Arrigo M., Foresto P., Carreras L., Etchepare Cuezso R., Di-Tulio L., Alet A., Valverde J. and Rasia R. Implicancia hemorreológicas y microcirculatorias en la diabetes.
 - Ballone C., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. Estudio del ácido siálico sérico en pacientes diabéticos.
 - Alet A., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. and Rasia R. Erythrocyte aggregation measurement by relative viscosity.
 - D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. and Rasia R. Rol de la reología en la regulación de la Presión sanguínea.
- International Conference on Medical Diagnostic Techiques & Procedures. Indian Institute of Technnology. Madras (India), December 15-17, 1999
 - Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. and Rasia R. Microscopic image analysis aggregate morphology applied to the diagnostic of vascular diseases.

4-2 Nacionales

- XIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Noviembre 1993.
 - Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. Influencia de la Tripsinación en la fragilidad eritrocitaria
- II Jornadas Bioquímicas de Rosario. Rosario, 15-18 de junio de 1994.
 - Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. "El Coeficiente de partición, un nuevo parámetro para detectar anomalías de membrana".

- XI Jornadas Nacionales de Reología. XI Jornadas de Reología Nacionales de la Asociación Argentina de Reología. Rosario, 21 y 22 de noviembre de 1994.
- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. "Un método cinético para detectar anomalías de membrana".
- "Primer Congreso Rosarino y XIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 21 al 23 de noviembre de 1994.
- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. "El Coeficiente de partición, un nuevo parámetro para detectar anomalías de membrana".
- 2do. Encuentro Bioquímico. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. Rosario, 15 al 17 junio de 1995.
- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. Eritrocitos con alteraciones de membrana detectadas por partición en sistemas acuoso bifásicos.
- V Congreso Argentino de Medicina Transfusional. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunoematología. Buenos Aires, 27 al 29 de septiembre de 1995.
- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. Alteraciones de membrana eritrocitaria detectadas por coeficiente de Partición.
- XV Reunión Anual de la Soc. de Biología de Rosario. Rosario, 22 y 23 de noviembre de 1995.
- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. Parametro de agregacion como indicador de alteraciones hemorreologicas.
- 3er Congreso Argentino de Hipertensión Arterial. 16 Reunión del Consejo Argentino de Hipertensión Arterial de SAC - 5 Reunión Anual de Hipertensión Arterial de FAC. Rosario, del 28/10 al 1/11 de 1995.
- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J., Filippini F., Gallo R., Alonzo H. Hipertensión y Marcadores de Grupo Sanguíneo. Asociación con el locus MN.
- Soc. Argentina de Hipertension. Circulo Medico de Rosario. Rosario, 3 de octubre de 1996
- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde P. Hipertension y Marcadores de grupo sanguineo MN.
- XVI Reunión de la Soc. de Biología de Rosario. Rosario, 27 y 28 de noviembre de 1996
- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. Modificación de la carga eritrocitaria por acción de anticuerpos.
- Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. Analisis Biorreologico comparativo entre liquido sinovial y soluciones de hialuronato.

- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. Comportamiento de eritrocitos de distintas especie en sistemas bifasicos sensibles.
- Tercer Encuentro Bioquimico 1997 Rosario, Agosto de 1997.
- D'Arrigo M., Foresto P., Farrugia B., Valverde J. Estudio de un suero monoclonal anti-M por el metodo de reparto.
- D'Arrigo M., Foresto P., Gatti V., Valverde J Anticuerpos eritrocitarios en liquido sinovial
- Congreso Nacional de Bioquimica - CUBRA IV. San Miguel de Tucuman , setiembre 1997.
- D'Arrigo M., Foresto P., Farrugia B., Valverde J. Alteraciones superficiales eritrocitarias detectadas por el metodo de reparto
- Sociedad de Biología de Rosario, XVII Reunión anual. Rosario, 24 y 25 de noviembre de 1997.
- D'Arrigo M., Foresto P., Farrugia B., Valverde J. Participación del ácido sialico en la carga superficial eritrocitaria. poster 175
- Congreso Argentino de Bioquímica 6 al 9 de octubre de 1998 Buenos Aires.
- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. Sistema Indian (CD44) y adhesión de eritrocitos. poster n° 19. 62°
- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. Alteraciones inmunológicas detectadas por el coeficiente de reparto. poster n° 28. 62°
- XIII Reunión de la Soc de Biología de Rosario . Rosario, 17-18 de nov de 1998.
- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J . Efecto de la tripsina sobre la agregación eritrocitaria. poster N° 155
- 4to Encuentro Bioquímico. Rosario, 5-7 de agosto de 1999
- Alet A., Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. Rasia R. Determinación del índice de agregación eritrocitario por viscosimetría.
- Suarez Sala V., Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J Adhesión CD44-Hialuronato
- XLIV Reunión Anual de la SAIC Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, 17-20 noviembre de 1999.
- D'Arrigo M., Foresto P., Carreras L., Etchepare Cuezco R., Valverde J and Rasia R. Agregación eritrocitaria y diabetes.
- 19 Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 3 de diciembre de 1999
- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J and Rasia R. Rol de la reología en la regulación de la presión sanguínea
- D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J y Rasia R. Energía de adhesión de glóbulos rojos. Su cuantificación en cámara de adhesión.

- Suarez Sala V., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J . Adhesión CD44-Hialuronato.

PREMIOS Y DISTINCIONES OBTENIDOS:

Premio 'Prof. Carlos Fasciolo por el trabajo: Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J., Gallo , Filipini. Hipertension y Marcadores de grupo Sanguineo. Asociacion con el locus MN.

3er Congreso Argentino de Hipertension Arterial.
Rosario, noviembre 1995.

Fe de errata

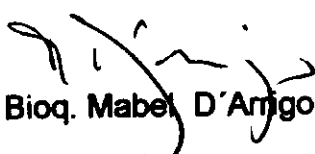
pag 58 renglón 12 - Donde dice: "El origen de las fuerzas de repulsión de las partículas en un medio líquido de suspensión, en un medio líquido, es bien conocido." debe decir: "El origen de las fuerzas de repulsión de las partículas en suspensión, en un medio líquido, es bien conocido."

pag 75 renglón 6 - Donde dice : "El mecanismo de reparto es desconocido" debe decir "El mecanismo de reparto se puede describir como una compleja interacción entre la partícula suspendida en una de las fases y las moléculas que hay a su alrededor.

pag 84 renglón 4 - Donde dice: "carga superficial " debe decir: "carga eléctrica superficial"

pag 91 renglón 16 - Donde dice: "El coeficiente de reparto (P) se define como la cantidad de células en la fase superior respecto del total de células adicionadas." debe decir: "El coeficiente de reparto (P) ha sido calculado, según la expresión:

$$P = \{ [\text{Hb g/dl -fase superior-}] / [\text{Hb g/dl -total-}] \} \cdot 100$$


Bioq. Mabel D'Amigo