

ÍNDICE

Contenidos	Páginas
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
1- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los eritrocitos	1
1.2. Organización estructural de la membrana de los glóbulos rojos	3
1.2.1. El macrocomplejo proteico Banda 3/Rh	4
1.2.2. Glicoforinas	6
1.2.3. Lípidos de membrana	7
1.2.4. Moléculas de adhesión eritrocitarias	8
1.2.4.1. Sialoadhesinas	8
1.2.4.2. ICAM-4/Glicoproteína LW	9
1.2.4.3. CD47 (Proteína asociada a integrina)	9
1.2.5. Proteínas reguladoras del Sistema del Complemento	10
1.3. Los eritrocitos senescentes	12
1.3.1. Envejecimiento celular	12
1.3.2. Modificaciones asociadas a la senescencia eritrocitaria	13
1.3.2.1. Deformabilidad celular	13
1.3.2.2. Volumen celular. Sodio y Potasio	14
1.3.2.3. Calcio	14
1.3.2.4. Oxidación de proteínas	15
1.3.2.5. Actividad enzimática	15
1.3.2.6. Proteína Banda 3	16
1.3.2.7. Glicoforinas	17
1.3.2.8. Exposición de fosfatidilserina	17

1.3.2.9. Expresión de las MACs	19
1.3.2.9.1. CD47 y SIRP	19
1.3.2.9.2. Acido siálico y siglecs	21
1.3.2.10. Proteínas reguladoras del Sistema del Complemento	21
1.4. Mecanismos de remoción eritrocitaria	22
1.4.1. Autoanticuerpos anti-Banda 3	24
1.4.2. Participación del Sistema del Complemento	26
1.4.3. Antígeno específico de senescencia eritrocitaria	27
1.4.4. Envejecimiento eritrocitario y apoptosis	28
1.5. Separación de poblaciones de eritrocitos	31
1.5.1. Centrifugación en gradiente de densidad: Percoll	33
1.6. Citometría de Flujo y Senescencia eritrocitaria	34
1.6.1. Aplicaciones clínicas de la Citometría de Flujo	36
1.6.2. Aplicaciones de la Citometría de Flujo a la Investigación Básica	37
 2- HIPOTESIS Y OBJETIVOS	 38
2.1. Objetivos específicos	41
 3 – MATERIALES Y METODOS	 43
3.1. Muestras	43
3.2. Separación de poblaciones eritrocitarias	43
3.2.1. Centrifugación en gradientes de densidad de Percoll	44
3.2.1.1. Recolección de las fracciones eritrocitarias	44
3.2.2. Parámetros de control de la eficiencia de la separación de las fracciones eritrocitarias	45

3.2.2.1. Volumen corpuscular medio	45
3.2.2.2. Porcentaje de reticulocitos	45
3.2.2.3. Determinación de creatina eritrocitaria	45
3.3. Proteínas de membrana	46
3.3.1. Obtención de proteínas de membrana eritrocitarias	46
3.3.2. Determinación de la concentración de proteínas de membrana eritrocitaria.	46
3.3.3. Oxidación de proteínas de membrana eritrocitaria	46
3.3.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacríamida	48
3.3.4.1. Preparación de las muestras	48
3.3.4.2. Preparación de geles	48
3.3.4.3. Tinción de proteínas	48
3.3.4.4. Densitometría	49
3.3.5. Inmunodetección de la Proteína Banda 3	49
3.3.5.1. Densitometría	50
3.4. Determinación de IgG unida a la membrana	50
3.4.1. Prueba de Antiglobulina Directa	50
3.4.2. Enzimoimmunoanálisis cuantitativo	50
3.4.2.1. Sensibilización de placas	51
3.4.2.2. Control de placas	51
3.4.2.3. Curva de calibración	51
3.4.2.4. Determinación de IgG en GRSe y GRJ	51
3.4.3. Microscopía confocal	52
3.5. Eritrofagocitosis	52
3.5.1. Preparación de la monocapa	52
3.5.2. Preparación de GRs tratados con enzimas desialinizantes	53
3.5.3. Ensayo de fagocitosis	53
3.6. Aplicación de la Citometría de Flujo al estudio de la senescencia eritrocitaria	54

3.6.1. Determinación de IgG en GRSe y GRJ	54
3.6.1.1. Marcación de los GRs	55
3.6.1.2. Análisis por Citometría de Flujo	55
3.6.2. Estudio de marcadores de senescencia por Citometría de Flujo en sangre entera.	56
3.6.2.1. Complemento C3	56
3.6.2.2. CD47	56
3.6.2.3. Fosdatidilserina (Anexina V)	56
3.6.2.4. Banda 3 (CD233)	57
3.6.2.5. Glicoforina A (CD235a)	58
3.6.2.6. CD55	58
3.6.2.7. CD59	59
3.7. Análisis Estadísticos	59
 4 – RESULTADOS	 61
4.1. Parámetros de control de la eficiencia de la separación de las fracciones eritrocitarias.	61
4.1.1. Volúmen corpuscular medio	61
4.1.2. Porcentaje de reticulocitos	61
4.1.3. Determinación de creatina eritrocitaria	62
4.2. Proteínas de membrana	62
4.2.1. Determinación de la concentración de proteínas de membranas	62
4.2.2. Oxidación de proteínas de membrana eritrocitaria	63
4.2.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacríamida	64
4.2.3.1. Densitometría	64
4.2.4. Inmunodetección de la proteína Banda 3	65
4.2.4.1. Densitometría	66
4.3. Determinación de IgG unida a la membrana de GRs intactos	67

4.3.1. Prueba de Antiglobulina Directa	67
4.3.2. Enzimoimmunoanálisis cualitativo	67
4.3.2.1. Aplicación a GRSe y GRJ	68
4.3.3. Microscopía confocal	68
4.4. Eritrofagocitosis	69
4.4.1. Interacción entre GRSe y monocitos	70
4.4.2. Interacción entre células de SFM y GRs tratados con enzimas	71
4.5. Aplicación de la Citometría de Flujo al estudio de la senescencia eritrocitaria	72
4.5.1. Determinación de IgG en GRSe y GRJ	72
4.5.2. Estudio de marcadores de senescencia por Citometría de Flujo en sangre entera	77
4.5.2.1. Complemento C3	77
4.5.2.2. CD47	78
4.5.2.3. Fosfatidilserina	81
4.5.2.3.1. Porcentaje de células anexina V+ en GRSe y GRJ	81
4.5.2.3.2. Porcentaje de células anexina V+ en GRs con anemias hemolíticas	83
4.5.2.4. Banda 3 (CD233)	84
4.5.2.5. Glicoforina A (CD235a)	85
4.5.2.6. CD55	87
4.5.2.7. CD59	87
5 – DISCUSIÓN	90
6 – CONCLUSIONES	103
7 – BIBLIOGRAFÍA	108

ABREVIATURAS

ACII	Anhidrasa Carbónica II
AE1	Intercambiador de Aniones del glóbulo rojo
ASE	Antígeno de Senescencia Eritrocitario
AV	Anexina V
CFM	Citometría de Flujo
CHbCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EMM	Ensayo de monocapa de monocitos
EROs	Especies reactivas del oxígeno
GPA	Glicoforina A
GPB	Glicoforina B
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRs	Glóbulos Rojos
GRJ	Glóbulos Rojos Jóvenes
GRN	Glóbulos Rojos Normales
GRSe	Glóbulos Rojos Senescentes
GRS	Glóbulos Rojos Sensibilizados
Hb	Hemoglobina
Igs	Inmunoglobulina
IgSF	Superfamilia de las Inmunoglobulinas
IF	Intensidad de Fluorescencia
IFM	Intensidad de Fluorescencia Media
MAC	Molécula de Adhesión Celular
PAD	Prueba de Antiglobulina Directa
PBS	Buffer Fosfato Salino

PS	Fosfatidilserina
R	Reticulocitos
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
VCM	Volumen Corpuscular Medio

RESUMEN

Los glóbulos rojos (GRs) constituyen un interesante modelo para estudiar el envejecimiento celular debido a la facilidad de obtención de la muestra, su constante remoción y la carencia de núcleo y otras organelas subcelulares. El término “senescencia” se utiliza para los hematíes que muestran la mayor cantidad de cambios dependientes del tiempo y representan la población de eritrocitos que ha sido condenada a muerte. En un individuo con 5 litros de sangre, aproximadamente 10^{11} hematíes son formados y removidos cada día.

El eritrocito maduro se halla desprovisto de mecanismos de síntesis, iniciando desde el reticulocito, un proceso de envejecimiento progresivo que termina aproximadamente a los 115 días de su salida de médula ósea. Actualmente se ha propuesto que durante este proceso de senescencia, se producen modificaciones en algunas moléculas de la membrana que alteran

sus funciones y las vuelven inmunogénicas. Estos antígenos de senescencia eritrocitaria son reconocidos por autoanticuerpos fisiológicos iniciando el proceso de remoción de los glóbulos rojos senescentes (GRSe) por las células del sistema mononuclear fagocítico (SMF). Sin embargo, la identidad molecular de estos neoantígenos y la naturaleza de los procesos que inducen a su expresión no han sido totalmente dilucidadas.

La oxidación de las proteínas de membrana sería uno de los mecanismos más aceptados. Las modificaciones conformacionales o estructurales de la proteína Banda 3, podrían conducir a la formación o exposición de un sitio antigénico. Kay asignó el antígeno de senescencia eritrocitario (ASE) específicamente a la proteína Banda 3. Además, algunos autores han observado en GRSe, una pérdida de la asimétrica lipídica como resultado de la translocación de fosfatidilserina (FS) a la monocapa externa de la membrana plasmática. Los lípidos de la membrana eritrocitaria podrían ser considerados como el primer blanco oxidativo en el proceso de senescencia del hematíe. Experimentos *in vitro*, en los cuales se evaluaron el tiempo de almacenamiento de la sangre y la depleción metabólica del eritrocito, han demostrado un aumento en la fragilidad de la membrana del GRSe con la posterior liberación de microvesículas. Las vesículas son rápidamente removidas por células del SMF en un proceso mediado por receptores en los macrófagos que unen FS y probablemente también por autoanticuerpos específicos contra el ASE.

Debido a que la membrana del eritrocito experimenta una fuerte interacción con el ambiente extracelular, las modificaciones en sus moléculas podrían ser responsables de la remoción selectiva de los hematíes. Actualmente se considera que los GRSe o dañados son removidos de la circulación *in vivo* por células fagocíticas en un proceso conocido como eritrofagocitosis. Algunos cambios en los GRs estarían involucrados en su eliminación por fagocitosis, aunque los detalles exactos de los procesos de señalización no son aún totalmente conocidos. Las modificaciones en la Banda 3 mayoritariamente debidas a procesos oxidativos aumentarían la afinidad por

los anticuerpos naturales anti-Banda 3 que se encuentran normalmente en circulación. Estos anticuerpos autólogos junto con el depósito de fragmentos del Complemento principalmente C3, serían fácilmente reconocidos por receptores específicos de las células fagocíticas.

Los eritrocitos son protegidos normalmente de la lisis mediada por complemento por proteínas de superficie reguladoras de la actividad del complemento. El factor acelerador de la degradación o DAF (CD55) inhibe la ruptura de C3 y C5 aumentando el decaimiento de la convertasa C3 y C5. El inhibidor de membrana de la lisis reactiva (CD59), impide la formación del complejo de ataque a la membrana mediante su unión a C8 y C9. La disminución de la expresión de las proteínas CD55 y CD59 en la superficie de los GRSe, conduciría a un aumento de la lisis mediada por el Sistema del Complemento.

Por otro parte, el hematíe maduro en la circulación enfrenta un medio ambiente dinámico y es sometido a distintas fuerzas en sus pasajes por los vasos sanguíneos. Diferentes moléculas de adhesión participan en la regulación de esta interacción. En humanos, la glicoproteína CD47 está asociada con los antígenos Rhesus y ambos forman parte del complejo macromolecular Banda 3. CD47 inhibe la fagocitosis de los eritrocitos por los macrófagos del SFM a través de la unión a las proteínas regulatorias de las señales (SIRP α) en el macrófago. Un modelo experimental propone que durante el envejecimiento se induce un cambio conformacional en CD47, que le permite unirse a la trombospondina (TSP-1) creando un nuevo sitio de unión para SIRP α , que es capaz de reconocer a CD47 como una señal de fagocitosis en lugar de una señal inhibitoria de este mecanismo.

La Hipótesis de este trabajo de Tesis es que durante el proceso de senescencia del hematíe, se producen cambios en algunas moléculas de la membrana plasmática, que actuarían como marcadores en la superficie celular activando la remoción selectiva de los GRSe. Por otra parte, considerando que las preguntas sobre los mediadores que determinan la captura de los GRs por las células del SMF y los procesos propios de la eritrofagocitosis siguen

actualmente sin respuesta, el estudio propuesto en este trabajo de Tesis permitirá profundizar los conocimientos sobre los mecanismos biológicos involucrados en la senescencia celular y en la destrucción eritrocitaria.

Como objetivos generales nos proponemos: investigar las modificaciones de moléculas de la membrana eritrocitaria durante el envejecimiento de los GRs y analizar la participación de estos cambios en la remoción selectiva de los GRSe.

En una etapa inicial de este trabajo de Tesis, separamos las poblaciones de GRs de distintas edades por medio de gradientes de densidad. Debido a que la senescencia es un proceso continuo que no produce ningún cambio crítico que permita identificar con precisión las diferentes poblaciones eritrocitarias, evaluamos la separación por gradientes de densidad de Percoll, mediante el estudio de parámetros hematológicos (Volumen Corpuscular Medio (VCM) y % de Reticulocitos) y parámetros bioquímicos (concentración de creatina). En las poblaciones de GRJ obtenidas, los valores de VCM y el % de Reticulocitos, fueron significativamente mayores que los observados en las suspensiones de GRSe. Estos resultados verifican la eficacia en la obtención de fracciones eritrocitarias homogéneas, porque los hematíes envejecidos presentan menor tamaño. El aumento de la densidad de los hematíes en función del tiempo, se produce por una pérdida preferencial de los constituyentes más livianos de la solución citoplasmática, que conduce a una reducción del volumen. El mayor % de R en las suspensiones de GRJ, es un hallazgo esperable porque esta fracción representa los hematíes de menor edad. Los valores promedios de concentración de creatina en las poblaciones de GRSe, significativamente menores que los observados en los glóbulos rojos jóvenes (GRJ) se deben a una disminución en los intermediarios fosforilados del metabolismo energético que ocurre en el envejecimiento.

También realizamos la cuantificación de las proteínas de membrana en las suspensiones de GRSe y GRJ, sin hallar diferencias significativas respecto a la edad del hematíe en la concentración de proteínas. En trabajos recientes se ha propuesto, que el proceso de oxidación de proteínas de membrana

tendría un rol central en las modificaciones que se producen durante la senescencia eritrocitaria, debido a que los GRs son especialmente susceptibles a la injuria por oxidación al estar expuestos constantemente a altas concentraciones de O₂. Por ello, estudiamos la formación de grupos carbonilos en las distintas poblaciones eritrocitarias, como marcadores de estrés oxidativo debido a su formación relativamente temprana y la estabilidad de las proteínas carboniladas. Los resultados obtenidos revelaron que el contenido de grupos carbonilos es significativamente mayor en los GRSe, confirmando un incremento del nivel de oxidación de las proteínas de membrana durante el envejecimiento. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la senescencia eritrocitaria es un proceso multifactorial de enorme complejidad, que se caracteriza por alteraciones a nivel celular de aspectos fisicoquímicos y biológicos, estos resultados contribuyen a destacar la relevancia de los cambios oxidativos en las proteínas de la membrana involucrados en el proceso de reconocimiento y remoción selectiva de los GRSe de la circulación.

Considerando que el parámetro fisiológico más importante del envejecimiento eritrocitario es la presencia de IgG autóloga, continuamos nuestra investigación determinando la concentración de IgG en GR intactos. Desarrollamos una técnica que mide el consumo de anti-IgG humana marcada con una enzima por células que contienen IgG unida a su superficie, realizando posteriormente la cuantificación de los anticuerpos anti-IgG no unidos. Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en el contenido de IgG en las suspensiones de GRSe con respecto a los valores observados en los GRJ. Además, confirmamos el incremento de IgG autóloga sobre la membrana eritrocitaria en las poblaciones de GRSe mediante imágenes obtenidas por microscopía confocal, visualizando en forma directa la mayor cantidad de anticuerpos unidos a las células de mayor edad. El escaso número de IgG eritrocito específico encontrado bajo condiciones fisiológicas *in vivo* indica que la remoción de los GRSe es un proceso eficiente y muy bien regulado.

Debido a que se ha propuesto que la acumulación de IgG provee un mecanismo directo para la remoción selectiva de los GRSe mediante la unión a

receptores específicos sobre las células del SFM utilizamos un ensayo funcional de monocapa de monocitos (EMM) como parámetro evaluador de los fenómenos que ocurren *in vivo*. Los resultados obtenidos en esta prueba funcional confirman el incremento en la fagocitosis de GRSe que ha sido demostrada por otros autores utilizando técnicas más laboriosas y de mayor costo. Además evaluamos la pérdida de ácido siálico, utilizando el EMM con hematíes tratados con enzimas desialinizantes. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con neuraminidasa aumenta la interacción entre los eritrocitos y las células del SFM. En cambio, la actividad desialinizante de la tripsina no fue suficiente para producir variaciones en la fagocitosis. Estos hallazgos confirman que la pérdida de ácido siálico participa en la destrucción del hematíe, constituyendo una vía alternativa del principal proceso de fagocitosis selectiva de los GRSe que se produce por depósito de IgG autóloga en la superficie eritrocitaria .

Considerando que en la obtención de células de diferentes edades por métodos separativos, la manipulación y la cantidad de muestra son limitaciones en estas investigaciones, estudiamos distintos marcadores de senescencia en sangre entera por Citometría de Flujo, por las ventajas que presenta esta metodología. Validamos el empleo de esta técnica analizando la presencia de IgG autóloga en poblaciones de GRs separadas por gradiente de densidad y en muestras de sangre entera sin separación física de las células. Posteriormente evaluamos la participación de proteínas reguladores de la actividad del Complemento (C3, CD55, CD59) y de la molécula de adhesión CD47. Las modificaciones en el nivel de expresión de las proteínas mayoritarias de los GRs: Banda 3 (CD233) y Glicoforína A (CD235a) en las diferentes poblaciones etáreas, podrían ser el resultado del proceso de microvesiculización y reducción del VCM. Los resultados obtenidos indicaron que estas poblaciones de GRs, pueden estudiarse sin realizar una separación física de las células de distintas edades. La evaluación directa de los GRSe por Citometría de Flujo, permite utilizar pequeñas cantidades de muestras y evita las manipulaciones de las técnicas separativas.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis desde un punto de vista general, serán útiles a la investigación básica y aplicada vinculada al envejecimiento celular y en particular, profundizarán el conocimiento sobre los mecanismos de la senescencia eritrocitaria. Los avances obtenidos permitirán establecer la participación de los componentes intracelulares en los diferentes cambios en la superficie eritrocitaria que determinan su reconocimiento específico y los mediadores inmunológicos que conducen a la remoción selectiva de los GRSe. Además, la correcta descripción del proceso de senescencia eritrocitaria contribuirá al conocimiento sobre la etiología y desarrollo de algunas eritropatías y a la realización de un diagnóstico más precoz y adecuado. También, teniendo en cuenta que se ha postulado que en los GRs almacenados en los bancos de sangre se producen modificaciones similares a las observadas durante el envejecimiento eritrocitario *in vivo*, que podrían contribuir a los efectos adversos de las transfusiones, la identificación de los cambios en los GR envejecidos aportará nuevos enfoques para optimizar el mantenimiento metabólico y la integridad celular de los eritrocitos transfundidos. La correcta descripción del proceso de envejecimiento eritrocitario permitirá mejorar la eficacia transfusional y la conservación de las fracciones eritrocitarias en los bancos de sangre.