

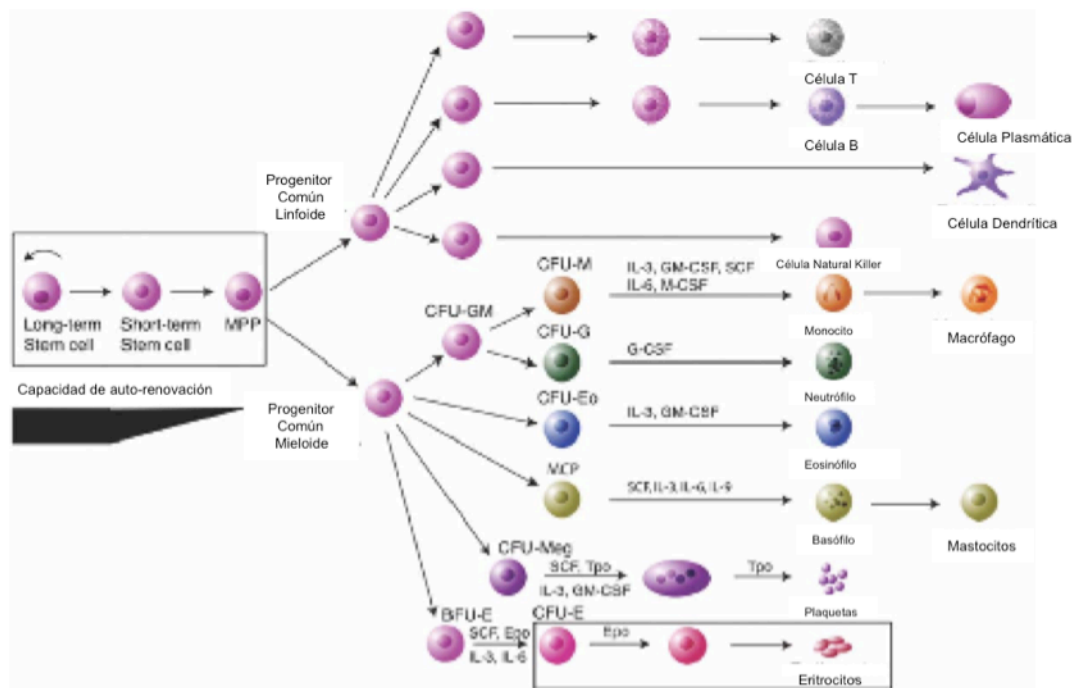
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Los eritrocitos

Los hematíes se originan a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes que se comprometen a células progenitoras de linaje eritroide. En la etapa fetal, los glóbulos rojos (GRs) se producen en el saco vitelino embrionario, el hígado y el bazo y en el individuo adulto se originan en la médula ósea. En la eritropoyesis se distinguen distintas etapas de diferenciación y maduración hasta que finalmente los eritrocitos jóvenes, ya sin núcleo, abandonan la médula ósea como reticulocitos, que se liberan en la sangre circulante y en 1-2 días se convierten en GRs maduros (1). En el adulto, aproximadamente el 1% de los eritrocitos circulantes se renuevan cada día. Cada etapa de diferenciación y maduración está regulada por citoquinas, dando lugar a un riguroso control de la producción de los diferentes tipos celulares específicos (2).

La eritropoyesis (Figura 1) es estimulada por la eritropoyetina, y regulada por el factor de transcripción inducible por hipoxia 2. La eritropoyetina previene la apoptosis de las células progenitoras de linaje eritroide, promueve la formación de eritroblastos a partir de células progenitoras eritroides e inhibe la muerte suicida de los GRs maduros (también denominada eryptosis por Lang y col.) (1, 3).

La regulación de la eritropoyesis y de la eryptosis proporciona variabilidad en el número de eritrocitos y como consecuencia en la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre.



**Figura 1:** Eritropoyesis. Tomada de: Stem Cell to Erythroblast: Regulation of Red Cell Production at Multiple Levels by Multiple Hormones. Harvey Lodish, Johan Flygare and Song Chou. Life, 62(7): 492–496, July 2010.

En individuos sanos, el número de eritrocitos supera los  $4 \times 10^{12}/l$  en la circulación sanguínea y tienen una vida de 115 días con una variación entre 70 y 140 días, y una diferencia del 15 % entre individuos (4, 5, 6). Por lo tanto en un individuo con 5 litros de sangre, aproximadamente  $10^{11}$  hematíes son formados y removidos cada día. La vida de los eritrocitos se encuentra limitada por la senescencia y la posterior eliminación de los GRs envejecidos (1).

## 1.2. Organización estructural de la membrana de los glóbulos rojos

La estructura de la membrana plasmática del eritrocito es de fundamental importancia para el intercambio gaseoso. El citoesqueleto subyacente es también vital para la función del GR, manteniendo una elevada relación superficie/área que le permite realizar deformaciones reversibles durante su pasaje por la vasculatura (7).

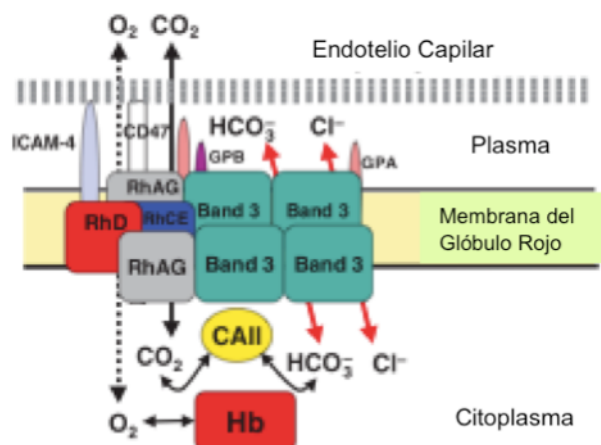
Las proteínas del citoesqueleto se encuentran físicamente unidas a la membrana por interacciones verticales con las proteínas integrales, que además forman macrocomplejos multiproteicos por medio de interacciones horizontales con la membrana (8). Una gran variedad de proteínas adaptadoras están involucradas en la formación y mantenimiento de las mismas. Las alteraciones de las uniones entre el citoesqueleto y las proteínas de membrana producen modificaciones en la forma de los GRs (esferocitos, eliptocitos, ovalocitos) indicando su importante participación en la estructura funcional.

Las principales uniones membrana-citoesqueleto se producen en dos sitios claves: el complejo asociado a la ankirina y el complejo de unión. El complejo asociado a la ankirina (también llamado macrocomplejo Banda 3), une al complejo tetramérico de Banda 3, formado por Banda 3, glicoforina A (GPA), proteína 4.2 y anhidrasa carbónica II (ACII) y al complejo Rh, formado por las proteínas RhAG, RhCe, RhD, CD47, ICAM-4 y glicoforina B (GPB), usando la asociación directa de Banda 3 (9) con la proteína 4.2 (10) y RhAG (11) con la ankirina (12).

La proteína 4.2, que se une a Banda 3 y ankirina, actúa como un puente entre los dos subcomplejos y los conecta al citoesqueleto mediante la interacción de la ankirina con la  $\beta$ -espectrina (13). El complejo de unión se forma en torno a un eje o "unión" que surge entre las conexiones laterales entre las proteínas 4.1R, actina y  $\beta$  espectrina (14). El citoesqueleto del eritrocito está formado por una red hexagonal de tetrámeros de espectrina unidos por cortos filamentos de actina (15).

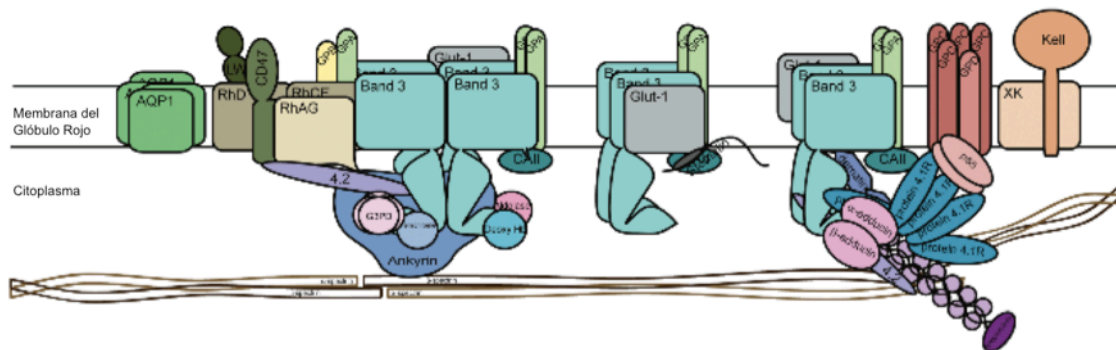
### 1.2.1. El macrocomplejo proteico Banda 3/Rh

La glicoproteína Banda 3, conocida como el intercambiador de aniones del GR (AE1), es la proteína eritrocitaria más abundante, con aproximadamente  $10^6$  copias por células (16). La proteína Banda 3 eritroide está formada por tres dominios: 1- un dominio N-terminal citoplasmático de 403 aminoácidos que interactúa con la ankirina y la proteína 4.2 del esqueleto submembranal y con enzimas glicolíticas, deoxyhemoglobina y hemicromos; 2- un dominio de membrana de 479 aminoácidos, que la atraviesa 14 veces; y 3- un dominio C-terminal citoplasmático de 29 aminoácidos que se une a la ACII (17) (Figura 2). Los 21 antígenos del sistema de grupo sanguíneo Diego surgen de sustituciones de aminoácidos sobre los dominios externos de la Banda 3 (18). Esta proteína tiene un rol importante en el transporte sanguíneo eficiente de los gases respiratorios. En los GRs, en presencia de agua ( $H_2O$ ), la ACII hidrata el dióxido de carbono ( $CO_2$ ) a bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) y  $H^+$ . La proteína Banda 3, transfiere iones  $HCO_3^-$  fuera de la célula en intercambio por cloruro ( $Cl^-$ ). El protón interactúa con la hemoglobina (Hb) promoviendo la liberación de  $O_2$ . Como el  $HCO_3^-$  es más soluble que el  $CO_2$ , este proceso favorece el transporte de  $CO_2$  y la liberación de  $O_2$  en los tejidos, mientras que en los pulmones se produce el proceso inverso (19, 20).



**Figura 2:** Diagrama que representa el macrocomplejo Banda 3/Rh en la membrana del glóbulo rojo, propuesto por Bruce y col (28) (Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, Mohandas N, Anstee DJ, Tanner MJA: A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003; 101:4180–4188). Muestra los tetrameros de Banda 3 funcionando como intercambiador aniónico HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>, la familia de proteínas Rh e interaccionando con la Hemoglobina y las moléculas de adhesión CD47 e ICAM-4. Figura tomada de: *Functions of red cell surface proteins* G. Daniels *Vox Sanguinis* (2007) 93, 331–340.

En los GRs humanos están presentes tres miembros de la familia de las proteínas Rh: RhD y RhCcEe, que expresan los antígenos del sistema de grupo sanguíneo Rh, y la glicoproteína asociada RhAG. Estas proteínas presentan dominios N- y C- terminales citoplasmáticos y 10 dominios que atraviesan la membrana. RhAG, en asociación trimérica o tetramérica con RhD y RhCcEe, forma parte de un macrocomplejo con tetrámeros de la proteína Banda 3 y con las moléculas de adhesión intercelular 4 (ICAM4/LW glicoproteína), CD47 y las glicoforinas A y B (Figura 3) (21). En el macrocomplejo Banda 3/Rh, RhAG se encuentra en un sitio ideal para canalizar CO<sub>2</sub> hacia y desde la ACII y O<sub>2</sub> hacia y desde la Hb. Además, las moléculas de adhesión ICAM4 y CD47 podrían contribuir a facilitar las interacciones adhesivas transitorias entre los GRs y el endotelio vascular para maximizar la transferencia de gases. El macrocomplejo Banda 3/Rh también estaría asociado en la membrana con la acuaporina 1 (AQP1), que proporciona el H<sub>2</sub>O necesaria para la hidratación del CO<sub>2</sub>.



**Figura 3:** Complejo Banda 3 en la membrana de los GRs. Tomada de: Modelling the structure of the red cell membrane. Nicholas M. Burton and Lesley J. Bruce. *Biochem. Cell Biol.* 89: 200–215 (2011).

### 1.2.2. Glicoforinas

Las glicoforinas denominadas también sialoglicoproteínas por su alto contenido en ácido siálico, son proteínas transmembranales. Presentan un segmento citoplasmático que interactúa con el citoesqueleto, un segmento hidrofóbico que atraviesa la bicapa y un segmento glicosilado extracelular con residuos de ácido siálico, que confieren al eritrocito sus cargas eléctricas negativas.

**Glicoforina A:** Es la principal glicoproteína de los GRs y representa el 2 al 4 % de la masa total de las proteínas eritrocitarias. Atraviesa todo el espesor de la bicapa y el polimorfismo de los aminoácidos en su extremo terminal determina los antígenos eritrocitarios M y N.

**Glicoforina B:** Es estructuralmente muy parecida a la anterior. La variabilidad en sus aminoácidos es responsable de los antígenos S y s.

Las glicoforinas A y B poseen más del 90% del ácido siálico total de la superficie del eritrocito. La homología estructural entre estas proteínas indica que provienen de un gen ancestral común.

**Glicoforinas C y D:** Participan en la estabilidad y en el mantenimiento de las propiedades de la membrana eritrocitaria. Son glicoproteínas estrechamente

relacionadas en las cuales se expresan los antígenos del grupo sanguíneo Gerbich. Desempeñan una importante función en la membrana de los GRs, debido a que su ausencia se encuentra asociada a modificaciones morfológicas. Los eritrocitos deficientes en glicoforinas C y D (denominado fenotipo Leach) tienen anormalidades funcionales y presentan una forma elíptica (22, 23).

### **1.2.3. Lípidos de membrana**

La bicapa lipídica está compuesta por proporciones iguales de colesterol y fosfolípidos (24, 25). El colesterol se considera distribuido en forma igualitaria entre las 2 capas, mientras que los 4 principales fosfolípidos se encuentran dispuestos asimétricamente. La fosfatidilcolina y la esfingomielinina están predominantemente localizadas en la monocapa externa, mientras que la mayoría de la fosfatidiletanolamina y toda la fosfatidilserina (PS) junto con constituyentes fosfoinositósidos menores, se encuentran en la monocapa interna (26, 27). Los diferentes tipos de transportadores proteicos de fosfolípidos, dependientes y no dependientes de energía, han sido implicados en la generación y mantenimiento de la asimetría de los fosfolípidos (28, 29). Las flipasas mueven fosfolípidos de la monocapa externa a la interna, mientras que las flopasas hacen lo opuesto contra un gradiente de concentración de una manera energía dependiente. En contraste, las escramblasas mueven fosfolípidos bidireccionalmente contra sus gradientes de concentración de una manera energía independiente (30, 31).

El mantenimiento de la distribución asimétrica de los fosfolípidos, en particular la localización exclusiva de la PS y los fosfoinositósidos en la monocapa interna, es importante en las funciones eritrocitarias. Debido a que los macrófagos reconocen y fagocitan GRs que exponen PS en su superficie externa, la ubicación de estos lípidos en la monocapa interna es esencial para que la célula sobreviva a sus frecuentes encuentros con los macrófagos del

sistema fagocítico mononuclear (SFM), especialmente en el bazo. La pérdida de la asimetría de los lípidos lleva a la exposición de la PS sobre la monocapa externa, que podría ser importante en la destrucción prematura de los GRs en hemoglobinopatías y en los GRs senescentes (GRSe) (32, 33, 34). Por otra parte, la restricción de la PS la monocapa interna, también inhibe la adhesión de los GRs normales a las células endoteliales vasculares, garantizando así el tránsito a través de la microvasculatura (35).

#### **1.2.4. Moléculas de adhesión eritrocitarias**

Una molécula de adhesión celular (MAC) se define como un receptor de la superficie celular capaz de unirse a otras células o a algún sustrato de la matriz extracelular por medio de la interacción con su ligando (36). Las MACs pueden ser agrupadas en superfamilias, teniendo en cuenta sus estructuras primarias (37, 38, 39). Las células eritroides, en sus diferentes estadios de diferenciación, expresan MACs de las superfamilias de las inmunoglobulinas (IgSF), integrinas y sialomucinas y de las familias de la caderinas y selectinas junto con unas MACs que tienen poca homología estructural con otras proteínas (40) (Figura 4). Con excepción de CD47, el cual se expresa en  $2$  a  $4 \times 10^4$  copias por GR, todas las MACs son expresadas en un número relativamente bajo (41). Las moléculas IgSF sobre los GRs incluyen las glicoproteínas Lutheran (Lu), ICAM-4, proteína de membrana asociada al eritroblasto (ERMAP, la proteína JMh), el antígeno Scianna, basigina (CD147) y CD47. ICAM-4 y CD47 son parte del macrocomplejo Banda 3/Rh (16).

##### **1.2.4.1. Sialoadhesinas**

Las sialoadhesinas, actualmente llamadas Siglecs son receptores de la superficie celular que reconocen residuos de ácido siálico. Pertenecen a la IgSF con 2 a 17 dominios inmunoglobulina (Ig) y constituyen lectinas

específicas para muchas variantes del ácido siálico. Las Siglecs se unen a la mayoría de los residuos más comunes del ác. N-acetilneuramínico uniéndose por  $\alpha$  2-3 ó  $\alpha$  2-6 a galactosa (42).

#### **1.2.4.2. ICAM-4/Glicoproteína LW**

LW es el antígeno original Rhesus y comparte una relación fenotípica con RhD. La parte externa de la molécula está formada por 2 dominios Ig. La glicoproteína LW ha sido llamada ICAM-4. Las ICAMs son los ligandos para las integrinas; son moléculas de adhesión que consisten en heterodímeros con varias subunidades transmembranas  $\alpha$  y  $\beta$ . Aunque las otras ICAMs son específicas para una sola integrina, ICAM-4 interactúa con una amplia variedad de integrinas:  $\alpha$ L $\beta$ 2,  $\alpha$ M $\beta$ 2,  $\alpha$ X $\beta$ 2,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ V $\beta$ 1,  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ V $\beta$ 5 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 1. ICAMs 1, 2 y 3 son moléculas de adhesión de linfocitos, granulocitos y monocitos pero ICAM-4 parece estar restringida a las células eritroides y posiblemente a la placenta (43). La unión de ICAM-4 sobre los GRs, a la integrina del monocito/macrófago  $\alpha$ X $\beta$ 2 en el bazo, podría tener una participación en la remoción de los GRs (44). Como parte del macrocomplejo Banda3/Rh, ICAM-4 facilitaría las interacciones adhesivas transitorias entre los GRs y el endotelio vascular para maximizar la transferencia gaseosa (21).

#### **1.2.4.3. CD47 (Proteína Asociada a Integrina)**

Esta proteína presenta 5 dominios de membrana y un dominio extracelular Ig altamente glicosilado. Se distribuye en forma amplia en los tejidos y no expresa antígenos de grupos sanguíneos (45). Además participa en la migración transcelular y en la adhesión celular a la matriz extracelular. En algunos tipos celulares, la molécula de CD47 está física y funcionalmente asociada con la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 y con VLA-2  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, justificando su nombre de proteína asociada a integrina. Los dominios Igs de CD47 se unen a dominios C-terminales de proteínas de la matriz extracelular (46).

La regulación de la adhesión celular depende de diversos factores, que incluyen el nivel de expresión y el estado de activación de las moléculas de adhesión y de sus ligandos, la accesibilidad del ligando y las fuerzas físicas que son aplicadas entre las células y las moléculas de adhesión. El eritrocito maduro en la circulación se encuentra en un medioambiente dinámico y sometido a fuerzas en sus pasajes por los vasos sanguíneos. Aunque los reticulocitos y los GRs maduros presentan sobre su superficie una determinada cantidad de MAC, en condiciones normales, estas células son no-adhesivas en la vasculatura (38, 43).

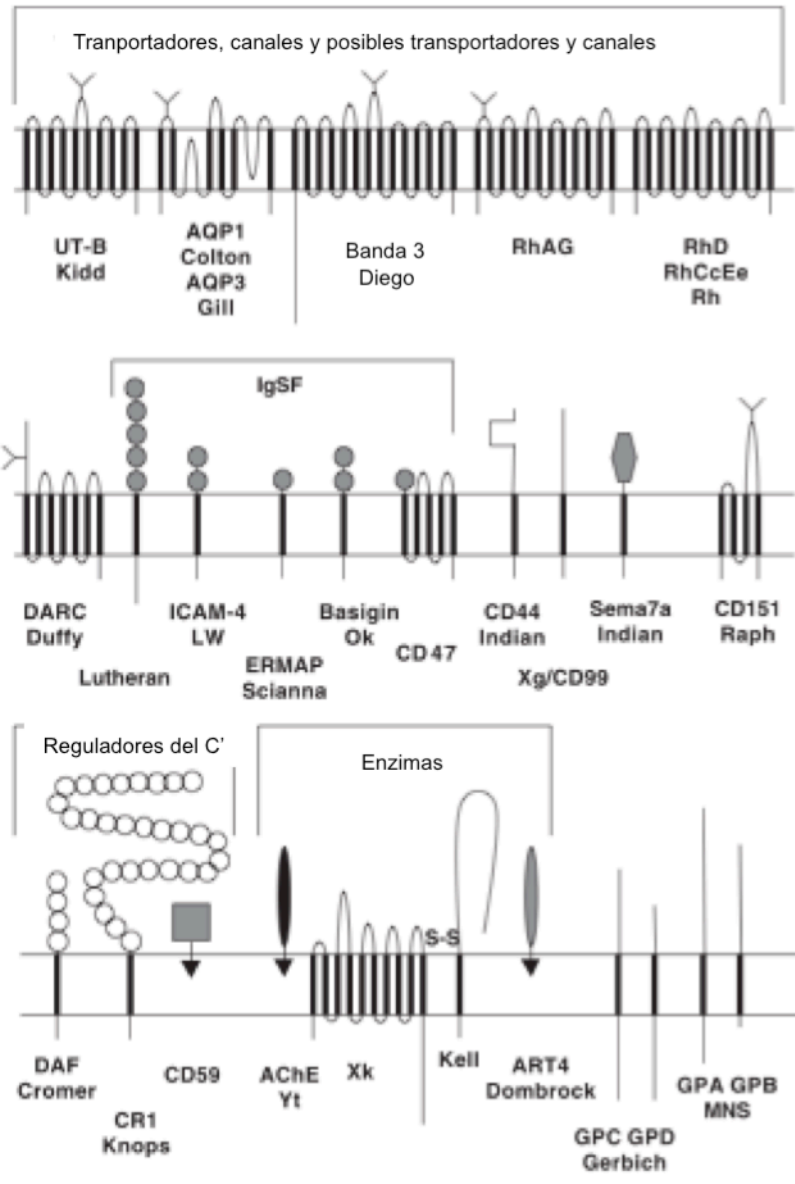
#### **1.2.5. Proteínas reguladoras del Sistema del Complemento**

Dos glicoproteínas de la superficie de los GRs pertenecen a la superfamilia de proteínas de control del complemento (CCP):

1- el factor acelerador de decaimiento (DAF, CD55), unido a la membrana por medio de glicosilfosfatidilinositol (GPI), tiene 4 dominios repetidos CCP y expresa los 15 antígenos del sistema de grupo sanguíneo Cromer

2- el receptor del complemento-1, (CR1, CD35), tiene alrededor de 30 dominios CCP y expresa los 9 antígenos del sistema Knops.

La glicoproteína CD55 ayuda a proteger a los GRs de la lisis por complemento autólogo, un rol que comparte con CD59, otra glicoproteína unida por GPI, que no es polimórfica y no presenta actividad de grupo sanguíneo (47). CD55 inhibe la acción de la convertasa C3, mientras que CD59 previene el ensamble del complejo de ataque a la membrana. La principal función de CR1 en los GRs es unir y procesar complejos inmunes y transportarlos al hígado y al bazo para su remoción de la circulación (48).



**Figura 4:** Representación esquemática de proteínas de la superficie de los GRs. Figura tomada de: Functions of red cell surface proteins G. Daniels Vox Sanguinis (2007) 93, 331–340.

### **1.3. Los eritrocitos senescentes**

Los GRs han sido utilizados como un interesante y conveniente modelo para estudiar el envejecimiento celular debido a la facilidad de su obtención, su constante remoción y su carencia de núcleo y de otras organelas subcelulares (23, 49).

La palabra “senescencia”, según Bessis (50) no significa solamente envejecimiento celular, es la expresión de desórdenes que conducen a una disminución de la capacidad de sobrevivir y a un incremento de la susceptibilidad a las condiciones hostiles. En el caso particular de los GRs, Aminoff (52) afirma que el término senescente se utiliza para los eritrocitos que muestran la mayor cantidad de cambios dependientes del tiempo (52-54). Después de una vida de aproximadamente 115 días los eritrocitos son eliminados de la circulación por células del SFM. Este proceso es similar al observado en la destrucción de los GRs sensibilizados por auto y aloanticuerpos en la mayoría de las Anemias Hemolíticas Inmunes (55-57).

#### **1.3.1. Envejecimiento celular**

El envejecimiento es un proceso biológico universal inevitable, que puede ser descrito como una disminución general en las funciones fisiológicas, acumulación de cambios adversos y probabilidad de muerte aumentada. La principal característica molecular del envejecimiento es la acumulación progresiva de daños en las macromoléculas (58, 59).

Entre las diferentes hipótesis, la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo constituye la mejor descripción del proceso de envejecimiento, que se manifiesta dentro de un organismo a nivel genético, molecular, órgano celular, y sistémico (60). Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son producidas por las células aeróbicas como un subproducto de sus procesos metabólicos. A nivel celular, estas EROs se encuentran en equilibrio con moléculas antioxidantes. El estrés oxidativo es el resultado de un desbalance debido a la depleción de antioxidantes, exceso de acumulación de EROs o ambos, con

consecuencias perjudiciales para el organismo. Según la teoría de los radicales libres del envejecimiento, el estrés oxidativo aumenta con la edad, dando lugar a la acumulación de productos de oxidación de lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono y esteroides que causan la disfunción celular y aumentan la susceptibilidad a los agentes nocivos externos. En el estudio de las alteraciones bioquímicas que ocurren durante el envejecimiento y el estrés oxidativo se han utilizado diferentes modelos. Los GRs, junto con su membrana constituyen uno de los sistemas más empleados por su importante papel en procesos fisiológicos y metabólicos (61-63). Debido a su deformabilidad, los GRs pueden atravesar capilares más estrechos que su diámetro y recuperar rápidamente su forma original. Considerando la ausencia de organelas celulares particularmente núcleo y mitocondrias, los eritrocitos pierden su capacidad para sintetizar proteínas y limitan su metabolismo para sobrevivir hasta su eliminación, siendo continuamente removidos de la circulación para mantener el número adecuado, equilibrando la formación en la médula ósea con la velocidad de eliminación por las células del SFM (64). Los eritrocitos tienen una vida útil definida en todas las especies animales, indicando que, como en otras células, la vida y la muerte están bien reguladas, a pesar de su incapacidad para la síntesis de proteínas. (65).

### **1.3.2. Modificaciones asociadas a la senescencia eritrocitaria**

#### **1.3.2.1. Deformabilidad celular**

Los eritrocitos humanos deben sobrevivir a una gran variedad de cambios físicos y químicos durante su vida. Los cambios físicos de los hematíes son necesarios para que su diámetro de aproximadamente  $7\mu\text{m}$ , se reduzca a  $1,5\mu\text{m}$  para atravesar los pequeños vasos sanguíneos y los capilares sinusoides (66). La membrana eritrocitaria mantiene su integridad

estructural mientras está sujeta a deformaciones y estrés, conservando su capacidad de deformación (67).

Los GRs normales, con el envejecimiento, experimentan un ligero incremento en la concentración de Hb como resultado de la pérdida de agua, un aumento en la viscosidad intracelular y una reducción de su superficie que limita la extensión de la deformación (52). La deformabilidad también se modifica en diversas patologías entre ellas algunas Anemias Hemolíticas. Los GRs de pacientes con Esferocitosis,  $\alpha$  y  $\beta$  Talasemias Hereditarias, Anemia Drepanocítica y Esferocitosis Autoinmune, presentan una disminución de la deformabilidad asociada a un acortamiento de la vida de esos GRs (68, 69).

#### **1.3.2.2. Volumen celular. Sodio y Potasio**

Debido a que la Hb es el principal componente de los GRs, la densidad celular está primariamente determinada por la concentración intracelular de Hb, que depende del contenido de agua ( $H_2O$ ) del GR, regulada por la concentración de potasio ( $K^+$ ) y de sodio ( $Na^+$ ). Con el envejecimiento, la población de GRSe se vuelve más densa debido a que contienen menos concentración de  $Na^+$  y  $K^+$  que el resto de los GRs. Estudios realizados sobre los mecanismos de transporte de estos iones en la población de GRs más densa, mostraron una progresiva disminución en la concentración de  $K^+$  mientras que el contenido de  $Na^+$  permanece constante. También, se ha demostrado un aumento de la permeabilidad al  $K^+$  en la membrana de los GRSe (70).

#### **1.3.2.3. Calcio**

Una hipótesis sobre la senescencia involucra una depleción metabólica que produce el funcionamiento alterado en la bomba de  $Ca^{2+}$ -ATP dependiente, conduciendo a una acumulación de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en el interior del eritrocito durante el envejecimiento. La depleción de ATP conduciría al incremento de los

niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, activando a su vez, la permeabilidad al  $\text{K}^+$   $\text{Ca}^{2+}$  dependiente. La consecuente pérdida desbalanceada de  $\text{K}^+$  podría causar deshidratación, contracción celular (71) e incremento en la concentración intracelular de Hb. Además, también se postula que el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la membrana celular es contribuir a la pérdida de la deformabilidad del eritrocito a medida que envejece (72).

#### **1.3.2.4. Oxidación de Proteínas**

La capacidad antioxidante del plasma es la medida principal y el marcador más adecuado para evaluar el estado y potencial del estrés oxidativo en el envejecimiento. Los métodos de estudio utilizados se basan principalmente en la evaluación de los radicales libres y la inhibición de la peroxidación lipídica (73-75). Las proteínas son objetivos importantes debido a su alta concentración en las células, en el plasma, y la mayoría de los tejidos, y por su capacidad de reaccionar con los radicales libres y otros oxidantes (76). Las EROs conducirían a la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos y a la formación de enlaces cruzados proteína-proteína dando lugar a la fragmentación proteica (77). El ataque de las EROs a las proteínas modifica los aminoácidos lisina, arginina, residuos de histidina y de prolina, generando grupos carbonilos. Estas modificaciones estructurales serían un marcador temprano de la oxidación de las proteínas y es considerado como una medida del daño proteico (78).

#### **1.3.2.5. Actividad enzimática**

Las variaciones químicas potenciales que experimentan los GRs durante su envejecimiento incluyen estrés oxidativo, depleción metabólica y pérdida de su gradiente iónico (79, 80) que son mantenidos por las células mediante un importante repertorio de mecanismos enzimáticos. Cuando el eritrocito pierde su núcleo y ribosomas, no puede sintetizar proteínas, dependiendo de la

glucólisis anaeróbica para obtener la energía necesaria (80-82). Durante su vida en la circulación, el eritrocito es capaz de sostener un nivel efectivo de adenosina-trifosfato (ATP), nicotinamida-adenina di nucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), su forma reducida NADH y su forma fosforilada NADP y mantener su composición iónica (83). También puede reducir meta Hb y glutatión oxidado, sintetizar glutatión y resellar su membrana.

La actividad de algunas de las enzimas eritrocitarias ha sido determinada en las poblaciones de GR jóvenes (GRJ) y GRSe. Estos estudios han demostrado una disminución en las actividades de enzimas como glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y superóxido dismutasa. Se ha observado que la actividad enzimática disminuye a medida que el eritrocito envejece, indicando que la destrucción de los GRSe podría depender de la pérdida del potencial metabólico y de alteraciones en algunas biomoléculas de membrana (84-89).

#### **1.3.2.6. Proteína Banda 3**

La Banda 3 eritrocitaria humana es una proteína de 92-kDa con aproximadamente  $1.2 \times 10^6$  copias por GR. Participa en la homeostasis del volumen celular y en el intercambio  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , manteniendo la integridad celular.

Las alteraciones en la proteína Banda 3 observadas en los GRSe son producidas por mecanismos que involucran la desnaturalización de la Hb dando lugar a la formación de hemicromos. Como la proteína Banda 3 atraviesa la membrana 14 veces es más vulnerable al daño de los radicales libres y a los hemicromos (90). Las modificaciones en la proteína Banda 3, producidas por ruptura proteolítica o agregación como resultado de procesos oxidativos, dan lugar a la formación o exposición de un sitio antigénico, denominado antígeno de senescencia eritrocitario (ASE), que induce la acumulación de IgG autóloga en la superficie celular favoreciendo la remoción de los GRs. Kay asignó el antígeno de senescencia eritrocitario

específicamente a la región de los aminoácidos 538-554 y 812-830 de la proteína Banda 3 (91-94).

#### **1.3.2.7. Glicoforinas**

Los GRSe presentan una disminución del 10-15% en el contenido de ácido siálico por célula con respecto a los GRJ. En algunos estudios el ácido siálico fue determinado como la cantidad liberada por la acción de la neuraminidasa, dependiendo su valor de la posibilidad de obtener poblaciones homogéneas de células jóvenes y senescentes. Los contenidos totales de ácido siálico por célula, son menores en células envejecidas debido a la pérdida de membrana que experimentan durante su vida. Sin embargo, por diversas técnicas se ha demostrado una idéntica movilidad electroforética en hematíes de distintas edades, a pesar del menor contenido de ácido siálico en las células envejecidas. Esta discrepancia aparente podría atribuirse a la pérdida de componentes superficiales en algunas proteínas sin cambios en la densidad de cargas, mientras aparecen nuevos grupos carbonilos (95-98). Las alteraciones en la carga negativa de los residuos de ácido siálico en las glicoproteínas de membrana, reduciría la repulsión entre los GRs y los fagocitos, permitiendo así la ingestión de los GRs envejecidos y alterados por el SFM (99).

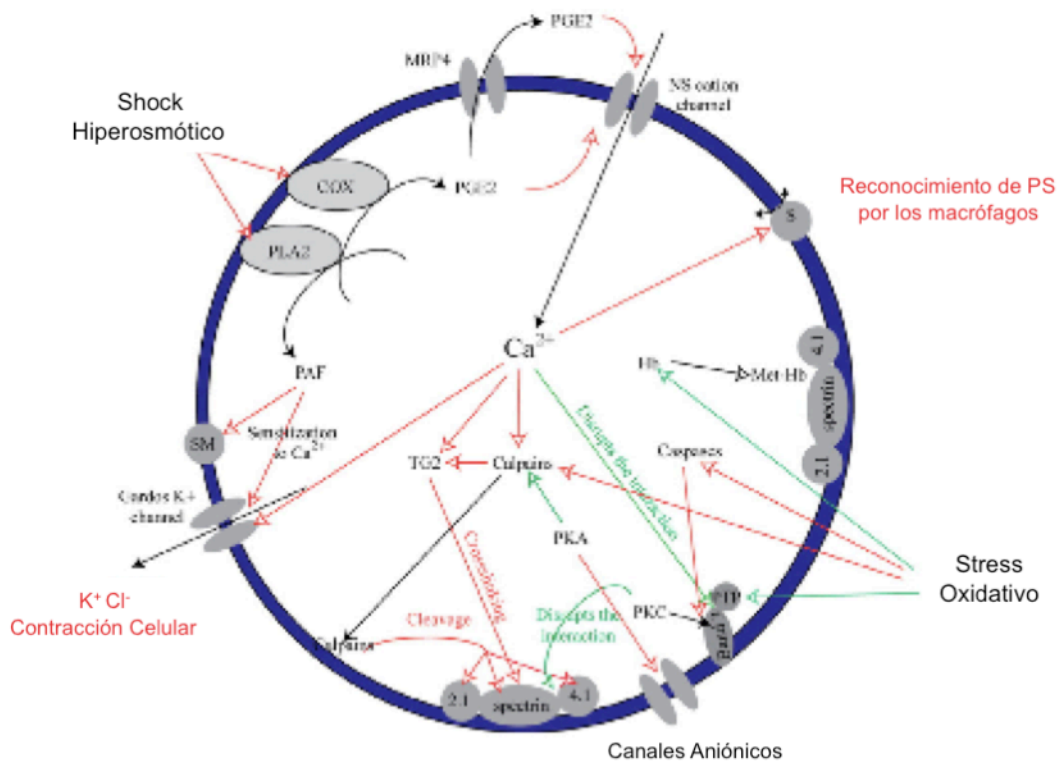
#### **1.3.2.8. Exposición de fosfatidilserina**

La exposición de PS en la capa externa de la membrana ha sido descrita como un marcador de apoptosis en las células nucleadas (100, 101). Aunque la apoptosis en los GRs sigue siendo discutida, los hematíes muestran señales de la misma, tales como la exposición de PS y la formación y liberación de vesículas de la membrana (102). Este proceso recientemente fue denominado eryptosis por Lang y col. (103). Un incremento intracelular de  $Ca^{2+}$  en los GRs produciría la activación de varios procesos importantes para la

exposición de PS: 1- activación de la escramblasa e inhibición de la flipasa (28), 2- activación de canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> llevando a una pérdida de K<sup>+</sup> y agua, dando lugar a la contracción celular (104, 105), 3- activación de la Proteín Kinasa C (PKC) (106) y 4- activación de la calpaína, una cisteína endopeptidasa que degrada proteínas del citoesqueleto favoreciendo la formación de microvesículas sobre la membrana de los GRs (3, 107, 108). En la actualidad la interconexión entre las vías no ha sido totalmente dilucidada. Otros parámetros estarían involucrados además en la exposición de PS en los GRs humanos, tal como la activación de caspasas, la producción de ceramidas, el estrés oxidativo y agotamiento de ATP (103, 107-109).

En algunas Anemias Hereditarias (32, 34, 110) y durante el almacenamiento a largo plazo en los bancos de sangre, la disminución en la sobrevida de los GRs está asociada con un incremento en la exposición de PS (111). Debido a que la exposición de PS proporciona actividad procoagulante (33, 112), en los pacientes con desórdenes hemolíticos hereditarios estaría aumentado el riesgo de trombosis (113).

La disminución en la asimetría de los fosfolípidos, una de las consecuencias del envejecimiento fisiológico a nivel de la membrana, resulta en la exposición de PS, que junto con otras señales, participan en el reconocimiento y remoción de los GRSe vía fagocitosis (Figura 5 ) (114, 115). Por lo tanto la exposición de PS sobre los GRs y su reconocimiento directo por receptores fagocíticos puede agregar redundancia al mecanismo de eliminación y conferirle mayor eficacia en pacientes hipo y agamaglobulinémicos.



**Figura 5:** Vías conocidas que llevan a la eritropoiesis. Tomado de: Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s). Niels Lion y col. Journal of Proteomics 73 (2010) 374–385

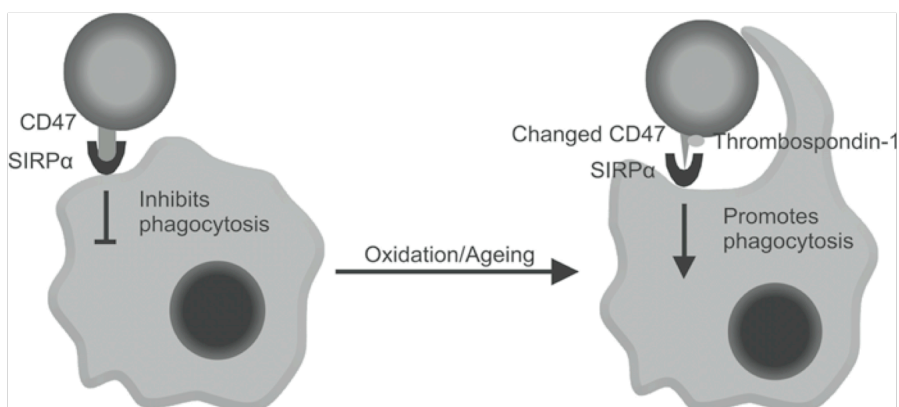
### 1.3.2.9. Expresión de las MACs

#### 1.3.2.9.1. CD47 y SIRP

En humanos, la proteína CD47 está asociada con los antígenos Rhesus y ambos son parte del complejo macromolecular de proteínas de membrana integrales y periféricas involucradas en el intercambio gaseoso y el transporte de  $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$  (21). La inserción de CD47 en la membrana de los GRs es dependiente de la presencia de la proteína periférica Banda 4.2 que actuaría como una chaperona en este proceso y formaría un puente entre CD47 y la porción citoplasmática de la Banda 3 (21, 115, 116, 117). CD47 inhibe la fagocitosis de los eritrocitos por los macrófagos del SFM (118, 119) a través de

la unión a proteínas regulatorias de las señales (SIRP $\alpha$ ) en el macrófago que a su vez induce la señalización inhibitoria por medio de secuencias motivo basadas en el inmunoreceptor de tirosina (ITIMs) presentes en la región citoplasmática de SIRP $\alpha$  (120, 121). La unión de CD47 a SIRP $\alpha$  activa las fosfatasa SHP-1 y SHP-2, que regulan las vías de señalización y las funciones efectoras 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 $\alpha$ , que es capaz de reconocer a CD47 como una señal de fagocitosis en lugar de una señal inhibitoria de este mecanismo (Figura 6 ). Los daños oxidativos pueden ser un factor importante en la generación de esta señal de fagocitosis porque inducen un cambio conformacional en CD47, necesario para la unión de TSP-1 (122). Además como CD47 se encuentra en un complejo de proteínas formado por Banda 3, Glicoforina A y CD44, es posible un efecto indirecto sobre la conformación de CD47 por modificación de estas proteínas de membrana (123, 124).



**Figura 6:** Cambios oxidativos y el envejecimiento llevan a un cambio conformacional en CD47 que llevan a la unión de TSP-1. En condiciones normales, CD47 sobre los eritrocitos inhibe la fagocitosis por medio de la interacción con SIRP $\alpha$  sobre el macrófago. Luego del cambio conformacional en CD47, TSP-1 es capaz de unirse a CD47 y enviar una señal de fagocitosis a los macrófagos. Tomada de CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance – the Dutch Point of View. Patrick Burger y Col. Transfus Med Hemother 2012; 39:348–352.

### **1.3.2.9.2. Acido siálico y siglecs**

El ácido siálico y las siglecs estarían involucrados en la regulación del contacto célula – célula (42). Por lo tanto, los residuos de ácido siálico terminales no solamente evitan la aglutinación debido a su carga negativa, sino que además actúan como marcadores de lo propio evitando que los macrófagos fagociten a las células portadoras de ácido siálico. Los GRs humanos se unen a las siglecs por múltiples puntos de unión y el tratamiento con sialidasas anula su unión (125). Esto permite un nuevo abordaje a una vieja historia, explicando como la pérdida de ácido siálico puede ser el disparador de la remoción de los GRs (126). Los GRSe pierden parte de su superficie y con ello disminuye la expresión de las glicoforinas y en consecuencia la unión a las siglecs, por lo tanto pueden volverse más susceptibles a la fagocitosis por los macrófagos del SFM (127).

### **1.3.2.10. Proteínas Reguladoras del Sistema del Complemento**

Los GRs normalmente son protegidos de la lisis mediada por el complemento por la acción de proteínas reguladoras en la superficie celular. El receptor del complemento CR1 (CD35) es una glicoproteína transmembrana que previene la activación excesiva del complemento por inhibición de las convertasa C3 y C5. El factor acelerador del decaimiento (CD55) inhibe la ruptura de C3 y C5 acelerando el decaimiento de las convertasas C3 y C5 (128). El inhibidor de la lisis CD59, inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) por unión a C8 y C9. La disminución de la expresión de las proteínas CD55 y CD59 en la superficie de los GRSe, conduce a una susceptibilidad aumentada de lisis mediada por el Sistema del Complemento (129, 130).

#### 1.4. Mecanismos de remoción eritrocitaria

Las hipótesis relativas a la destrucción de los GRSe se basan en dos aspectos diferentes. El primero considera que los GRs envejecidos son removidos en forma directa por la alteración de alguna función intrínseca mientras que el segundo propone que los cambios sobre la superficie celular pueden proporcionar una señal para su reconocimiento por las células del SFM. El mecanismo de remoción aceptado actualmente considera que se produce por una combinación de ambos eventos, unidos por alguna comunicación transmembranal. El reconocimiento de las modificaciones en la superficie de los GRs puede proveer la última señal para la destrucción celular, pero estos cambios eritrocitarios estarían asociados con una alteración de la función intracelular.

En circunstancias fisiológicas, los GRSe tienen unido sobre su membrana IgG autóloga, que induce su reconocimiento y fagocitosis. La acumulación de este anticuerpo específico durante la parte final de la vida del hematíe representa una evidencia accesible a la identificación del antígeno al que está unido y al mecanismo de envejecimiento (131). El escaso número de IgG autóloga, encontrado *in vivo* indicaría que la remoción de los GRSe es un proceso eficiente y controlado. Lutz, afirma que unos cientos de moléculas de IgG sobre los GRSe y un tercio de este valor en los GRJ, es insuficiente para inducir la fagocitosis mediante los receptores Fcγ. Estos anticuerpos junto con algunos componentes del Sistema del Complemento podrían ser mediadores eficientes del reconocimiento de los GRSe por sus receptores específicos en los macrófagos (57, 131).

La prueba de la Antiglobulina Directa (PAD) permite demostrar *in vitro* la sensibilización de los eritrocitos, en particular con IgG y C3d . Sin embargo, algunos autores consideran que la sensibilidad de esta técnica no sería suficiente para detectar las mínimas cantidades de anticuerpos unidos a suspensiones de GRSe y GRJ, siendo necesario utilizar otros métodos más sensibles (132, 133).

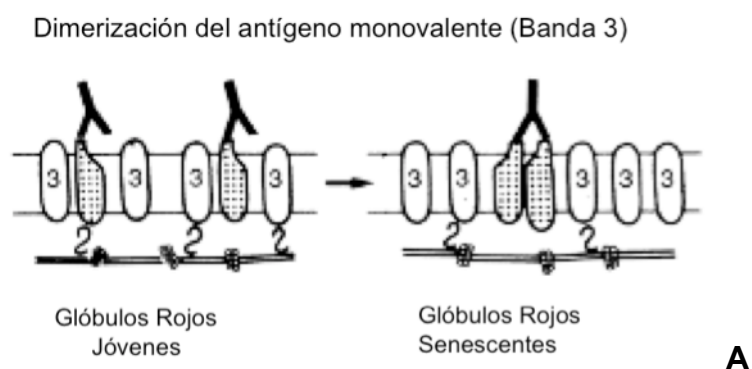
En los últimos años se han desarrollado ensayos funcionales que permiten evaluar la interacción entre GR sensibilizados por alo y autoanticuerpos y células efectoras del SFM. Este ensayo de monocapa de monocitos (EMM) se podría utilizar además para estudiar la fagocitosis fisiológica de GRSe. (56, 57, 134, 135).

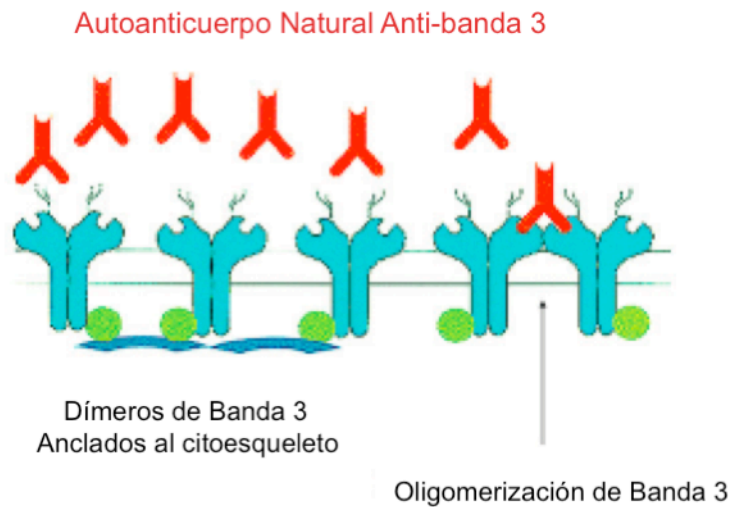
Por otra parte, algunos autores han propuesto que una disminución en la carga negativa de la membrana del GR podría reducir significativamente la repulsión interactiva con las células de SFM facilitando la fagocitosis. Los estudios de microscopía electrónica han mostrado que la densidad de carga superficial es menor en los GRs viejos (136). Estos hallazgos, junto con la observación de una rápida depuración de los GRs tratados con neuraminidasa de la circulación, sugieren que la pérdida de ácido siálico participaría en la remoción selectiva de los GRSe (98, 137, 138). En los últimos años se ha demostrado que la eritrofagocitosis puede ocurrir aún en ausencia de inmunoglobulinas. Estos hallazgos indican que habría al menos dos formas de eritrofagocitosis: la vía “clásica” que es inmunoglobulina dependiente y la “alternativa” que es inmunoglobulina independiente.

El recambio diario eritrocitario en el ser humano es de aproximadamente 20 g de células, que son eliminadas como GRSe intactos, en lugar de restos de lisis. La depuración de los GRs dañados funcionalmente pero intactos representa una necesidad para prevenir la exposición de autoantígenos al sistema inmune, evitando la autoagresión. El desarrollo de mecanismos de eliminación eficientes de GRSe, con daños oxidativos (52, 139, 140) ó de células apoptóticas (141, 142, 143, 144, 145), requiere de células fagocíticas y de la participación del sistema inmune humoral innato, formado por autoanticuerpos naturales de baja afinidad y por el Sistema del Complemento. Las uniones de C3b junto con los autoanticuerpos IgG actúan como ligandos de la unión de las células a los fagocitos (54).

### 1.4.1. Autoanticuerpos anti-Banda 3

La participación de IgG autóloga en la remoción selectiva de los GRSe fue reportada por primera vez por Kay (146, 147 ). La IgG autóloga aumenta *in vitro* la fagocitosis de los GRSe pero no de los GRJ. Las IgG humanas contienen diferentes tipos de autoanticuerpos naturales que reaccionan con proteínas de la membrana eritrocitaria (148) siendo el anti-Banda 3 el anticuerpo que se une a los GRSe (149,150). Estas IgG se unen a oligómeros de Banda 3 producidos por el daño oxidativo (151, 152, 153, 154, 155), que da lugar a la unión de hemicromos en las membranas de los GRs (90, 156, 157). Estos oligómeros no constituyen los tetrámeros preexistentes anclados al citoesqueleto (158), ni los dímeros individuales que pertenecen a la fracción móvil de la proteína Banda 3 (159). Estas estructuras presentan una baja afinidad para unirse al autoanticuerpo anti-Banda 3. Se postula que los dímeros están en forma de V de manera tal que las 2 porciones Fab de un autoanticuerpo anti-Banda 3 no se puedan unir simultáneamente a las 2 moléculas de la proteína dentro de un dímero, pero si puede unir bivalentemente 2 dímeros con forma de V que están y quedan en estrecho contacto (Figura 7).





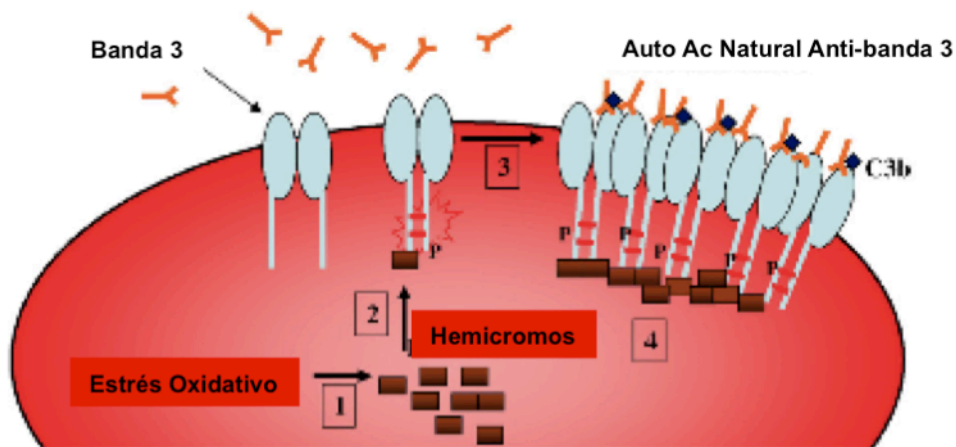
**B**

**Figura 7:** Modelo propuesto de para la exposición del antígeno de senescencia que permite la unión firme y bivalente del autoanticuerpos natural anti- Banda 3.

A) El antígeno específico de senescencia es monomérico, pero en gran medida está inmovilizado por la interacción con el citoesqueleto. El desprendimiento del citoesqueleto permite que la proteína monomérica forme dímeros que se unen al Autoanticuerpo natural bivalente. Tomado de: Lutz et al. *Swiss Medical Weekly* 1981; 111:1507-1517; 36

B) Estudios sobre la topología de la proteína Banda 3 sugieren que Banda 3 existe principalmente como dímeros anclados al citoesqueleto, que como tal no pueden unirse al autoanticuerpo contra la banda 3 bivalente. Por la separación del citoesqueleto, se forman tetrámeros u oligómeros de Banda 3 que facilitan la unión bivalente de los autoanticuerpos naturales anti-banda 3 Estos anticuerpos se unen a una región del péptido antigénico en la proteína Banda 3, pero no se unen a los hidratos de carbono presentes sobre la proteína (líneas finas sobre Banda 3). Tomado de: Naturally Occurring autoantibodies in mediating clearance of senescent red blood cells. Hans U. Lutz. *Naturally Occurring Antibodies (NAbs)*, edited by hans U. Lutz. ©2012 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

Lutz considera que es necesaria una alteración topológica entre las moléculas de Banda 3 para permitir la unión bivalente de los autoanticuerpos anti-Banda 3 (157, 158, 160-162) (Figura 8).



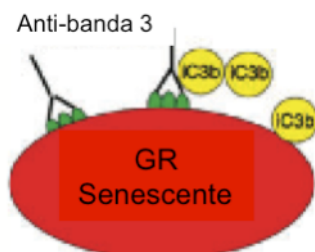
1. La desnaturalización debida a daño oxidativo de la hemoglobina lleva a la formación de hemicromos.
2. Los hemicromos se unen al dominio citoplasmático de Banda 3 provocando su ruptura oxidativa a través de puentes disulfuro y fosforilación de residuos de tirosinas
3. Disociación de Banda 3 de las proteínas del citoesqueleto y su agrupación (oligomerización)
4. Formación de clusters Banda 3/Hemicromos y opsonización con autoanticuerpos naturales y C3b.

**Figura 8:** tomada de: Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. Pantaleo y col. Autoimmunity Reviews 7 (2008) 457–462.

#### 1.4.2. Participación del Sistema del Complemento

Los autoanticuerpos dirigidos hacia proteínas grandes son generalmente de baja afinidad y se encuentran en el plasma normal en concentraciones menores de 1 ug/ml (163). Estos autoanticuerpos naturales no pueden opsonizar eficazmente sus células blanco, dependiendo de la activación del sistema del complemento para inducir fagocitosis (164-166). Los autoanticuerpos naturales activan la vía clásica del Complemento que conduce al depósito de C<sub>3</sub>b y también pueden estimular la amplificación del complemento formando complejos C<sub>3</sub>b<sub>2</sub>-IgG (167, 168). El autoanticuerpo natural anti-Banda 3 forma estos complejos con mayor afinidad por C<sub>3</sub> que las otras moléculas de IgG (169). Los complejos C<sub>3</sub>b<sub>2</sub>-IgG son 7 a 10 veces mejores activadores de la amplificación de la C<sub>3</sub> convertasa (170), por lo tanto,

los autoanticuerpos naturales que participan en la opsonización de los GRSe pueden aumentar su baja afinidad amplificando la unión al Complemento (167, 171, 172) (Figura 9).



**Figura 9:** Unión del autoanticuerpos natural Anti Banda 3 y proteínas del Sistema del Complemento a los GRSe. Tomada de A pair of naturally occurring antibodies may dampen complement-dependent phagocytosis of red cells with a positive antiglobulin test in healthy blood donors. Lutz y col. Vox Sanguinis (2009) 97, 338–347.

### 1.4.3. Antígeno Específico de Senescencia Eritrocitaria

Actualmente se considera que la proteína Banda 3 participa en la generación del ASE. Esta proteína sufre cambios durante la vida del hematíe que conduce a la unión de la IgG específica.

Estas modificaciones y la identidad molecular del ASE, no han sido totalmente identificados. Se han propuesto 2 etapas en la formación del neoantígeno: agregación y ruptura de la proteína Banda 3. En la primera hipótesis, la unión de Hb desnaturalizada al dominio citoplasmático de la Banda 3 produce su oligomerización, que resulta en la formación de un neoantígeno que es reconocido por la IgG específica. Esta hipótesis es sustentada por datos experimentales que muestran una asociación entre el incremento de la unión de IgG y la oligomerización de Banda 3 *in vitro* e *in vivo*. El aumento concomitante de hemicromos unidos a la membrana indica la participación de los productos de oxidación de la Hb en este proceso (173, 174). En la segunda hipótesis, la ruptura o disociación de la Banda 3 en el dominio de membrana sería el evento central que lleva a cambios conformacionales resultando en la

generación del ASE. Esta hipótesis es avalada por experimentos que demuestran una ruptura y una disminución de la capacidad del transporte aniónico dependiente de la edad del GR (175). Ambas teorías explican la disminución de la interacción entre la membrana y el citoesqueleto. En ambos escenarios se considera que la oxidación desempeña un rol central tanto en la hipótesis de oligomerización o a través de un aumento de la sensibilidad de la Banda 3 a la proteólisis en la hipótesis de la ruptura. Otras líneas de investigación indican que la ruptura relacionada con la edad de Banda 3 sería causada por la activación de proteasas sensibles al aumento de calcio intracelular (176).

#### **1.4.4. Envejecimiento eritrocitario y apoptosis**

Durante el envejecimiento, el volumen del eritrocito decrece, con un incremento de la densidad especialmente durante la primera parte de su vida y una disminución en el contenido de Hb durante el tiempo restante (177). Estos cambios están asociados con una disminución del colesterol y de los fosfolípidos y una disminución lineal en la medida de la relación superficie - área del 20%, que conduce a una pérdida de la membrana durante el envejecimiento, que podría ser explicada a través de la formación de microvesículas (178). Los análisis inmunológicos de estas vesículas por citometría de flujo e inmunoblotting revelaron que una fracción de las mismas contiene IgG, productos de degradación de la proteína Banda 3 y exponen PS. Los estudios por HPLC, demostraron que la composición de Hb de estas vesículas es semejante a la determinada en los GRSe y además están aumentados los productos de glicosilación y carbamilación (179). Las vesículas desaparecen rápidamente de la circulación. En un modelo en ratas, se ha observado que las células de Kupffer en el hígado, responsables de la remoción de los GRSe, eliminan estas vesículas rápidamente, principalmente por “receptores basureros” y siendo la PS el principal ligando (180). Después de la esplenectomía, comienzan a acumularse vacuolas en los eritrocitos de

todas las edades, posibles precursoras de las vesículas. Por lo tanto, se puede considerar que el bazo facilita el proceso de vesiculización de los hematíes. Es posible que los cuerpos de Heinz y otros cuerpos de inclusión conduzcan al GR a la misma vía. Puede también considerarse que el efecto benéfico de la esplenectomía en algunos pacientes con anemia hemolítica originada por errores congénitos en las proteínas de membrana del GR (181), puede ser causado por la prevención de una vesiculización inapropiada, que resulta en eritrocitos más grandes en estos pacientes.

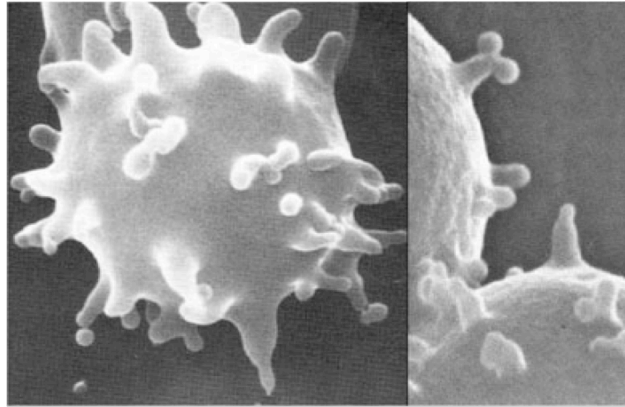
Actualmente se está realizando un análisis comparativo a nivel proteico e inmunológico de las vesículas producidas en circunstancias fisiológicas *in vivo* y en fracciones de GRs de diferentes edades (182, 183). Los datos disponibles permitirían combinar el proceso de vesiculización asociado con la edad y el mecanismo inmunológico, en una nueva hipótesis sobre el mecanismo de envejecimiento eritrocitario. Se propone que las modificaciones de las proteínas por oxidación, glicosilación, carbamilación, nitrosilación o ubiquitinilación ocurren en etapas tempranas de la vida del GR. Considerando a la Hb la principal responsable en el proceso de envejecimiento, la unión de Hb desnaturalizada al dominio citoplasmático de Banda 3 induciría la modificación en el dominio de membrana de esta proteína. En cambio las alteraciones en la estructura de la proteína Banda 3 podrían inducir la unión de la Hb. Las proteasas sensibles al aumento de calcio intracelular producido por la activación de canales catiónicos sensibles al volumen, estarían involucradas en las modificaciones de la proteína Banda 3 (184, 185). La presencia de productos de degradación de la proteína Banda 3, podría también explicar la pérdida de agua durante la primera parte de la vida del eritrocito, como una consecuencia osmótica de la disminución en la capacidad de transporte aniónico de la misma (177, 179). La difusión lateral de los monómeros de Banda 3 estaría influenciada por la unión de hemicromos y las alteraciones en las uniones membrana-citoesqueleto en las unidades funcionales compuestas por dímeros y tetrámeros de Banda 3 podrían incrementar la curvatura de la membrana e inducir vesiculización (186). Alternativamente, es posible que la

ruptura de la Banda 3 en la membrana altere la organización lipídica a través de la pérdida de lípidos anclantes alterando la movilidad de los lípidos en las sucesivas capas. Este mecanismo induciría la formación de vesículas sin alterar el citoesqueleto (178, 187). De esta manera, las vesículas conteniendo Hb desnaturalizada y con alteraciones estructurales en la proteína Banda 3, que formarían el ASE, generarían señales para su eliminación. A través de este proceso, los productos no funcionales y/o tóxicos son continuamente removidos del eritrocito durante la mayor parte de su vida. Hacia el final, sin embargo, las defensas celulares se agotan, saturando el sistema de formación de vesículas dando lugar a la remoción de GR enteros (Figura 10).

Actualmente se considera que la muerte celular programada, denominada apoptosis ocurre a través de una cadena de eventos disparados por señales de stress intra o extracelulares (llamada fase de activación), y además:

- 1- los componentes proteicos de este proceso están expresados constitutivamente
- 2- la fase de ejecución involucra una cascada proteolítica Ca-dependiente (fase de ejecución)
- 3- la activación está controlada por proteínas regulatorias, y
- 4- los remanentes son removidos por fagocitosis, sin proceso de inflamación (denominada fase de sepultura)

La desconexión entre el citoesqueleto y la membrana celular, da como resultado la vesiculización, fragmentación celular y la fagocitosis de los restos celulares es disparada por “rasgos distintivos” tal como la presencia de PS en la superficie de las membranas (114, 188). Una recopilación de los eventos de los mecanismos que llevan a la remoción de los GRSe de la circulación descritos anteriormente (envejecimiento, oxidación, autoinmunidad, proteólisis Ca dependiente, vesiculización, exposición de PS, fagocitosis) muestran una casi completa superposición con los términos que caracterizan el proceso apoptótico de células nucleadas (189).



**Figura 10:** Imágen que muestra la formación de microvesículas en los eritrocitos. Tomada de: The how and why of exocytic vesicles. Tibor J. Greenwalt. TRANSFUSION 2006; 46:143-152.

En este contexto debería enfatizarse que los datos obtenidos durante la última década muestran que el eritrocito contiene un complejo grupo funcional de sistemas regulatorios. El contenido de ATP, la concentración de aniones y cationes, el volumen celular y la forma celular no son estáticos como consecuencia del medioambiente del eritrocito pero, como en todas las células, son reguladas como una respuesta a la demanda de células y de órganos vecinos (190, 191). Así, varias vías de transducción de señal están presente y activas, poniendo la vida y la muerte del eritrocito una vez más, en una posición central en el estudio de la homeostasis del organismo.

### **1.5. Separación de Poblaciones de Eritrocitos**

El método más comúnmente empleado para separar células senescentes de las jóvenes, está basado en el aumento de la densidad que presentan a medida que envejecen. Este aumento de la densidad (masa / volumen) en función del tiempo se debe a una pérdida preferencial de los constituyentes más livianos de la solución citoplasmática que se acompaña con una reducción del volumen celular. Se pierde fundamentalmente agua mientras

que se conserva la Hb. Esta correlación densidad - edad permite obtener por métodos de centrifugación a las poblaciones celulares de distintas edades. Las primeras separaciones de GRs de distintas edades se realizaron en sangre de sujetos humanos normales cuyos hematíes habían sido marcados utilizando hierro radioactivo. Las células marcadas tenían una baja densidad y se concentraban cerca de la superficie de una muestra de células centrifugadas, pero cuando progresaba el tiempo, las células eran encontradas en posiciones correspondientes a densidades más altas. Estos investigadores concluyeron que los GRs humanos normales se vuelven progresivamente más densos y que los métodos de separación celular dependiente de la densidad proporcionaban un medio efectivo de separación de poblaciones celulares de progresivo incremento de edad. Una crítica importante a esta metodología se basa en el descubrimiento que la densidad de los GRs humanos no incrementa de manera uniforme a lo largo de la vida del GR (192-194).

El aumento de susceptibilidad a la lisis osmótica es otra de las propiedades que se observa en el envejecimiento celular, por lo tanto puede ser utilizada para la obtención de GRSe. Sin embargo las fracciones obtenidas basándose en esta característica no son totalmente homogéneas respecto a la edad (195). Se ha propuesto también la separación por edad de las distintas poblaciones eritrocitarias basándose en la carga superficial o el tamaño celular (53, 196). Estos métodos emplean un campo eléctrico o métodos de distribución contracorriente usando solventes inmiscibles de diferente polaridad. Sin embargo, este modelo no ha sido ampliamente usado.

El almacenamiento de GRs *in vitro* podría proveer un modelo de envejecimiento *in vivo*. Dado que la capacidad de sobrevivencia de los hematíes almacenados decrece con el tiempo, se considera que los GRs continúan envejeciendo durante la conservación y que las características adquiridas durante este período que limita su sobrevivencia podrían ser comparables con las adquiridas durante la senescencia fisiológica. Para evaluar esta posibilidad, células almacenadas han sido comparadas con células de alta densidad recientemente separadas. Se han observado algunas semejanzas, incluyendo

una disminución de la superficie de la membrana, similares patrones de cambios en las proteínas de membrana como las observadas por electroforesis en gel (197), y un incremento en la unión a autoanticuerpos séricos (147). En una manera análoga, características similares entre células densas normales y GRs de diversas varias patologías, tal como GRs de Talasemias, Anemia Drepanocítica o Esferocitosis Hereditaria, han llevado a sugerir que tales patologías celulares podrían representar instancias de aceleración del envejecimiento. Anteriormente, la suposición de que la destrucción de GRs normales era análoga a la de células patológicas ha llevado a conclusiones prematuras acerca de los mecanismos fundamentales de la senescencia eritrocitaria. Estos modelos son a veces útiles para investigar la función y destrucción de los GRs con diferentes anomalías, pero las conclusiones obtenidas deberían ser cuidadosamente evaluadas para su aplicabilidad a GRSe normales. El cambio en la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHbCM) y del VCM en las subpoblaciones de distintas edades son probablemente los indicadores más útiles para evaluar la calidad de la separación (198). Se deberían considerar también problemas potenciales asociados con contaminaciones por leucocitos o plaquetas (199).

#### **1.5.1. Centrifugación en gradiente de densidad: Percoll**

El Percoll es uno de los solutos más empleados en la elaboración de gradientes de densidad. Es una suspensión de partículas (5.15 nm) de ácido silícico revestidas de un derivado de polivinilo (polivinilpirrolidona, PVP) que protege a las células de la acción tóxica de la sílica coloidal, dando lugar a soluciones isosmóticas, con pH neutro y alta densidad. (200, 201). Los gradientes de Percoll han sido usados para fraccionar varios tipos de células sanguíneas humanas y también de otras especies; hepatocitos; macrófagos humanos y murinos; células de otros tejidos normales y neoplásicos; organelas; bacterias, protozoos y virus (202-204).

El Percoll presenta ventajas como medio de formación de gradientes de densidad: las partículas adheridas a las especies separadas son fácilmente removidas de la superficie celular con lavados; la superficie de PVP del Percoll puede ser marcada radiactivamente y es un compuesto estable en múltiples condiciones. Esta característica permite ajustar la solución de Percoll a la osmolaridad de las células y partículas a separar (205, 206).

### **1.6. Citometría de Flujo y Senescencia Eritrocitaria**

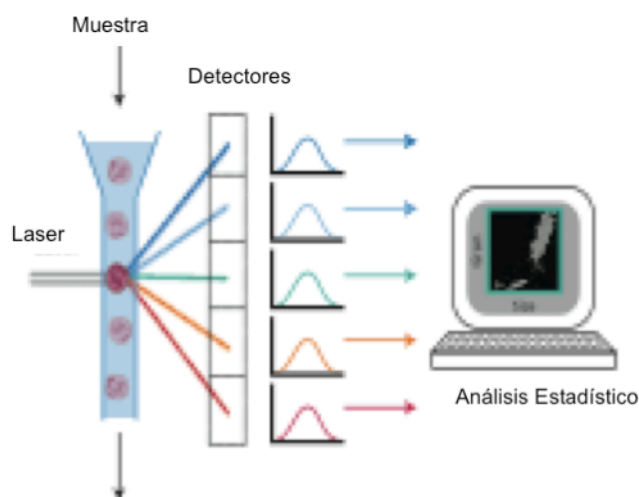
En los últimos años, el diagnóstico clínico ha experimentado profundas modificaciones debidas, en gran medida, a los avances producidos por los nuevos métodos cuali y cuantitativos de análisis celular. Entre ellos se destaca la citometría de flujo (CMF), que ha alcanzado gran relevancia en la evaluación médica, además de la obtenida en la investigación básica.

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Aunque, desde el punto de vista cronológico, la CMF es una tecnología relativamente reciente, sus características especiales como técnica de análisis celular han hecho que en la última década su uso se haya extendido de forma rápida, desde los laboratorios de investigación básica hasta los laboratorios clínicos (207).

La CMF ha encontrado amplia utilidad en ciencias como la inmunología, hematología, oncología, anatomía patológica y biología celular (208). En comparación con los métodos bioquímicos de análisis celular, en los que se obtiene un resultado promedio para toda la muestra, la CMF es capaz de proporcionar una información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando están presentes muy baja cantidad. La CMF es una metodología de análisis que permite discriminar células o partículas en suspensión de diferente tamaño, forma y características inmunofenotípicas,

que atraviesan una fuente de luz láser. Esta técnica es utilizada en muchos laboratorios clínicos y de investigación para medir y cuantificar propiedades fenotípicas, bioquímicas y/o moleculares de células individualizadas mediante la utilización de sondas fluorescentes específicas de uno o varios marcadores celulares (209-211). El análisis se realiza a velocidades de miles de células/segundo, permitiendo obtener datos de elevada fiabilidad estadística e identificar poblaciones de baja frecuencia dentro de la población global.

La CMF representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión. El principio que utiliza esta tecnología es simple: pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Figura 11) (211).



**Figura 11:** Representación esquemática del fundamento de la Citometría de Flujo

### **1.6.1. Aplicaciones Clínicas de la Citometría de Flujo**

La CMF es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de gran calidad facilita la aplicación de este método analítico en el diagnóstico, clasificación, evaluación pronóstica y valoración de enfermedad mínima residual. Esta metodología permite el análisis de un gran número de células (habitualmente entre 10,000 células por muestra y más de un millón en los estudios de enfermedad mínima residual). La aplicación de la CMF al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo) lo que contribuye a aumentar, tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba (Figura 12). En otras áreas como en el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, en el monitoreo de enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple (212), lupus eritematoso sistémico (213) y artritis reumatoide (214)) la CFM ha demostrado en numerosos trabajos su utilidad. También ha permitido realizar el seguimiento de la recuperación inmune después del trasplante de médula ósea (215), la identificación precoz del rechazo en pacientes que han recibido un trasplante alogénico (216), o el monitoreo terapéutico de los enfermos con anemia aplásica (217).

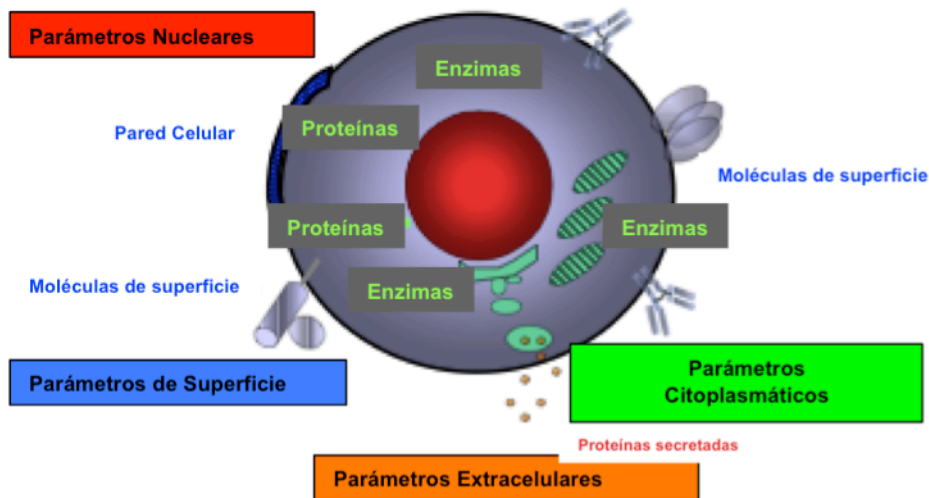


Figura 12: Parámetros medibles por Citometría de Flujo

### 1.6.2. Aplicaciones de la Citometría de Flujo a la investigación Básica

Los aportes de la CMF a la investigación básica son innumerables en distintos campos: microbiología, hematología, inmunología, citología, patología, biología celular y molecular, entre otros. Sin embargo, es posible intentar clasificar dichas aplicaciones según el área específica en la que es posible utilizar la CFM como herramienta de investigación. Esta metodología ha sido utilizada en el monitoreo del contenido de ADN (218), expresión fenotípica, transporte de drogas, flujo de calcio, proliferación y apoptosis (219). Virtualmente es posible marcar cualquier molécula que sea de interés siempre que se disponga de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo que pueda ser detectado por el citómetro de flujo, esto hace posible que sus aplicaciones se adapten prácticamente a cualquier necesidad de investigación. Actualmente, la relación entre la aplicación básica y clínica es cada vez más estrecha dando la oportunidad a su vez a la aplicación diagnóstica, pronóstica y de tratamiento en múltiples enfermedades.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Al analizar lo expresado previamente, podemos afirmar que la senescencia eritrocitaria es un proceso complejo afectado por varios parámetros bioquímicos e inmunológicos. Las distintas hipótesis sobre los mecanismos del envejecimiento del hematíe y su eliminación selectiva pueden resumirse en dos puntos de vista. Uno considera que los GRSe son depurados como resultado de alteraciones en algunas funciones intrínsecas y el otro propone que los cambios en la superficie celular permiten su reconocimiento por las células del SMF. Este proceso podría ser una combinación de ambos eventos. Las modificaciones en la superficie constituirían la última señal para la destrucción celular, pero estos cambios estarían asociados a un decaimiento de las funciones intracelulares.

Considerando que la principal limitación al estudio del envejecimiento del hematíe, es la obtención de poblaciones etáreas homogéneas, evaluamos la técnica más adecuada. El método más comúnmente empleado para separar los GRSe se basa en el aumento de densidad que presentan las células a medida que envejecen. La correlación densidad-edad permite realizar un fraccionamiento de las poblaciones eritrocitarias de distintas edades por métodos de centrifugación (2,4).

Varios autores han demostrado distintas modificaciones en las moléculas del hematíe durante su envejecimiento. Debido a que los GRs maduros son incapaces de sintetizar proteínas, se considera que alteraciones

conformacionales y/o químicas en las proteínas pre-existentes, producen cambios reconocibles en la superficie de la membrana. Las modificaciones estructurales u oxidativas de la principal proteína eritrocitaria Banda 3, conducirían a la exposición de un antígeno de senescencia implicado en la remoción selectiva de los GRSe. En algunas investigaciones se han considerado a los lípidos de la membrana eritrocitaria como un blanco oxidativo en el proceso de senescencia, debido al incremento en la lipoperoxidación y a la alteración de la asimetría de la membrana, con exposición de FS en la capa externa. La disminución en la sobrevivencia eritrocitaria también se ha asociado con un aumento en la exposición de FS en los GRs de pacientes con Anemias Hereditarias. Esta evidencia junto con el rol atribuido a la FS en el reconocimiento y la remoción de las células apoptóticas, indica que podría participar en el envejecimiento normal del eritrocito.

Considerando que la membrana del hematíe ejerce una fuerte interacción con el ambiente extracelular, las modificaciones observadas en sus moléculas podrían ser responsables de su remoción selectiva de la circulación sanguínea. La acumulación de IgG autóloga en la superficie celular, se produce debido principalmente a los cambios que ocurren en la proteína Banda 3. Aunque este mecanismo no ha sido completamente dilucidado, estudios preliminares han sugerido que escasas moléculas de IgG son suficientes para la fagocitosis y que la unión se produce en las últimas semanas, indicando que la destrucción de los GRSe es un proceso eficiente y organizado. Las modificaciones en Banda 3 debidas mayoritariamente a procesos oxidativos, aumentarían la afinidad por los anticuerpos anti-Banda 3 que se encuentran normalmente en circulación. La presencia sobre la membrana eritrocitaria de estos anticuerpos y de fragmentos del Complemento, especialmente C3, serían reconocidos por los receptores específicos del fagocito. Para una mejor comprensión de los mecanismos biológicos que regulan la eritrofagocitosis es necesario implementar meticulosos ensayos *in vitro* que permitan una mejor aproximación a la eliminación fisiológica de los GRSe.

Otras moléculas de la superficie eritrocitaria también se modifican en el proceso de senescencia. La glicoproteína CD47, señal de inhibición de la fagocitosis en los GRs, debido a los procesos oxidativos que ocurren durante la vida del hematíe, se transforma en una señal activadora para la remoción. Las proteínas reguladoras de la actividad del Complemento CD55 y CD59 disminuyen su expresión en el GR, aumentando la susceptibilidad a la lisis. Por otra parte, el proceso de vesiculación que ocurre durante el envejecimiento eritrocitario, conduciría a la disminución de la expresión de las proteínas mayoritarias (Banda 3 y Glicoforina A). Las vesículas son rápidamente removidas por las células del SMF en un mecanismo mediado por receptores scavenger que unen FS y también por autoanticuerpos específicos contra el ASE .

La Citometría de Flujo es una herramienta muy útil en el análisis celular porque permite el estudio individual de gran cantidad de células, de manera objetiva, sensible y específica. Una de sus aplicaciones más conocidas consiste en el estudio del inmunofenotipo celular que permite identificar y caracterizar las neoplasias hematológicas. Aunque su empleo en la evaluación de la fisiología de los GRs maduros es limitado, principalmente por los inconvenientes en la aglutinación y agregación de los hematíes, consideramos que podría aportar nuevos enfoques al envejecimiento eritrocitario.

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.

## 2.1. Objetivos específicos

- Obtener fracciones eritrocitarias homogéneas de distintas edades y verificar la eficiencia de la separación mediante el estudio de parámetros hematológicos (VCM y % de Reticulocitos) y bioquímico (concentración de creatina)
- Investigar las modificaciones de las moléculas de la membrana durante el envejecimiento del GR
  - \* Estudiar el nivel de oxidación de las proteínas de la membrana eritrocitaria.
  - \* Analizar los cambios cuali y cuantitativos de la proteína Banda 3 en las poblaciones de GRs de distintas edades.
  - \* Cuantificar la IgG unida a la membrana en las fracciones de hematíes.
- Estudiar la interacción entre las diferentes poblaciones eritrocitarias y las células mononucleares periféricas mediante el EMM:
  - \* Utilizar esta prueba funcional con suspensiones de GRs de distintas edades.
  - \* Determinar el efecto de enzimas desialinizantes en la fagocitosis eritrocitaria.
- Evaluar la contribución de la CMF al estudio de la expresión de los diferentes marcadores implicados en la senescencia eritrocitaria.
  - \* Validar los análisis por CMF en el estudio de los GRSe, sin realizar la separación física de las células, determinando la presencia de IgG autóloga en las diferentes muestras.
  - \* Determinar del factor C3 del Sistema del Complemento y la expresión de las proteínas reguladoras de su actividad (CD55 y CD59) sobre la superficie del GR en las distintas poblaciones eritrocitarias.
  - \* Estudiar la alteración de la asimetría de la bicapa lipídica por medio de la exposición de FS en las distintas fracciones de GR.
  - \* Investigar la expresión de CD47 en los eritrocitos de diferentes edades.

\* Comparar la expresión de las proteínas mayoritarias de los hematíes:  
Glicoforina A y Banda 3 en las poblaciones etáreas.

## **3. MATERIALES y MÉTODOS**

### **3.1. Muestras**

Se utilizaron muestras de sangre periférica de donadores voluntarios con serología negativa, que concurrieron al Servicio de Hemoterapia del Hospital Provincial del Centenario. Todos los donantes pertenecían al grupo O RhD positivo, eran de sexo masculino y tenían edades comprendidas entre 20 y 40 años. En todos los estudios realizados en este Trabajo de Tesis el número utilizado fue de 20 muestras de sangre anticoaguladas con EDTA. (n=20).

Los individuos recibieron un consentimiento escrito informado y firmaron un certificado de aceptación para participar en este proyecto de tesis. En este estudio se respetaron estrictamente los estándares éticos establecidos por la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

Aprobado por el Comité de Bioética Expediente N° 6060/089

### **3.2. Separación de poblaciones eritrocitarias**

Se centrifugaron 10 mL de sangre entera anticoagulada con EDTA a 1000 g durante 5 minutos. Se separó el plasma y se realizaron 3 lavados del paquete

globular con solución fisiológica (NaCl 8.5 g/L) (SF). Finalmente se preparó una suspensión al 80% en SF (GR-80%).

### **3.2.1. Centrifugación en gradientes de densidad de Percoll**

Se prepararon soluciones constituidas por 9 partes (v/v) de Percoll (Fluka) (pH 9,0), 25 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O (densidad: 1,130 ± 0,005 g/mL) y 1 parte de NaCl 1,5 M. Se mezclaron 10,363 mL de Percoll, 1,037 mL de NaCl 1,5 M y 4,6 mL de buffer fosfato de sodio 100 mM (pH 7,4) para lograr una osmolaridad de 310 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O. Estas soluciones fueron empleadas para obtener gradientes que permiten la separación de las poblaciones eritrocitarias de diferentes edades.

En tubos corex de fondo redondo se colocaron 12 mL de la solución de Percoll. Se centrifugó a 20000 g durante 20 minutos a 4°C en centrífuga SORVALL RC 5C, rotor SS-34.

Una vez obtenido el gradiente se sembraron 1,5 mL de la suspensión de GR-80% en la parte superior y se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos a 4°C en centrífuga SORVALL RC 5C, rotor HB-4.

Después de la centrifugación se descartaron 2 mL de la parte superior para eliminar las plaquetas. Posteriormente se realizó una centrifugación a 1000 g durante 20 minutos a 4°C.

#### **3.2.1.1. Recolección de las fracciones eritrocitarias**

Se recuperaron las distintas fracciones con bomba peristáltica desde la parte superior del tubo con un flujo de 600 µL/minuto. Consideramos que la primera fracción obtenida, 5-10% del total, corresponde a los GRJ y la última a los GRSe. Las fracciones celulares obtenidas se lavaron 3 veces con SF para la remoción completa de Percoll.

Finalmente se preparó una suspensión al 40% con SF (GR-40%) para cada una de las fracciones obtenidas.

### **3.2.2. Parámetros de control de la eficiencia de la separación de las fracciones eritrocitarias**

#### **3.2.2.1. Volumen Corpuscular Medio (VCM)**

Se determinó el VCM de las suspensiones de GRSe y GRJ obtenidas (3.2) en un contador SYSMEX SF 3000, expresando el resultado en fL (67).

#### **3.2.2.2. Porcentaje de reticulocitos (R)**

Se realizó el conteo de R en las suspensiones de GRSe y GRJ obtenidas (3.2) utilizando la coloración supravital con azul brillante de cresil.

En microscopio óptico se contaron 1000 GR y se identificaron los R presentes, expresando el resultado en porcentaje (66).

#### **3.2.2.3. Determinación de creatina eritrocitaria**

En las poblaciones de GRSe y GRJ (3.2), la concentración de creatina se determinó espectrofotométricamente a partir de la reacción con diacetilo y  $\alpha$ -naftol (220).

Se lisaron 100  $\mu$ L de GR-40% de las fracciones de GRSe y GRJ con 700  $\mu$ L H<sub>2</sub>O destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). Se desproteinizó con 100  $\mu$ L de Ba(OH)<sub>2</sub> 47,3 g/L, luego con 100  $\mu$ L de ZnSO<sub>4</sub> 8 g/L. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 300  $\mu$ L del sobrenadante y se agregaron 400  $\mu$ L del reactivo diacetilo- $\alpha$ -naftol. Luego de incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 520 nm utilizando como estándar una solución de creatina monohidrato 80 mg/L (Merck).

Se determinó la concentración de hemoglobina (Hb) en cada una de las muestras de GR-40% en un contador SYSMEX SF 3000.

Los resultados fueron expresados en  $\mu$ g de creatina/mg Hb.

### **3.3. Proteínas de membrana**

#### **3.3.1. Obtención de proteínas de membranas eritrocitarias**

Se tomaron 500  $\mu$ L de las suspensiones de GRSe y GRJ obtenidas (3.2) y se agregaron 3 mL de buffer de lisis: Tris-HCl 10 mM pH 7,45; EDTA 1 mM; fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,1 mM (221). Se centrifugaron a 20000 g durante 20 minutos a 4°C en centrifuga SORVALL rotor SS-34. Se eliminó el sobrenadante y el pellet constituido por las membranas eritrocitarias, se lavó con el buffer de lisis hasta eliminar completamente la Hb.

A las distintas muestras obtenidas se le agregó igual volumen de buffer Tris-HCl 10 mM pH 6,8, EDTA 1 mM, PMSF 0,1 mM, SDS 0,1 %. Se centrifugó a 20000 g durante 15 minutos a 4° C. El sobrenadante que contiene las proteínas de la membrana eritrocitaria se reservó a -70°C.

#### **3.3.2. Determinación de la concentración de proteínas de membranas eritrocitarias**

La concentración de proteínas de membrana fue determinada utilizando el método colorimétrico de Lowry modificado por Markwell (222).

Se realizó una curva de calibración entre 0 y 40  $\mu$ g usando como estándar albúmina sérica bovina (BSA) cuya concentración fue determinada espectrofotométricamente a 279 nm ( $\epsilon^{1\%}_{279}=6,67$ ).

#### **3.3.3. Oxidación de proteínas de membranas eritrocitarias**

Para la detección de los grupos carbonilos en las proteínas de la membrana eritrocitaria, se utilizó un enzimoimmunoensayo (223).

En primer lugar se realiza una derivatización de los grupos carbonilos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), dando lugar a la formación de un producto estable que es la dinitrofenilhidrazona (DNP) que se detecta utilizando un anticuerpo anti-DNP.

Se realizó una curva de calibración mezclando BSA completamente reducida y completamente oxidada en un rango de 0-100% oxidación.

La BSA completamente reducida se preparó a partir 50 mL de una solución 10 mg/mL BSA en buffer fosfato salino (PBS), con 50 mg de NaBH<sub>4</sub> (boro hidruro de sodio). Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y luego se neutralizó con HCl 2N. Se dializó durante toda la noche contra PBS a 4° C con agitación.

La BSA completamente oxidada se preparó a partir de 2 mL de BSA 50 mg/mL, se agregaron 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 mM, 2 mL de sulfato de vanadilo 25 mM y 4 mL de PBS. Se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Se dializó toda la noche contra PBS a 4° C con agitación.

En ambas soluciones la concentración de proteínas, se determinó espectrofotométricamente a 279 nm.

Se prepararon soluciones estándares a partir de la mezcla de BSA reducida y oxidada equivalentes a 0%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de oxidación.

Se realizó un ensayo de inmunoensayo (ELISA) procesando los estándares y las muestras obtenidas según el siguiente protocolo.

Se utilizaron policubetas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp. En cada pocillo se colocaron 200 µL de los estándares y de cada muestra correspondiente a una concentración 10 µg/mL. Se trabajó por triplicado.

Se incubaron durante toda la noche a 4° C. Se realizaron 3 lavados con 300 µL PBS. Se agregaron 200 µL de 2,4-DNPH 0,05 mM pH 6,2 y luego se incubaron 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron 5 lavados con 300 µL de PBS: etanol (1:1, v/v) y una vez con 300 µL de PBS.

Se bloqueó con 260 µL de solución de bloqueo (leche descremada 5% en PBS).

Se colocaron 200 µL de la solución del anticuerpo primario fabricado en conejo anti-DNP (Sigma, D-9656), 1:3333 en solución de bloqueo/Tween-20 0,1% incubando 1 hora a 37° C. Se realizaron 5 lavados con 300 µL de PBS /Tween-20 0,1% (T-PBS). Se colocaron 200 µL de la solución del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP) (Sigma A 0545), 1:4000 en solución de bloqueo, Tween-20 0,1% y se realizó una incubación durante 1 hora a 37° C. Se realizaron 5 lavados con 300 µL de solución de T-PBS.

Se reveló con 100  $\mu$ L del reactivo de revelado constituido por una mezcla de 1:1:2 de  $H_2O_2$  60 mM en buffer citrato 50 mM pH 3,2 (Wiener Lab), tetrametilbencidina 0,01 M en HCl 0,1 N (Wiener Lab) y  $H_2O_d$ . La reacción de color se detuvo a los 3 minutos por el agregado de 50  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  2N (Wiener Lab). Se midió absorbancia a 450 nm.

Los resultados fueron expresados en nmoles de carbonilos/mg proteína.

### **3.3.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.**

#### **3.3.4.1. Preparación de las muestras**

Las muestras de proteínas (3.3.1) se mezclaron con buffer de siembra 6X preparado con 3.6 mL Tris-HCl 1M (pH 6,8), 6 mL Glicerol, 1,2 g SDS, 1,2 mg Azul de bromofenol y  $H_2O_d$  csp 10 mL. Se desnaturalizaron por calentamiento en baño de agua a 100 °C durante 5 minutos y fueron centrifugadas a 12000 g. Para electroforesis en condiciones reductoras al buffer de siembra se le agregó  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (v/v).

#### **3.3.4.2. Preparación de geles**

Se utilizaron minigeles verticales del sistema Miniprotean III Gel System (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) de 0,75 mm de espesor.

Las electroforesis se llevaron a cabo según el sistema discontinuo de Laemmli (224). Los geles de concentración se prepararon al 4% y los de separación al 8% de acrilamida. Las corridas electroforéticas se realizaron a temperatura ambiente a 15 mA por gel en buffer de corrida.

#### **3.3.4.3. Tinción de proteínas en geles**

Para visualizar el patrón de proteínas de cada una de las muestras al finalizar la corrida electroforética, los geles fueron teñidos con Azul de Coomasie.

Se incubaron en solución de tinción (0,25 g de Azul de Coomasie R-250, 500 mL metanol,  $H_2O_d$  csp para 1 L) durante 1 hora, a temperatura ambiente. La

decoloración se llevó a cabo mediante sucesivos cambios de la solución decolorante (100 mL HAc, 400 mL metanol y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> csp para 1 L). La decoloración se realizó hasta no observar coloración de fondo en el gel.

#### **3.3.4.4. Densitometría**

Los geles teñidos con el colorante azul de Coomasie fueron analizados mediante el programa GelPro Analyzer.

#### **3.3.5. Inmunodetección de la proteína Banda 3 eritrocitaria**

Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con poro de 0,2 µm (Hybond, Amersham Biosciences, San Francisco, CA, EE.UU.) utilizando el sistema Miniprotean III (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) según el procedimiento descrito por Towbin (225).

Al terminar la electroforesis los geles se equilibraron con buffer de transferencia (14,41 g Glicina 192 mM, 3,02 g Tris 25 mM, 200 mL de metanol y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> csp 1 L) durante 15 minutos. La membrana se hidrató en las mismas condiciones. La transferencia se realizó durante toda la noche a 40 mA a 4° C. Para verificar la eficiencia de la transferencia, se tiñó la membrana con Rojo Punzó. El colorante fue eliminado mediante sucesivos lavados con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. La membrana se incubó en buffer Tris Salino (TBS) para equilibrarla. Se bloqueó con buffer TBS, Tween-20 0,05% y leche descremada 0,75%. Se realizó un lavado con buffer TBS.

Se incubó durante 1 hora con una dilución 1:10000 del anticuerpo primario: Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-Banda 3 humana. Clone BIII-136 (Sigma, B-9277). Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con buffer TBS. Se incubó durante 1 hora con una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Amersham) conjugada a la enzima peroxidasa de rabanita (HRP). Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con buffer TBS. Se incubó durante 1 minuto con diaminobencidina (DAB) y se lavó varias veces con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> para detener la reacción de revelado.

#### **3.3.5.1. Densitometría**

La densitometría de las membranas reveladas con DAB fueron analizadas mediante el programa GelPro Analyzer.

### **3.4. Determinación de IgG unida a la membrana de GR intactos**

#### **3.4.1. Prueba de Antiglobulina Directa**

Se investigó la presencia de IgG unidas a la membrana del GR mediante la Prueba de Antiglobulina Directa (PAD).

Se utilizaron 20 muestras de sangre para obtener las suspensiones de GRSe y GRJ según se describe en 3.2. Las poblaciones eritrocitarias fueron lavadas 3 veces con SF. 50  $\mu$ L de las suspensiones en concentraciones entre 2 y 5% se enfrentó con 50  $\mu$ L de Antiglobulina humana (AGH) poliespecífica (anti IgG + anti C3d/3b) (Organón Teknika). Se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 1000 g y se observó aglutinación. Se utilizaron los siguientes controles:

Control positivo: suspensiones de GR Sensibilizados (GRS). 50  $\mu$ L de GR-80 % se incubaron con 50  $\mu$ L de anticuerpo anti-D policlonal de clase IgG obtenido en nuestro laboratorio, convenientemente diluido, durante 60 minutos a 37°C.

Control negativo: GR normales (GRN) 50  $\mu$ L de GR-80 % incubados con 50  $\mu$ L de SF.

En ambos controles se realizaron 3 lavados con SF y se evaluó la sensibilización de los GR mediante la PAD (132).

#### **3.4.2. Enzimoimmunoanálisis cuantitativo**

La cantidad de IgG en la membrana eritrocitaria se cuantificó usando un test de antiglobulina conjugada con enzima. Este método se basa en el consumo de anti-IgG humana por células que tienen IgG unida a su superficie. Posteriormente se determinó la anti-IgG remanente (133).

#### **3.4.2.1. Sensibilización de las placas**

Las policubetas de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp) fueron sensibilizadas con IgG humana (10 µg/mL). La fijación se realizó en solución de NaHCO<sub>3</sub> 0,1M y se bloquearon los sitios libres con una suspensión de leche descremada al 5% en PBS durante 90 minutos a 37°C y 20 horas a 4°C. Los lavados se realizaron con el buffer de lavado (PBS y tensioactivo no iónico 0,1 g/L) diluido al 1:5.

#### **3.4.2.2. Control de placas**

Las placas sensibilizadas fueron cubiertas con anti-IgG humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) e incubadas durante 30 minutos a 37°C. Luego de 5 lavados con buffer de lavado se agregaron 50 µL del sustrato de la fosfatasa alcalina: paranitrofenilfosfato (p-NPP) 0,01 M en ácido clorhídrico 0,1N. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se leyó absorbancia a 405 nm.

#### **3.4.2.3. Curva de calibración**

Se realizó para determinar la cantidad de IgG unida a distintas suspensiones de GR "O" Rh(D)+ sensibilizados con anti-Rh(D) utilizando las siguientes diluciones de IgG anti-D en PBS : 2,03 10<sup>-3</sup> mg/m L; 1,63 10<sup>-3</sup> mg/m L; 1,02 10<sup>-3</sup> mg/m L; 8,13 10<sup>-4</sup> mg/m L; 6,5 10<sup>-4</sup> mg/m L; 4,06 10<sup>-4</sup> mg/m L; 2,03 10<sup>-4</sup> mg/m L; 1,02 10<sup>-4</sup> mg/m L.

Esta curva se utilizó para determinar posteriormente la cantidad de IgG unida a las distintas suspensiones eritrocitarias estudiadas.

#### **3.4.2.4. Determinación de IgG unida a GRSe y GRJ**

Las distintas suspensiones eritrocitarias (n=20) en una concentración de 8x10<sup>9</sup> células/mL se incubaron con anti-IgG humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina durante 90 minutos a 20°C en agitación continua.

Se transfirieron alícuotas a las placas sensibilizadas con IgG humana. Se incubaron 30 min a 37° C. Luego de 5 lavados con solución de lavado, para remover las células con anticuerpos unidos, se agregó el sustrato de la

fosfatasa (p-NPP) y se determinó la cantidad remanente de anticuerpos por lectura de absorbancia a 405 nm.

En cada ensayo se usaron controles positivos con GRS, controles negativos con el anticuerpo conjugado en ausencia de células y con pocillos no sensibilizados.

### **3.4.3. Microscopia Confocal**

Suspensiones de GRSe y GRJ obtenidas según el ítem 3.2. al 0.2 % fueron incubadas con 50 µL de anti-IgG humana marcada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen, USA) diluída 1:100, durante 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con SF. Paralelamente se procesaron GRS como control positivo y GR sin marca como control negativo.

Las células fueron observadas en un microscopio confocal Nikon C1, utilizando láser azul 488 nm.

Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa EZ.C1 Gold.Version

## **3.5. Eritrofagocitosis**

La interacción entre las distintas suspensiones eritrocitarias y las células fagocíticas mononucleares se realizó mediante el ensayo de monocapa de monocitos. Se determinó el porcentaje de monocitos activos (MA), considerando a todas aquellas células mononucleares que tenían GR adheridos y/o fagocitados (226).

### **3.5.1. Preparación de la monocapa de monocitos**

Se colocaron 1.5 mL de sangre entera en portaobjetos y se incubaron en cámara húmeda durante 60 minutos a 37°C. Después de retirar el coágulo

formado, se lavaron las células con SF. Las mismas obtenidas por su capacidad de adherirse al vidrio, fueron reconocidas por criterios morfológicos en un microscopio óptico, observando la presencia de monocitos en un 90 %. La viabilidad fue determinada con Azul de Tripán y fue superior al 95 %.

### **3.5.2. Preparación de GR tratados con enzimas desialinizantes**

Alícuotas de cada muestra de GR-80% fueron tratadas con neuraminidasa (0.01UI) durante 60 minutos a 37°C (GRNe) y con tripsina (5 mg/mL) durante 30 minutos a 37°C (GRT).

### **3.5.3. Ensayo de eritrofagocitosis**

Se incubaron los portaobjetos con monocapa de monocitos durante 3 horas a 37°C en cámara húmeda, con 1 mL de las siguientes suspensiones eritrocitarias al 4 % en SF adicionada con 20 % de suero humano compatible:

- GRSe obtenidos según 3.2.
- GRJ obtenidos según 3.2.
- GRNe
- GRT
- Control positivo: GRS
- Control negativo: GRN

Los portaobjetos fueron lavados con SF a 37°C para eliminar los GR no unidos. Los preparados se fijaron con metanol durante 1 minuto y se tiñeron según la técnica de May Grünwald Giemsa.

Se realizó la observación microscópica contando 200 células mononucleares y se calculó el porcentaje MA. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

### **3.6. Aplicación de la Citometría de Flujo al estudio de la senescencia eritrocitaria**

La evaluación de los marcadores de senescencia eritrocitaria por Citometría de Flujo (CMF), se realizó mediante la información obtenida de los parámetros de dispersión de luz y las medidas de intensidad de fluorescencia (FL). El parámetro forward scatter (FSC) corresponde a la luz dispersada recolectada entre 0 y 10° y está relacionado con el tamaño de las células y el valor side scatter (SSC) se refiere a la luz dispersada recolectada a 90° y se relaciona con la estructura interna de las células. Teniendo en cuenta que FSC representa el tamaño celular y SSC está relacionado con la complejidad celular interna, cuando se adquiere una muestra de GRs sin ningún paso previo de separación de poblaciones etáreas, consideramos que la población de GRSe se encuentra en la zona de menor FSC y un SSC con mayor dispersión mientras que la fracción de GRJ estaría ubicada en la región de mayor FSC y un SSC más homogéneo.

La evaluación por CFM se realizó en el citómetro FACSAria II (BD) equipado con dos láser (488 nm y 630 nm) y cuatro canales de detección de fluorescencias (FL-1: 515 - 550nm, FL-2: 575 – 620 nm, FL-3: mayor a 630 nm y FL-4 650 – 670nm) Las muestras fueron adquiridas con el programa FACSDiva (BDBiosciences) y analizadas con FACSDiva (BDBiosciences) y Paint a gate (BDBiosciences).

#### **3.6.1. Determinación de IgG en GRSe y GRJ**

La evaluación de IgG unida a la superficie de la membrana de los eritrocitos, se realizó por CFM, separando las poblaciones de acuerdo a la información obtenida de los parámetros de dispersión de luz (FSC y SSC).

Las suspensiones eritrocitarias evaluadas fueron:

- 1.- Poblaciones de GRSe y GRJ obtenidas según 3.2.
- 2.- GR lavados de muestras de sangre entera sin realizar previamente separación física de los mismos.

Luego de 4 lavados con 3 ml PBS se prepararon suspensiones al 0.2% en PBS de cada una de las distintas poblaciones de GRs.

#### **3.6.1.1. Marcación de los GRs**

50  $\mu$ L de cada suspensión fueron incubados con 50  $\mu$ L de anti-IgG humana marcada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen, USA) diluida 1:100. Después de 60 minutos de incubación en la oscuridad, las suspensiones de GRs fueron lavadas una vez con PBS y resuspendidas en el diluyente FACSFlow (BD Biosciences). Se utilizaron los siguientes controles:

Control positivo: GRS.

Control negativo: GR al 0.2% sin marcación con anti-IgG humana-Alexa Fluor 448.

#### **3.6.1.2. Análisis por Citometría de Flujo**

Las poblaciones eritrocitarias fueron seleccionadas en un dot-plot FSC/SSC en escala logarítmica y para la detección de IgG-Alexa 488 se evaluó la intensidad de fluorescencia en FL-1. Se adquirieron 100.000 eventos. Las muestras fueron evaluadas por duplicado.

Se realizó la comparación estadística de los resultados obtenidos para este parámetro en las subpoblaciones de GRs de diferentes edades separadas con Percoll y en las suspensiones de GRs sin ningún paso de separación previo.

El análisis estadístico demostró que por ambas metodologías se obtienen valores de la variable analizada en las dos poblaciones de GRSe y GRJ, que no difieren significativamente. La obtención de resultados comparables en las muestras sin separación previa permitió el estudio posterior de otros marcadores de senescencia utilizando muestras de GRs sin ningún paso previo de separación, evaluando cada marcador en las regiones definidas por los parámetros de dispersión de luz FSC y SSC (227, 228, 229).

### **3.6.2. Estudio de marcadores de senescencia por Citometría de Flujo en sangre entera.**

#### **3.6.2.1. Complemento C<sub>3</sub>**

50  $\mu$ L de cada una de las suspensiones de GRs se incubaron con 10  $\mu$ L de anti-C3b (Anti-C3b,-C3d (Bioclone. Ortho Diagnostic Systems). Luego de 30 minutos de incubación se realizó un lavado con PBS y se agregaron 50  $\mu$ L del anticuerpo secundario anti-mouse marcado con alofocianina (APC) (BD Pharmingen USA). Se incubaron 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente los GRs fueron lavados una vez con PBS y resuspendidos en el diluyente FACSSFlow.

Las poblaciones eritrocitarias fueron seleccionadas en un dot-plot FSC/SSC en escala logarítmica y para la detección de C3 marcado con APC, se utilizó la intensidad de fluorescencia en FL-4. Se adquirieron 100.000 eventos. Las muestras fueron evaluadas por duplicado.

#### **3.6.2.2. CD47**

50  $\mu$ L de cada una de las suspensiones de GRs se incubaron con 5  $\mu$ L de CD47 anti-humano marcado con ficoeritrina (PE) (Clon B6H12. BD Pharmingen USA). Luego de 30 minutos de incubación se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron en el diluyente FACSSFlow.

Las poblaciones eritrocitarias fueron seleccionadas en un dot-plot FSC/SSC en escala logarítmica y para la detección de CD47 marcado con PE, se utilizó la intensidad de fluorescencia en FL-2. Se adquirieron 100.000 eventos. Las muestras fueron evaluadas por duplicado.

#### **3.6.2.3. Fosfatidilserina (Anexina V)**

La evaluación de la expresión de fosfatidilserina en la superficie externa de los GRs, se fundamenta en su unión específica a Anexina V (230). Las suspensiones eritrocitarias al 0.2% fueron preparadas en un buffer con calcio (Annexin Binding Buffer). 25  $\mu$ L de cada suspensión de GRs fueron incubados con 5  $\mu$ L de anexina V-PE (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I.BD Pharmingen USA), durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente se realizó un lavado con el buffer con calcio y los GRs se resuspendieron en 0.5 mL del diluyente FACSFlow.

Control negativo: GR sin marcar resuspendidos en el buffer Ca.

Control positivo: La permeabilización de los eritrocitos se realizó incubando 50  $\mu$ L de GRs lavados con 50  $\mu$ L de etanol al 50% en PBS, 2 minutos a 39°C. Los GRs fueron lavados y resuspendidos en annexin Binding Buffer ( 1  $\mu$ L + 0.5 mL de buffer Ca). 25  $\mu$ L de esa suspensión fueron incubados con 5  $\mu$ L de anexina V-PE (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I.BD Pharmingen USA), durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente se realizó un lavado con el buffer calcio y los GRs se resuspendieron en 0.5 mL del diluyente FACSFlow. En estas condiciones, la anexina V se une a la fosfatidilserina expuesta en la capa externa de la membrana así como a la fosfatidilserina presente en la membrana interna.

Las poblaciones eritrocitarias fueron seleccionadas en un dot-plot FSC/SSC en escala logarítmica y para la detección de anexina V-PE, se utilizó la intensidad de fluorescencia en FL-2. Se adquirieron 100.000 eventos. Las muestras fueron evaluadas por duplicado.

Además se estudiaron 21 muestras de pacientes con distintas Anemias Hemolíticas, en las mismas condiciones experimentales.

#### **3.6.2.4. Banda 3 (CD233)**

50  $\mu$ L de cada suspensión de GRs se incubaron con 50  $\mu$ L de anti-Banda 3 (clon 10D2, reconoce un epítopo del dominio extracelular de banda 3.

Academia de Medicina. Bs. As. ) diluido 1:2000. Luego de 30 minutos de incubación se realizó un lavado con PBS y se agregaron 50 µL del anticuerpo secundario anti-mouse marcado con APC (BD Pharmingen USA). Se incubaron 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente los GRs fueron lavados una vez con PBS y resuspendidos en el diluyente FACSFlow.

Las poblaciones eritrocitarias fueron seleccionadas en un dot-plot FSC/SSC en escala logarítmica y para la detección de Banda3 marcado con APC, se utilizó la intensidad de fluorescencia en FL-4.

Se adquirieron 100.000 eventos. Las muestras fueron evaluadas por duplicado.

#### **3.6.2.5 Glicoforina A (CD235a)**

50 µL de cada suspensión de GRs se incubaron con 50 µL de CD235a anti-humana marcada con isotiocinato de fluoresceína (FITC) diluido 1/1000 (clone GA-R2(HIR2). BD Pharmingen USA). Luego de 30 minutos de incubación se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron en el diluyente FACSFlow.

Las poblaciones eritrocitarias fueron seleccionadas en un dot-plot FSC/SSC en escala logarítmica y para la detección de CD235a-FITC, se utilizó la intensidad de fluorescencia en FL-1. Se adquirieron 100.000 eventos. Las muestras fueron evaluadas por duplicado.

#### **3.6.2.6. CD55**

50 µL de cada suspensión de GRs se incubaron con 50 µL de anti-human CD55 anti-humano conjugado con PE (clone IA10, IgG2a, BD Pharmingen USA). Luego de 30 minutos de incubación se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron en el diluyente FACSFlow.

Las poblaciones eritrocitarias fueron seleccionadas en un dot-plot FSC/SSC en escala logarítmica y para la detección de la expresión de CD55-PE, se utilizó la intensidad de fluorescencia en FL-2. Se adquirieron 100.000 eventos. Las muestras fueron evaluadas por duplicado.

### **3.6.2.7. CD59**

50  $\mu$ L de cada suspensión de GRs se incubaron con 50  $\mu$ L de CD59 antihumano conjugado con FITC (clone p282 (H19), IgG2a, BD Pharmingen USA). Luego de 30 minutos de incubación se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron en el diluyente FACSCFlow.

Las poblaciones eritrocitarias fueron seleccionadas en un dot-plot FSC/SSC en escala logarítmica y para la detección de CD55-FITC, se utilizó la intensidad de fluorescencia en FL-1. Se adquirieron 100.000 eventos. Las muestras fueron evaluadas por duplicado.

### **3.7. Análisis estadísticos**

Para verificar el cumplimiento del supuesto de normalidad exigido por las distintas técnicas estadísticas utilizadas se aplicó el test de Shapiro-Wilk (231, 232).

La comparación de los valores obtenidos en las poblaciones de GRSe y de GRJ de las distintas variables estudiadas, se realizó aplicando el test t de Student para muestras dependientes o apareadas o el de Wilcoxon (previa verificación del supuesto de normalidad).

Para analizar la variación en los promedios del % de MA en las distintas suspensiones de GR se empleó un Análisis de la varianza (ANOVA) correspondiente a un diseño en bloques (muestras) y las comparaciones múltiples de Scheffé.

Para estimar el ajuste de las curvas de calibración realizadas se utilizó regresión lineal simple. La bondad del ajuste lineal se verificó gráficamente y mediante el cálculo del coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

La comparación estadística de los resultados obtenidos para los distintos parámetros analizados en las poblaciones de GRSe separadas por gradientes

preformados de Percoll y estudiadas en sangre entera sin ninguna técnica separativa previa, se efectuó mediante el test de Wilcoxon.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Parámetros de control de la eficiencia de la separación de las fracciones eritrocitarias

#### 4.1.1. Volumen Corpuscular Medio

Los valores promedio del VCM obtenidos en las poblaciones de GRSe y GRJ separadas por gradiente de Percoll, se resumen en la Tabla I.

	VCM	
	GRSe	GRJ
Media	89.2	91.4
Desvio Estandard	2.9	3.3

**Tabla I:** VCM en las distintas suspensiones eritrocitarias.

En las poblaciones de GRSe, el valor promedio de VCM fue significativamente menor que el observado en las suspensiones de GRJ ( $p < 0.0001$ ).

#### 4.1.2. Porcentaje de Reticulocitos (R)

Los % de R obtenidos en las poblaciones de GRSe y de GRJ se describen en la Tabla II.

% de Reticulocitos		
	GRSe	GRJ
Media	0.50	2.19
Desvio Estandard	0.18	0.26

**Tabla II:** % R en GRSe y GRJ.

El valor promedio del % de R en las suspensiones de GRSe fue significativamente menor que el observado en las poblaciones de GRJ ( $p < 0.0001$ ).

#### 4.1.3. Determinación de creatina eritrocitaria

La Tabla III muestra los valores de concentración de creatina obtenido en las poblaciones de GRSe y GRJ.

Cc de Creatina ( $\mu\text{g}/\text{mg Hb}$ )		
	GRSe	GRJ
Media	2.76	4.15
Desvio Estandard	0.76	3.3

**Tabla III:** Concentración de creatina en GRSe y GRJ.

En las suspensiones de GRSe el valor promedio de concentración de creatina eritrocitaria fue significativamente menor que el observado en las poblaciones de GRJ ( $p < 0.0001$ ).

## 4.2. Proteínas de membrana

### 4.2.1. Determinación de la concentración de proteínas de membranas eritrocitarias

En la tabla IV se observan los valores de concentración de proteínas de membranas de las dos poblaciones de GRs.

Cc de Proteínas (mg/ml)		
	GRSe	GRJ
Media	$1,18 \cdot 10^{-2}$	$1,10 \cdot 10^{-2}$
Desvio Estandard	$1,56 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-3}$

**Tabla IV:** Concentraciones de proteínas de membrana en GRJ y GRSe.

No existen diferencias significativas en los valores promedios de las concentraciones de proteínas de membrana en GRSe y GRJ ( $p > 0.05$ )

#### 4.2.2. Oxidación de proteínas de membranas eritrocitarias

Los resultados obtenidos en la curva de calibración realizada con BAS oxidada y reducida por el enzimoimmunoensayo mostraron linealidad en el rango de trabajo ( $p < 0,05$ ) y se utilizaron para el cálculo de la concentración de grupos carbonilos en las proteínas de membrana obtenidas de las distintas subpoblaciones eritrocitarias.

Las concentraciones de grupos carbonilos determinadas por este ensayo en muestras de GRJ y GRSe se muestran en la Tabla V.

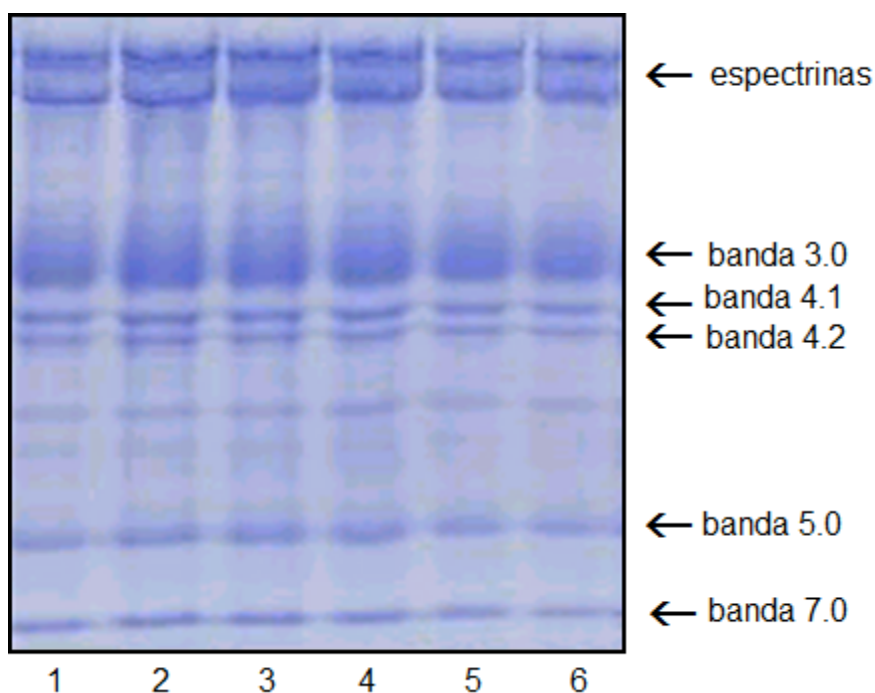
Cc de Grupos Carbonilos (nmoles carbonilo/mg proteína)		
	GRSe	GRJ
Media	0.704	0.602
Desvio Estandard	0.041	0.087

**Tabla V:** Concentraciones de grupos carbonilos en GRSe y GRJ.

El valor promedio de la concentración de los grupos carbonilos en las proteínas de membrana de GRSe es significativamente mayor que el observado en los GRJ ( $p < 0.005$ ).

### 4.2.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Los resultados de la electroforesis en poliacrilamida de las proteínas de membrana de GRSe y GRJ se muestran en la Figura 1.



**Figura 1:** Gel de electroforesis de las proteínas de membrana de GRSe y GRJ. En todas las calles se sembraron 30 mg de proteínas totales. Calles 1, 3 y 5: GRJ; calles 2, 4 y 6: GRSe. Las flechas señalan las proteínas mayoritarias en la membrana de los GR.

#### 4.2.3.1. Densitometría

Los resultados de la densitometría realizada con el programa GelPro Analyser en el gel de poliacrilanida teñido con Azul de Coomasie se muestran en la Tabla VI.

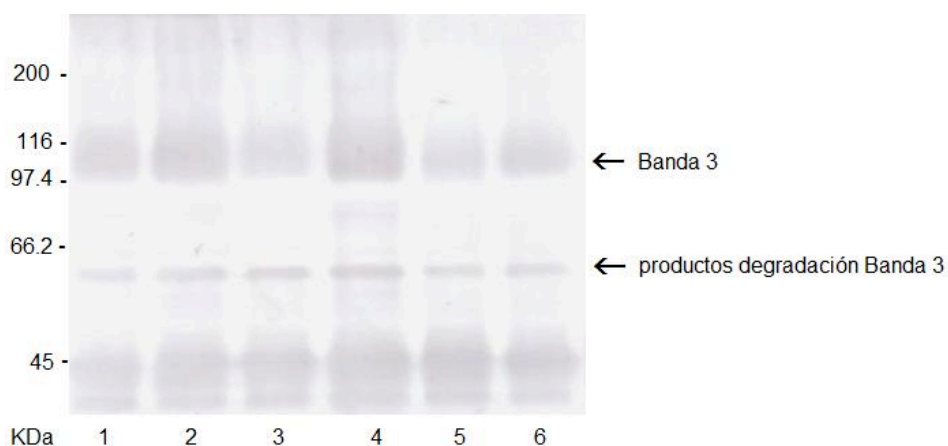
	Espectrinas	Banda 3	Banda 4.1	Banda 4.2	Banda 5	Banda 7
GRSe	26,58 ± 5,89	23,40 ± 4,34	5,13 ± 1,31	5,38 ± 1,53	7,18 ± 3,82	6,44 ± 4,76
GRJ	26,10 ± 3,62	22,20 ± 6,22	5,08 ± 1,75	5,07 ± 1,83	5,75 ± 8,58	7,28 ± 5,19

**Tabla VI:** Porcentajes expresados como las medias y sus correspondientes desvíos estándares ( $x \pm sx$ ) de las proteínas de membrana.

No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de las distintas proteínas eritrocitarias entre GRSe y GRJ.

#### 4.2.4. Inmunodetección de la proteína Banda 3 eritrocitaria

La Figura 2 corresponde al inmunoblotting para la proteína Banda 3 a partir del gel de poliacrilamida para las membranas de GRSe y GRJ.



**Figura 2.** Inmunodetección de la proteína Banda 3. En todas las calles se sembraron 30 ug de proteínas. Calles 1, 3 y 5: GRJ; calles 2, 4 y 6: GRSe. A la izquierda se indican los pesos moleculares de los marcadores. Las flechas señalan la proteína Banda 3 y sus productos de degradación.

La proteína Banda 3 se ubica en un rango de pesos moleculares de 90-100 KDa, y sus productos de degradación en un rango de 55-60 kDa. La proteína banda 3 migra en los geles de policríalmida como una banda difusa. El ancho de la banda se debe a la heterogeneidad del tamaño en las cadenas de carbohidratos presente sobre las moléculas.

#### 4.2.4.1 Densitometría

Los porcentajes de las bandas obtenidos con el programa GelPro Analyser correspondiente al inmunoblotting se muestran en la Tabla VII

	Banda 3		Productos de degradación	
	GRSe	GRJ	GRSe	GRJ
Media	88.3	58.2	22.1	17.0
Desvio Estandard	15.4	10.2	5.8	5.3

**Tabla VII:** Porcentajes de Banda 3 y sus fragmentos de degradación en GRSe y GRJ.

Los porcentajes de las intensidades de las bandas correspondientes a la proteína Banda 3 (90-100 KDa) y las de sus productos de degradación (55-60 kDa) obtenidos en las poblaciones de GRSe fueron significativamente mayores que para GRJ ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Determinación de IgG unida a la membrana de GRs intactos

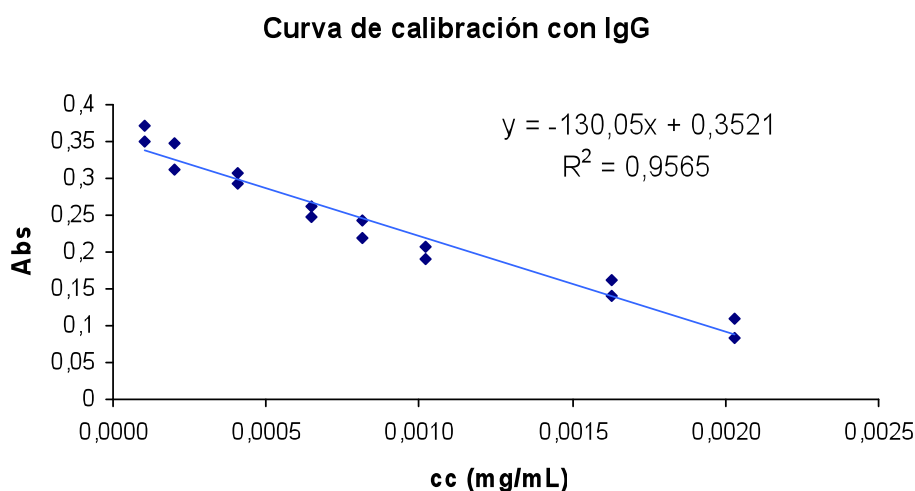
#### 4.3.1. Prueba de Antiglobulina Directa

La determinación de inmunoglobulinas unidas al GR mediante la PAD fue sistemáticamente negativa en todas las poblaciones de GRSe y GRJ.

#### 4.3.2. Enzimoimmunoanálisis cuantitativo

El escaso número de inmunoglobulinas unida a los eritrocitos senescentes se determinó mediante un enzimoimmunoanálisis cuantitativo. Se realizó una curva de calibración con IgG en distintas concentraciones para luego calcular el contenido de IgG en los GRSe y GRJ.

Los resultados se muestran en la Figura 3.



**Figura 3:** Representación gráfica de la curva de calibración con IgG para el enzimoimmunoensayo. Los valores de absorbancia obtenidos para el intervalo establecido de concentraciones de IgG cumple el supuesto de linealidad de la recta.

#### 4.3.2.1. Aplicación del método en GRSe y GRJ

Las concentraciones de IgG unidas a la superficie del eritrocito en las distintas suspensiones se calcularon a partir de la curva de calibración anterior y se muestran en la Tabla VIII.

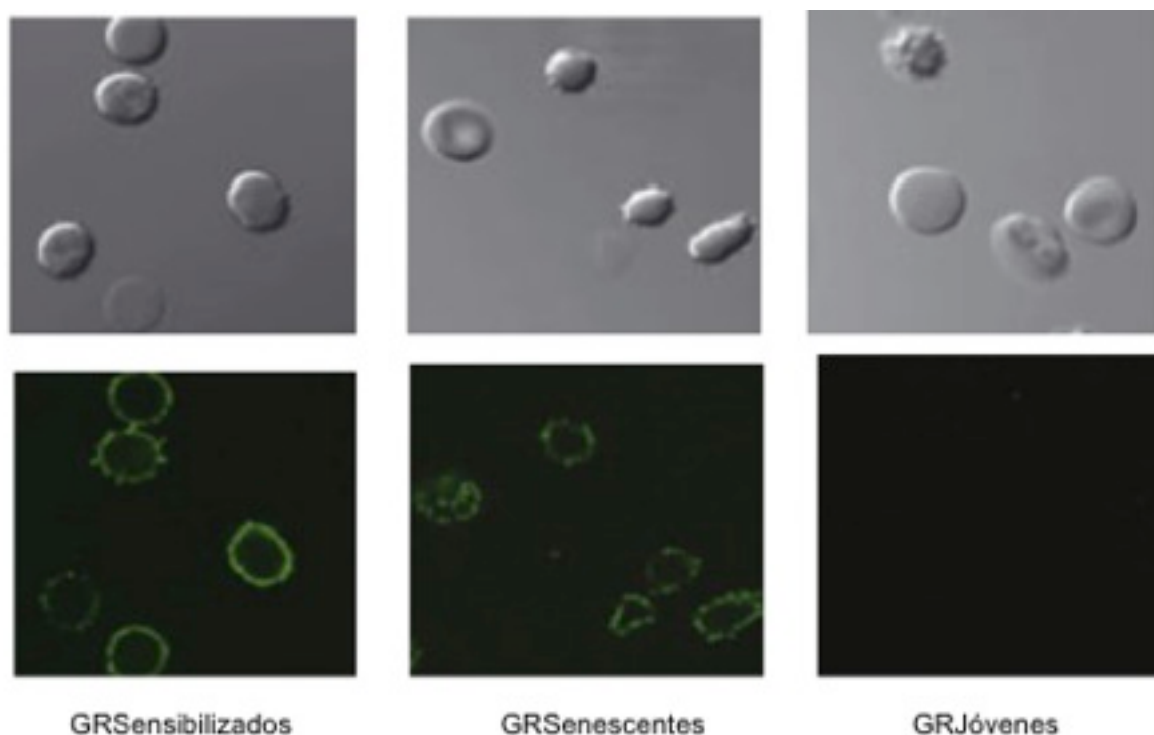
Cc de IgG ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	GRSe	GRJ
Media	$13.31 \times 10^{-4}$	$3.35 \times 10^{-4}$
Desvio Estandar	$1.57 \times 10^{-4}$	$1.39 \times 10^{-4}$

**Tabla VIII:** Concentraciones de IgG en GRSe y GRJ.

Las valores de IgG unida a los GRSe son significativamente mayores que las correspondientes a los GRJ ( $p < 0.0001$ ).

#### 4.3.3. Microscopía Confocal

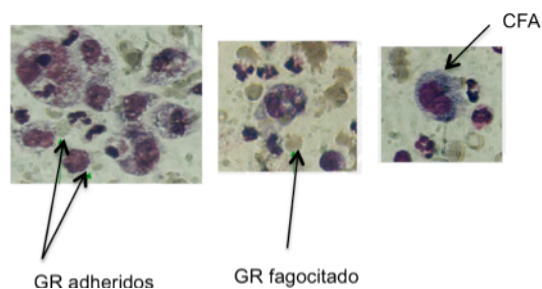
En la figura 4 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal, de las poblaciones de GRs de distintas edades, separadas por gradientes de Percoll.



**Figura 4:** Imágenes obtenidas con microscopio confocal de GRSensibilizados como control positivo (izquierda), GRSe (centro) y GRJ (derecha).

#### 4.4. Eritrofagocitosis

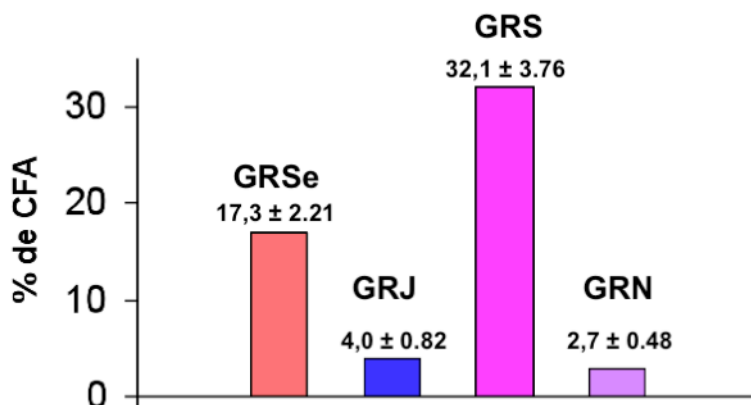
En este análisis hemos considerado como MA a las células mononucleares que tienen adheridos y/o fagocitados GR. Esta consideración se debe a que en estudios previos realizados con cámara de video se ha observado que antes de la fagocitosis de los GRS (control positivo) se produce la adherencia de los mismos a las células mononucleares. El valor inferior de corte de MA en los GRN (control negativo) fue establecido en  $< 4\%$  debido a artificios técnicos. En los preparados los hematíes pueden presentarse en distintos planos y ser considerados como GR adheridos o fagocitados por los monocitos.



**Figura 5:** Imágenes del EMM donde pueden distinguirse GR adheridos y fagocitados por MA.

#### 4.4.1. Interacción entre GRSe y monocitos de sangre periférica

Los valores de CFA obtenidos con las distintas suspensiones eritrocitarias se muestran en la Figura 6.



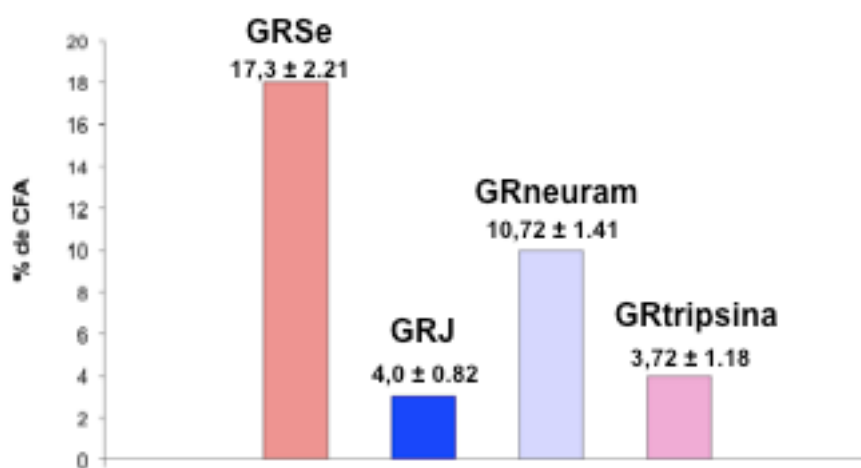
**Figura 6:** % de CFA expresados como medias y desvios estandar para GRSe, GRJ, GRS (control positivo), GRN (control negativo).

Los valores promedios del % de CFA en las 4 poblaciones de GR no son iguales ( $p < 0.0000$ ). Los valores promedios del % de CFA son significativamente mayores en los GRS que en los GRSe, GRJ y GRN. Los valores promedios del % de CFA son significativamente mayores en los GRSe

que en los GRJ y GRN. No existen diferencias significativas en el % promedio de CFA entre los GRJ y GRN ( $p < 0.0000$ ).

#### 4.4.2. Interacción entre células del SFM y GRs tratados con enzimas desialinizantes

Los valores de % CFA obtenidos con GR tratados con neuraminidasa o tripsina se muestran en la Figura 7.



**Figura 7:** % de CFA expresados como medias y desvios estandar en GR tratados con neuraminidasa, GR tratados con tripsina, GRSe y GRJ.

Se concluye que existen diferencias en los valores del % CFA en GRs tratados con neuraminidasa, con tripsina, GRSe y GRJ.

Las comparaciones múltiples permiten concluir que los valores promedios de % CFA de GRs tratados con neuraminidasa son marginalmente inferiores a los % CFA de GRSe y mayores que para los GR tratados con tripsina y los GRJ ( $p < 0,05$ ).

Los % de CFA obtenidos con GRs tratados con tripsina fueron similares a los observados con GRJ. Estos resultados indican que la acción de la

neuraminidasa aumenta la interacción entre GRs y células del SFM. La actividad desialinizante de la tripsina no es suficiente para producir variaciones en los % de CFA.

#### 4.5. Aplicación de la Citometría de Flujo al estudio de la senescencia eritrocitaria

##### 4.5.1. Determinación de IgG en GRSe y GRJ

Las suspensiones eritrocitarias evaluadas fueron:

- 1.- GRSe y GRJ obtenidas según 3.2.
- 2.- GRs lavados de muestras de sangre entera sin realizar previamente ninguna separación física.

Los valores promedios de los porcentajes de células positivas para IgG en las distintas suspensiones de GR se muestran en la Tabla IX:

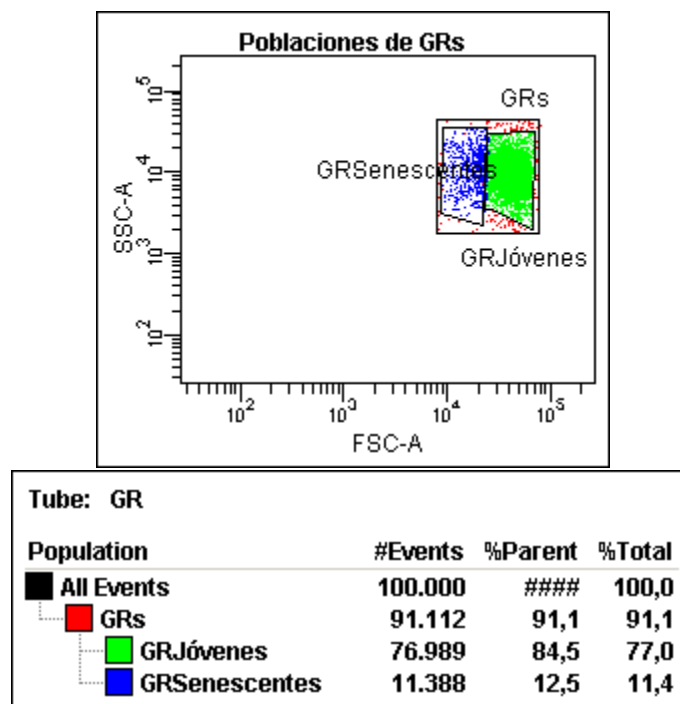
% de GR IgG+		
	GRSe	GRJ
Suspensión 1	2.6%±1.25%	0.4%±0.25%
Suspensión 2	2.3%±1.4%	0.4%±0.25%

**Tabla IX:** Porcentajes de células IgG+ en muestras de GRs separados por gradientes de Percoll (suspensión 1) y en sangre entera (suspensión 2).

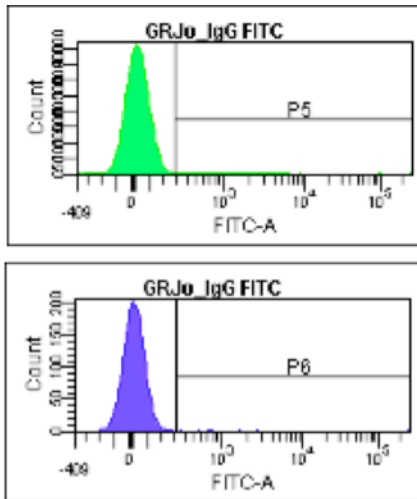
En las suspensiones de GRSe los valores promedios de los porcentajes para IgG fueron significativamente mayores que los observados en GRJ ( $p = 0.0019$  ó  $p < 0.002$ ) cuando se estudian las poblaciones eritrocitarias obtenidas por ambos métodos.

El análisis estadístico (Test de Wilconxon para muestras apareadas) demostró que por ambas metodologías se obtienen valores de porcentajes de células positivas para IgG en las poblaciones de GRSe y GRJ, que no difieren significativamente. La obtención de resultados comparables en las muestras sin separación previa permitió el estudio posterior de otros marcadores de senescencia en muestras de GRs sin ningún paso de separación, evaluando cada marcador en las regiones definidas por los parámetros de dispersión de luz (FSC Y SSC).

A continuación se detallan la estrategia de análisis utilizada (Figura 8), los resultados para las muestras separadas con gradientes de Percoll y de sangre entera (Figura 9) y los controles utilizados (Figura 10).



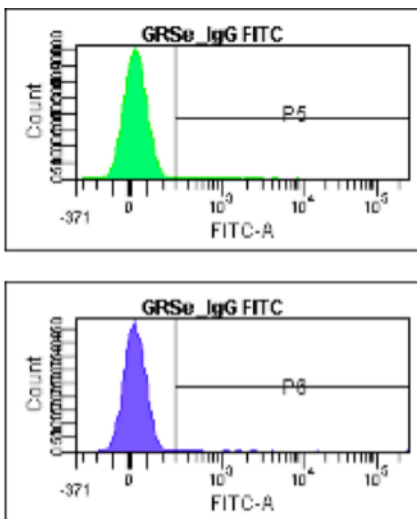
**Figura 8:** Gráfico de puntos (dot-plot) con la estrategia de análisis utilizada para la evaluación de las poblaciones de GRs de distintas edades utilizando sangre entera.



Tube: GRJo\_IgG FITC

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100.000	###	100,0
P1	94.576	94,6	94,6
GRJóvenes	89.132	91,6	89,4
P5	544	0,6	0,5
GRSenescentes	4.030	4,2	4,0
P6	52	1,3	0,1
P4	626	0,7	0,6

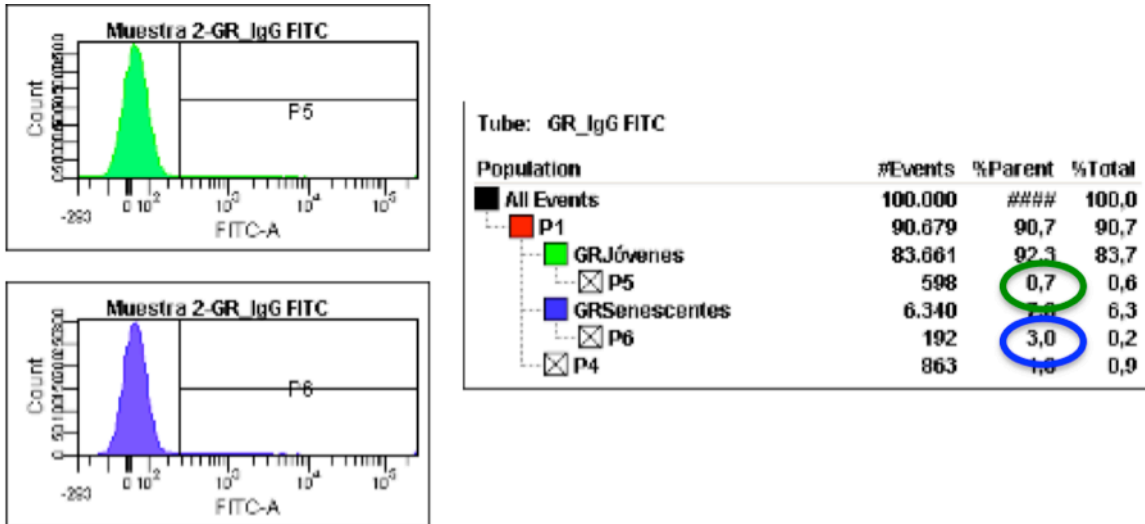
### Análisis en GRJ en muestras separadas con gradientes de Percoll



Tube: GRSe\_IgG FITC\_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100.000	###	100,0
P1	96.164	96,5	96,5
GRJóvenes	86.371	89,5	86,4
P5	362	0,4	0,4
GRSenescentes	9.559	9,8	9,6
P6	109	1,1	0,1
P4	493	0,5	0,5

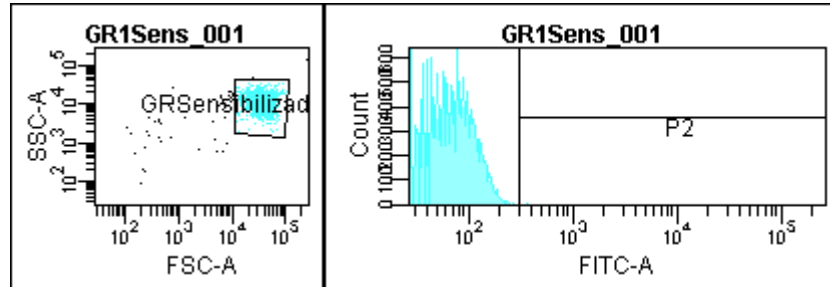
### Análisis en GRSe en muestras separadas con gradientes de Percoll



**Evaluación de GRSe y GRJ en muestras de sangre entera.**

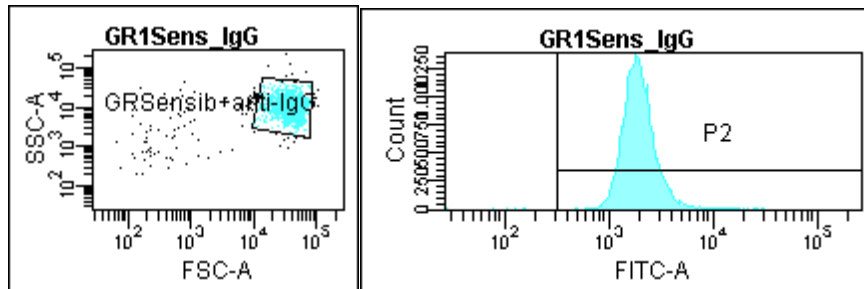
**Figura 9:** Histogramas de % de GR IgG+ en poblaciones de GRs separadas con gradientes de Percoll y en muestras de sangre entera basados en las diferencias de los parámetros de dispersión de luz (FSC y SSC) de ambas poblaciones.

### Control Positivo Con GR Sensibilizados con IgG



Tube: GR1Sens\_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30.000	####	100,0
GRSensibilizados	29.502	98,3	98,3
P2	3	0,0	0,0



Tube: GR1Sens\_IgG

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30.000	####	100,0
GRSensib+anti-IgG	28.808	96,0	96,0
P2	28.793	99,9	96,0

**Figura 10:** Histogramas con los resultados obtenidos para los controles positivos: GR "O" Rh(D) Positivos sensibilizados con Anti-D de clase IgG, marcados con Anti-IgG humana conjugada con FITC.

## 4.5.2. Estudio de marcadores de senescencia por Citometría de Flujo en sangre entera

### 4.5.2.1. Complemento C<sub>3</sub>

En la Tabla X se describen las medianas de los porcentajes de GRs con C3 unido sobre su membrana para las poblaciones de GRs estudiadas si separar físicamente los eritrocitos.

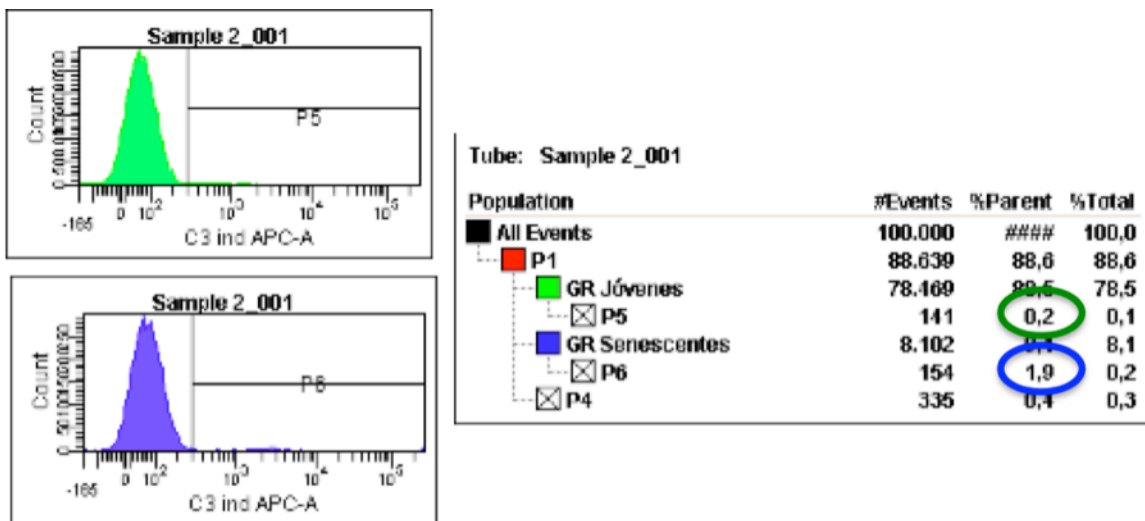
	% de células C3 positivas	
	GRSe	GRJ
Mediana	2.2	0.2
Rango Intercuartil	1.4	0.55

**Tabla X:** Porcentaje de GRs C3 positivos en las regiones asignadas a GRSe y GRJ.

Los datos obtenidos se analizaron aplicando el test de Wilcoxon.

El valor de la mediana del porcentaje de células C3 positivas en GRSe es significativamente mayor que en los GRJ ( $p=0.00005$  ó  $p<0.0001$ ).

En la Figura 11 se observa un ejemplo de una muestra de GRs marcada con anti-C3.



**Figura 11:** Histogramas con el análisis de muestras de sangre entera marcada anti-C3 humana marcada indirectamente con APC.

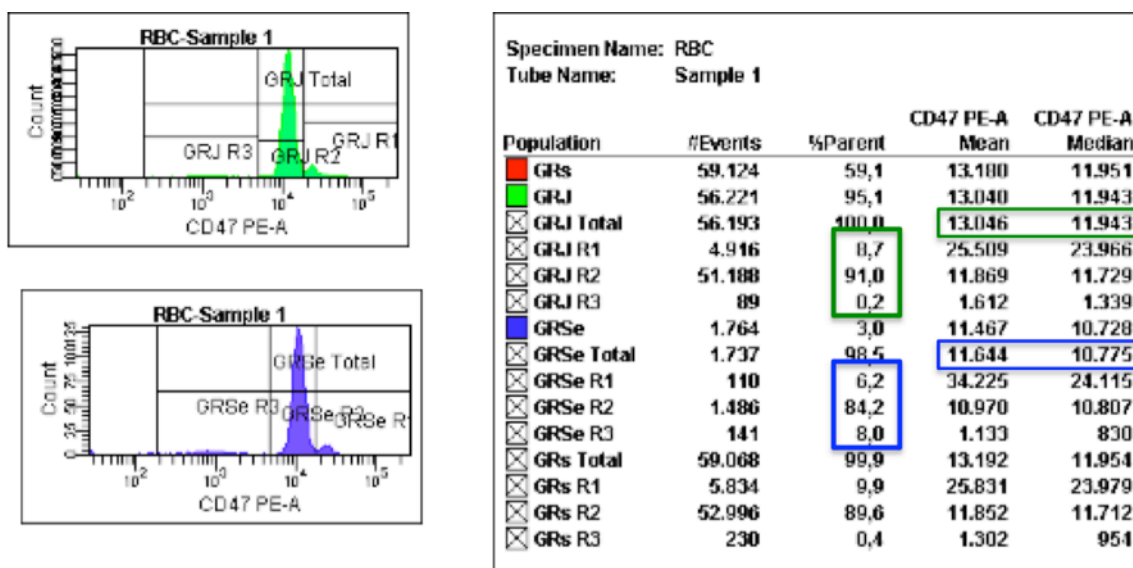
#### 4.5.2.2. CD47

Los valores promedios de las media y mediana de la intensidad de fluorescencia (IFM) de CD47 son significativamente menores en GRSe que en GRJ ( $p=0.0000$  ó  $p < 0.001$ ), como se observa en la Tabla XI.

CD47	IFM Media		IFM Mediana	
	GRSe	GRJ	GRSe	GRJ
Media	11839.2	12970.7	11010.0	11965.0
Desvio Estandard	1043.85	1117.92	882.98	945.7

**Tabla XI:** Comparación de los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia de CD47 para ambas poblaciones de GR (Senescentes y Jóvenes).

En los histogramas obtenidos se observó una redistribución en los porcentajes de células y en las intensidades de fluorescencia de CD47 entre la región asignada a GRSe y la población donde se ubican los GRJ, como se puede ver en la figura 12:



**Figura 12:** Histogramas de la Intensidad de Fluorescencia para GRs marcados con CD47PE, donde puede observarse una redistribución entre los porcentajes de células con diferentes intensidades de expresión de CD47 para las dos poblaciones de hematias de diferentes edades.

El porcentaje de células positivas para CD47 fue analizado en regiones con diferente intensidad de fluorescencia: GRSe R1, GRSe R2, GRSe R3 para los GRSe y GRJ R1, GRJ R2 y GRJ R3 para GRJ, donde R1 representa la mayor expresión de CD47, R2 una expresión intermedia y R3 menor expresión de IF para CD47.

La siguiente tabla muestra la información del porcentaje de células con diferente intensidad de expresión de CD47 en media y mediana como medidas de posición y sus respectivas medidas de dispersión: desviación estándar (DE) y rango intercuartil (RI), para cada una de las regiones analizadas:

	GRJ			GRSe		
	GRJR1	GRJR2	GRJR3	GRSeR1	GRSeR2	GRSeR3
<b>Media aritmetica (DE)</b>	8.21(3.65)	91.66(3.64)	0.1(0.13)	6.30(3.52)	91.65(4.23)	1.76(1.70)
<b>Mediana (RI)</b>	7.55(4.95)	92.35(5.05)	0.05(0.15)	5.75(5.5)	92.7(7.4)	1.3(0.95)

**TablaXII:** Porcentaje de GRs en regiones con diferentes nivel de expresión de CD47.

Se comparan GRJR1 con GRSeR1, GRJR2 con GRSeR2 y GRJR3 con GRSeR3.

El porcentaje promedio de células positivas para CD47 en la R1 de GRJ es significativamente mayor que para R1 de GRSe ( $p=0.02$  ó  $p<0.05$ ). El porcentaje promedio de células positivas para CD47 en la R2 de GRJ no difiere significativamente de los correspondientes en la R2 de GRSe ( $p=0.49$  ó  $p>0.40$ ). Como las distribuciones de la variable porcentaje de células positivas para CD47 en las poblaciones R3 de GRJ y la R3 de GRSe son asimétricas a la derecha y no se verifica el supuesto de normalidad de la variable diferencia para comparar promedios de muestras dependientes, se comparan las medianas poblacionales y debe informarse la mediana y el rango intercuartil como medidas de posición y dispersión de los datos muestrales. La mediana del porcentaje de células positivas para CD47 en las poblaciones R3 de GRJ es significativamente menor que en la R3 de GRSe ( $p=0.0000$  ó  $p<0.0001$ ).

### 4.5.2.3. Fosfatidilserina (Unión de Anexina V)

#### 4.5.2.3.1. Porcentaje de células Anexina V+ en GRSe y GRJ

En la Tabla XIII se observan los porcentajes de células con aumento de PS en la cara externa de la membrana, basado en la afinidad de unión a la Anexina V.

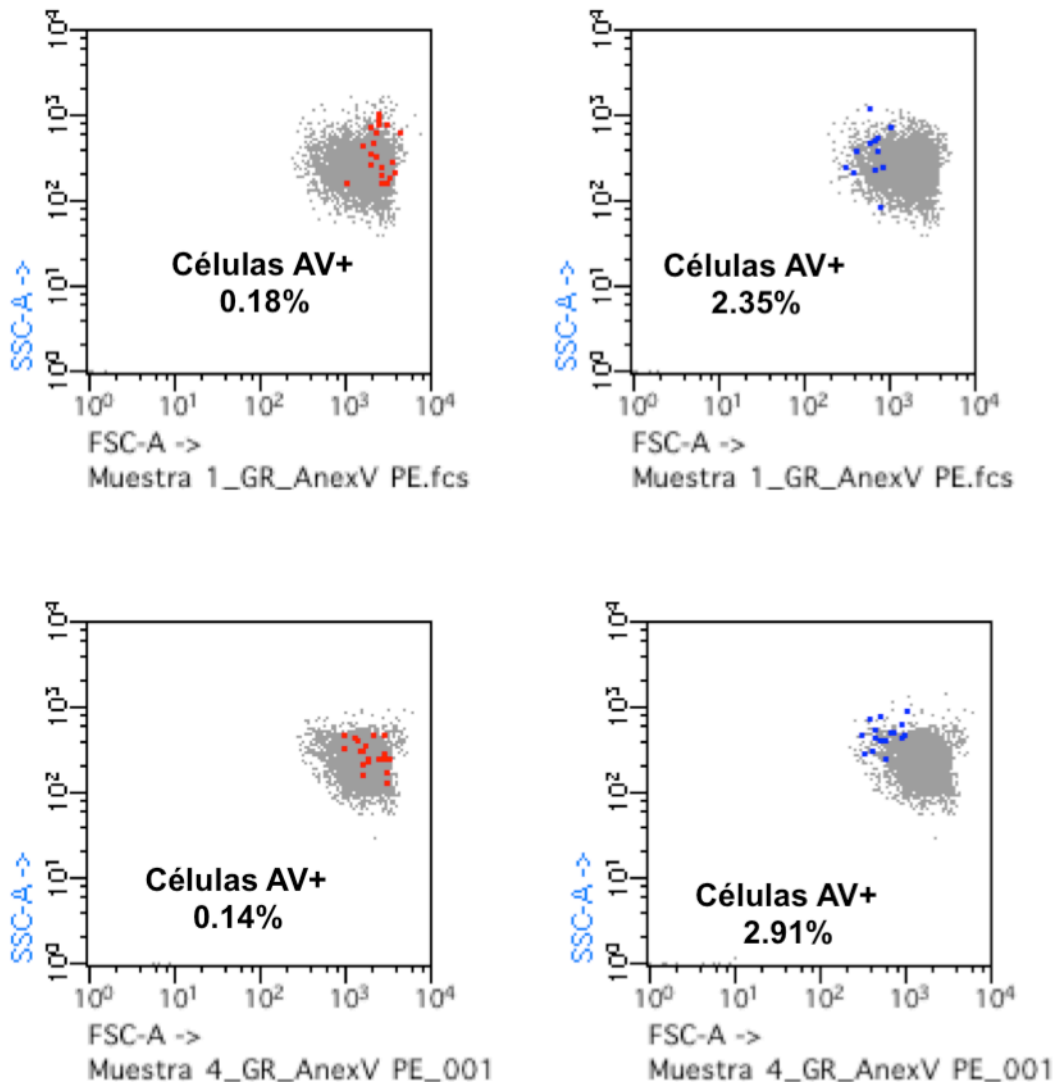
% de células Anexina V positivas		
	GRSe	GRJ
Mediana	1.1	0.15
Rango Intercuartil	0.5	0.1

**Tabla XIII:** Porcentaje de GRs AV+ en las poblaciones de eritrocitos de distintas edades, evaluados a través de la afinidad de unión de la PS a la anexina V.

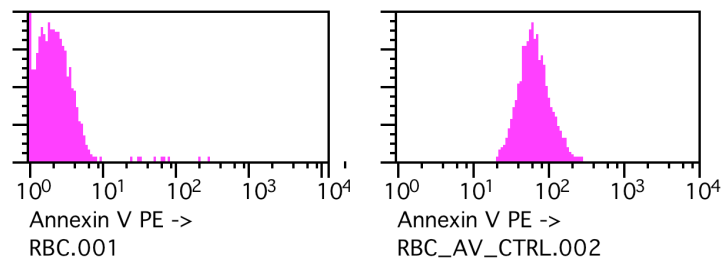
El valor de la mediana del porcentaje de células Anexina V positivas (AV+) en cada región, en GRSe es significativamente mayor que en GRJ ( $p=0.0005$  ó  $p < 0.001$ ).

En la Figura 13 puede observarse la diferencia de expresión de la PS en las regiones estudiadas con el programa de análisis Paint a Gate y las imágenes obtenidas para el control positivo.

A



B



**Figura 13: A:** Gráficos de puntos que muestran las diferencias obtenidas en el porcentaje de GRs AV+ entre las regiones asignadas a GRSe (puntos rojos) y GRJ (puntos azules). **B:** Histogramas de la expresión de Anexina V para el control positivo, donde se midió la expresión de Anexina V en GRs permeabilizados con etanol.

#### 4.5.2.3.2. Porcentajes de células AV+ en pacientes con Anemias Hemolíticas

En la tabla XIV se muestran los porcentajes de GRs AV+ en las poblaciones de GRSe, GRJ y en la población total de eritrocitos (GR).

Paciente	Diagnóstico	GR	GRJ	GRSe
1	Anemia Hemolítica HbA/C	0.32	0.25	<b>4.35</b>
2	Anemia Hemolítica HbA/C	0.29	0.30	<b>3.45</b>
3	Anemia Hemolítica HbS/C	0.30	0.40	1.05
4	Anemia Hemolítica HbA/S	0.32	0.30	1.15
5	ADA	0.45	0.20	<b>2.80</b>
6	Anemia Hemolítica Deficiencia de G6PD	0.30	0.10	0.90
7	Anemia Hemolítica HbH	0.15	0.35	0.65
8	Anemia Hemolítica $\alpha^0$ . Med	0.25	0.10	1.90
9	Control Normal	0.70	0.20	1.40
10	Anemia Hemolítica $\alpha^0$ . Med	0.40	0.30	<b>3.55</b>
11	Anemia Hemolítica Hb A/C <sup>Harlem</sup>	0.30	0.15	1.90
12	Anemia Hemolítica Hb A/C <sup>Harlem</sup>	0.20	0.10	1.15
13	Anemia Hemolítica (Esplenectomizado)	0.30	0.20	0.50
14	Anemia Hemolítica (Esferosictosis Hereditaria)	0.10	0.10	0.40
15	Anemia Hemolítica (Esferosictosis Hereditaria)	0.20	0.15	0.35
16	Anemia Hemolítica Deficiencia de G6PD	0.10	0.10	0.65
17	Anemia Hemolítica Hb Lepore	0.55	0.10	<b>3.55</b>
18	Anemia Hemolítica (Esferosictosis Hereditaria)	0.15	0.10	<b>2.00</b>
19	Anemia Hemolítica $\alpha$ Talasemia <sup>3.7</sup> / HbS	0.10	0.10	0.90
21	Anemia Hemolítica (Esferosictosis Hereditaria)	0.85	0.60	1.95

**Tabla XIV:** Porcentajes de GRsAV+ evaluados a través del aumento la expresión de PS en la superficie de los eritrocitos en muestras de pacientes con diferentes Anemias Hemolíticas Hereditarias.

#### 4.5.2.4. Proteína Banda 3 (CD233)

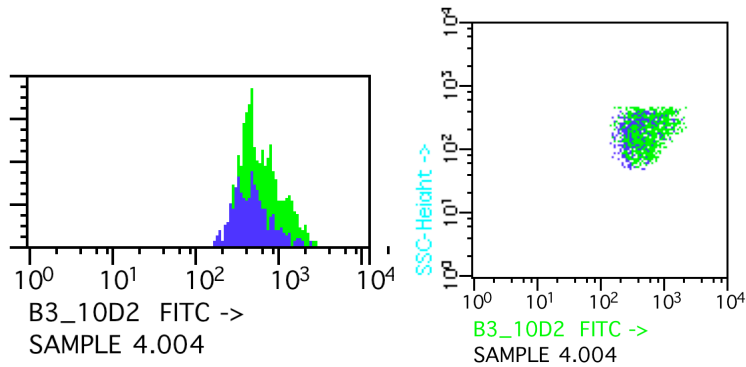
En la tabla XV se muestran los resultados obtenidos para los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia para la expresión de CD233 en las poblaciones de GRs de diferentes edades.

CD233	IFM Media		IFM Mediana	
	GRSe	GRJ	GRSe	GRJ
Mediana	31016.5	34070.0	28416.0	32384.0
Rango Intercuartil	4198.0	5878.0	3712.0	4864.0

**Tabla XV:** Comparación de los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia de CD233 (Banda 3) para ambas poblaciones de GR (Senescentes y Jóvenes).

Para comparar los valores de medias aritméticas y de medianas de la Intensidad de Fluorescencia (IF) de Banda 3 en glóbulos rojos jóvenes y senescentes se aplicó el test de Wilcoxon.

Los valores de las medias aritméticas de la IF de Banda 3 son significativamente más elevados para los GRJo respecto de los GRSe ( $p < 0.005$ ). Los valores de las medianas de IF de Banda 3 son significativamente mayores en los GRJo respecto de los GRSe ( $p < 0.005$ ). En la Figura 14 se muestra un ejemplo del análisis de la expresión de CD233



Experiment Name: Band 3		Specimen Name: SAMPLE 10		B3_10D2 FITC FL1-A B3_10D2 FITC FL1_	
Population	#Events	%Parent	Mean	Median	
P1	1.072	10,7	31.073	30.464	
GRJóvenes	396	36,9	32.209	31.232	
P5	396	100,0	32.209	31.232	
GRSenescentes	469	43,8	30.137	29.440	
P6	469	100,0	30.137	29.440	
P4	1.072	100,0	31.073	30.464	

**Figura 14:** Histograma, gráfico de puntos y estadísticas de la expresión de CD233 en GRSe (azul) y GRJ (verde).

#### 4.5.2.5. Glicoforina A (CD235a)

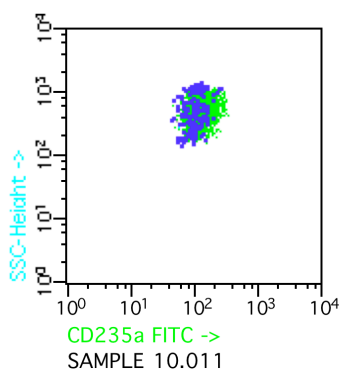
En la tabla XVI se muestran los resultados obtenidos para los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia para la expresión de CD233 en las poblaciones de GRs de diferentes edades.

CD235a	IFM Media		IFM Mediana	
	GRSe	GRJ	GRSe	GRJ
Mediana	7516.0	8420.5	6601.5	7745.5
Rango Intercuartil	4806.5	5307.0	4500.0	4555.5

**Tabla XVI:** Comparación de los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia de CD235a (Glicoforina A) para ambas poblaciones de GR (Senescentes y Jóvenes).

Para comparar los valores de medias aritméticas y de medianas de la IF CD235 a en glóbulos rojos jóvenes y senescentes se aplicó el test de Wilcoxon. Los valores de las medias aritméticas de CD235a son significativamente más elevados para los GRJo respecto de los GRSe ( $p < 0.01$ ). Los valores de las medianas de IF de CD235a son significativamente mayores en los GRJ respecto de los GRSe ( $p < 0.01$ ). En la Figura 15 se observan las estadísticas y grafico de puntos de la evaluación de la expresion de CD235a.

Experiment Name: CD235a				
Tube Name: Sample 2				
Population	#Events	%Parent	CD235a FITC FL1-A Mean	CD235a FITC FL1-A Median
<span style="color: red;">■</span> P1	9.217	42,1	9.108	8.960
<span style="color: green;">■</span> GRJóvenes	8.310	90,2	9.268	8.960
<span style="color: blue;">■</span> P5	8.307	100,0	9.271	8.960
<span style="color: blue;">■</span> GRSenescentes	660	7,2	7.314	6.784
<span style="color: blue;">■</span> P6	659	99,8	7.325	6.912
<span style="color: blue;">■</span> P4	9.213	100,0	9.112	8.960



**Figura 15:** gráfico de puntos y estadísticas de la expresión de CD233 en GRSe (azul) y GRJ (verde).

#### 4.5.2.6. CD55

En la tabla XVII se muestran los resultados obtenidos para los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia para la expresión de CD55 en las poblaciones de GRs de diferentes edades.

CD55	IFM Media		IFM Mediana	
	GRSe	GRJ	GRSe	GRJ
Media Aritmética	1211.0	1395.4	1001.4	1147.4
Desviación estándar	274.3	342.2	228.8	284.2

**Tabla XVII:** Comparación de los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia de CD55 para ambas poblaciones de GR (Senescentes y Jóvenes).

Se concluye que los valores promedios de la expresión de CD55, cuando se considera como variable aleatoria la media aritmética de la intensidad de fluorescencia de CD55 en la población de GRSe son significativamente menores que en los GRJ ( $p < 0.001$ ).

Los valores promedios de la expresión de CD55, cuando se considera como variable aleatoria la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD55 en la población de GRSe son significativamente menores que en los GRJ ( $p < 0.001$ ).

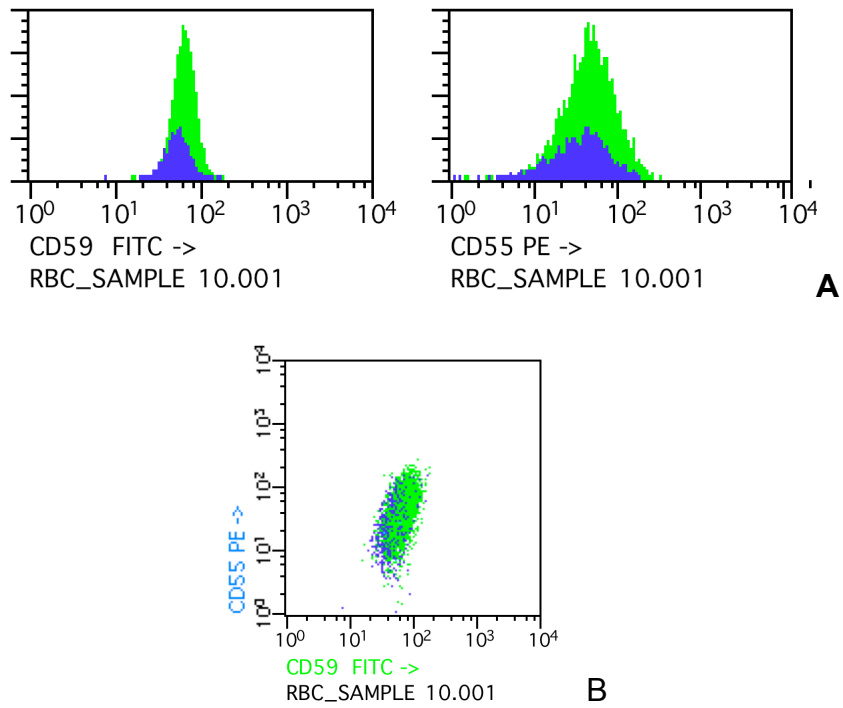
#### 4.5.2.7. CD59

En la tabla XVIII se muestran los resultados obtenidos para los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia para la expresión de CD59 en las poblaciones de eritrocitos de diferentes edades

CD59	IFM Media		IFM Mediana	
	GRSe	GRJ	GRSe	GRJ
Media Aritmética	1561.6	1742.4	1467.5	1649.1
Desviación estándar	415.0	469.9	379.9	439.6

**Tabla XVIII:** Comparación de los valores de media y mediana de la intensidad de fluorescencia de CD59 para GRSe y GRJ.

Los valores promedios de la expresión de CD59, cuando se considera como variable aleatoria la media aritmética de la intensidad de fluorescencia de CD59 en la población de GRSe son significativamente menores que en los GRJ ( $p < 0.001$ ) y los valores promedios de la expresión de CD59, cuando se considera como variable aleatoria la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD59 en la población de GRSe son significativamente menores que en los GRJ ( $p < 0.001$ ). En la figura 16 se muestran los histogramas y gráfico de puntos de la expresión de las proteínas reguladoras de la actividad del complemento: CD55 y CD59.



**Figura 16: A:** Histogramas de la expresión de CD55 y CD59 para GRSe (azul) y GRJ (verde) analizados con el programa Paint a Gate. **B:** Gráfico de puntos (dot plot) CD59 vs CD55 en las dos poblaciones de eritrocitos en estudio, analizados con el programa Paint a Gate.

## 5. DISCUSIÓN

Después de una vida de aproximadamente 115 días, los hematíes son eliminados de la circulación, por un proceso complejo afectado por varios parámetros bioquímicos e inmunológicos (4, 23, 54). Los mecanismos que determinan la senescencia eritrocitaria han sido extensamente estudiados, debido a que podrían aportar algunos nuevos enfoques sobre el envejecimiento y los factores involucrados en la eliminación de las células senescentes (42, 59). Los GRs se consideran un modelo experimental adecuado, debido a la disponibilidad de las muestras y a la carencia de organelas intracelulares, que permiten obtener las membranas plasmáticas sin necesidad de un fraccionamiento subcelular.

La separación de las distintas poblaciones eritrocitarias etareas se realiza generalmente, utilizando métodos físicos basados en las modificaciones dependientes de la edad que presenta el hematíe, principalmente la densidad o el volumen (82, 193, 195). El principio básico de la separación de las células senescentes de las jóvenes, se basa en el aumento de la densidad que exhiben los GRs a medida que envejecen, debido a la pérdida progresiva de agua, durante un proceso estocástico en el cual no todas los eritrocitos aumentan su densidad en un mismo grado (23, 66, 79). En una etapa inicial de este Trabajo de Tesis utilizamos la centrifugación en gradientes de Percoll,

porque este compuesto es ampliamente utilizado en la obtención de células, organismos y partículas subcelulares (200, 201, 202). El uso de estos gradientes preformados nos permitió realizar una adecuada separación de las poblaciones eritrocitarias de distintas edades, con un mínimo daño en sus parámetros fisiológicos (203, 204). Posteriormente, evaluamos la eficiencia de la técnica empleada, mediante el estudio de los parámetros VCM y % de R, que se encuentran entre las variables hematológicas más utilizadas por los investigadores que trabajan en senescencia eritrocitaria (52, 66). Los valores del VCM de las poblaciones de GRSe, determinados en un contador hematológico, fueron significativamente menores que los observados en las suspensiones de GRJ. Estos resultados deben atribuirse a que durante el proceso de envejecimiento, los eritrocitos pierden parte de la membrana en forma de microvesículas, liberan iones y agua, y en consecuencia se vuelven más pequeños y densos, como ha sido establecido por numerosos autores. La variable % de R, estudiada por la técnica de coloración supravital, mostró un aumento significativo en las suspensiones de GRJ, un hallazgo esperable debido a que esta fracción representa los hematíes de menor edad, entre los que se encuentran mayoritariamente estas células (23, 49, 52).

Entre las numerosas hipótesis propuestas para explicar el proceso de envejecimiento del GR, se ha considerado que una de las principales causas del decaimiento de la funcionalidad celular, puede atribuirse a una disminución en la capacidad de respuesta al estrés oxidativo y a un creciente desbalance homeostático (52, 136). Por lo tanto, como la concentración de creatina eritrocitaria ha sido reportada como un marcador asociado a la edad del GR (77, 233), hemos determinado espectrofotométricamente este parámetro, mediante la reacción con diacetilo y  $\alpha$ -naftol (220), en las suspensiones de eritrocitos de distintas edades, separadas por gradientes de Percoll. Los valores promedios de concentración de creatina en las poblaciones de GRSe fueron significativamente menores que los observados en los GRJ. Estos hallazgos se deben a una disminución en los intermediarios fosforilados del metabolismo energético observada durante el envejecimiento celular (71, 81,

82). Los resultados obtenidos en los parámetros hematológicos y bioquímico estudiados, subrayan la eficiencia de la centrifugación en gradientes preformados de Percoll, la técnica preparativa utilizada en este Trabajo de Tesis, para realizar la separación física de las distintas poblaciones eritrocitarias etáreas.

Varios autores han considerado que durante la senescencia del hematíe, se producen modificaciones en las moléculas de la membrana, principalmente en sus proteínas. (49, 51). Debido a que los GRs no tienen núcleo y no pueden sintetizar nuevas proteínas, las alteraciones en estas estructuras participaría en los cambios fenotípicos que presentan los eritrocitos envejecidos. Por ello, 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 las proteínas totales. Nuestros resultados son coincidentes con los encontrados en la literatura, donde la mayoría de los investigadores consideran que las principales modificaciones que ocurren en el proceso de envejecimiento del GR, no involucran importantes cambios cuantitativos en las proteínas eritrocitarias (23, 52, 53).

Por otra parte, en trabajos recientes se ha postulado que el proceso de oxidación de las proteínas de membrana, tendría un rol central en las modificaciones que se producen durante la senescencia eritrocitaria (64, 175, 234), debido a que los GRs son especialmente susceptibles a la injuria por oxidación, al estar expuestos constantemente a altas concentraciones de O<sub>2</sub> (235, 236). En este Trabajo de Tesis, determinamos la presencia 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. El grado de oxidación fue evaluado mediante la cuantificación de grupos carbonilos a través de un enzimoimmunoanálisis, debido a que este método requiere mínimas cantidades de proteínas (223, 237). Los resultados obtenidos revelaron que el contenido de grupos carbonilos es significativamente mayor en los GRSe, indicando un incremento durante el envejecimiento, del nivel de oxidación de las proteínas de membrana.

Considerando que la identidad molecular del ASE y la naturaleza de los cambios que inducen su expresión no están totalmente identificados, estos hallazgos confirman la participación del proceso oxidativo en la generación del neoantígeno, como ha sido propuesto por Kay (92, 146, 147) y destacan la relevancia de los cambios oxidativos en las proteínas de la membrana eritrocitaria, iniciando el proceso de reconocimiento y remoción selectiva de los GRSe de la circulación sanguínea.

Debido a que en distintas investigaciones, se ha reportado que durante el proceso de senescencia eritrocitaria se producen modificaciones en la proteína Banda 3, que conducirían al desarrollo del ASE (93, 175, 238), continuamos este Trabajo de Tesis profundizando el estudio de esta proteína. En primer lugar, determinamos la relación existente entre la proteína Banda 3 y el resto de las proteínas de membrana, a través de electroforesis en geles de poliacrilamida, sin observar diferencias significativas en los porcentajes de las distintas bandas entre las poblaciones de GRSe y GRJ. Por el contrario, en el análisis del inmunoblotting utilizando anticuerpos específicos contra el dominio citoplasmático de la proteína Banda 3, se observó en las membranas de los GRSe, una mayor intensidad en las regiones de menor peso molecular atribuidas a los productos de degradación, indicando que en el envejecimiento eritrocitario se producen cambios estructurales/conformacionales en la Banda 3. Además, debemos considerar que los resultados obtenidos en el análisis del inmunoblotting, no dependen solamente del uso de las condiciones desnaturizantes y de los geles apropiados para separar los complejos proteicos de alto peso molecular, sino también de la especificidad de los anticuerpos empleados. El anticuerpo anti Banda 3 utilizado en este Trabajo de Tesis (clon BIII 136) reconoce la proteína Banda 3 (90-100 KDa) y diferentes péptidos de menor masa molecular que migran en los geles de poliacrilamida en las regiones de 60, 40 y 20 KDa. Las múltiples bandas de diferente peso molecular detectadas, podrían ser el resultado de las modificaciones que se producen en esta proteína, durante el envejecimiento de los hematíes. El anticuerpo usado reconoce un epítipo localizado en la región citoplasmática de

la molécula de Banda 3, situado aproximadamente a 20 KDa del extremo N-terminal. El incremento observado en los productos de degradación, puede ser correlacionado con los eritrocitos envejecidos. Sin embargo, debemos tener en cuenta que el inmunoblotting no es un método cuantitativo y la intensidad relativa de las bandas de menor masa molecular, es usualmente más alta que en el caso de los polipéptidos grandes. Algunos autores han explicado de diferente forma estas discrepancias, debido a que no se ha dilucidado si los complejos que contienen Banda 3, están formados por Banda 3 intacta junto con otras proteínas que perduraron en el proceso de desnaturalización o si son agregados de los productos de degradación de esta proteína. Por ello, los valores obtenidos podrían no reflejar los valores reales y el grado de degradación fisiológico de Banda 3, podría ser menor que el encontrado en nuestros estudios, realizados *in vitro*. Sin embargo, esta metodología resulta útil para fines comparativos y los resultados obtenidos, demostraron una mayor formación de fragmentos de Banda 3 en los GRSe, evidenciando las modificaciones de esta proteína durante el envejecimiento eritrocitario (52, 93, 94, 239).

En la última década, se ha establecido un consenso general sobre los mecanismos implicados en la remoción de los GRSe de la circulación sanguínea. Se ha postulado que la formación de neoantígenos expresados en la proteína Banda 3 de la membrana eritrocitaria, conduciría a la acumulación de IgG autóloga y a su posterior fagocitosis por las células del SFM (57, 234, 240, 241). Para aplicar esta teoría a nuestro trabajo, comenzamos realizando la PAD con un anticuerpo anti-IgG + anti C3d, que permite identificar GRS *in vitro* e *in vivo*. La cantidad de IgG unida a la membrana eritrocitaria en los GRSe no fue suficiente para obtener resultados positivos en esta prueba, que requiere al menos 500 moléculas de IgG por célula, como ha sido demostrado por otros autores (12, 94, 132). 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 los GRs intactos usando una metodología más sensible. 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. En estudios preliminares se probaron distintas condiciones de trabajo, que demostraron la validez de este enzimoimmunoanálisis, para cuantificar pequeñas cantidades de IgG unida a la membrana eritrocitaria. 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, que nos permitió visualizar en forma directa la cantidad superior de anticuerpos unidos a las células de mayor edad. En opinión de Lutz, el rol funcional de los anticuerpos que se encuentran naturalmente asociados a los GRSe, aún no ha sido aclarado debido al bajo número de moléculas de IgG unidas. Este autor considera que la presencia de unos pocos cientos de moléculas de IgG sobre los GRSe y menos de un tercio de este valor para los GRJ, sería insuficiente para inducir una fagocitosis eficiente mediante únicamente los receptores Fc. Estos anticuerpos podrían ser mediadores eficientes de la fagocitosis, a través de receptores en los macrófagos, que favorecerían este mecanismo. (54, 57). El escaso número de moléculas de IgG eritrocito específico, hallado en condiciones fisiológicas, indica que la remoción de los GRSe es un proceso eficiente y muy bien regulado.

Debido a que se ha planteado 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 (56, 57, 134, 135), utilizamos un ensayo funcional de monocapa de monocitos (EMM) como parámetro evaluador de los fenómenos que ocurren *in vivo*. La simplicidad de esta metodología permite obtener los monocitos de sangre periférica, con un alto porcentaje de viabilidad y disminuir la contaminación con otras células mononucleares observada en algunas técnicas. La mayor desventaja del método, consiste en la lectura microscópica de los preparados y el tiempo

requerido para realizarlo. Esta prueba desarrollada por nuestro grupo de investigación, fue utilizada en trabajos anteriores para investigar la interacción de los monocitos con los GRS, demostrando su valor como indicador de la destrucción eritrocitaria por auto y aloanticuerpos. (226). Hemos realizado el ensayo de eritrofagocitosis con las poblaciones de GRSe y GRJ para determinar su interacción con los monocitos. Se obtuvieron porcentajes de MA con las poblaciones de GRSe significativamente mayores a los observados con las suspensiones de GRJ y GRN (testigo negativo). Los valores de MA en los GRSe fueron estadísticamente menores a los observados con los GRS (testigo positivo), debido al reducido número de moléculas de anticuerpos unidas a la membrana eritrocitaria, como demostramos en los estudios anteriores utilizando la PAD. Los resultados obtenidos en esta prueba funcional, confirman el incremento en la fagocitosis de los GRSe, que ha sido demostrada por otros autores utilizando técnicas más laboriosas y de mayor costo (57, 135).

Además del mecanismo de destrucción de los GRSe analizado previamente, se ha propuesto otra vía alternativa IgG independiente. Se ha demostrado que los GRSe tienen un menor contenido de ácido siálico por célula y que esta pérdida produce una disminución de la carga superficial que podría favorecer la interacción con las células del SFM (23, 96, 98). Para estudiar este mecanismo hemos desarrollado un modelo *in vitro* de GR envejecidos, modificando el contenido del ácido siálico de la membrana. Se utilizaron dos enzimas que producen desianilización eritrocitaria por distintos mecanismos. La enzima neuraminidasa actúa en forma específica, eliminando aproximadamente un 80% de los residuos de ácido siálico. En cambio, la enzima tripsina produce solamente un 30% de desianilización, actuando de manera indirecta por su actividad proteolítica. Analizamos este mecanismo utilizando la prueba funcional de eritrofagocitosis discutida anteriormente. Los valores de MA obtenidos con los eritrocitos tratados con neuraminidasa, fueron inferiores a los obtenidos con las poblaciones de GRSe, pero significativamente superiores a los hallados con los GRJ. En cambio, los % de MA obtenidos con

los hematíes tratados con tripsina, fueron similares a los observados con las suspensiones de GRJ. Estos resultados indican que la acción de la neuraminidasa aumenta la interacción entre los GRs y las células del SFM. Por otra parte, la actividad desialinizante de la tripsina no fue suficiente para producir variaciones en los % de MA. Por lo tanto, los hallazgos obtenidos en este modelo *in vitro*, indican que la pérdida de ácido siálico participa en la destrucción eritrocitaria fisiológica. La importancia de la desialinización en la remoción de los GRSe, ha sido estudiada en modelos de animales agammaglobulinémicos, concluyendo que esta vía alternativa constituye un mecanismo adaptativo o potenciador del principal proceso de reconocimiento y fagocitosis selectiva de los GRs envejecidos, que requiere la acumulación de IgG autóloga (23,135).

En la última etapa de esta Tesis, considerando las ventajas que presenta la CMF, aplicamos esta metodología al estudio de distintos parámetros implicados en la senescencia eritrocitaria. Con el objetivo de validar la utilización de esta tecnología en nuestro modelo experimental, identificamos la presencia de IgG autóloga sobre las poblaciones eritrocitarias de distintas edades, fraccionadas por el método de gradientes preformados de Percoll y en sangre entera, sin realizar previamente la separación física de los hematíes. La obtención de valores similares en los porcentajes de células con IgG unida, en las muestras sin separación previa, nos permitió posteriormente estudiar otros marcadores de senescencia en sangre entera. La evaluación de las poblaciones de diferentes edades, se efectuó en las regiones definidas por los parámetros de dispersión de luz (FSC y SSC) y utilizando una estrategia de análisis definida. Este hallazgo experimental fue de gran importancia en la realización de esta Tesis, porque nos permitió investigar con la misma precisión, las modificaciones que se producen durante el envejecimiento del GR, empleando menor cantidad de muestra, evitando las manipulaciones del método separativo y disminuyendo el tiempo requerido para obtener eritrocitos de distintas edades. Además, la estrategia de análisis utilizada en la evaluación de los resultados y la gran cantidad de células que nos permite estudiar,

confirmaron la ventaja de continuar la investigación de la expresión de marcadores de senescencia eritrocitaria, empleando esta metodología.

Teniendo en cuenta que varios autores, principalmente Lutz (54, 57, 93), han considerado la participación del Sistema del Complemento en la remoción de los hematíes, evaluamos el depósito de C3 sobre la membrana eritrocitaria. Demostramos que el porcentaje de células C3 positivas en la región asignada a los GRSe, es significativamente mayor al observado en la zona correspondiente a los GRJ. Estos hallazgos son coincidentes con los reportados por algunos investigadores, que demostraron un incremento de C3 en la superficie de los eritrocitos envejecidos, utilizando otras metodologías (169, 172). Golan y colaboradores (173), al realizar estudios sobre la estructura de la membrana de los GRs, plantearon que el depósito aumentado de C3 sobre la superficie de la membrana del hematíe, produce una redistribución en las proporciones de los dímeros y los tetrámeros de Banda 3, modificando las interacciones de esta proteína con el citoesqueleto, aumentando la rigidez de la membrana y en consecuencia, favoreciendo el reconocimiento por parte de los macrófagos de los eritrocitos menos deformables. El aumento de C3 en la región asignada a los GRSe, ejerce una acción sinérgica en la fagocitosis de los GRs con IgG unida, como se ha observado en las Anemias Hemolíticas Inmunológicas. La presencia incrementada de C3 en los GRs envejecidos, confirma el rol central del sistema inmune en la remoción selectiva de estos hematíes de la circulación sanguínea, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis tisular. Aunque generalmente los autoanticuerpos naturales han sido considerados irrelevantes en el repertorio de las moléculas de Igs, intervienen en la eliminación de las células apoptóticas, de los GRSe y sus residuos. La unión firme bivalente de autoanticuerpos naturales anti-Banda 3, requiere la presentación de la proteína en forma de oligómeros. Estos autoanticuerpos naturales activan la vía clásica del Complemento y algunos de ellos son capaces de estimularla favoreciendo la opsonización. De esta manera, los autoanticuerpos naturales participan en la homeostasis de los

tejidos, amplificando su baja afinidad mediante la movilización de todas las etapas que comprenden la cascada del Sistema del Complemento (160, 142).

Algunas investigaciones actuales consideran que durante el envejecimiento, se produce un cambio conformacional en la glicoproteína CD47 que la transforma en una señal de fagocitosis para los macrófagos. Los cambios oxidativos en el eritrocito, inducen las modificaciones requeridas en CD47 para la unión de TSP-1, indicando que el daño oxidativo es un factor importante en la generación de señales estimuladoras de la fagocitosis para los macrófagos (122-124). La evaluación de la expresión de CD47 utilizando CMF, demostró una redistribución en los % de las células con diferente intensidad de expresión del marcador estudiado en las muestras de sangre analizadas. Se observó un aumento de las células con menor intensidad de expresión de CD47 en la región asignada a los GRSe. Considerando que CD47 forma parte del macrocomplejo Banda 3, las modificaciones en las proteínas, principalmente en Banda 3, tendrían un efecto indirecto en la conformación de CD47, transformando a esta glicoproteína en una señal de fagocitosis en lugar de ejercer un efecto inhibitorio.

Los fosfolípidos están distribuidos asimétricamente en la membrana plasmática de la mayoría de las células. La exposición de FS en la capa externa de la membrana, se describe como un marcador de apoptosis en las células nucleadas (24, 100, 108). Aunque la apoptosis en los GRs, denominada eryptosis por Lang y col. (245) aún es discutida, presenta algunas características similares: aumento de calcio intracelular, exposición de PS y formación de vesículas durante el envejecimiento de los GRs. El análisis de la expresión de FS en la membrana eritrocitaria, evaluada por su afinidad de unión con la anexina V a través de CMF, mostró valores significativamente mayores en los porcentaje de las células que expresan FS en su superficie, en la región asignada a los GRSe. Este incremento de la expresión de FS, favorecería el reconocimiento de estos eritrocitos por los macrófagos, a través de receptores scavenger, contribuyendo a su eliminación. Además, investigamos el porcentaje de células que expresan FS en su superficie, en

muestras de pacientes con Anemias Hemolíticas Hereditarias, observando en algunos casos, un mayor porcentaje de células con FS. Este hallazgo coincide con los datos encontrados en la bibliografía, donde se ha considerado que en estas patologías, se produce una aceleración del proceso del envejecimiento eritrocitario, similar al mecanismo que ocurre durante la senescencia fisiológica (27, 32-34, 110).

La proteína Banda 3 desempeña un rol central en la morfología y en la deformabilidad eritrocitaria. Durante el envejecimiento del hematíe, las alteraciones morfológicas se asocian con una disminución de la deformabilidad, con cambios fenotípicos en las membranas y en la estructura de Banda 3 (82, 139,146). La pérdida de unión entre Banda 3 y el citoesqueleto puede ser responsable del incremento de la oligomerización y/o agregación de Banda 3 durante el envejecimiento y además del aumento de la susceptibilidad a la ruptura (94, 95, 151). La disminución en la unión entre Banda 3 y la bicapa lipídica podría ser la causa necesaria para la formación y liberación de vesículas. Por lo tanto, los cambios en la estructura de Banda 3 no son solamente responsables del reconocimiento por autoanticuerpos naturales, sino que también participan en la formación de las vesículas. La vesiculización *in vivo*, es considerada una parte integral del proceso de envejecimiento fisiológico, permitiendo la eliminación de las regiones dañadas de la membrana, pero conservando la integridad funcional del eritrocito (178, 180). Esta teoría es avalada por los estudios realizados en las bolsas de GRs, durante su almacenamiento en los Bancos de Sangre, que muestran un incremento en la formación de vesículas con el tiempo, que las vesículas contienen más Banda 3 agregada y degradada que los eritrocitos con el mismo tiempo de depósito y que presentan varias señales de remoción de los hematíes envejecidos (FS, IgG y proteínas del Sistema del Complemento) (178, 179). La disminución en la región asignada a los GRSe, en la expresión de las proteínas Banda 3 (CD233) y Glicoforina A (CD235a) evaluadas por CMF, puede explicarse por la formación de microvesículas. Además, la disminución en los niveles de expresión de Glicoforina A , presenta una buena

correlación con la pérdida de ácido siálico que sufren los eritrocitos a lo largo de su vida, favoreciendo la interacción de los GRSe con los macrófagos del SMF. (243, 246)

Los GRs son protegidos de la lisis mediada por el Sistema del Complemento, por la presencia en la superficie de proteínas que regulan su actividad. La glicoproteína CD55 inhibe la ruptura de C3 y C5 acelerando el decaimiento de las convertasas y CD59 impide la formación del complejo de ataque a la membrana por unión a C8 y C9. Las proteínas CD55 y CD59 han sido extensamente estudiadas en la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, demostrando que sus deficiencias conducen a hemólisis mediadas por el Sistema del Complemento. En este Trabajo de Tesis, evaluamos las glicoproteínas CD55 y CD59 por CMF, evidenciando una disminución en el nivel de expresión de ambas proteínas en la zona asignada a los GRSe. Estos resultados concuerdan con la formación de microvesículas que ocurre durante el envejecimiento de los hematíes, indicando que la disminución en la expresión de estas proteínas reguladoras de la actividad del Complemento, podría explicarse a través de la pérdida de superficie. Además, estos hallazgos son coincidentes con el aumento de fragilidad osmótica de los GRSe, que ha sido evaluada por otras metodologías (178-180).

Finalmente, realizamos una comparación estadística de la media y la mediana de la IF y sus respectivas medidas de dispersión, obtenidas en los estudios de los niveles de expresión de CD233, CD235a, CD55 y CD59 en las poblaciones de GRs evaluadas en este Trabajo de Tesis por CMF. Los resultados obtenidos en estos análisis, no mostraron diferencias significativas, indicando la validez de informar la expresión de los marcadores estudiados con ambas medidas estadísticas (244).

Como en muchos fenómenos biológicos complejos, la remoción selectiva de los hematíes de mayor edad, es un mecanismo individual de reconocimiento y destrucción de células. La eliminación de los GRSe está regulada de manera positiva y negativa. El aumento de algunas moléculas en la superficie eritrocitaria (IgG autóloga, C3 y PS), constituyen señales positivas que inducen

la remoción de los eritrocitos envejecidos. En cambio, la presencia de marcadores de lo propio (CD47 y ácido siálico) sobre los hematíes, transmiten señales de regulación negativa a los fagocitos. Estas moléculas ahorran la eliminación de células propias, mientras que modificaciones en la superficie celular, actúan como señales que son reconocidas por los macrófagos para iniciar la fagocitosis. En la homeostasis de los tejidos de organismos multicelulares, es necesaria la participación de diversos sistemas de reconocimiento independientes, pero finalmente convergentes.

El proceso de envejecimiento eritrocitario estudiado en este Trabajo de Tesis, considerando al hematíe como una célula especializada con su propia homeostasis y maquinaria de transducción de señales, indica que el GR puede constituir un valioso modelo, para el estudio del estadio final de la apoptosis incluyendo la vesiculización de membranas - formación de vesículas, el reconocimiento inmune y la fagocitosis. Este aporte puede acelerar el conocimiento sobre el envejecimiento celular, permitiendo hallar las claves desconocidas en la fase de ejecución de un programa de apoptosis.

Además, una descripción inequívoca de la vía fisiológica del envejecimiento eritrocitario sería de gran importancia para una mejor comprensión del destino de los GRs en circunstancias patológicas, contribuyendo a aumentar el conocimiento de la etiología y desarrollo de las eritropatías y a realizar un diagnóstico más precoz y certero, mejorando el pronóstico de las Anemias Hemolíticas.

Finalmente, teniendo en cuenta que se ha postulado que en los GRs conservados en los Servicios de Hemoterapia, 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 que permitan mejorar el mantenimiento metabólico y la integridad celular de los eritrocitos transfundidos. La correcta descripción del proceso del envejecimiento eritrocitario, permitirá acrecentar la eficacia transfusional y optimizar la conservación de las fracciones eritrocitarias en los Bancos de Sangre.

## 6. CONCLUSIONES

- En la evaluación de las fracciones eritrocitarias de distintas edades, obtenidas mediante la separación por gradientes de densidad de Percoll, los valores de los parámetros hematológicos (VCM y % de Reticulocitos) y bioquímico (concentración de creatina) fueron significativamente menores en las suspensiones de GRSe. Estos hallazgos verifican la eficacia en la obtención de poblaciones eritrocitarias etáreas homogéneas.
- La cuantificación de las proteínas de membrana en las suspensiones de GRSe y GRJ, no mostró diferencias significativas respecto a la edad del hematíe. Nuestros resultados verifican que durante el proceso de envejecimiento del GR, no se producen cambios cuantitativos importantes en la concentración de las proteínas eritrocitarias.
- La determinación de los grupos carbonilos en las poblaciones de GRs de distintas edades, indicó un incremento en el nivel de oxidación de las proteínas de membrana en los GRSe, demostrando la participación de los cambios oxidativos en el envejecimiento fisiológico de los hematíes.

- Aunque las modificaciones en la proteína Banda 3, conducirían al desarrollo del ASE, no obtuvimos diferencias significativas en los porcentajes de las distintas bandas de proteínas entre las poblaciones eritrocitarias de distintas edades. En cambio, en la inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-Banda 3 humana (Clone BIII-136), específico contra el dominio citoplasmático de la proteína Banda 3, se observó en las membranas de GRSe, una mayor intensidad en las regiones atribuidas a los productos de degradación, indicando que durante el envejecimiento se producen cambios estructurales/ conformacionales en esta proteína.
- En la determinación de la concentración de IgG y en las imágenes obtenidas por microscopía confocal, hallamos un aumento significativo en el contenido de IgG en las suspensiones de GRSe. La unión de IgG autóloga al hematíe envejecido constituye una demostración de la función fisiológica del sistema inmune en el mantenimiento de la homeostasis celular.
- En el EMM, se obtuvieron porcentajes de MA en las poblaciones de GRSe significativamente mayores a los observados con los GRJ y estadísticamente menores a los obtenidos con los GRS (control positivo), debido al menor número de moléculas de anticuerpos unidas a la membrana eritrocitaria, como se demostró con la PAD. Estos hallazgos confirman el incremento en la fagocitosis de GRSe, demostrada por otros autores utilizando técnicas más laboriosas y de mayor costo. Los valores de MA obtenidos con los GRs tratados con neuraminidasa, fueron inferiores a los observados con los GRSe pero significativamente mayores a los hallados con los GRJ, indicando que esta enzima aumenta la interacción entre los eritrocitos y las células del SFM. En cambio, los % de MA obtenidos con los GRs tratados con tripsina fueron similares a los observados con los GRJ, señalando que 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 eritrocitaria. Esta vía alternativa constituye un mecanismo adaptativo o potenciador del principal proceso de reconocimiento y fagocitosis selectiva de los GRSe por acumulación de IgG autóloga.

- Evaluamos la utilidad de la CMF en el estudio de la senescencia eritrocitaria, comparando los porcentajes de células con IgG unida en muestras de GRSe y GRJ separados con Percoll y en las muestras sin separación previa. La obtención de valores comparables, nos permitió investigar las modificaciones que se producen durante el envejecimiento del hematíe, empleando menor cantidad de muestra, evitando las manipulaciones del método separativo y disminuyendo el tiempo requerido para obtener eritrocitos de distintas edades. Además, la estrategia de análisis utilizada en la evaluación de los resultados y la gran cantidad de células que nos permite evaluar, confirmaron la ventaja de continuar el estudio de la expresión de marcadores de senescencia eritrocitaria empleando esta metodología.
- Al analizar la participación del Sistema del Complemento en la remoción de los eritrocitos, demostramos que el porcentaje de células C3 positivas en la región asignada a los GRSe es significativamente mayor que en la zona correspondiente a los GRJ. Estos resultados confirman el rol central del sistema inmune en la remoción selectiva de los hematíes envejecidos de la circulación sanguínea, contribuyendo a mantener la homeostasis tisular.
- La evaluación de las glicoproteínas CD55 y CD59 por CMF, evidenció una disminución en el nivel de expresión de ambas proteínas en la zona asignada a los GRSe. Estos hallazgos concuerdan con la formación de microvesículas durante el envejecimiento de los GRs, indicando que la disminución en la expresión de estas proteínas reguladoras de la actividad del Complemento podría explicarse por la pérdida de superficie.

- En la investigación de la expresión de CD47 utilizando CMF, se observó un aumento de células con menor intensidad de expresión de CD47 en la región asignada a los GRSe. Considerando que CD47 forma parte del macrocomplejo Banda 3, las modificaciones en las proteínas, principalmente en Banda 3, tendrían un efecto indirecto en la conformación de CD47, actuando como una señal de fagocitosis en lugar de una señal inhibitoria.
- El análisis de la expresión de FS en la membrana eritrocitaria, evaluada por su afinidad de unión con la anexina V, mostró un aumento en el porcentaje de células que expresan FS en su superficie, significativamente mayor en la región asignada a los GRSe. Este incremento de expresión de FS en la superficie, favorecería su reconocimiento por los macrófagos, contribuyendo a su eliminación.
- Los mayores porcentajes de células que expresan FS en su superficie en muestras de pacientes con Anemias Hemolíticas Hereditarias son similares a los datos encontrados en la bibliografía, donde se considera que en estos desórdenes hereditarios se produciría un proceso de envejecimiento acelerado, similar al de la senescencia fisiológica.
- La disminución en la expresión de la proteína Banda 3 (CD233) y de Glicoforina A (CD235a) evaluada por CMF, en la población asignada a los GRSe, se explicaría por la pérdida de membrana durante el envejecimiento eritrocitario mediante la formación de microvesículas, Además la disminución en los niveles de expresión de Glicoforina A , confirmaría la pérdida de ácido siálico que sufren los eritrocitos a lo largo de su vida, favoreciendo la interacción de los GRs con los macrófagos del SMF.
- 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.

- La correcta descripción del proceso de senescencia eritrocitaria, será de gran importancia para una mejor comprensión del destino de los GRs en circunstancias patológicas y la sobrevivencia de los hematíes después de la transfusión, permitiendo optimizar el empleo de los procedimientos más racionales en los Bancos de Sangre.