

Tesis Doctoral

Eriptosis. Mecanismos involucrados y efecto protector de la eritropoyetina

Vota, Daiana Marina

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vota, Daiana Marina. (2012). Eriptosis. Mecanismos involucrados y efecto protector de la eritropoyetina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Vota, Daiana Marina. "Eriptosis. Mecanismos involucrados y efecto protector de la eritropoyetina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

“Eriptosis. Mecanismos involucrados y efecto protector de la eritropoyetina”

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Autor: Daiana Marina Vota

Directora: Dra. Alcira B. Nesse

Directora asistente: Dra. Daniela C. Vittori

Consejera de estudios: Dra. Elba Vásquez

Laboratorio de Fisiología Celular de la Eritropoyetina

Buenos Aires, 2012

Eriptosis. Mecanismos involucrados y efecto protector de la eritropoyetina

Los procesos inflamatorios, frecuentemente asociados a anemia de enfermedades crónicas, podrían cumplir un rol en la inhibición de la eritropoyesis. La existencia de señales intracelulares comunes entre los procesos que regulan la eritropoyesis y la respuesta inflamatoria sugiere que la desregulación de un sistema podría explicar la disminución de la función del otro. Por otro lado, un daño directo sobre los eritrocitos maduros en circulación, causado por factores presentes en dichos procesos, podría contribuir también al desarrollo de anemia. Teniendo en cuenta que la identificación de factores que pueden afectar la sensibilidad de células eritroides a las diferentes señales recibidas permitiría conocer la interferencia de la inflamación en la eritropoyesis, se planteó como primer objetivo, dilucidar la interrelación entre diferenciación eritroide y apoptosis. Se observó una mayor sensibilidad de la línea eritroleucémica humana K562 a la acción proapoptótica de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β , cuando las células se encontraban en etapa de diferenciación eritroide. El estudio de los mecanismos involucrados permitió sugerir, por primera vez, una posible explicación del efecto de TNF- α e IL-1 β basada en la disminución de los niveles de la proteína antiapoptótica c-FLIP observada durante la diferenciación con hemina. Más aún, el tratamiento previo con el factor de crecimiento eritropoyetina (Epo) de las células inducidas a diferenciación eritroide las protegió de la acción proapoptótica a la vez que se detectó la modulación positiva de c-FLIP. La Epo contrarrestaría los cambios en las vías de señalización producidos durante el proceso de diferenciación eritroide permitiendo a las células mantener su resistencia a la apoptosis mediada por citoquinas proinflamatorias.

Bajo ciertas circunstancias, eritrocitos maduros pueden sufrir autodestrucción prematura presentando alteraciones celulares similares a las de la apoptosis de una célula nucleada, razón por la que se denominó a este proceso eriptosis.

Además de citoquinas, durante los procesos inflamatorios es frecuente encontrar incrementados los niveles de compuestos prooxidantes. Por ello, a continuación se enfocó el trabajo hacia la evaluación de un posible efecto directo de estos agentes sobre eritrocitos maduros. Se estudió el desarrollo de signos de eriptosis en los eritrocitos expuestos a citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) y a agentes prooxidantes (NaNO₂ y H₂O₂). Se encontró que éstos pero no las citoquinas indujeron traslocación de fosfatidilserina (PS) en la membrana del eritrocito. Para investigar los posibles mecanismos involucrados en la autodestrucción prematura de los eritrocitos, se analizaron cambios morfológicos y bioquímicos en el glóbulo rojo expuesto a dos condiciones: aumento masivo de calcio

intracelular y exposición celular a NaNO_2 y H_2O_2 . Además de la externalización de PS, los eritrocitos bajo ambos tratamientos mostraron un incremento del nivel intracelular de calcio, ambas características típicas del desarrollo de eriptosis. Sólo en el modelo de estrés oxidativo se observó, además, el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disminución de glutatión (GSH). La activación de la proteína PI3K parecería ser relevante en la eriptosis inducida por ambos modelos mientras que la activación de la fosfatasa PTP1B estaría favorecida en el modelo de sobrecarga de calcio. Las modificaciones de proteínas de membrana y los cambios en la morfología celular fueron también signos diferenciales entre ambos tratamientos.

La Epo fue capaz de disminuir significativamente la inducción de la alteración en el estado redox celular por NaNO_2 y H_2O_2 . En cambio, no fue capaz de inhibir la traslocación de PS en el modelo de incremento de calcio. Las diferencias en los mecanismos involucrados en los dos modelos estudiados podrían explicar la acción diferencial de Epo sobre los eritrocitos inducidos a eriptosis por los diferentes agentes.

En base a los resultados obtenidos y a otros trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio, se decidió, en el siguiente paso, investigar si compuestos de aluminio pueden actuar como factores proeriptóticos. Experiencias *in vivo* e *in vitro* permitieron asociar la sobrecarga de aluminio con anemia. En este trabajo, se estudiaron mecanismos de acción del metal, utilizando un modelo de eritrocitos humanos sometidos a tratamiento prolongado *in vitro* con cloruro de aluminio. La aparición de eritrocitos con morfología anormal sugirió una interacción del metal con la superficie celular, sustentado por el hallazgo de elevada concentración de Al en la membrana celular. Se demostró que el Al induce signos de eriptosis, como externalización de PS, aumento de calcio intracelular y degradación de banda 3. El hallazgo de un incremento significativo de ROS en conjunto con una disminución de la concentración de GSH mostró un estado de estrés oxidativo. Un punto interesante es que la acción prooxidante del aluminio fue contrarrestada por la Epo. El hecho de que este resultado fuera similar a la prevención del desbalance óxido-reducción por la acción del antioxidante N-acetilcisteína (NAC), sugiere un rol antioxidante de la Epo.

El efecto antieriptótico de la Epo podría contribuir a enriquecer el conocimiento acerca del rol fisiológico de esta hormona sobre células eritroides. Independientemente de cuál sea su mecanismo antioxidante, el efecto de Epo demostrado en este modelo de exposición a aluminio, así como en el modelo de estrés oxidativo, nos permite sugerir potenciales beneficios del tratamiento con la hormona en pacientes con anemia asociada a patologías con un ambiente redox alterado.

Palabras claves:

eritrocitos; anemia; eriptosis; estrés oxidativo; eritropoyetina; calcio intracelular; citoquinas proinflamatorias; aluminio.

Mechanisms involved in eryptosis and the protective effect of erythropoietin

The first part of this study focused on the modulation of factors that would affect the sensitivity of erythroid differentiated cells to proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β . The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) affects a wide range of biological activities, such as cell proliferation and apoptosis. Cell life or death responses to this cytokine might depend on cell condition. Therefore, it was interesting to study whether erythroid differentiation may affect erythroid progenitors to apoptosis induced by proinflammatory cytokines.

Hemin-differentiated K562 cells showed higher sensitivity to TNF-induced apoptosis than undifferentiated cells. At the same time, hemin-induced erythroid differentiation reduced c-FLIP expression. However, this negative effect was prevented by previous treatment with erythropoietin, which allowed the cell line to maintain c-FLIP levels. The results suggest that erythroid differentiation might deregulate the balance between growth promotion and death signals induced by TNF- α , depending on cell type and environmental conditions. The role of c-FLIP seemed to be critical in the protection of erythroid differentiated cells from apoptosis or in the determination of their sensitivity to TNF-mediated programmed cell death. Epo, which for the first time was found to be involved in the prevention of c-FLIP downregulation, proved to have an antiapoptotic effect against the proinflammatory factor.

The identification of signals related to cell life/death switching would have significant implications in the control of proliferative diseases, and would contribute to the understanding of mechanisms underlying the anemia associated to inflammatory processes.

Proinflammatory factors may not only affect the erythropoiesis process but also cause direct injury upon mature erythrocytes. Eryptosis is a process by which red blood cells can undergo self-destruction sharing several features with apoptosis. Since premature programmed erythrocyte death may be induced by different agents, in this work mechanisms involved in two eryptotic models (oxidative stress and cell calcium overload) were compared. Phosphatidylserine (PS) translocation and increased calcium content were common signs observed in erythrocytes exposed to sodium nitrite plus hydrogen peroxide or calcium ionophore A23187, while increased reactive oxygen species (ROS) and decreased reduced glutathion (GSH) levels were detected in the oxidative model. Protein kinase activation seemed to be an outstanding feature in eryptosis induced by oxidative stress whereas phosphatase activation was favored in the calcium overload model. Cell morphology and membrane protein alterations were also differential signs between both models. Erythropoietin was able to prevent cell oxidative unbalance, thus blunting PS translocation. However, the hormone favored intracellular calcium influx which could be the reason why it

could not completely counteract the induction of eryptosis. Instead, erythropoietin was unable to inhibit PS externalization in the increased calcium model. The different mechanisms involved in the eryptotic models may explain the differential action of erythropoietin upon erythrocytes induced to eryptosis by different agents.

Previous works developed in our laboratory suggested that aluminum compounds could be proeryptotic agents. The widespread use of aluminum provides easy exposure of humans to the metal and its accumulation remains a potential problem. *In vivo* and *in vitro* assays have associated Al overload with anemia and erythrocyte morphological and biochemical changes. To better understand the mechanisms by which aluminum affects human erythrocytes, these cells were exposed to long-term treatment with the metal using an *in vitro* model developed in our laboratory that mimic *in vivo* effects. The appearance of erythrocytes with abnormal shapes suggested metal interaction with cell surface, supported by the fact that high amounts of aluminum were found attached to cell membrane. Long-term incubation of human erythrocytes with Al induced signs of premature erythrocyte death (eryptosis), such as phosphatidylserine externalization, increased intracellular calcium, and band 3 degradation. Signs of oxidative stress, such as significant increase in ROS in parallel with decrease in the amount of GSH, were also observed. Interestingly, Epo protected erythrocytes from the prooxidative action of aluminum. Since this result was similar to that of the antioxidant N-acetylcysteine, it can be suggested an antioxidant ability of Epo. In conclusion, results provide evidence that chronic aluminum exposure may lead to biochemical and morphological alterations similar to those shown in eryptosis induced by oxidant compounds in human erythrocytes. The antieryptotic effect of Epo may contribute to enhance the knowledge of its physiological role on erythroid cells. Irrespective of the mechanism involved in its antioxidant action, this property of Epo shown in this model of aluminum exposure, let us suggest additional benefits of the Epo treatment in patients with anemia associated to altered redox environment.

Keywords:

erythrocytes; anemia; eryptosis; oxidative stress; erythropoietin; intracellular calcium; proinflammatory cytokines; aluminum toxicity

Agradecimientos

Agradezco a todas y cada una de las personas que son parte de mi vida y que han participado de este proceso de una u otra manera, en lo personal y/o en lo profesional, ya que gracias a ellos el tránsito de este duro camino fue más agradable.

En primer lugar le agradezco a Pablo, mi amor, por su paciencia infinita y su compañía desde siempre en todos mis proyectos. Su comprensión y ayuda me enseña día a día a encontrarle el verdadero sentido a las cosas.

Agradezco profundamente a mis padres Marina y Angel, quienes me han dado todo, por su apoyo y amor incondicional, y por enseñarme a luchar por lo que quiero.

Le doy gracias a la mejor hermana, la mía (Alexia), por acompañarme y aconsejarme siempre, a mi cuñado Luciano y mi sobrino Santino, Los tres son muy especiales en mi vida.

También le doy gracias a mi nueva familia: Cecilia, Norma, Tatá, y Mati. Les agradezco por el amor mutuo que nos une.

Quisiera agradecer especialmente a las Doctoras Daniela Vittori y Alcira Nesse por todo lo compartido durante estos 8 años, por enseñarme y por guiarme de la manera más correcta por este difícil camino.

A Maru, mi amiga incondicional, compañera de trabajo, de estudios y de la vida, le doy gracias por todos los momentos vividos y todo lo que me ayudó durante estos años. Espero que sean muchos más.

Agradezco también a Renée, Vane, Lau, Gla, Mari, Shir, Lu, Vale y Romi por la hermosa amistad que nació entre pipetas y microscopios y que hoy perdura.

Les doy las gracias a mis amigas y amigos de la vida, a los viejos y a los nuevos, por compartir conmigo tantos lindos momentos, por escucharme aunque no entiendan nada de los que le hablo y por aceptarme como soy.

Les agradezco a las Doctoras Lucía, Irene, Claudia, Ana María, Rosana y Graciela por la cordialidad y el afecto con los que siempre me han tratado, así como también a sus becarios, en especial a Daniel, Vale y Julia, a Yani y a las vecinas de QB 24.

Gracias, Dai.

Este trabajo está dedicado a mi familia y amigos más cercanos, quienes me confirman día a día que nada en esta vida tiene sentido sin amor, y que los logros no pueden ser disfrutados si no tenemos con quien compartirlos.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han dado origen a las siguientes publicaciones:

Artículos

✚ **"c-FLIP is involved in erythropoietin-mediated protection of erythroid-differentiated cells from TNF- α -induced apoptosis "**

Daniela Vittori¹, Daiana Vota¹, Mariana Callero, María E. Chamorro, Alcira Nesse.

¹ These authors contributed equally to this work.

Cell Biology International; ISSN: 1065-6995. Vol. 34 (6): 621–630 (2010).

✚ **" Oxidative stress due to aluminium exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin "**

Daiana M. Vota, Renée L. Crisp, Alcira B. Nesse, Daniela C. Vittori.

Journal of Cellular Biochemistry, ISSN: 0730-2312. Vol. 113 (5): 1581-9 (2012).

✚ **"Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents "**

Daiana M. Vota, Romina E. Maltaneri, Shirley D. Wenker, Alcira B. Nesse, Daniela C. Vittori.

"Cell Biochemistry and Biophysics", ISSN: 1085-9195. En prensa, DOI: 10.1007/s12013-012-9408-4. (2012).

Capítulo de libro

✚ **"Erythrocyte : Programmed Cell Death"**

Vittori D; Vota D; Nesse A.

Título del libro: "Anemia". Editorial: InTech, Donald S. Silverberg (Ed.). ISBN: 978-953-51-0138-3, cap.2, pág. 21-38, Croacia, (2012).

<http://www.intechopen.com/articles/show/title/erythrocyte-programmed-cell-death>

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACD	<i>Anemia of chronic disease</i>
ADN	Ácido desoxi ribonucleico
ADNc	ADN copia
AG	AG490
Al	Aluminio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BFU-E	<i>Burst-forming unit-erythroid</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
[Ca]_i	Contenido de calcio intracelular
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
CFU-E	<i>Colony-forming unit-erythroid</i>
DAF	2,7-diaminofluoreno
DCFDA-DH	2',7' diclorofluorescína diacetato
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTPs	Nucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)- N,N,N',N'-tetraacético
Epo	Eritropoyetina
EpoR	Receptor de eritropoyetina
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa
GSH	Glutation reducido
GR	Glóbulos rojos
H	Hemina
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IP	Ioduro de propidio

ABREVIATURAS

IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
Jak	<i>Janus</i> quinasa
LY	LY294002
NAC	N- acetilcisteína
NC	Membranas de nitrocelulosa
NFkB	Factor nuclear kB
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PARP	<i>Poly-adenosin ribose polimerase</i>
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PS	Fosfatidilserina
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
PY	fosfotirosina
rhuEpo	Eritropoyetina recombinante humana
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Suero fetal bovino
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TBS	<i>Buffer</i> tris salino
TBS-T	<i>Buffer</i> tris salino-Tween 20
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRIS	Tris hidroximetil amino metano
TEMED	Tetra metiletildiamina

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
I. HEMATOPOYESIS Y ERITROPOYESIS	1
Eritropoyetina	2
II. APOPTOSIS	4
Vías de señalización en apoptosis	5
Vía intrínseca	5
Vía extrínseca	6
Inhibidores de apoptosis	8
III. ERIPTOSIS	9
Morfología del eritrocito	9
Metabolismo y función del eritrocito	11
Mecanismos de eriptosis	12
IV. INTERFERENCIA DE MECANISMOS INFLAMATORIOS EN LA ERITROPOYESIS	13
Citoquinas inflamatorias	14
Especies reactivas de oxígeno y defensas antioxidantes	15
V. MODELO DE TOXICIDAD DEL ALUMINIO SOBRE ERITROCITOS	16
Biodisponibilidad del metal	16
Fuentes de exposición	17
Aluminio y anemia	19
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	
EQUIPOS	25
REACTIVOS Y ANTICUERPOS	25
Calidad de agua y reactivos	25
Reactivos específicos	25
Anticuerpos	27
DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO Y RESIDUOS PELIGROSOS	27
ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES Y SOLUCIONES	27
PROTOCOLOS	28
I. CRIOPRESERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	28
I.a. Congelamiento	28
I.b. Descongelamiento	28
II. CULTIVO CELULAR	28
II.a. Línea celular eritroleucémica humana K562	28
II.b. Línea celular promonocítica humana THP-1	29
II.c. Diferenciación celular	29
Células K562	29
Células THP-1	31
III. VIABILIDAD CELULAR	33
IV. EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS DE CÉLULAS K562	35
IV.a. Determinación de núcleos apoptóticos	35
IV.b. Clivaje de la proteína PARP	35
IV.c. Actividad de caspasa 3	37
V. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE LAS CÉLULAS K562	38

V.a. Amplificación de los fragmentos de ADNc por RT-PCR	39
V.b. Real Time PCR	40
VI. EXPRESIÓN DE C-FLIP POR CITOMETRÍA DE FLUJO	42
VII. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE ERIPTOSIS	42
VII.a. Estandarización de protocolos experimentales	42
VII.b. Estudio del aluminio como agente eriptótico	43
VII.c. Análisis de la morfología eritrocitaria por microscopía electrónica de barrido	44
VII.d. Determinación de exposición de residuos de fosfatidilserina	44
VIII. EVALUACIÓN DEL ESTADO REDOX INTRACELULAR	45
VIII.a. Cuantificación de ROS	45
VIII.b. Cuantificación de GSH	45
VIII.c. Cuantificación de los niveles de lipoperoxidación celular	45
IX. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	
X. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITARIAS	46
X.a. Cuantificación de la proteína banda 3 en membrana plasmática	46
X.b. Glicoforina A	46
X.c. Acuaporina 1 y EpoR	47
X.d. Preparación de membranas eritrocitarias	47
X.e. Detección de la actividad de PTP1B	47
X.e.i. Inmunoprecipitación	47
X.e.ii. Medición de la actividad enzimática	48
X.f. Determinación de la expresión de banda 3 y su fosforilación en residuos tirosina	48
XI. CUANTIFICACIÓN DE IONES ALUMINIO	49
XII. ERITROFAGOCITOSIS	49
XII.a. Detección de eritrofagocitosis por microscopía óptica	49
XII.b. Detección de eritrofagocitosis por citometría de flujo	50
XIII. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
CAPÍTULO I	
I. EFECTO DE UN AMBIENTE PROINFLAMATORIO SOBRE EL LINAJE ERITROIDE	
I.1. Acción de citoquinas proinflamatorias sobre progenitores eritroides	51
I.1.a. Desarrollo de muerte celular programada	51
I.1.a.i. Determinación de células apoptóticas	51
I.1.a.ii. Determinación de la actividad de caspasa 3	52
I.1.a.iii. Clivaje de la proteína PARP	55
I.1.b. Efecto de la diferenciación celular sobre la síntesis y expresión de c-FLIP _L	56
I.2. Acción de mediadores inflamatorios sobre eritrocitos maduros	57
I.2.a. Traslocación de fosfatidilserina (PS)	57
I.2.b. Hemólisis celular	59
DISCUSIÓN CAPÍTULO I	60
CAPÍTULO II	
II. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE ERIPTOSIS	
II.1. Signos de eriptosis	63
II.1.a. Externalización de fosfatidilserina	63

II.1.b. Contenido de calcio intracelular	64
II.1.c. Morfología eritrocitaria	64
II.2. Estudio del estado de óxido-reducción celular	66
II.3. Modificaciones a nivel de membrana plasmática	67
II.4. Rol del calcio intracelular en la externalización de fosfatidilserina	73
II.5. Rol de las quinasas y fosfatasa	74
II.6. Reconocimiento por el sistema retículo endotelial	75
DISCUSIÓN CAPÍTULO II	79
CAPÍTULO III	
III. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ERITROPOYETINA SOBRE CÉLULAS EN ETAPA DE DIFERENCIACIÓN ERITROIDE Y ERITROCITOS MADUROS	
III.1. Acción de la Eritropoyetina sobre células K562 hemoglobinizadas cultivadas en un medio proinflamatorio.	83
III.1.a. Determinación de células apoptóticas	84
III.1.b. Determinación de la actividad de caspasa 3	84
III.1.c. Síntesis y expresión de c-FLIP _L en presencia de eritropoyetina	85
III.2. Acción directa de la Eritropoyetina sobre eritrocitos maduros inducidos a eriptosis	87
III.2.a. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	87
III.2.b. Peroxidación lipídica	88
III.2.c. Traslocación de fosfatidilserina	89
III.2.d. Calcio intracelular	90
III.2.e. Expresión del receptor de eritropoyetina en eritrocitos maduros	92
III.3. Acción de eritropoyetina sobre la fagocitosis de eritrocitos inducidos a eriptosis	93
DISCUSIÓN CAPÍTULO III	95
CAPÍTULO IV	
IV. EFECTO DIRECTO DE LA SOBRECARGA DE ALUMINIO SOBRE ERITROCITOS HUMANOS	
IV.1. Signos de eriptosis	97
IV.1.a. Cambios morfológicos inducidos por aluminio in vitro	97
IV.1.b. Externalización de fosfatidilserina y aumento de calcio intracelular	99
IV.2. Detección de la presencia de aluminio en los eritrocitos	100
IV.3. Balance óxido-reducción en eritrocitos luego de la exposición a aluminio	101
IV.4. Relación entre el desbalance óxido-reducción y el desarrollo de signos de eriptosis	101
IV.5. Participación del ion calcio en el efecto del aluminio	102
IV.6. Degradación de la proteína banda 3 de membrana luego del tratamiento con aluminio	103
IV.7. Susceptibilidad a sufrir estrés oxidativo de los eritrocitos expuestos a aluminio	104
IV.8. Acción de la eritropoyetina sobre eritrocitos expuestos a aluminio	106
DISCUSIÓN CAPÍTULO IV	108
COCLUSIONES FINALES	112
REFERENCIAS	117

INTRODUCCIÓN

I. HEMATOPOYESIS Y ERITROPOYESIS

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se producen las células sanguíneas en la médula ósea a partir de una única *stem cell* pluripotente. Esta célula, con alta capacidad de autorrenovación durante toda la vida del individuo puede dar origen a todas las líneas celulares, como eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, plaquetas y células del linaje linfoide.

El sistema hematopoyético de los vertebrados requiere la presencia de progenitores que aseguren una producción continua de nuevas células, necesarias para reemplazar las células maduras cuya vida media es limitada.

Las *stem cells* son capaces de diferenciarse como respuesta al estímulo inducido por distintas citoquinas, originando células progenitoras, las cuales al dividirse y diferenciarse pierden su multipotencialidad en forma gradual. Este proceso de diferenciación es irreversible y da lugar a la formación, principalmente, de células unipotenciales y bipotenciales (comprometidas hacia una o dos líneas hematopoyéticas mieloides) y muy escasamente a células multipotenciales.

La eritropoyesis es un complejo proceso multifásico que involucra la diferenciación de células "*stem*" hematopoyéticas a eritrocitos o glóbulos rojos maduros (Fig.1).

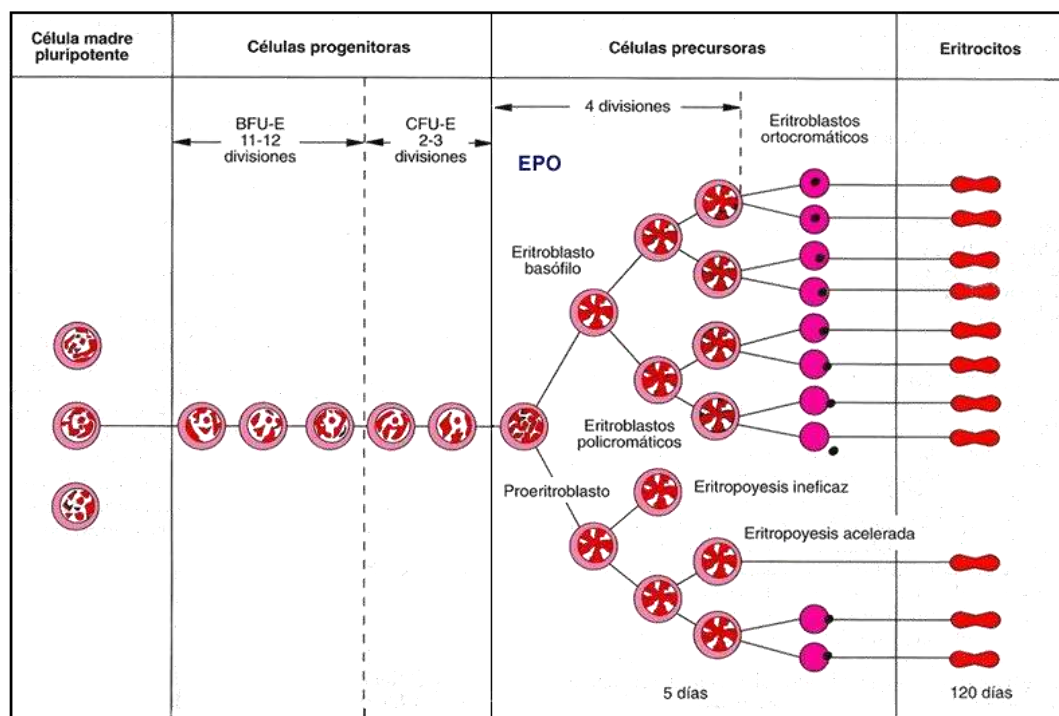


Figura 1: Esquema representativo de eritropoyesis. A partir de una célula madre pluripotente se generan progenitores eritroides que sufren diferentes estadios de diferenciación hasta convertirse en eritrocitos maduros. Adaptada de <http://www.iqb.es/hematologia/atlas/eritropoyesis.htm>

En la ontogenia eritropoyética, las BFU-E (*burst forming units-erythroid*) anteceden a las CFU-E (*colony forming units-erythroid*). Entre trece y quince es el número de divisiones celulares que realizan los progenitores eritroides antes de alcanzar el primer estadio de maduración morfológicamente reconocible, el proeritroblasto. La actividad mitótica de éstas células continúa en la etapa de eritroblasto basófilo hasta la etapa de eritroblasto policromatófilo. A lo largo de su diferenciación, los progenitores eritroides adquieren o pierden antígenos; este último es el caso de la expresión de los antígenos pluripotencial (CD34) y mieloide temprano (CD33). El proceso de diferenciación de las células eritropoyéticas, se caracteriza por la disminución gradual del tamaño celular, el cambio progresivo de coloración citoplasmática basófila a eosinófila debido a la síntesis cada vez mayor de hemoglobina, y a la progresiva condensación y achicamiento del núcleo hasta su extrusión definitiva. Las células maduras son retenidas en la médula ósea hasta que alcanzan cierto grado de maduración, con características morfológicas y funcionales distintivas y sin potencial proliferativo. El último estadio de diferenciación previo a la formación del eritrocito maduro se denomina reticulocito, donde la célula hemoglobinizada ya ha perdido su núcleo y organelas pero conserva restos de ácidos ribonucleicos (ARNs) en su interior. Una vez alcanzado el estadio de eritrocito circulante esos restos de ARN se han perdido.

Eritropoyetina

Esta producción continua de glóbulos rojos es activada por diversos factores, entre los que adquiere preponderancia, la eritropoyetina (Epo), la hormona que regula la producción de células eritroides.

La Epo, glicoproteína de 34 kDa, es sintetizada como precursor de 193 aminoácidos y luego sufre un clivaje de 27 aminoácidos y la glicosilación de 4 aminoácidos (serina en la posición 126 y tres en asparraginas en posición 24, 38 y 83). La remoción del extremo C-terminal del aminoácido arginina da por finalizado el proceso postraducciona (Bahlmann *et al*, 2004).

La Epo es producida en riñón e hígado, siendo éste el sitio de síntesis predominante durante la vida fetal. Después del nacimiento, aproximadamente el 10% de la producción de Epo sigue generándose en el hígado, pero la mayor producción se efectúa en las células intersticiales peritubulares de la corteza renal (Fisher, 2003).

La Epo actúa principalmente sobre las CFU-E y, en forma sinérgica con otros factores, sobre las BFU-E. Así, desde ambos estadios, CFU-E y BFU-E, se promueve tanto la proliferación, como la diferenciación (Testa, 2004).

El receptor de eritropoyetina (EpoR) pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas de tipo I. Su activación causa la homodimerización y la subsiguiente autofosforilación y activación de la tirosina kinasa Jak-2 (*Janus kinase 2*), una tirosina kinasa asociada al EpoR. Dicha activación, lleva a la fosforilación de distintas moléculas *target*, las cuales forman parte de diversas vías de señalización. Entre ellas se encuentran: PI3K (Fosfatidilinositol-3-kinasa), el factor de transcripción Stat-5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*) y NF- κ B (Factor nuclear kappa B) (Sirén *et al*, 2001; Zhao *et al*, 2006).

Desde su descubrimiento, Epo ha despertado la curiosidad de los hematólogos, pero ese interés se amplió a la clínica general cuando se pudo acceder a la eritropoyetina recombinante humana (rhuEpo). El conocimiento de la secuencia aminoacídica de Epo y el advenimiento de la ingeniería genética permitieron obtener líneas celulares productoras a gran escala de rhuEpo con potente actividad biológica (Lin *et al*, 1985).

La rhuEpo fue utilizada, inicialmente, en pacientes con insuficiencia renal crónica. Los resultados del tratamiento demostraron la eficacia de la hormona para corregir la anemia asociada a esta patología, ya que este signo deriva, en parte, de una marcada disminución de la síntesis renal de Epo (Eschbach *et al*, 1987).

Actualmente, la terapéutica con rhuEpo abarca también a pacientes con cáncer y mielodisplasias, a pacientes que sufren procesos crónicos (SIDA, artritis reumatoidea) o han recibido transplante de médula ósea.

Existe evidencia que sustenta la hipótesis de que la Epo no sería sólo responsable del compromiso del linaje eritroide sino que, a través de una acción antiapoptótica, aseguraría la supervivencia para que las células puedan cumplir con su programa de diferenciación (Mulcahy, 2001).

Esta acción antiapoptótica de la Epo sería la responsable de su notable habilidad de protección tisular en modelos de isquemia neuronal, renal y cardíaca, observaciones que han sido reportadas en varias publicaciones (Grasso *et al*, 2004; Jelkmann, 2004; Rossert y Eckardt, 2005). La elevada eficacia de la Epo observada en esos modelos depende de la activación de múltiples caminos de protección que incluyen inhibición de apoptosis, restauración de la autorregulación vascular, atenuación de respuestas inflamatorias e incremento de funciones reconstituyentes (Grasso *et al*, 2004).

II. APOPTOSIS

Como la homeostasis del sistema eritropoyético requiere un balance apropiado entre la velocidad de producción y destrucción de glóbulos rojos, los mecanismos de apoptosis tienen un rol relevante en el control de la eritropoyesis, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Testa, 2004).

La apoptosis o muerte celular programada, constituye, así, una forma activa de destrucción celular fundamental para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos adultos. Requiere de una programación genética por parte de la célula, para promover una cascada proteolítica, dependiente de energía, la que dará origen a los cambios morfológicos y bioquímicos que conducirán a la muerte celular. Dichos cambios son:

- ✓ Disminución del potencial de membrana mitocondrial con liberación de proteínas intramitocondriales
- ✓ Activación de proteasas (caspasas)
- ✓ Exposición de residuos de fosfatidilserina sobre el lado externo de la membrana plasmática debido a que dejan de funcionar las enzimas que traslocan dicho fosfolípido hacia la cara interna de la membrana
- ✓ Compactación de organelas
- ✓ Deformación del citoesqueleto
- ✓ Condensación de la cromatina
- ✓ Fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son porciones de citoplasma con organelas rodeadas de membrana plasmática. Estos cuerpos son fagocitados por células del sistema inmunológico que los reconocen como extraños debido a la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática (Hail *et al*, 2006).

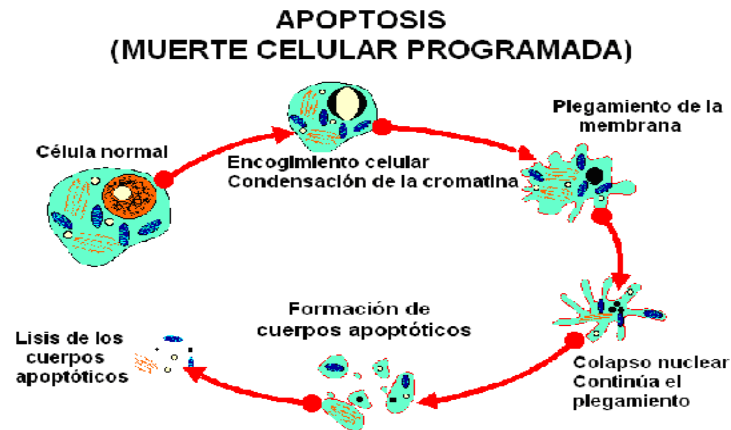


Figura 2: Cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis. Cuando se gatilla el mecanismo de apoptosis, la célula se encoge debido a la activación de caspasas que degradan el esqueleto interno. El ADN y otros componentes nucleares comienzan a condensarse y degradarse debido a la acción de ciertas caspasas específicas. El núcleo se desintegra. Por último, se forman cuerpos apoptóticos listos para ser fagocitados. Figura adaptada de <http://muta-tion.blogspot.com.ar/2011/08/apoptosis.html>

La inducción de apoptosis es el resultado de un balance entre las señales activadoras de supervivencia y de muerte. Las primeras, secretadas por otras células, son de necesidad continua y están representadas por factores de crecimiento y por hormonas (Benn y Woolf, 2004). Por otro lado, los factores que favorecen la muerte celular programada son de naturaleza variada. Entre ellos se pueden destacar citoquinas proinflamatorias, estrés oxidativo y efectores citotóxicos, así como daño irreversible en el material genético.

Vías de señalización en apoptosis

La apoptosis puede ser desencadenada por activación de las vías intrínseca y extrínseca. La alteración de alguno de estos caminos de señalización en los progenitores eritroides que ocurre en algunas condiciones patológicas se encuentra asociada a anemia (Testa, 2004).

La **vía intrínseca** de apoptosis involucra cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Las causas que pueden provocar dicho evento son de naturaleza variada, destacándose estrés oxidativo, radiación ionizante y alteración de la homeostasis del calcio, entre otras (Benn y Woolf, 2004; Donovan y Cotter, 2004). Esta vía de activación se caracteriza por una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial, acompañada por la liberación de moléculas desde dicha

organela (citocromo c, SMAC/DIABLO, *apoptosis-inducing factor* -AIF-) hacia el citosol, las cuales generan la activación de una cascada proteolítica (Benn y Woolf, 2004).

La familia de moléculas Bcl-2 (*B-cell leukaemia/lymphoma-2*) se encuentra conformada por miembros pro y antiapoptóticos, los cuales ejercen efectos opuestos sobre la integridad de la mitocondria. Mientras que los factores proapoptóticos (Bax, Bok, Box) afectan la permeabilidad de la mitocondria, sus antagonistas (Bcl-2, Bcl-X_L) preservan la integridad de dicha organela, impidiendo la liberación de proteínas solubles involucradas en la activación de la fase efectora (Benn y Woolf, 2004; Donovan y Cotter, 2004).

El mecanismo por el cual los factores de la familia Bcl-2 actúan sobre la integridad de la mitocondria se encuentra aún en discusión. Una de las vías propuestas para la inducción del proceso de muerte celular involucra la oligomerización de factores proapoptóticos como Bax, con el fin de facilitar la liberación del citocromo c. Este evento podría ser prevenido por Bcl-2 induciendo la inhibición de la oligomerización de Bax junto con el accionar de otros factores proapoptóticos (Donovan y Cotter, 2004).

En el **camino extrínseco**, las células son sensibles a estímulos apoptóticos por activación de receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia del factor de necrosis tumoral TNF, tales como TNFR1, TNFR2, FAS y TRAILR.

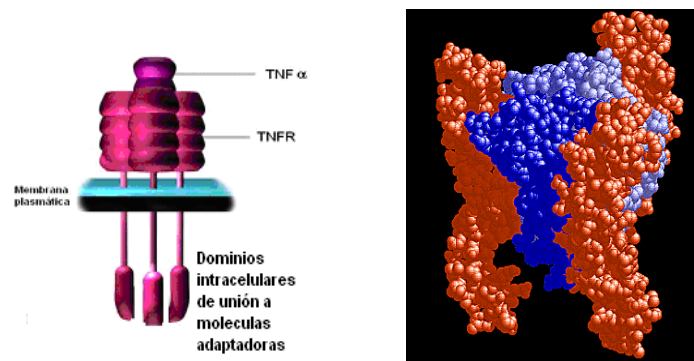


Figura 3: Representación gráfica de la estructura del receptor de TNF. A la derecha se muestra una imagen tridimensional de la molécula donde se pueden apreciar, al igual que en el esquema de la izquierda, la presencia de tres dominios transmembrana a través de los cuales, una vez unida la citoquina del lado extracelular, la señal es transmitida al interior de la célula por medio de la interacción de dichos dominios con moléculas adaptadoras intracelulares. Adaptada de <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/apoptosis/receptor.htm>

La estimulación de estos receptores conduce a la formación de un complejo proteico multimolecular llamado DISC (*death-inducing signaling complex*), formado por la asociación de moléculas adaptadoras a los dominios citoplasmáticos de los receptores

de muerte. Dichas moléculas adaptadoras, TRADD (*Tumor necrosis factor receptor associated death domain*) y FADD (*Fas-associated death domain*), reclutan a la procaspasa 8 (antiguamente llamada FLICE), la cual posee dominios de muerte en *tandem* (DEDs), para permitir su autoclivaje y consecuente activación.

FADD posee dominios DEDs, al igual que procaspasa 8, y es a través de dichos dominios que ambas proteínas interactúan para formar el DISC. Procaspasa 8 es clivada en tres pasos consecutivos para convertirse en caspasa 8 activada, a partir de lo cual se desencadena la cascada de caspasas (Kreuger *et al*, 2001). La activación de caspasa 8, iniciadora de apoptosis, activa la caspasa 3 ejecutora, la cual, a su vez, clivará a distintas proteínas, entre las que se encuentra PARP (*poly-adenosin ribose polymerase*), proteína nuclear que protege al ADN de su degradación (Peter, 2004).



Figura 4: Esquema de las moléculas FADD y procaspasa 8. FADD recluta procaspasa 8 interactuando a través de sus dominios DEDs al formarse el complejo DISC.

La activación de una de las vías de iniciación de apoptosis puede desencadenar la activación de la otra y, de esta manera, se amplifican los niveles de apoptosis como puede observarse en el esquema siguiente:

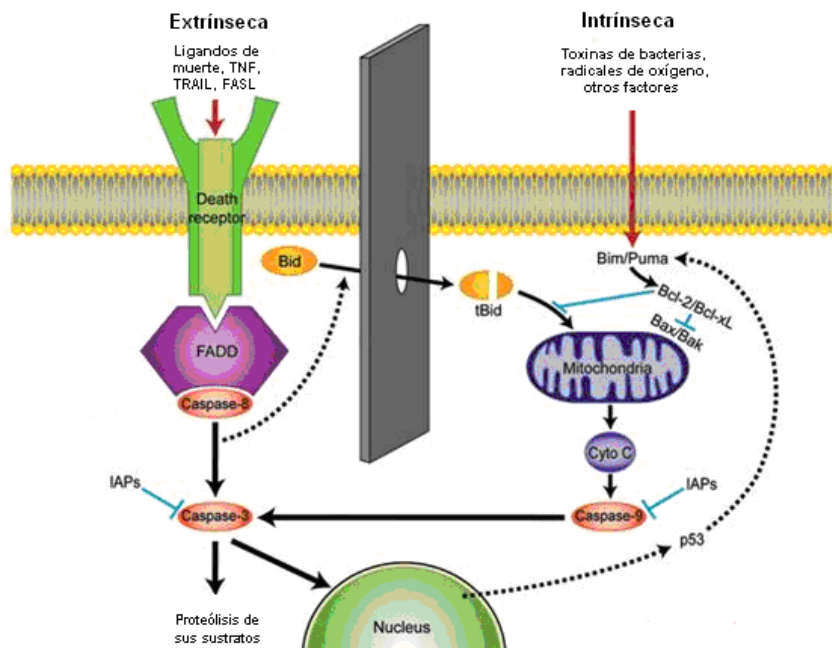


Figura 5: Esquema de las vías de activación extrínseca e intrínseca de apoptosis. En este esquema puede observarse cómo ambas vías se conectan dando lugar a la amplificación de la señal apoptótica. Adaptado de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v6n1/coto.html>

Inhibidores de apoptosis

La apoptosis se encuentra altamente regulada. Se conocen varios inhibidores de este proceso, los que actuarían interfiriendo algún paso de las vías de activación intrínseca o extrínseca.

Como fue mencionado anteriormente, existen miembros de la familia Bcl-2 que poseen un rol antiapoptótico (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w), ya que impiden la liberación y dimerización de factores inductores mitocondriales de apoptosis (vía intrínseca).

Se conoce una proteína denominada c-FLIP (*cellular FLICE inhibitory protein*) que posee homología estructural con la procaspasa 8 y ha sido asociada a funciones antiapoptóticas frente a la activación de la vía extrínseca.

c-FLIP posee dos variantes, c-FLIP_S (*short*), la cual sólo posee dos dominios N-terminal DEDs muy similares a los que posee caspasa 8 en sus prodominios, y c-FLIP_L (*long*), la cual posee idéntica longitud de DEDs en *tandem* a la procaspasa 8, pero la alteración de su dominio de caspasa la convierte en una enzima inactiva (Peter, 2004). c-FLIP_L tiene la estructura clásica de un inhibidor dominante negativo: posee su dominio de interacción proteína-proteína intacto, mientras que su dominio enzimático es inactivo.

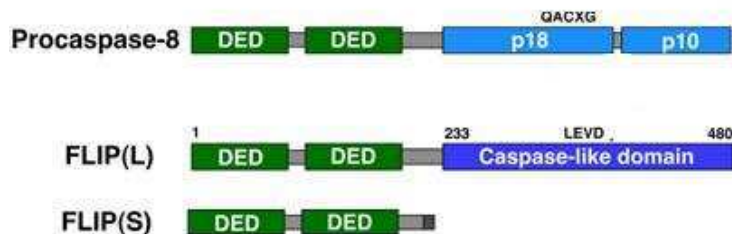


Figura 6: Esquema que muestra la similitud de secuencia de las isoformas de c-FLIP con procaspasa 8.

PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa) es una enzima que cataliza la fosforilación de fosfatidilinositol-4 fosfato y fosfoinositol-4,5 fosfato. La cascada de señalización que activa la fosforilación de los *targets* de dicha kinasa, regula la progresión del ciclo celular. Existen trabajos que sugieren un rol activo de PI3K en la regulación de la expresión del factor antiapoptótico NF- κ B, promoviendo así la supervivencia celular (Bahlmann *et al*, 2004; Panka *et al*, 2000).

III. ERIPTOSIS

Los eritrocitos maduros no tienen la capacidad de sintetizar proteínas o auto repararse, por lo cual su vida media es finita y puede ser aún más corta cuando el ambiente extracelular se convierte en hostil o cuando los glóbulos rojos (GR) pierden su habilidad para prevenir el posible daño generado por estímulos extracelulares. Su vida media limitada implica, como en otros tipos celulares, que exista un balance bien regulado entre la vida y la senescencia de los GR a pesar de su incapacidad de generar nuevas proteínas (Vittori *et al*, 2012; Bosman *et al*, 2005).

El envejecimiento o senescencia de los GR está asociado a encogimiento celular, cambios morfológicos, disminución de volumen, microvesiculación de la membrana plasmática, degradación de proteínas del citoesqueleto y pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de membrana con exposición de fosfatidilserina (Bratosin *et al*, 2001). Por la similitud de estos cambios con los que ocurren durante la apoptosis de células nucleadas y para distinguir ambos procesos se sugirió el término “eriptosis” para la apoptosis de eritrocitos (Lang *et al*, 2005).

Morfología del eritrocito

La morfología normal de disco bicóncavo del GR se debe a que posee un exceso de superficie en relación al volumen, lo que explica que la hemoglobina se halle más concentrada en la periferia que en la parte central de la célula. Este hecho facilita la difusión de oxígeno y dióxido de carbono hacia las células y maximiza la probabilidad de unión con las moléculas de hemoglobina.

La elevada relación entre superficie y volumen celular, junto con el contenido hemoglobínico y las propiedades viscoelásticas de la membrana, constituyen los tres factores principales que determinan la capacidad del eritrocito para deformarse, atravesar la microcirculación y resistir las turbulencias que se producen en los grandes vasos. La deformabilidad es una propiedad importante, decisiva para la supervivencia de los hematíes en la circulación sanguínea (Mohandas y Groner, 1989, Vives Corrons, 1992). Esto es particularmente relevante ya que el diámetro de los glóbulos rojos es de, aproximadamente, 8 μm , mientras que los capilares a través de los cuales deben circular tienen entre 2 y 3 μm de diámetro.

La membrana juega un rol crítico en la determinación de la forma y en la capacidad de deformación del eritrocito. Por eso, una modificación de la membrana tal que altere la morfología puede traducirse en un acortamiento de la vida media del GR.

Desde el punto de vista estructural, la membrana plasmática del eritrocito no difiere esencialmente de otras membranas biológicas y, en principio, está constituida por la bicapa lipídica, dos capas monomoleculares de lípidos unidos por sus extremos hidrofóbicos, en cuyo interior se encuentran incluidas numerosas proteínas integrales (Fig. 7).

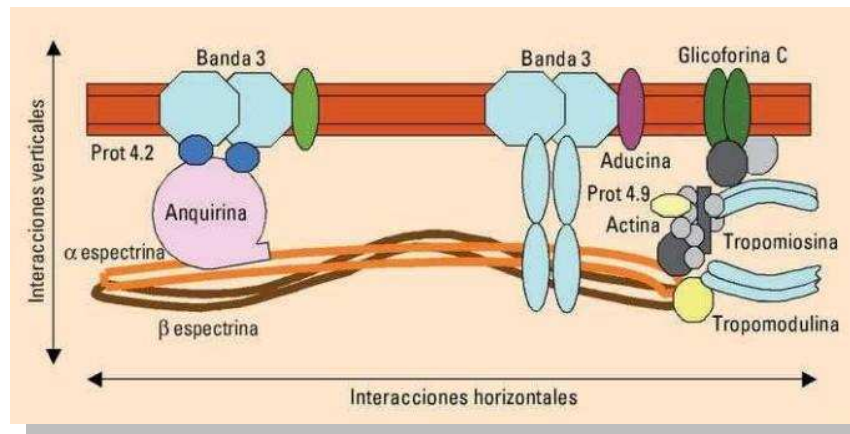


Figura 7: Proteínas de membrana eritrocitaria. Esquema representativo de la red bidimensional de proteínas transmembrana y citoplasmáticas que interaccionan entre sí otorgando particular flexibilidad y elasticidad al GR.

La proteína integral de la membrana más abundante es la proteína transportadora aniónica, que contribuye al intercambio de iones cloro y bicarbonato entre el interior y el exterior del eritrocito. Esta proteína, de elevada Mr (90 K), denominada banda 3 por su desplazamiento electroforético (Fairbanks *et al*, 1971), atraviesa la bicapa lipídica diez veces. La banda 3, junto con la glicoforina A, cumple una función importante en la fijación del citoesqueleto de la membrana a la bicapa lipídica. Otras proteínas integrales son las sialoglicoproteínas, entre las que se destacan las glicoforinas (alfa, beta, gamma, delta). Las cadenas de hidratos de carbono, que afloran hacia el exterior de la bicapa, contribuyen a determinar los sustratos antigénicos de los grupos sanguíneos.

Por otro lado, las proteínas periféricas, que constituyen el citoesqueleto, se encuentran en el citoplasma formando una red bidimensional en íntimo contacto con la hemoglobina y la bicapa lipídica. Esta red está formada por diferentes proteínas, tales como espectrina, tetrámero que establece unión entre sí para formar la base estructural, junto con actina, anquirina, proteína 4.1, proteína 4.2, proteína 4.9, aducina y el grupo de miosina y tropomiosina.

Las acuaporinas son proteínas transmembrana que están involucradas en el flujo activo de agua hacia y desde el interior celular, participando en el mantenimiento de la osmolaridad y volumen de las células. Se ha demostrado que los eritrocitos expresan acuaporina 1 en su membrana (Yang *et al*, 2001).

La relación funcional de las proteínas entre sí y con la bicapa lipídica se ha establecido a partir del modelo que considera la existencia de dos tipos de uniones proteicas: horizontales y verticales. Las uniones horizontales son las que se establecen entre las proteínas del esqueleto, mientras que las verticales son las que se establecen entre las proteínas del esqueleto y las proteínas integrales de membrana. Las uniones horizontales contribuyen a la estabilidad global del esqueleto y las verticales a fijar el esqueleto a la bicapa.

La bicapa lipídica, junto con las proteínas de transmembrana, aísla y regula en forma química el interior celular mientras que la red esquelética provee un soporte rígido y estabilidad a la interfase de la bicapa, aumentando, así, la capacidad del eritrocito para cambiar de forma (Mohandas y Chasis, 1993).

Metabolismo y función del eritrocito

El GR constituye un vehículo para la hemoglobina, que es la encargada de transportar oxígeno y dióxido de carbono en la sangre. La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno está modulada por la concentración de fosfatos, especialmente, por la del 2,3-difosfoglicerato, por la presión parcial de oxígeno, la temperatura y el pH del medio. La capacidad de la hemoglobina para enlazar oxígeno está relacionada con la presencia de cuatro grupos prostéticos hemo en la molécula, cada uno de los cuales porta un átomo de hierro. Los átomos de hierro en estado ferroso tienen seis enlaces de unión, cuatro para los nitrógenos pirrólicos del hemo, uno para el nitrógeno imidazólico de histidina de cada cadena globínica y uno que se une reversiblemente al oxígeno.

El eritrocito sufre cambios metabólicos graduales durante aproximadamente 120 días, al término de los cuales la célula es eliminada de circulación. Los eritrocitos senescentes tienen un área superficial más pequeña y mayor concentración media de hemoglobina celular, comparados con las células más jóvenes. Además, los eritrocitos envejecidos pierden ácido siálico de sus membranas, exponiendo una asialoglicoforina. Al reconocerse este antígeno senescente, se induce la síntesis de un anticuerpo. Tras la unión del autoanticuerpo con el antígeno, la célula senescente es

reconocida y eliminada de circulación por células del sistema retículo endotelial (Nelson y Davey, 1993).

Una vez que el eritrocito desaparece de circulación, la hemoglobina liberada por la lisis se combina con haptoglobina. Este complejo es captado por el sistema retículoendotelial, donde la hemoglobina es degradada en sus tres constituyentes, hierro, protoporfirina y globina. El hierro queda depositado y puede ser empleado nuevamente. Las cadenas polipeptídicas son degradadas e incorporadas a la reserva de aminoácidos del organismo. El anillo de protoporfirina se desdobla; ésta es convertida en bilirrubina y extraída del plasma por la célula hepática para su excreción por la bilis. Este sistema de degradación explica por qué el nivel de haptoglobina disminuye, generalmente, después de una crisis hemolítica.

Entre la formación y la destrucción de los eritrocitos en la sangre existe, normalmente, un estado de equilibrio, con lo que se mantiene de manera bastante constante la masa hemoglobínica en circulación. La anemia surge cuando un aumento en la eliminación de GR no puede ser compensado por un aumento de la producción, cuando disminuye la oferta de hematíes o la síntesis de hemoglobina, o cuando los dos procesos ocurren a la vez. Cuando se desarrolla anemia, la hipoxia resultante de los tejidos induce la producción de eritropoyetina, estimulándose la producción de eritroblastos que conduce a un mayor número de eritrocitos en circulación. Para determinar los mecanismos de una anemia, a menudo es necesario evaluar el grado de eritropoyesis eficaz (producción y liberación de hematíes a circulación), eritropoyesis ineficaz y la destrucción de los eritrocitos.

Mecanismos de eriptosis

Este proceso de eriptosis puede ser desencadenado por diversos factores que modifican la homeostasis e inducen la muerte prematura de los GR aumentando su velocidad de *clearance* de la sangre: *shock* osmótico (Kempe *et al*, 2007), apertura de canales catiónicos (Bratosin *et al*, 2001), sepsis (Kempe *et al*, 2005), deficiencia de hierro (Niemoeller *et al* 2006).

En cuanto a los mecanismos de eriptosis, existe evidencia de una rápida inducción por influjo de Ca^{2+} (Bratosin *et al*, 2001; Myssina *et al*, 2003; Lang *et al*, 2005; Lang *et al*, 2006) y prevención por inhibidores de cisteína-proteasas (Bratosin *et al*, 2001; Lang *et al*, 2006). Bajo determinados estímulos se detectó la formación de ceramida en la superficie celular (Niemoeller *et al* 2006; Kempe *et al*, 2007) y la participación de calpaína, pero no estarían involucradas en el proceso las caspasas, a pesar de la

presencia de procaspasa 3 y 8 (Lang *et al*, 2006). La proteína tirosina fosfatasa 1 B (PTP 1B), se encontró asociada a banda 3, que es la proteína cuantitativamente más importante de la membrana del eritrocito y fundamental para el mantenimiento de la forma discoide. Se ha sugerido que la regulación negativa sobre la fosforilación de banda 3 que ejerce PTP1B cumpliría un rol importante en la formación de vesículas como mecanismo de senescencia de eritrocitos humanos (Zipser y Kosower, 1996; Minetti *et al*, 2004).

Conocer los mecanismos por los cuales se desencadenaría la eritosis es importante no sólo por su asociación con procesos de anemia sino porque permitiría mejorar las condiciones de conservación en los bancos de sangre aumentando la viabilidad de los eritrocitos almacenados (Bratosin *et al.*, 2002).

IV. INTERFERENCIA DE MECANISMOS INFLAMATORIOS EN LA ERITROPOYESIS

Los procesos inflamatorios, frecuentemente asociados a anemia de la enfermedad crónica (*anemia of chronic disease*, ACD), constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad.

Se ha propuesto que la producción incrementada de citoquinas inflamatorias en médula ósea y otros órganos de pacientes con ACD (insuficiencia renal, artritis reumatoidea, cáncer) podría ejercer efectos directos o indirectos sobre las células eritroides. Las citoquinas mediadoras del proceso inflamatorio podrían cumplir un rol en la inhibición del efecto antiapoptótico de la rhuEpo y, como consecuencia, ser responsables de la resistencia al tratamiento con la hormona que presentan algunos pacientes (Stenvinkel, 2001). Aunque se desconocen los mecanismos involucrados, numerosos ensayos clínicos han documentado la relación ACD-inflamación-eritropoyetina recombinante (rhuEpo) (Macdougall, 1995; Jongen *et al*, 1997; Goicoechea *et al*, 1998; Allen *et al*, 1999; Pertosa *et al*, 2000; Koury, 2002; Papadaki *et al*, 2002). Por otra parte, el efecto proapoptótico de las citoquinas podría ser contrabalanceado por la acción antiapoptótica de Epo (Koury, 2002; Elliot *et al*, 2003). Esta hipótesis se basa en que los mecanismos mediados por Epo y por citoquinas involucran factores comunes, algunos de los cuales, a su vez, regulan tanto la eritropoyesis como la respuesta inflamatoria (Zhang *et al*, 1998; Krebs y Hilton, 2000).

Citoquinas inflamatorias

Actualmente, existe evidencia que adjudica a las citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , un rol causal en la inhibición de la eritropoyesis (Papadaki *et al*, 2002), aunque los mecanismos de su acción bajo distintos estadios de diferenciación celular no son bien conocidos. Se ha observado que células progenitoras eritroides CFU-E y BFU-E, extraídas de médula ósea de pacientes con ACD, formaban un bajo número de colonias en cultivo respecto de aquellas células extraídas de médula ósea de individuos sanos (Allen *et al*, 1999). Los niveles de inhibición de formación de colonias de células eritroides en dichos pacientes se correlacionaban con los niveles de TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) cuantificados en plasma, es decir, cuanto mayor eran los niveles de TNF- α encontrados mayor era la inhibición.

Otra investigación demostró que células eritroides extraídas de médula ósea de dadores sanos, al ser expuestas en placas de cultivo con citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , también presentaban inhibición de crecimiento (Rusten y Jacobsen, 1995). Además, la anemia de pacientes con artritis reumatoidea fue asociada con un aumento de apoptosis de progenitores eritroides, signos que revirtieron por tratamiento con anti-TNF- α (MacDougall, 1995).

Estas asociaciones son probables si se tiene en cuenta que el receptor para Epo es un miembro de la familia de receptores de citoquinas y que la activación de éstos por la unión del ligando específico induce señales intracelulares semejantes. De hecho, el NF- κ B estaría involucrado tanto en el proceso inflamatorio como en la eritropoyesis. En efecto, este factor, rápidamente activado por condiciones de estrés celular, es un activador transcripcional de TNF- α e IL-1 β y por otra parte, se observó que ejercería una acción regulatoria sobre genes involucrados en el proceso eritropoyético de células de la línea eritroide humana TF-1 (Zhang *et al*, 1998).

TNF- α es una citoquina de la superfamilia TNF que tiene la capacidad de inducir tanto apoptosis como supervivencia celular dependiendo de factores del entorno y de señales reguladoras que experimenta la célula en diferentes situaciones. Dicha citoquina puede unirse a dos receptores de membrana, TNFR1 y TNFR2. La unión a ellos inicia la formación del complejo de muerte DISC por asociación a las moléculas TRADD y/o FADD y consecuente activación de procaspasa 8. En contraste, la unión de TNF- α a su receptor también puede activar diferentes kinasas que inducirían supervivencia celular vía NF- κ B.

IL-1 β actúa a través de receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas (Goldsby *et al*, 2000). Su función como inductora de apoptosis no es tan conocida como la de TNF- α , sin embargo existen evidencias que avalarían su rol como inductor de apoptosis (Shakibaei *et al*, 2007).

Especies reactivas de oxígeno y defensas antioxidantes

Durante un proceso inflamatorio crónico, no solo se encuentran elevados los niveles de citoquinas producidas por la activación del sistema retículo endotelial, sino también existe un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) las cuales pueden generar radicales libres produciendo importantes daños celulares.

Los radicales libres son moléculas en cuya última órbita existe un electrón impar desapareado, inestable, altamente reactivo que puede interaccionar rápidamente con otras moléculas. Estos compuestos tienen una vida media muy corta, por lo que su acción dependerá de la cercanía a otras moléculas con las que pueda reaccionar. Están implicados en muchas funciones celulares y son un componente común de los organismos vivos, se producen en diferentes sitios celulares, como mitocondria, membranas o citosol. Pueden aumentar su concentración endógena en situaciones de estrés o acumularse por acción de factores exógenos ambientales como la contaminación, humo de cigarrillo o rayos ultravioletas.

Las ROS o RNS se forman por reducciones univalentes sucesivas y están involucradas en procesos fisiológicos y patológicos como el cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas o degenerativas. Entre las fuentes de producción endógena de ROS y ERN, la cadena respiratoria es la principal. Otro factor importante es la presencia de ciertos metales como el hierro, donde a través de la reacción de Fenton el peróxido de hidrógeno en medio ácido puede reaccionar con el metal generando una especie reactiva.

Cuando por la reacción de ROS o RNS con moléculas se altera la homeostasis óxido-reducción se produce daño celular y se presenta un estado de estrés oxidativo. El daño a las células puede darse a nivel de proteínas, ácidos nucleicos o lípidos.

Para mantener el balance óxido-reducción molecular en un ambiente donde se producen constantemente especies reactivas, existen compuestos antioxidantes que se encargan de contrarrestar la acción pro oxidante de las mismas. Las defensas antioxidantes pueden ser enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa, glutathion

reductasa), no enzimáticas (glutathion reducido) o inorgánicas (algunos metales).

Los eritrocitos están expuestos continuamente a la formación de especies reactivas debido a la alta tensión de oxígeno que encuentran al circular por las arterias y al contenido de hierro que se encuentra en los grupos hemo de la hemoglobina. Por estos motivos, los eritrocitos tienen diferentes fuentes enzimáticas y no enzimáticas antioxidantes que le permiten reducir la producción de ROS o generar intermediarios menos reactivos. Sin embargo, por su incapacidad para sintetizar proteínas, la capacidad para amortiguar el efecto de los radicales libres es limitada.

V. MODELO DE TOXICIDAD DE ALUMINIO SOBRE ERITROCITOS

Biodisponibilidad del metal

El aluminio es un elemento ubicuo usado extensamente en la vida contemporánea debido a su elevada conductividad térmica y eléctrica, baja densidad y gran resistencia a la corrosión. A pesar de su amplia distribución en el medio, la evolución no le ha conferido utilidad conocida en los sistemas biológicos. Por el contrario, son cada vez más numerosas las referencias a los efectos tóxicos que han sido demostrados en plantas, animales acuáticos y animales de experimentación, y de los que, bajo ciertas condiciones clínicas, no están exentos los seres humanos.

El aluminio es un metal perteneciente al grupo IIIA de la Tabla Periódica, que presenta un estado de oxidación +3. Además de formar compuestos con materia orgánica, el aluminio se encuentra en el medio en forma de silicatos, óxidos e hidróxidos en conjunto con otros metales. No se lo encuentra como metal libre por su elevada reactividad, ya que la exposición al agua, al oxígeno o a otros oxidantes conduce a la formación de una capa superficial de óxido de aluminio que confiere al metal una gran resistencia a la corrosión.

En cuanto a la interacción del aluminio con sistemas biológicos, la misma resulta de tal complejidad que es una de las razones que han dificultado las investigaciones. La absorción, excreción y depósito en los tejidos depende de las propiedades de los complejos que forme el ion aluminio con ligandos biológicos. Desafortunadamente, los intentos por describir la cinética de la formación de estos complejos se han visto, generalmente, frustrados por la tendencia a hidrolizarse que presentan ambos, el ion libre Al^{3+} y los complejos de aluminio.

Fuentes de exposición

Los procesos naturales y las actividades humanas (minería y agricultura) agregan continuamente partículas de aluminio al ambiente. La concentración del metal en el agua natural generalmente es baja, sin embargo, la acidificación del suelo, en particular por precipitaciones ácidas, libera aluminio disolviéndolo. De esta manera, aumenta su disponibilidad en las corrientes de agua (Harris *et al*, 1996).

Otra fuente de exposición es la dietaria. Se produce principalmente a través de la ingestión de agua y alimentos. Varios tipos de vegetales contienen aluminio, ya que crecen en suelos en los cuales la concentración del metal es elevada. Cuando el pH del suelo es menor que 5,0, el aluminio se solubiliza y es absorbido por las raíces de las plantas (Exley y Birchall, 1992).

Por otra parte, se ha reportado que los aditivos agregados a los alimentos pueden contribuir con cantidades que superan 1 mg Al/ración (Pennington y Schoen, 1995). Las sales de aluminio no sólo son agregadas durante el proceso de elaboración industrial de algunas frutas, quesos y cerveza sino que constituyen, además, componentes habituales de los polvos de hornear, aditivos y conservantes alimentarios. El proceso de potabilización del agua incluye una etapa de clarificación química con aluminato de sodio, aluminato de amonio o sulfato de aluminio (Busler, 1979). Con estos compuestos se promueve la precipitación de hidróxido de aluminio con adsorción de la turbiedad, mientras que el exceso de ion Al^{3+} permanece en solución (Hem, 1986). El agua de la red urbana puede contener trazas del catión en estado libre y en forma de distintos complejos orgánicos.

Otra fuente de exposición es el empleo cotidiano de vajilla, utensilios, recipientes y folios de aluminio. La mayoría de los alimentos, afortunadamente, no disuelve cantidades importantes del catión aunque el ataque químico a tales recipientes y envoltorios varía con las condiciones de pH, temperatura y presencia de otras sustancias. La biodisponibilidad del metal por el uso de recipientes de aluminio en la cocina no ha sido muy estudiada, aunque se sabe que tanto el calor suministrado durante la cocción, como la adición de jugos ácidos y soluciones salinas, aumentan considerablemente la movilización del metal de los elementos que lo contienen (Rodríguez Suárez *et al*, 1986; Nagy y Jobst, 1994).

La encefalopatía dialítica fue una de las primeras observaciones que hicieron sospechar el desarrollo de alteraciones neurológicas a causa de la exposición a aluminio (Alfrey *et al*, 1976). La prescripción, a pacientes hemodializados, de medicamentos conteniendo hidróxido de aluminio como complejante de fosfatos para

controlar la hiperfosfatemia (Wills y Savory, 1983; de Broe *et al*, 1988; Sanai *et al*, 1991; Salusky *et al*, 1991), acrecentaba la acumulación del metal incorporado directamente en el torrente sanguíneo a raíz de su presencia como contaminante del líquido de diálisis. A pesar de que la neurotoxicidad causada por aluminio ha virtualmente desaparecido en la población en diálisis, por el tratamiento previo del agua (Alfrey, 1994), aún se reportan efectos tóxicos causados por contaminación del agua o de las cañerías con el metal (Berend *et al*, 2001).

Otros pacientes que también están expuestos a aluminio son los bebés nacidos en pretérmino e individuos con quemaduras severas, los cuales se encuentran sometidos a nutrición parenteral, ya que el aluminio es un bien conocido contaminante de soluciones intravenosas (Nayak, 2002; Burrell y Exley, 2010; Bohrer *et al*, 2010).

Las sales de aluminio son un constituyente habitual de productos cosméticos y antitranspirantes. Si bien la absorción del metal por la piel es muy baja, deben considerarse otras rutas: inhalación e ingestión en las fórmulas en aerosol. En particular, la ruta nasal-olfativa puede resultar muy significativa, ya que transportaría al aluminio directamente al cerebro, eludiendo las barreras hematoencefálica y renal (Flarend, 2001).

Debe llamarse la atención sobre una de las mayores fuentes de exposición a aluminio que, generalmente, pasa inadvertida por desconocimiento. Numerosos individuos están expuestos al metal por la ingestión regular de drogas sin prescripción, tales como antiácidos, aspirinas tamponadas o suplementos de calcio, la que puede aportar, diariamente, entre 10 y 100 mg de aluminio (Flarend, 2001).

La combinación de la amplia disponibilidad del metal con sus propiedades mecánicas y eléctricas únicas, aseguran a la química del aluminio un futuro brillante y en constante expansión. Ello implica que se deberá considerar, también, una mayor exposición ambiental (Atwood y Yearwood, 2000).

Aluminio y Anemia

La relación entre la acumulación de aluminio en determinado órgano y su toxicidad es compleja. En un principio, el aluminio fue sospechado como agente agravante de la anemia de la enfermedad renal al observarse una intensificación de la anemia normocítica preexistente pero con reservas normales de hierro (Wills y Savory, 1983; Eschbach y Adamson, 1985; Eschbach, 1989). El tratamiento de pacientes

“aluminizados” con el agente quelante de aluminio desferrioxamina condujo a un significativo aumento de la concentración de hemoglobina, por lo que se adjudicó al aluminio el rol de un potente inhibidor de la síntesis de hemoglobina (Altmann *et al*, 1988).

La modificación de los parámetros hematológicos en los individuos expuestos a aluminio por la terapéutica dialítica, sin embargo, sólo constituyó una evidencia indirecta de la toxicidad adjudicada al metal, debido a la multiplicidad de factores que afectan la eritropoyesis en enfermos renales. La asociación entre aluminio y anemia pudo ser establecida más claramente en ensayos experimentales. No sólo se estudiaron ratas urémicas (Kaiser *et al*, 1984; Drüeke *et al*, 1986; Nesse *et al*, 1997), sino, también, animales con función renal intacta con diversa exposición al metal. Se demostró, así, que la exposición crónica al catión constituye un riesgo de intoxicación incluso en ausencia de disfunción renal. La anemia fue inducida mediante distintos diseños experimentales que incluían la administración de compuestos de aluminio a través de diversas rutas (Kaiser *et al*, 1984; Drüeke *et al*, 1986; Garbossa *et al*, 1996 y 1998a; Vittori *et al*, 1999).

Varios mecanismos han sido postulados como responsables de la inducción de anemia por exposición a aluminio. Hasta el presente no se ha presentado evidencia de alteración en la producción de cadenas de globina, pero existe bibliografía sobre posible bloqueo de la síntesis de hemo.

Las similitudes químicas entre Fe^{3+} y Al^{3+} sugieren que ambos elementos podrían producir efectos metabólicos similares. Se ha comprobado que el receptor para transferrina, localizado en la membrana celular, no distingue entre la proteína que transporta aluminio y la que lleva unido el ligando fisiológico hierro. A ese nivel, se establece una competencia para la incorporación de ambos metales. Por ello, la célula sufre una adaptación aumentando la captación celular del metal esencial por vías no dependientes de transferrina (Pérez *et al*, 1999; 2001 y 2002).

Sobre la base de las experiencias realizadas con animales, se puede asumir que el aluminio es un factor exógeno responsable del desarrollo de signos de anemia. Además, parecería que la presencia del tóxico puede afectar diferentes estadios de las células en sus procesos de diferenciación y maduración eritroide. Sin embargo, falta información más concreta acerca de las características de la anemia desarrollada, de las alteraciones a que están expuestas las células con distintos grados de diferenciación, de los posibles mecanismos involucrados y de su interrelación para

poder interpretar los efectos causados sobre el sistema eritropoyético como consecuencia de la exposición a aluminio.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que la exposición crónica al aluminio no solo afecta a los progenitores eritroides sino también a los eritrocitos maduros. Ensayos *in vitro* e *in vivo* mostraron inhibición del crecimiento de CFU-E, así como alteraciones morfológicas en eritrocitos maduros (Vittori *et al*, 1999; Vittori *et al*, 2002). La incubación de eritrocitos *in vitro* con aluminio indujo diferentes alteraciones morfológicas y trazas del metal fueron detectadas en el citoplasma o en la membrana plasmática (Vittori *et al*, 2002) de los GR con anomalías. Estos resultados, junto con los observados en ratas sin disfunción renal expuestas de forma crónica al aluminio, sugieren que este metal podría acelerar la progresión de eritropatosis presentando cambios celulares similares a los de una célula nucleada en apoptosis (Vittori *et al*, 1999; Daugas *et al*, 2001).

OBJETIVOS

OBJETIVO 1

Justificación:

Los procesos inflamatorios, frecuentemente asociados a anemia de enfermedades crónicas, podrían cumplir un rol en la inhibición de la eritropoyesis y la resistencia al tratamiento con eritropoyetina humana recombinante. La homeostasis de la eritropoyesis requiere un balance entre proliferación, diferenciación y apoptosis celular. La existencia de señales intracelulares comunes entre los procesos que regulan la eritropoyesis y la respuesta inflamatoria sugiere que la desregulación de un sistema podría explicar la disminución de la función del otro.

El proceso fisiológico de eritropoyesis implica que las células progenitoras eritroides se encuentran sometidas a un desarrollo permanente caracterizado por proliferación y diferenciación celular. Estas células muestran diferentes características morfológicas y metabólicas en distintos estadios de diferenciación celular. Por otra parte, cuando existe un proceso inflamatorio, citoquinas como TNF- α e IL-1 β , son secretadas por células circundantes –linfocitos, neutrófilos, monocitos– y también se incrementan, en circulación, las concentraciones de peróxido de hidrógeno y nitritos, entre otros compuestos oxidantes.

Dado que el balance entre proliferación y muerte celular es imprescindible para mantener una eritropoyesis efectiva, se postula que la sensibilidad de las células a las citoquinas puede variar según su nivel de diferenciación.

Objetivo:

✚ “Determinar los cambios en la sensibilidad de células eritroides a citoquinas proinflamatorias debido al proceso de diferenciación, utilizando la línea celular K562”.

Objetivos específicos:

- ✓ Evaluar el efecto apoptótico de TNF- α e IL-1 β sobre células diferenciadas e indiferenciadas.
- ✓ Caracterizar las señales intracelulares mediadas por el proceso de diferenciación que podrían estar involucradas en la sensibilidad a las citoquinas proinflamatorias.

OBJETIVO 2

Justificación:

Los eritrocitos maduros no tienen la capacidad de sintetizar proteínas o auto repararse, por lo cual su vida media es finita y puede ser aún más corta cuando el ambiente extracelular se convierte en hostil o cuando las células pierden su habilidad para contrarrestar el posible daño generado por estímulos extracelulares. Debido a que este proceso de muerte prematura eritrocitaria comparte varias características con las desarrolladas por células nucleadas durante la apoptosis, se ha propuesto el término de eriptosis para este proceso.

El conocimiento de los mecanismos por los cuales se desencadena la eriptosis es importante no sólo por su asociación con procesos de anemia sino porque permitiría mejorar las condiciones de conservación en los bancos de sangre aumentando la viabilidad de los eritrocitos almacenados (Bratosin *et al*, 2002).

Objetivo:

✚ “Caracterizar el proceso de autodestrucción prematura de eritrocitos (eriptosis) e identificar mecanismos de producción e inhibición del proceso”.

Objetivos específicos:

- ✓ Identificar signos de eriptosis, tales como:
 - Desarrollo de alteraciones de la membrana celular.
 - Rol del calcio intracelular en la traslocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática.
 - Participación de kinasas y fosfatasas en el desarrollo de eriptosis.
- ✓ Analizar el rol de citoquinas proinflamatorias y agentes prooxidantes como posibles inductores de eriptosis.
- ✓ Estudiar los mecanismos involucrados en el proceso de eriptosis en presencia de dos condiciones diferentes: ingreso masivo de calcio a la célula y presencia de agentes pro oxidantes.

OBJETIVO 3

Justificación:

La eritropoyetina (Epo) es una hormona conocida por su función estimulante de la proliferación e inducción de diferenciación de progenitores eritroides para la producción de

glóbulos rojos. Sin embargo, la evidencia actual le atribuye un importante rol antiapoptótico y de protección tisular.

En nuestro laboratorio se demostró que la Epo previene la muerte programada de células K562 (Vittori *et al*, 2005) y posee un efecto protector sobre la línea celular de origen neuronal SH-SY5Y (Pregi *et al*, 2006; Wenker *et al*, 2007) frente a la inducción de apoptosis. Menos conocidas son las propiedades antiinflamatoria o antioxidante de la Epo.

Objetivo:

✚ “Determinar la acción de la Epo sobre células en etapa de diferenciación eritroide y sobre eritrocitos maduros expuestos *in vitro* a un microambiente hostil”.

Objetivos específicos:

- ✓ Investigar el efecto antiapoptótico de la Epo en los tratamientos con citoquinas.
- ✓ Determinar una posible vía de señalización a través de la cual la hormona ejerce su acción.
- ✓ Estudiar si la presencia de Epo en los cultivos puede impedir el desarrollo de eritrosis inducido por nitrito de sodio y peróxido de hidrógeno o por entrada masiva de calcio.
- ✓ Determinar los posibles mecanismos involucrados.

OBJETIVO 4

Justificación:

El aluminio (Al) es el tercer elemento más abundante en la naturaleza y debido a su ubicuidad, la exposición humana al metal es prácticamente cotidiana. Este compuesto está presente en el agua y es ampliamente utilizado en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética. En la actualidad se reconocen dos poblaciones particularmente expuestas al metal: individuos con enfermedades renales crónicas y neonatos prematuros. Los pacientes sometidos a diálisis pueden sufrir sobrecarga de Al debido a la presencia del mismo en los líquidos utilizados para dicho proceso, así como también debido a los medicamentos utilizados en el tratamiento de las enfermedades renales crónicas. En el caso de los bebés prematuros, la sobrecarga del metal estaría dada por la presencia del mismo en las fórmulas para alimentación por vía parenteral.

Trabajos experimentales *in vitro* e *in vivo* de nuestro laboratorio mostraron que el Al, además de inhibir el desarrollo de progenitores eritroides, induce alteraciones morfológicas

eritrocitarias. Si bien se demostró el efecto directo del metal sobre los glóbulos rojos, aún no ha sido dilucidado el mecanismo de acción.

Objetivo:

✚ “Determinar si los compuestos de Al constituyen agentes proeriptóticos”.

Objetivos específicos:

- ✓ Estudiar si el Al induce eriptosis de eritrocitos humanos expuestos al metal por períodos prolongados.
- ✓ Investigar el mecanismo de acción del Al sobre los glóbulos rojos.
- ✓ Determinar si la presencia de Epo es capaz de prevenir la acción del Al.

MATERIALES Y MÉTODOS

EQUIPOS

- + Cámara digital (Kodak DC 120)
- + Centrífuga refrigerada Hermle Z323K
- + Citómetro de flujo FACS AREA (BD) (Servicio de Citometría del Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA).
- + Cuba electroforética Liberty 2 (Biokey American Instruments, Inc. USA) para fragmentos de PCR.
- + Cuba electroforética (Miniprotean III, Bio-Rad) para SDS-PAGE y electrotransferencia.
- + Dark Box II (FujiFilm)
- + Equipo para la obtención de agua ultra-pura Millipore Simplicity 185
- + Espectrofotómetro Beckman DB
- + Espectrómetro de absorción atómica Shimadzu AA-6501 (Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Fisicoquímica, FCEN, UBA).
- + Estufa de cultivo Revco RMI 3000S-7VBA
- + Fuente de poder (EPS 600, Pharmacia).
- + Lector de microplacas BioRad Modelo 680
- + Microscopio Nikon XS100
- + Microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert 135
- + Microscopio electrónico de barrido Zeiss Supra 40 (Servicio del Centro de Microscopía Avanzada, FCEN, UBA).
- + Termociclador Eppendorf (Mastercycler gradient) para RT-PCR
- + Termociclador BioRad (Opticon Monitor) para *Real Time*-PCR
- + Transiluminador (Hoefler Macro Vue UV-20)

REACTIVOS Y ANTICUERPOS**1. Calidad de agua y reactivos**

Las soluciones, reactivos y medios de cultivo fueron preparados con agua deionizada de calidad ultrapura, con resistividad específica de 18 M Ω .

Todas las sales, ácidos y solventes utilizados fueron de calidad analítica (Merck, Mallinckrodt o Sigma-Aldrich).

2. Reactivos específicos**+ Amersham - GE:**

- ✓ Ready To Go T-Primed First-Strand Kit
- ✓ dNTPs
- ✓ Dietilpirocarbonato (DEPC)
- ✓ ECL, Kit para revelado por quimioluminiscencia

+ BD Biosciences:

- ✓ IL-1 β recombinante humana
- ✓ Anexina-FITC
- ✓ Proteína A agarosa
- ✓ Reactivo Cytotfix/Cytoperm
- ✓ Reactivo Perm/Wash
- ✓ Proteína recombinante humana TNF- α

+ Biodynamics S.R.L:

- ✓ Agarosa
- ✓ Marcador de número de pares de base

- ✚ **Bioser, GENSA:**
 - ✓ Suero Fetal Bovino (SFB)
 - ✓ Penicilina
 - ✓ Estreptomina

- ✚ **Calbiochem:**
 - ✓ Ionóforo de calcio A23187
 - ✓ Calpeptina
 - ✓ Ly 294002

- ✚ **Fermentas:**
 - ✓ Dual color protein *buffer*
 - ✓ Marcador de peso molecular preteñido para geles de SDS-poliacrilamida

- ✚ **GIBCO BRL:**
 - ✓ Trizol
 - ✓ Tryple Select
 - ✓ Medio 199

- ✚ **Invitrogen-Life Technologies:**
 - ✓ Bromuro de etidio
 - ✓ DMSO, dimetilsulfóxido
 - ✓ FLUO 4-AM
 - ✓ Primers
 - ✓ Taq polimerasa
 - ✓ BODIPY 665/676
 - ✓ cellTrace CFSE cell proliferation kit

- ✚ **Santa Cruz :**
 - ✓ CinnGel 2ME

- ✚ **Sigma Chemical Co.:**
 - ✓ Medio RPMI 1640
 - ✓ DAF; 2,7 diaminofluoreno
 - ✓ DCHF-DA; 2',7' dicloro fluorescína diacetato
 - ✓ Mercury Orange
 - ✓ 5'Eosina maleimida
 - ✓ 12-miristato13-acetato de forbol (PMA)

- ✚ **ICN Biomedicals:**
 - ✓ Paraformaldehído (PFA)

- ✚ **WIENER-Lab:**
 - ✓ Kit para la detección de actividad de fosfatasas ALP 405 AA líquida

- ✚ **ZELLTEK S.A.**
 - ✓ Eritropoyetina recombinante humana purificada (rhEpo)

3. Anticuerpos

+ BD Biosciences:

- ✓ Anti glicoforina A humana monoclonal conjugado con R-ficoeritrina (RPE)
- ✓ Anti tirosina fosforilada
- ✓ Anti PARP monoclonal
- ✓ Control de isotipo conjugado con ficoeritrina (PE)

+ Amersham – GE:

- ✓ Anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP)
- ✓ Anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (HRP)

+ Invitrogen-Life Technologies:

- ✓ Anti IgG de conejo conjugado con Alexa-Fluor 488

+ Santa Cruz Biotechnology Inc:

- ✓ Anti PTP1B humano monoclonal (clon FG6-1G)
- ✓ Anti receptor de Eritropoyetina policlonal (M-20)
- ✓ Anti CD14 humano monoclonal conjugado con FITC

+ Sigma-Chemical Co.:

- ✓ Anti Banda 3 humana monoclonal

+ Serotec:

- ✓ Controles de isotipo: IgG1 de ratón para PH01

H₂O-DEPC

Agua conteniendo dietil pirocarbonato (DEPC, compuesto que destruye ARNasas) 0,1% (v/v).

Descarte del material biológico y residuos peligrosos

El material que estuvo en contacto con el colorante de Hoechst y los geles conteniendo bromuro de etidio fueron inactivados bajo luz UV durante 1 h y, posteriormente, descartados como residuos peligrosos a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEN.

El material de descarte (plástico, guantes, geles de poliacrilamida) fue eliminado como residuo peligroso a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEN. De la misma forma fueron descartadas las soluciones de DAF, Folin y las soluciones conteniendo solventes orgánicos o ácidos como metanol, ácido acético entre otros.

Esterilización de materiales y soluciones

El material fue esterilizado por calor seco (160-170 °C, 90 min), por calor húmedo (121 °C, 1 atm, 30 min) o por radiación gamma, según las características del mismo.

Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por pasaje a través de membrana de acetato de celulosa, con poros de 0,22 μm (Millipore), utilizando presión positiva de nitrógeno.

PROTOCOLOS

I. CRIOPRESERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

I.a. Congelamiento

Para preservar las células por un período prolongado se requieren temperaturas extremadamente bajas. Estas temperaturas hacen que el metabolismo celular disminuya significativamente. El principal problema que presenta el congelamiento celular es la formación de cristales en el citoplasma, los que tienden a romper la membrana celular. Para evitar este inconveniente, se han utilizado diferentes agentes químicos –glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO), polivinilpirrolidona– que hacen que la temperatura intracelular descienda de manera gradual.

La suspensión celular a ser congelada (10^6 - 10^7 cél/ml) fue centrifugada a 350 *g* durante 10 min. La mezcla congelante (medio de cultivo: SFB:DMSO; 45:45:10; v/v/v) fue agregada al *pellet*. La suspensión celular fue rápidamente homogeneizada y trasvasada a un criotubo que fue colocado en un contenedor para frisar “*Mr Frosty*” (Nalgene). Este recipiente colocado a -70°C permite que la temperatura disminuya aproximadamente 1-2 $^{\circ}\text{C}$ por min. Cuando el sistema alcanzó dicha temperatura, los criotubos fueron almacenados en un tanque con nitrógeno líquido a -174°C (Hay, 1992).

I.b. Descongelamiento

Para descongelar las células, el criotubo fue rápidamente sumergido en baño a 37 $^{\circ}\text{C}$. Una vez descongelada, la suspensión fue trasvasada a un tubo de centrífuga al que se agregó la mezcla apropiada de medio de cultivo, SFB y antibióticos. Por último, después de centrifugar 10 min a 200 *g*, se removió el sobrenadante y se agregó medio fresco.

II. CULTIVO CELULAR

II.a. Línea celular eritroleucémica humana K562

Las células fueron adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea fue establecida por Lozzio & Lozzio (1975) a partir de la pleura de una paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica terminal. A través del estudio de las proteínas de membrana se demostraron características eritroleucémicas de estas células. Expresan REpo en membrana (Fraser *et al*, 1988; Anagnostou *et al*, 1994), y poseen capacidad de sintetizar hemoglobina por estímulo de distintos inductores (Pérez *et al*, 1999).

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 pH $7,0 \pm 0,3$, conteniendo L-glutamina 2 mM, HEPES 25 mM y adicionado con NaHCO_3 26,8 mM, SFB 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos fueron mantenidos a una densidad de $1,5 \times 10^5$ cél/ml en estufa a 37 °C en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO_2 (Vittori *et al*, 2005). El medio fue renovado cada 3-4 días. Para ello, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 350 *g* durante 10 min a 25 °C y resuspendidas en medio de cultivo.

II.b. Línea celular promonocítica humana THP-1

La línea celular THP-1 procede de un paciente con leucemia monocítica aguda. Estas células expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3b. Sin embargo, no expresan inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas. Están caracterizadas por su capacidad fagocítica y por la producción de lisozima y esterasa, además de por su capacidad para restaurar la respuesta de los linfocitos T a la concavalina A. Al tratar las THP-1 con 12-miristato,13-acetato de forbol (PMA) exhiben características morfológicas similares a los macrófagos a la vez que se observa adherencia a la superficie de cristal.

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 Hepes modificado adiconado con NaHCO_3 26,8 mM y suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v), penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 $\mu\text{g/ml}$, glutamina 1%, glucosa 250 mg/ml, piruvato de sodio 11 mg/L y β -mercaptoetanol 50 μM . Fueron mantenidas a una densidad de $1,5 \times 10^5$ cél/ml en estufa a 37 °C en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO_2 . El medio fue renovado cada 3-4 días. Para ello, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 350 *g* durante 10 min a 25 °C y resuspendidas en medio de cultivo.

II.c. Diferenciación celular

Células K562

Para inducir diferenciación eritroide, se utilizó hemina (H), compuesto hemo preformado. La hemina induce hemoglobinización de las células K562.

Para preparar H, 10 mg de la misma fue humedecida con 100 μl de etanol absoluto y 200 μl de NaOH 1M, homogeinizando con varilla de vidrio. Se agregaron 7,85 ml de NaHCO_3 0,1 M y la suspensión fue agitada durante 2 h, protegida de la luz. A continuación, la misma fue filtrada en esterilidad y se midió absorbancia a 388 nm, máximo de absorción del compuesto. Se calculó la concentración de H en la solución empleando como datos la

lectura de la absorbancia a 388 nm y el coeficiente de absorptividad molar ($\epsilon= 47,9$) (Pérez *et al*, 2001). La solución se prepara en el día de su utilización.

Para evaluar diferenciación celular, se realizó una tinción citoquímica utilizando el sustrato cromogénico DAF. Este compuesto es oxidado debido a que la actividad pseudoperoxidásica de la hemoglobina sobre el H_2O_2 genera el compuesto coloreado azul fluoreno cuya concentración muestra una relación lineal con la concentración de hemoglobina presente (Worthington *et al*, 1987).

Se cultivaron 2×10^5 cél/ml durante distintos períodos en presencia del inductor. Se centrifugó la suspensión celular a 350 g durante 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y un volumen de 50 μ l de *buffer* Tris-HCl 0,2 M pH 7 fue agregado a los *pellets*. Una alícuota (10 μ l) de la suspensión celular fue incubada durante 10 min con 10 μ l de solución de color (100 μ l de *buffer* Tris-HCl, 10 μ l de H_2O_2 20 vol. y 10 μ l de la solución de DAF stock de 10 mg/ml en alcohol isopropílico). Una vez finalizado el período de incubación, se realizó el recuento diferencial de las células hemoglobinizadas en cámara de Neubauer (400 \times), contando un total de 400 células.

Para estandarizar la metodología se emplearon distintas concentraciones de H y diferentes tiempos de diferenciación (Fig. I).

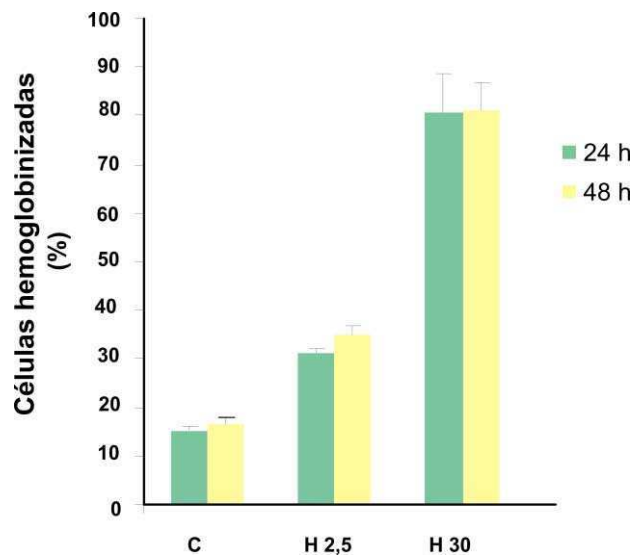


Figura I: Porcentaje de células diferenciadas en presencia de hemina (H). Las células fueron incubadas durante 24 ó 48 h en presencia de diferentes concentraciones de H (2,5 y 30 μ M). A continuación de la tinción con DAF, se determinó el porcentaje de células hemoglobinizadas por recuento en cámara de Neubauer.

Células THP-1

Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones (50, 100 y 200 nM) de PMA durante diferentes períodos (24, 48 y 72 h) en estufa a 37 °C en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO₂. En primer lugar se determinó el porcentaje de diferenciación contando el número de células adheridas y ahusadas (morfología de macrófago) en un total de 500 células. De esta manera se estandarizó la concentración de PMA y el tiempo de incubación (Fig. II).

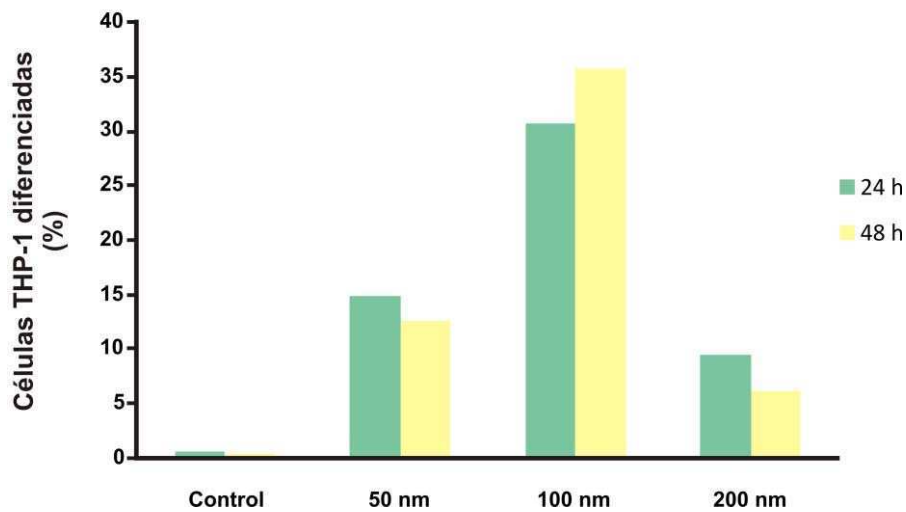


Figura II: Porcentaje de células diferenciadas en presencia de PMA. Las células fueron incubadas durante 24 ó 48 h en presencia de diferentes concentraciones de PMA (50, 100 ó 200 nM). Evaluación de la diferenciación por características morfológicas y adhesión celular.

De acuerdo a los resultados, la concentración de 100 nM fue la elegida ya que fue con la que se observó mayor número de células diferenciadas. A concentraciones mayores disminuía considerablemente la viabilidad y las células se despegaban.

La estandarización del tiempo de incubación con PMA 100 nM permitió determinar como tiempo óptimo 72 h de cultivo (Fig. III).

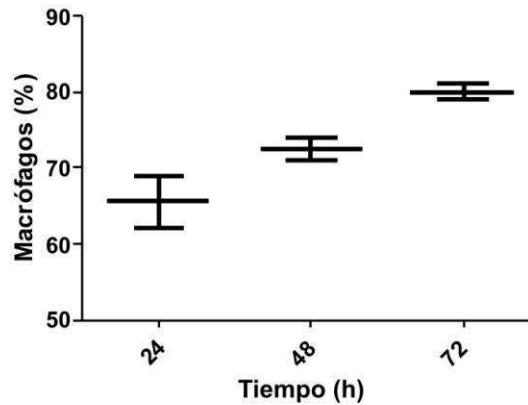


Figura III: Porcentaje de células diferenciadas en presencia de PMA. Las células fueron incubadas durante diferentes períodos (24, 48 ó 72 h) en presencia de 100 nM de PMA. Evaluación de la diferenciación por características morfológicas y adhesión celular.

Estos resultados fueron confirmados por determinación del nivel de expresión del marcador de diferenciación CD14 en la superficie celular. Para ello, las células fueron cultivadas en presencia de PMA 100 nM durante 72 h. Luego fueron despegadas utilizando 200 μ l de TRIPLE durante 5 min a 37 $^{\circ}$ C y lavadas 2 veces con buffer fosfato de sodio (PBS: NaH_2PO_4 1,9 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; NaCl 0,137 M; KCl 3 mM; pH 7,4) por centrifugación a 350 g durante 10 min c/u a 23 $^{\circ}$ C. A continuación fueron incubadas con 2 μ l del anticuerpo anti CD14 conjugado con FTIC durante 30 min en oscuridad, a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con PBS nuevamente y analizadas por citometría de flujo utilizando el láser de excitación de 488 nm (Fig. IV). Los resultados mostraron las condiciones óptimas del protocolo utilizado.

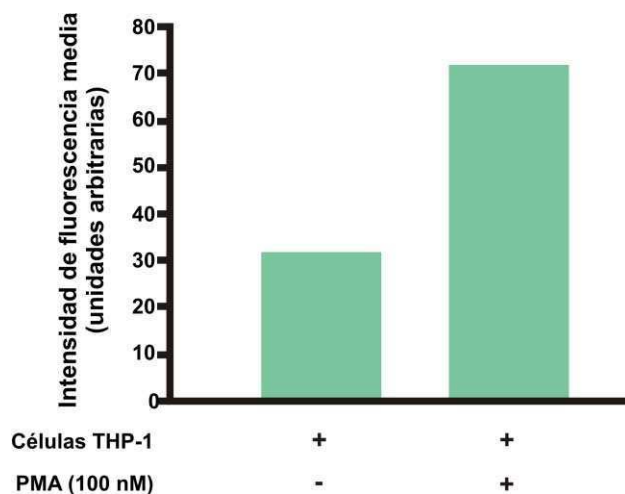


Figura IV: Expresión de CD14 en células THP-1. Las células fueron incubadas durante 72 h en presencia/ausencia de 100 nM de PMA. Luego de la marcación inmunológica, se determinó la intensidad de fluorescencia celular mediante citometría de flujo.

III. VIABILIDAD Y RECUENTO CELULAR

La viabilidad celular fue determinada mediante la prueba de exclusión de colorante supravital en una dilución de la suspensión celular 1:2 con azul Tripán 2 g/l en PBS. El recuento de células en esta suspensión fue determinado con aumento de 400× en un microscopio óptico, utilizando una cámara de Neubauer modificada (McAteer & Davis, 1994).

Analizamos la viabilidad de ambas líneas celulares luego de inducir el proceso de diferenciación. Los resultados se muestran en las Figuras V, VI y VII.

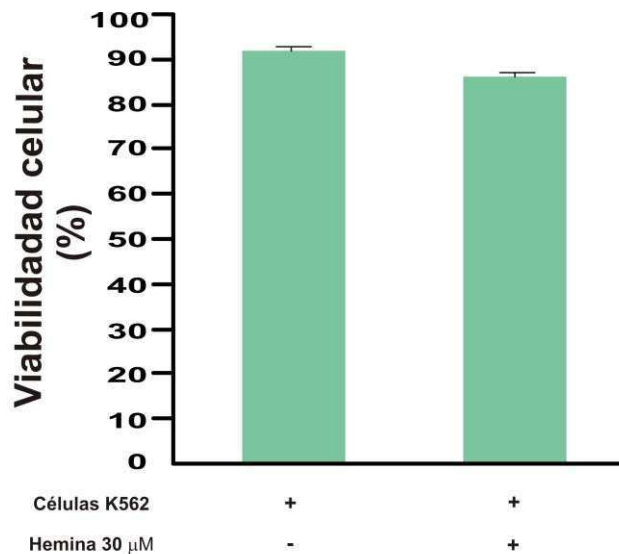


Figura V: Ensayo de viabilidad de las células K562. Las células fueron incubadas durante 48 h en presencia de 30 μ M de hemina. Se determinó el porcentaje de células vivas mediante recuento celular en cámara de Neubauer utilizando el colorante de exclusión azul Tripán.

Cuando analizamos la proliferación y viabilidad celular en las células THP-1, observamos que el proceso de diferenciación arresta a las células impidiendo su proliferación y disminuyendo la viabilidad celular, por lo que el número de células en cultivo también disminuye (Fig. VI).

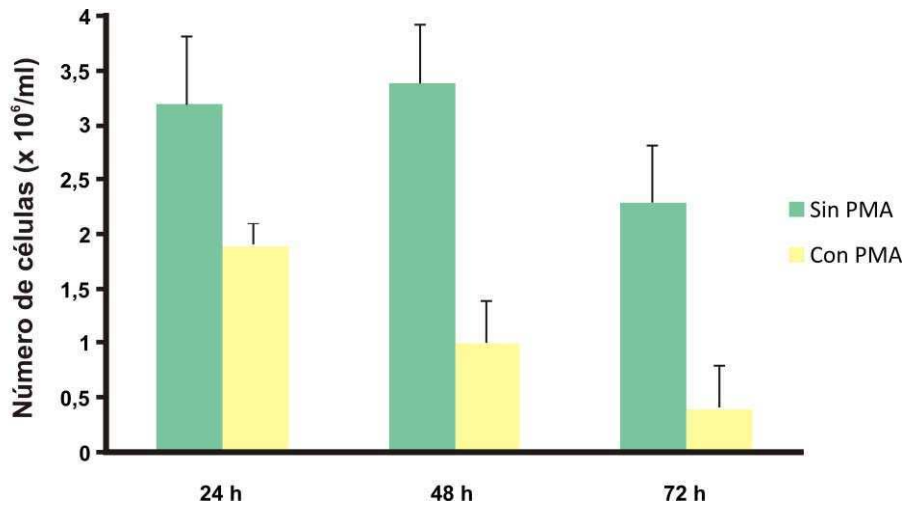


Figura VI: Ensayo de proliferación de las células THP-1. Las células (6×10^5 /ml) fueron incubadas durante diferentes períodos en presencia de 100 nM de PMA. Se determinó el número de células mediante recuento celular en cámara de Neubauer utilizando el colorante de exclusión azul Tripán.

Sin embargo, la viabilidad de las células adheridas no sufre cambios apreciables en función del tiempo de diferenciación (Fig. VII).

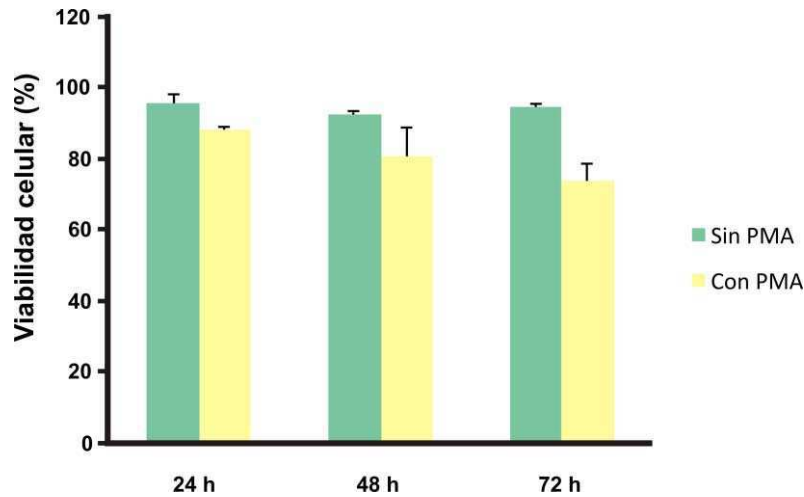


Figura VII: Ensayo de viabilidad de las células THP-1. Las células fueron incubadas durante diferentes períodos en presencia de 100 nM de PMA. Se determinó el porcentaje de células vivas mediante recuento celular utilizando el colorante de exclusión azul Tripán.

IV. EVALUACIÓN DE APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS K562

IV.a. Determinación de núcleos apoptóticos

El colorante Hoechst 33258 (Trihidroclorhidrato de (2'-[4-Hidroxifenil]-5-[4-metil-1-pipetrazinil]-2,5'-bi-1H benzimidazol) es una sustancia con capacidad para intercalarse entre las bases adenina y timina del ADN. El ADN teñido con dicho colorante, y excitado con luz de longitud de onda apropiada ($\lambda=350$ nm), emite fluorescencia de color azul brillante. El recuento diferencial de células apoptóticas se realiza mediante microscopía de fluorescencia. Los núcleos apoptóticos a diferencia de las células intactas, se observan más brillantes y de tamaño reducido debido a la condensación de la cromatina, y se visualiza la presencia de cuerpos apoptóticos como pequeños desprendimientos del núcleo también de color azul brillante.

Los cultivos de células K562 fueron realizados sobre cubreobjetos, previamente esterilizados por tratamiento con etanol 96° y calor, y colocados en placas de Petri de 35 mm estériles. Después de una incubación de 48 h a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad, se agregaron 5 gotas de fijador Carnoy (ácido acético:metanol, 3:1) sobre la suspensión celular. Luego de 2 min se descartó el líquido de las placas y se repitió el proceso dos veces con 1 ml de fijador Carnoy durante 5 min. Luego de dejar secar las placas a temperatura ambiente durante 10 min, se agregó el reactivo de Hoechst 33258 (0,05 g/l en PBS) manteniendo 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Con el fin de retirar remanentes de dicho intercalante, se realizaron tres lavados con H₂O, finalizando el procedimiento con el montaje del preparado colocándolo sobre una gota de PBS en sentido invertido sobre un portaobjetos.

La cuantificación de núcleos apoptóticos fue realizada mediante el recuento de 600 células, empleando microscopía de fluorescencia, con filtro de 365 nm. Las imágenes fueron digitalizadas (Vittori *et al*, 2005).

IV.b. Clivaje de la proteína PARP

PARP (*poly-adenosin ribose polymerase*) es una proteína nuclear que protege al ADN de su degradación. Es blanco de acción de caspasa 3, la cual cliva esta proteína permitiendo así la fragmentación del ADN durante la apoptosis. Por este motivo, el clivaje de PARP es una medida de los niveles de apoptosis en una población celular, y puede evaluarse por la técnica de *Western blotting*, utilizando un anticuerpo que reconozca tanto a la proteína intacta (116 kDa) como a un fragmento resultante del clivaje (85 kDa).

Lisis celular

Las células (4×10^6) fueron lavadas 3 veces con PBS por centrifugación a 350 *g* durante 10 min a 22 °C. Posteriormente, fueron lisadas con 130 μ l de *buffer* hipotónico (Tris 50 mM, pH 8; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; aprotinina 1 μ g/ml y leupeptina 2 μ g/ml) y Na_3VO_4 1 mM. Luego de 30 min de incubación a 0 °C el material insoluble fue removido por centrifugación a 17.300 *g* durante 15 min.

SDS-PAGE

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y colaboradores (1951) tras efectuar una dilución de la muestra 1:40 en dodecil sulfato de sodio (SDS) 1% (p/v).

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de las proteínas de los lisados celulares, empleando el sistema discontinuo de Laemmli (1970). El tratamiento con SDS equipara la densidad de carga superficial de las proteínas por lo que, empleando geles con tamaño de poro selectivo, la velocidad electroforética de las proteínas se relaciona con las diferencias entre sus tamaños moleculares.

Las concentraciones en el gel concentrador (T 4%) fueron: acrilamida 39 g/l; bisacrilamida 1 g/l; SDS 1 g/l en Tris-HCl 125 mM, pH 6,8. Como catalizador de la polimerización se empleó N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED $\delta=0,77 \pm 0,02$ g/l) 0,3 ml/l y persulfato de amonio 0,37 g/l como iniciador.

Las concentraciones en el gel separador fueron: acrilamida 78 g/l; bisacrilamida 2 g/l (T: 8%); SDS 1 g/l; TEMED 0,3 ml/l; persulfato de amonio 0,37 g/l en Tris-HCl 375 mM, pH 8,8.

En algunos casos, se utilizaron geles comerciales de SDS-poliacrilamida en gradiente (4-15%).

Las proteínas fueron solubilizadas en el *buffer* de muestra (dual color protein *buffer* (Tris-HCl 0,0625 M, EDTA 0,4 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 10%(v/v); DTT 0,5M) por calentamiento a ebullición durante 4 min. Una masa determinada de proteínas fue sembrada en cada calle y en cada placa fue incluido un marcador de pesos moleculares precoloreado. La electroforesis fue desarrollada a corriente constante de 20 mA durante el proceso de isotacoforesis en el gel concentrador y de 25 mA durante el desarrollo electroforético en el gel separador.

Electrotransferencia e *immunoblotting*

Las proteínas separadas por *SDS-PAGE* fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) a 350 mA y 100 V por 90 min, siguiendo la metodología descrita por Towbin y colaboradores (1979).

Previo a la transferencia, las NC y los geles fueron hidratados durante 30 min en el *buffer* de transferencia (Tris 25 mM; glicina 195 mM; SDS 0,05%, pH 8,3; metanol 20%, v/v).

Al finalizar la transferencia, las NC fueron lavadas varias veces con *buffer* TBS (Tris 25 mM; NaCl 137 mM; KCl 3 mM; pH 7,4). Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con leche descremada 5% (p/v) en TBS-Tween 20 0,1% (TBS-T) durante 1 h. Luego, las NC fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con anticuerpo monoclonal anti PARP o anti actina diluidos 1:500 con TBS-T.

Se utiliza la evaluación de actina como control de la cantidad de proteínas totales sembrada en cada calle, ya que es una proteína celular cuya concentración se mantiene constante en todas las células y no se modifica por los tratamientos.

Luego de 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T se procedió a incubar las NC durante 1 h con agitación, en presencia de anticuerpo de conejo contra IgG de ratón, conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 con TBS-T. Las proteínas no unidas fueron removidas mediante un procedimiento de lavado igual al anteriormente explicado. Las bandas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando un equipo Dark Box II Fujifilm Intelligent acoplado a una cámara digital. En la reacción enzimática ocurre oxidación del luminol en presencia de H₂O₂ por acción de la peroxidasa, obteniéndose un compuesto excitado que emite luz al retornar a su estado basal. La solución reveladora posee fenoles para aumentar la luz emitida aproximadamente 1000 veces además de extender el tiempo de emisión de la misma. Las bandas fueron visualizadas mediante el uso del programa Image Reader LAS-1000.

IV.c. Actividad de caspasa 3

Células en densidad de 2x10⁵/ml fueron cultivadas durante 48 h. Luego de lavar con PBS, fueron lisadas con *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 10 mM; digitonina 10 µM) más PMSF 100 µM, por incubación durante 30 min en hielo. Después de centrifugar a 17.300 g por 15 min a 8 °C para eliminar los restos celulares, se trasvasó el sobrenadante a tubos de 0,2 µl. Se separaron 2 alícuotas de 10 µl cada una para cuantificar proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951).

Para medir la actividad de caspasa 3, se emplearon microtiras. En cada *well* se colocaron: 150 µl de *buffer* de reacción (HEPES 100 mM pH 7,5; EDTA 0,5 mM; DTT 5 mM agregado en el momento y glicerol 20%, v/v), 144 µl de lisado celular correspondiente a cada

tratamiento y 6 μ l de sustrato de caspasa 3 (Ac-DEVD-pNA) 5 nM. La placa fue incubada a 37 °C en oscuridad durante 7 h. Cada ensayo fue realizado por duplicado. A cada hora, se procedió a leer la absorbancia a 405 nm correspondiente a la liberación de p-nitroanilina, compuesto producido por la hidrólisis del sustrato debido a la actividad de caspasa 3, empleando lector de placas. Para estandarizar los resultados, los datos de absorbancia fueron referidos a la concentración proteica de cada muestra.

V. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE LAS CÉLULAS K562

Para analizar la expresión génica de distintas proteínas fue utilizada la técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*). Dicha metodología consta de dos etapas: uso de oligo dTs (complementario a la cola poli A de los ARNm) como *primer* para la reacción de transcripción reversa de la cual se obtiene ADN copia (ADNc) a partir de ARNm, seguido de la amplificación mediante PCR y el uso de *primers* específicos de los ADNc correspondientes a los ARNm de interés.

Extracción de ARN total

El ARN total de 4×10^6 células fue extraído mediante incubación durante 5 min a temperatura ambiente con 0,5 ml de reactivo de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol Reagent), de acuerdo al método de Chomczynski y Sacchi (1987). Se agregó 0,1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 s. Luego de 3 min, se centrifugó por 15 min a 9500 *g* a 4°C. Se descartó la fase orgánica. Se agregaron 0,25 ml de alcohol isopropílico a la fase acuosa y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Al finalizar este período, se centrifugó 10 min a 9.500 *g*.

El ARN contenido en el *pellet* fue lavado con 0,5 ml de etanol 75% agitando vigorosamente y centrifugado a 7.500 *g* durante 5 min. El ARN fue disuelto en 30 μ l de H₂O-DEPC e incubado 10 min a 60 °C. Una alícuota de esta solución se utilizó para medir la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro. La concentración de ARN total fue calculada considerando que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm corresponde a 40 μ g/ml de ARN simple cadena (Sambrook y Russel, 2001). La relación de A_{260}/A_{280} del ARN aislado se encontró entre 1,6 y 1,8. Estos valores concuerdan con los valores de preparaciones puras de ARN. En este paso se estudió la integridad del ARN mediante electroforesis en agarosa 1% (p/v) en *buffer* TEB (Tris 90 mM; EDTA 2 mM; ácido bórico 90 mM; pH 8 en H₂O-DEPC, v/v), conteniendo 0,5 mg/l de bromuro de etidio.

Obtención de ADN copia

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total extraído, por transcripción reversa de los ARNm utilizando oligo (dT) como *primer* y enzima transcriptasa reversa, empleando el *kit* optimizado “Ready To Go T-Primed First-Strand Kit”.

La síntesis de ADNc fue realizada a partir de 2,5 µg de ARN total, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADNc fue fraccionado y conservado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

V.a. Amplificación de los fragmentos de ADNc por RT-PCR

Para comenzar la PCR, se preparó una mezcla de reacción en *buffer* Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM, conteniendo Taq polimerasa 25 U/ml; *primers* adecuados 0,25 µM y dNTPs 200 µM. Con el fin de optimizar las condiciones de amplificación, se estandarizaron las cantidades de ADNc inicial y temperatura de *annealing* (temperatura en la cual se unen los *primers* a las hebras de ADN) en un termociclador. Una vez decididos estos parámetros se realizó una curva de número de ciclos térmicos para evaluar la cantidad óptima de ciclos a utilizar.

Las condiciones seleccionadas para amplificar cada secuencia se muestran en la siguiente tabla:

	c-FLIP	GAPDH
ADNc inicial	2 µl (dilución 1/10)	2 µl (dilución 1/10)
Desnaturalización inicial	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min
Cantidad de ciclos	35	40
Desnaturalización de cada ciclo	94 °C, 20 s	94°C, 45 s
Primer annealing	56 °C, 30s	61 °C, 45 s
Elongación	72 °C, 40 s	72 °C, 45 s
Elongación final	60 °C, 7 min	72 °C, 5 min

Primers utilizados:c-FLIP:

Forward: 5´ AATTCAAGGCTCAGAAGCGA 3´

Reverse: 5´ GGCAGAACTCTGCTGTTCC 3´

GAPDH:

Forward: 5´ TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG 3´

Reverse: 5´ TCCTTGGAGCCATGTAGGCCAT 3´

En cada ensayo de amplificación fue incluido un control negativo en el cual se excluyó el agregado de ADNc. El objetivo de este control fue comprobar que los diferentes reactivos empleados no se hubieran contaminado con ADN externo.

Análisis de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v) con bromuro de etidio 0,005% (v/v). Cada producto de PCR (10 µl) fue mezclado con 4 µl de *buffer* de siembra (azul de bromofenol 0,25%, p/v; sacarosa 4%, p/v en *buffer* TEB) y sembrado en el gel. En sendas calles, se sembraron un marcador de pb como control del tamaño de los fragmentos amplificados y un control negativo de PCR. La electroforesis se desarrolló a 280 V durante 25 min en una cuba electroforética Liberty 2. Los productos de amplificación obtenidos fueron detectados mediante la observación en transiluminador de las señales emitidas por el bromuro de etidio intercalado en el ADNc. Los geles fueron fotografiados empleando una cámara digital (Kodak DC 120) y las fotografías, analizadas utilizando dos programas para digitalización de imagen (Array Gauge e Image Gauge, Fujifilm).

Los niveles de intensidad de las bandas fueron normalizados con respecto a los valores correspondientes al estándar interno GAPDH (Sambrook y Russell, 2001).

V.b. Real Time PCR

Esta técnica se llevó a cabo con el fin de cuantificar los niveles de ARNm de c-FLIP. El protocolo es similar al utilizado para RT-PCR. El *buffer* de reacción posee los mismos reactivos en iguales concentraciones, con excepción la taq polimerasa que se utiliza en una concentración de 80 U/ml. El *buffer* de reacción posee también un colorante denominado “*Syber Green*”, el cual se intercala en el *ADN* doble hebra permitiendo así relacionar directamente la cantidad de fluorescencia detectada por el equipo con el ADNc amplificado. Las cantidades de cada reactivo, así como la cantidad de ciclos y la duración de cada paso del programa utilizado, fueron estandarizadas luego de varias pruebas, resultando las condiciones óptimas las que se detallan en la siguiente tabla:

	c-FLIP	GAPDH
ADNc inicial	2 μ l (dilución 1/10)	2 μ l (dilución 1/10)
Desnaturalización inicial	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min
Cantidad de ciclos	40	40
Desnaturalización de cada ciclo	94 °C, 45 s	94 °C, 45 s
Primer annealing	61 °C, 45s	61 °C, 45 s
Elongación	72 °C, 45 s y 86 °C, 5 s	72 °C, 45 s y 86 °C, 5 s
Elongación final	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min
Curva de <i>melting</i>	De 72 °C a 96 °C aumentando de a 0,5 °C cada 5 s.	De 72 °C a 96 °C aumentando de a 0,5 °C cada 5 s.

A diferencia de la técnica de RT-PCR, el programa de la técnica de *Real Time* PCR incluye un paso adicional, la curva de *melting*, como indica la tabla. La curva obtenida relaciona la fluorescencia de la muestra con la temperatura. Como dicha fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto formado, la curva de *melting* muestra el perfil de desnaturalización del mismo. Como resultado, en caso de obtenerse un único producto, se observa un solo pico en la curva, a un valor de temperatura igual a su T_M (temperatura a la cual el 50% de las cadenas se encuentran como doble hebra). Por el contrario, la observación de más de un pico sugiere la presencia de impurezas en la muestra.

Los *primers* utilizados para amplificar c-FLIP, así como los de GAPDH, son los mismos que se emplearon en la RT-PCR semicuantitativa.

Esta técnica a diferencia de la RT-PCR tradicional requiere curvas de calibración, tanto para GAPDH como para el gen de interés, las cuales se obtienen realizando diluciones seriadas 1:4 hasta 1:256, a partir del ADNc control y utilizando el *buffer* de reacción con los *primers* correspondientes. Estas curvas de calibración sirven para analizar la cantidad de copias obtenidas del gen de interés en función del ADNc total presente en la reacción. Los datos obtenidos de amplificación en las muestras se interpolan en dichas curvas en el momento del análisis de los datos.

Análisis de los productos de amplificación

El análisis de los datos se realizó utilizando el *software* Opticon monitor 3.1 (BioRad), que permite cuantificar cantidad de ADNc amplificado en la reacción.

En este caso también se normalizaron los valores obtenidos para c-FLIP respecto de los obtenidos para GAPDH en cada tratamiento.

Precauciones para mantener la calidad de los procedimientos

Todos los procedimientos previamente descritos para las técnicas de RT-PCR y *Real Time* PCR fueron realizados en gabinete de seguridad biológica tipo II empleando guantes descartables con el objeto de evitar la introducción de ARNasas foráneas.

El material plástico descartable utilizado para la extracción de ARN así como para las reacciones de RT-PCR, fue adquirido libre de enzimas que degradan ADN (ADNasas) y ARN (ARNasas).

El material plástico no descartable, así como la cuba electroforética fueron tratados con una solución de NaOH 0,5 M durante 10 min con el objeto de inactivar ARNasas. Posteriormente, fueron enjuagados con H₂O-DEPC.

Todo el material plástico fue esterilizado por autoclavado.

VI. EXPRESIÓN DE C-FLIP POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Luego de lavar las células dos veces con PBS, fueron fijadas y permeabilizadas por 20 min a 4 °C con el buffer comercial cytofix/Cytoperm. Luego fueron incubadas con anticuerpo anti c-FLIP_L humano producido en conejo por 1 h a 4 °C. Luego de lavar 3 veces con PBS se incubó con el segundo anticuerpo anti Ig G de conejo conjugado con rodamina durante 1 h a 4 °C. La expresión de c-FLIP fue determinada por citometría de flujo y los datos analizados con el programa WinMDI 2.9.

VII. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE ERIPTOSIS

Muestras de sangre periférica heparinizada fueron obtenidas de dadores sanos (25-38 años) bajo su consentimiento. Luego de centrifugar por 15 min a 500 *g* y 4 °C, el plasma y *buffy coat* fueron removidos cuidadosamente. Los eritrocitos fueron lavados 3 veces con PBS.

VII.a. Estandarización de protocolos experimentales

Se efectuó la estandarización tanto de los protocolos experimentales como de la metodología para analizar las manifestaciones fenotípicas que permitieran evaluar el desarrollo de eriptosis. En primer lugar se analizaron el hematocrito y el medio de cultivo en el cual se desarrollarían los experimentos. Se probaron medio 199 modificado con HEPES pH 7,0±0,3, suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, y *buffer* HEPES (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2,5 mM, glucosa 10 mM y

albúmina sérica bovina 0,1 % (w/v); pH 7,4) con hematocritos de 5%, 1% y 0,5%. La incubación fue realizada a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂ y 5% de humedad. Luego de analizar la morfología eritrocítica por microscopía óptica y determinar el porcentaje de hemólisis (espectrofotometría a 415 nm), se decidió continuar los experimentos utilizando *buffer* HEPES, debido a que si bien tanto en el medio 199 como en *buffer* HEPES los eritrocitos conservaron su forma y sufrieron un bajo porcentaje de hemólisis (37 °C; 24 y 48 h), el *buffer* HEPES permite realizar mediciones colorimétricas por espectrofotometría debido a que es incoloro. En cuanto al hematocrito, en los cultivos al 5% se observó una modificación apreciable de la morfología eritrocitaria (aumento de estomatocitos), mientras que en los cultivos al 0,5% se observó que el número de eritrocitos variaba entre ensayos debido a que el volumen del paquete globular a utilizar es muy pequeño y por ello se introduce un error elevado al pipetear. Se estandarizaron los experimentos con un hematocrito de 1%.

VII.b. Estudio del aluminio como agente eritrotóxico

La solución *stock* de aluminio fue preparada inmediatamente antes de uso disolviendo AlCl₃.6H₂O en 0,1 N Tris-HCl *buffer* pH 7,3 a una concentración de 10 mM, y esta solución fue diluida a la concentración deseada basándonos en experimentos previos de nuestro laboratorio sobre toxicidad del Al en eritrocitos maduros (Vittori *et al*, 2002). Todas las soluciones fueron esterilizadas utilizando filtros de jeringa con membranas de 0,22 µm inmediatamente luego de su preparación.

Los glóbulos rojos fueron lavados y resuspendidos en medio 199 completo a un hematocrito de 20 % y tratados con AlCl₃ 100 µM por 21 días a 4°C. Este medio sintético de composición química conocida que permite la supervivencia de las células sin necesidad de utilizar suero (Morgan *et al*, 1950) fue utilizado para simular el ambiente de los eritrocitos circulantes.

Experimentos control fueron llevados a cabo en *buffer* HEPES: NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2.5 mM, glucosa 10 mM y 0,1% (p/v) BSA, pH 7.4. Por otro lado, eritrocitos fueron incubados en medio libre de Al o tratados con NaCl 100 µM como controles. Para analizar la protección frente a la toxicidad del Al fueron utilizados NAC 5 mM o Epo 10 U/ml; los mismos fueron agregados a la suspensión celular 30 min antes de la adición de AlCl₃. La renovación del medio con o sin AlCl₃, NAC o Epo fue realizado cada 2 días. Para evaluar la susceptibilidad a agentes oxidantes, luego de la exposición por 21 días a Al, los eritrocitos fueron lavados e incubados con H₂O₂ 1 mM + NaNO₂ 5 mM por 90 min a 37 °C.

VII.c. Análisis de la morfología eritrocitaria por microscopía electrónica de barrido

Luego de cada tratamiento, los eritrocitos fueron colocados sobre vidrios de 50 mm² de área, y fijados por 20 min con glutaraldehído 3% (v/v) en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7,4. Las muestras fueron lavadas 3 veces con el mismo *buffer*, subsecuentemente deshidratadas mediante lavados en acetona (de 25% a 100%, v/v), y secados directamente en una bomba para punto crítico Balzers CPD 030 utilizando dióxido de carbono como fluido de transición. Las muestras fueron cubiertas con una fina capa de oro (Balzers Union SCD 040) y examinadas utilizando un microscopio electrónico de barrido (ZEISS Supra 40) (Vittori *et al*, 2005). Se tomaron fotografías de campos representativos en cada tratamiento.

VII.d. Determinación de exposición de residuos de fosfatidilserina

Una de las modificaciones celulares que ocurren durante la muerte celular programada es la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática. Esta modificación ocurre también durante el proceso de eritosis. En los eritrocitos eritóticos, así como en las células apoptóticas, el fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS) se trasloca de la capa interna de la bicapa lipídica hacia la capa externa, quedando de esta manera expuesto hacia el espacio extracelular.

La Anexina V es una proteína con alta afinidad y especificidad por los residuos de PS y no atraviesa la membrana plasmática, por lo que se une a este fosfolípido sólo cuando el mismo se encuentra externalizado. La anexina V conjugada con fluorocromos como isocianato de fluoresceína (FITC) se puede utilizar para determinar el número de células que externalizaron PS luego de un tratamiento, mediante el uso de citometría de flujo.

Luego de realizar los diferentes tratamientos, los eritrocitos fueron lavados y resuspendidos en *Binding Buffer* (HEPES/NaOH 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,14 M, CaCl₂ 2,5 mM) en una concentración de 1x10⁶ células/ml. Un volumen de 100 µl de suspensión celular fue incubado con 4 µl de anexina V-FITC durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción fue detenida por el agregado de 400 µl de *Binding Buffer* y el análisis por citometría de flujo fue realizado dentro de la primera hora siguiente excitando las muestras con un láser de argón a 488 nm.

En todos los casos que se utilizó la técnica de citometría de flujo, los datos fueron analizados con el programa WinMDI 2.9.

VIII. EVALUACIÓN DEL ESTADO REDOX INTRACELULAR

VIII.a. Determinación de ROS

Los eritrocitos lavados fueron resuspendidos en 250 ml de PBS (Hto. 1%) e incubados en presencia de DCFH-DA 0,4 mM durante 15 min a 37 °C en una atmósfera conteniendo 5% de CO₂ (Ghoti *et al*, 2007).

Las células son permeables al reactivo no fluorescente. En el interior de las mismas, DCFH-DA es hidrolizado por esterasas inespecíficas y por oxidación se transforma en 2', 7'-dichlorofluorescina que es altamente fluorescente. Permite determinar en forma rápida y sensible las ROS que se generan durante el metabolismo oxidativo. La reacción fue detenida por el agregado de 400 µl de PBS frío. Inmediatamente, se realizó la cuantificación de ROS por citometría de flujo excitando las células con un láser de argón a 488 nm.

VIII.b. Determinación de GSH

Para la cuantificación de los niveles de GSH intracelulares, 100 µl de suspensión celular (Hto 1%) fue incubada con la sonda Mercury Orange a una concentración final de 20 µM por 3 min a 0 °C e inmediatamente analizados por citometría de flujo excitando las células con un láser de argón a 488 nm (Ghoti *et al*, 2007). El reactivo naranja de mercurio forma aductos fluorescentes con GSH mediante sus grupos tioles (SH). La reacción es más rápida con GSH que con los grupos SH de proteínas de manera que puede alcanzarse especificidad para la determinación de GSH bajo condiciones de reacción controladas. En los eritrocitos, los grupos tioles no proteicos están constituidos casi totalmente por GSH. La difusión de GSH fuera de las células se evita manteniendo baja la temperatura durante la reacción y en todos los pasos previos.

VIII.c. Determinación de los niveles de lipoperoxidación celular

Cuando se produce un desbalance óxido-reducción celular, no sólo aumentan los niveles de ROS, sino que también puede generarse daño oxidativo a nivel de los lípidos de membrana, lo que va a interferir no sólo con la organización de la misma sino también con ciertas vías de señalización. Los eritrocitos tratados fueron lavados, suspendidos en 250 µl de PBS (Hto. 1%) e incubados con el sensor de peroxidación lipídica BODIPY 665/676 a una concentración final de 2 µM por 15 min a 37 °C. Luego de 2 lavados con PBS, las células fueron suspendidas en el mismo *buffer* y analizadas por citometría de flujo utilizando un

láser de excitación a 633 nm. Esta sonda exhibe una disminución de la fluorescencia al interactuar con radicales peróxilos, detectado a 665/676 nm.

IX. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

A fin de cuantificar la variación del contenido de calcio intracelular [Cai] luego de los diferentes tratamientos, los eritrocitos fueron lavados e incubados con la sonda fluorescente FLUO-4 AM en una concentración final de 2,5 μ M, a 25 °C durante 30 min. El reactivo FLUO-4 AM es un indicador de calcio incoloro que entra a la célula libremente y es hidrolizado por esterasas intracelulares no específicas resultando en un producto fluorescente al unirse al [Cai] libre. Luego de ser lavadas con PBS, las células fueron resuspendidas en PBS y luego de 30 min, analizadas por citometría de flujo. El contenido de calcio fue expresado como la intensidad de fluorescencia media por célula.

X. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITARIA

X.a. Detección de la proteína banda 3 en membrana plasmática

Luego de sus respectivos tratamientos, los eritrocitos fueron incubados con 0,5 mg/ml eosina-5-maleimida por 15 min a 25 °C protegidos de la luz. Este reactivo se une a banda 3 en la membrana plasmática de los eritrocitos y emite fluorescencia cuando es excitado a 488 nm. Se lo utiliza en estudios clínicos para cuantificar dicha proteína como parte del diagnóstico de diferentes tipos de anemia. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS, suspendidas en el mismo *buffer* y analizadas por citometría de flujo.

X.b. Glicoforina A

Es una glicoproteína integral de membrana con alto contenido de ácido siálico y es sustrato antigénico de los grupos sanguíneos. Junto con otras glicoforinas, participa en la interacción con otras células por su parte extracelular, y con otras proteínas citoplasmáticas de manera de darle estabilidad y fluidez al citoesqueleto.

Los eritrocitos fueron incubados con el anticuerpo monoclonal anti glicoforina A humano conjugado con el fluorocromo R-ficoeritrina (RPE) por 30 min a 4 °C. Como control negativo se utilizó la inmunoglobulina adecuada conjugada con RPE. A continuación, los eritrocitos fueron lavados 3 veces con PBS, suspendidos en el mismo *buffer* y analizados por citometría de flujo, excitando las muestras a 488 nm.

X.c. Acuaporina 1 y EpoR

Las acuaporinas (AQPs) son proteínas transmembrana que están involucradas en el flujo activo de agua hacia y desde el interior celular, participando en el mantenimiento de la osmolaridad y volumen de las células. AQP 1 fue cuantificada en la membrana de los eritrocitos inducidos a eritrosis bajo los 2 diferentes modelos. Tanto para el análisis de la expresión del receptor de Epo como de AQP 1 en membrana, los eritrocitos (4 μ l) fueron fijados con formaldehído 1% y glutardialdehído 0,025% en PBS por 15 min a 25 °C. Luego de centrifugarlos por 10 min a 500 *g*, las células fueron lavadas con BSA 1% en PBS y marcadas con anti AQP 1 o anti EpoR (M20) en el mismo *buffer* por 90 min a 4 °C. Los eritrocitos fueron lavados 2 veces y marcados con anticuerpo de cabra anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 (1:100) por 60 min a 4 °C en oscuridad. A continuación se lavaron 3 veces y fueron analizadas por citometría de flujo. Como control negativo se utilizó el isotipo apropiado.

X.d. Preparación de membranas eritrocitarias

Todo el procedimiento se realizó a 4 °C. La hemólisis se llevó a cabo por dilución 1:10 de la suspensión eritrocitaria con *buffer* fosfato de sodio hipotónico 5 mM, pH 8,0, conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 50 μ M, SBTI 50 mg/l, y o-vanadato de sodio 1 mM). Las membranas, en las cuales se iba a analizar la actividad de la fosfatasa PTP 1B, fueron obtenidas sin utilizar inhibidores de fosfatasa. Las membranas, obtenidas en el *pellet* luego de 30 min de centrifugación a 13.000 *g*, fueron lavadas en el mismo *buffer* hasta eliminar por completo los restos de hemoglobina (color crema). Las suspensiones de membranas fueron conservadas a -70 °C (Vittori *et al*, 1999). Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951).

X.e. Detección de la actividad de PTP1B

X.e.i. Inmunoprecipitación

A partir de 800 μ g de membranas eritrocitarias se solubilizaron las proteínas por tratamiento con 3 vol. (v/v) de Tritón X-100 1% en *buffer* hipotónico (fosfato de sodio 5 mM, pH 8,0) durante 15 min a 0 °C. Luego de centrifugar a 13.000 *g* y 4 °C, se colectaron los sobrenadantes y se los incubó con anticuerpo monoclonal de ratón anti PTP 1B humana (clon FG6-1G) concentración final de 2 μ g/ml a 4 °C por 1 h en agitación suave. A continuación se agregó proteína A agarosa y luego de incubar toda la noche en agitación a 4

°C, los inmunocomplejos fueron colectados por centrifugación (15.000 g, 15 min) y lavados 2 veces con *buffer* de lisis.

X.e.ii. Medición de la actividad enzimática

La actividad de PTP 1B se determinó mediante la hidrólisis del sustrato de fosfatasas p-nitrofenilfosfato (p-NPP) provisto por el kit ALP 405 AA líquida.

Los inmunoprecipitados de PTP 1B a partir de membranas eritrocitarias fueron lavados con *buffer* de ensayo (dietanolamina 1,0 M; Mg²⁺ 0,5 mM). La actividad de fosfatasas fue determinada en un volumen final de 200 µl por incubación de los inmunoprecipitados de PTP 1B en *buffer* de ensayo conteniendo p-nitrofenil fosfato (p-NPP) 2,4 mM. La densidad óptica del producto de hidrólisis del p-NPP fue medida a 415 nm en un espectrofotómetro de placas. La corrección por hidrólisis de p-NPP no enzimática fue evaluada mediante la detección de la absorbancia en ausencia de enzima (Callero *et al*, 2007).

X.f. Determinación de la expresión de banda 3 y su fosforilación en residuos tirosina

El proceso completo —electroforesis, electrotransferencia e *immunoblotting*— fue explicado en detalle en la **sección IV. b.**

Para la detección de las proteínas electrotransferidas a NC fue usado el equipo “ECL *Western blotting*”. Esta técnica utiliza un método de emisión de luz para detectar antígenos específicos inmovilizados con un anticuerpo conjugado con peroxidasa.

Las NC fueron bloqueadas con agente leche 5% en TBS-Tween 20 0,1% (TBS-T) durante 1 h, y luego, incubadas toda la noche con los anticuerpos monoclonales anti-banda 3, anti-fosfotirosina (P tyr) o el anticuerpo policlonal anti-β actina, diluidos 1:1000 en TBS-T a 4 °C. El anticuerpo anti-P tyr detecta proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. Luego de 3 lavados en TBS-T durante 10 min, las NC fueron incubadas 1 h con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 en TBS-T y, posteriormente, lavadas.

Una vez finalizados los lavados, las NC fueron puestas en contacto con el sustrato quimioluminiscente ECL (luminol) durante 1 min y reveladas con el equipo Fujifilm Intelligent Dark Box II acoplado a una cámara digital LAS-1000, para visualizar las bandas inmunoreactivas.

XI. CUANTIFICACIÓN DE ALUMINIO

Con el fin de eliminar cualquier traza de contaminación, todo el material plástico fue inmerso en una solución de HCl 30% por 2 h y enjuagado varias veces con agua ultrapura. Los niveles de Al fueron cuantificados en las fracciones eritrocitarias, soluciones de trabajo y en el agua ultrapura usando un espectrómetro de absorción atómica acoplado a un atomizador de grafito fumace con autosampler. El aluminio cuantificado en las fracciones de membrana y citosol luego de la lisis de los eritrocitos, fue expresado por 10^6 eritrocitos (Garbossa *et al*, 1998^b)

XII. ERITROFAGOCITOSIS

Se utilizaron células THP-1 diferenciadas con PMA (**sección II.c.**) y eritrocitos estimulados con agentes oxidantes (NaNO_2 5 mM + H_2O_2 1mM) o ionóforo de calcio A23187 0,15 μM (ICa) por 24 h a 37 °C.

Se realizaron cocultivos de ambos tipos celulares durante diferentes períodos (30', 1 h, 2 h, 4 h) en estufa a 37 °C en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO_2 , siendo 4 h el tiempo óptimo analizado. Finalizado el tiempo de incubación, las células adheridas fueron lavadas 2 veces con PBS. Los eritrocitos no fagocitados fueron lisados con 200 μl de agua destilada fría en agitación durante 30 s y la isotonicidad del medio fue recuperada rápidamente por el agregado de 20 μl de PBS 10X. A continuación, las células fueron tratadas de diferente manera según la técnica de análisis a utilizar.

XII.a. Detección de eritrofagocitosis por microscopía óptica

En este caso, la diferenciación de las THP-1 se llevó a cabo sobre cubreobjetos para su posterior montaje. Las células fueron fijadas con 400 μl de metanol frío durante 10 min a 4 °C, y a continuación fueron coloreadas con 400 μl del colorante Giemsa (15 gotas en 10 ml de agua tamponada) durante 15 min. Los preparados se dejaron secar y luego fueron montados sobre portaobjetos para su posterior análisis por microscopía. Se analizaron 15 campos representativos, los cuales fueron fotografiados, y se contaron 100 células totales para determinar el porcentaje de eritrofagocitosis, tomándose como criterio de célula positiva, la presencia de 1 o + eritrocitos dentro de las células THP-1 diferenciadas.

XII.b. Detección de eritrofagocitosis por citometría de flujo

Para esta técnica los eritrocitos fueron marcados con la sonda fluorescente CFSE previo a su inducción de eritosis. Los glóbulos rojos fueron incubados en PBS con CFSE 0,5 μ M durante 15 min a 37 °C. A continuación fueron lavados 3 veces con suero fetal bovino.

Las células fagocíticas fueron despegadas por incubación con 200 μ l de Triplex durante 10 min a 37 °C, fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS para su análisis por citometría de flujo. Como control de autofluorescencia se utilizaron células THP-1 diferenciadas que no fueron cocultivadas con eritrocitos. Se ubicó la población de macrófagos teniendo en cuenta su tamaño y complejidad y la fluorescencia de las células fagocíticas fue colectada en el canal FL-1.

XIII. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media aritmética y error estándar de la media (Media \pm SEM) como medidas de tendencia central y de dispersión.

La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar más de dos grupos independientes. De hallarse diferencias significativas, posteriormente se realizó la prueba de Mann-Whitney entre dos grupos para comparar distribuciones poblacionales. Diferencias de hasta $P < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

EFFECTO DE UN AMBIENTE PROINFLAMATORIO SOBRE EL LINAJE ERITROIDE

I.1. ACCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS SOBRE PROGENITORES ERITROIDES

Se ha sugerido que las citoquinas proinflamatorias podrían ejercer una acción proapoptótica sobre células eritroides (Rusten y Jacobsen, 1995). Por ello se evaluó el efecto apoptótico de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β sobre la línea celular con capacidad de diferenciación eritroide K562. Se analizó la posibilidad de que se produjeran cambios en el comportamiento celular frente a la acción de dichas citoquinas al inducir una modificación celular como es la diferenciación.

El fenómeno de diferenciación es un proceso complejo regulado por vías intrínsecas de la propia célula, por interacciones célula-célula y célula-sustrato, así como por la participación de un amplio espectro de moléculas extracelulares, como hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y factores tróficos, entre otros (López-Carballo *et al*, 2002).

La hemina (H) es el compuesto hemo preformado. Al ser agregado al cultivo de ciertas líneas celulares, como la eritroleucémica K562, induce hemoglobinización celular (Pérez *et al*, 1999). Su mecanismo de acción es aún desconocido.

Las células en presencia o ausencia de hemina (H) fueron incubadas con TNF- α (T) o IL-1 β (IL). Las citoquinas fueron agregadas al cultivo 1 h después de comenzado el ensayo y, al finalizar los cultivos, se realizaron distintos ensayos para la evaluación de apoptosis.

I.1.a. Desarrollo de muerte celular programada

I.1.a.i. Determinación de células apoptóticas

En primer lugar se evaluaron los cambios de morfología nuclear utilizando un colorante que se intercala en el ADN (Hoechst), permitiendo así la visualización de los núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia. El análisis del recuento diferencial de núcleos apoptóticos (Fig. 1) muestra que las células que se encontraban en etapa de diferenciación eritroide, debido a la presencia de hemina (H) en el medio, resultaron marcadamente más sensibles a la acción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β que las células indiferenciadas. En la Figura 1B, los núcleos apoptóticos se visualizan de tamaño reducido con respecto a

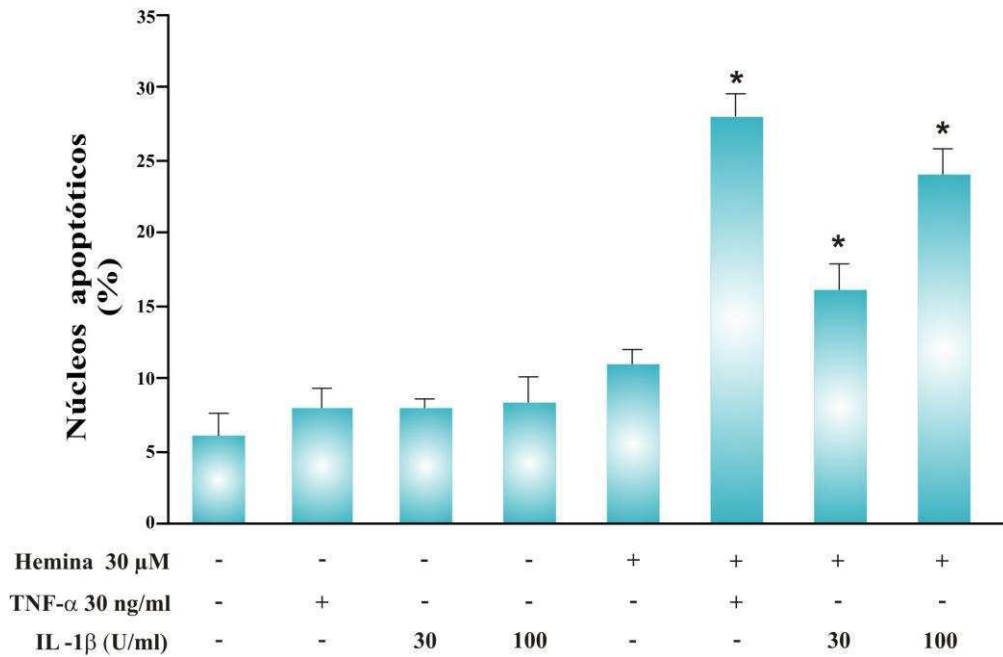
los de las células control. Mientras que las células intactas presentan núcleos teñidos homogéneamente de azul, los núcleos apoptóticos se observan de color celeste brillante acompañados por la presencia de cuerpos apoptóticos. Cuando la apoptosis es tardía, el núcleo se visualiza solamente como cuerpos apoptóticos.

1.1.a.ii. Determinación de la actividad de caspasa 3

El segundo ensayo realizado para evaluar los niveles de apoptosis fue la medición de la actividad de caspasa 3 a través de una reacción colorimétrica. Como se describió en Materiales y Métodos, los lisados celulares son incubados con el sustrato cromogénico Ac-DEVD-pNA, el cual al ser hidrolizado por la acción de la serino proteasa libera un compuesto coloreado (p-nitroanilina) el cual puede medirse por espectrofotometría. Las condiciones de cultivo de las células fueron las mismas que para el análisis de la morfología nuclear. La actividad de caspasa 3 fue determinada a partir de la lectura de absorbancia cada hora durante 7 horas a partir del momento en que se adicionó el sustrato (Fig. 2A). En la Figura 2B se muestra el incremento de la actividad de la serino proteasa caspasa 3 a las 6 h de incubación con el sustrato. Los resultados muestran un efecto proapoptótico tanto de TNF- α como de IL-1 β sobre células en etapa de diferenciación eritroide mientras que, al igual que en los ensayos de Hoechst, no indujeron un efecto significativo sobre células indiferenciadas. También puede observarse que la incubación con H en ausencia de TNF- α o de IL-1 β produce un pequeño incremento de la actividad de caspasa 3, sugiriendo que durante el proceso de hemoglobinización podrían estar ocurriendo cambios en vías de señalización celular lo que induciría el leve aumento de la activación de la cascada de caspasas llevando a la apoptosis. Independientemente de esto, el efecto de las citoquinas proinflamatorias es evidente ya que los niveles de actividad de caspasa 3 en células diferenciadas no sólo son significativamente mayores que los observados en las células indiferenciadas, sino que también lo son con respecto los cultivos en ausencia de citoquinas.

A

Morfología nuclear (Hoechst)



B

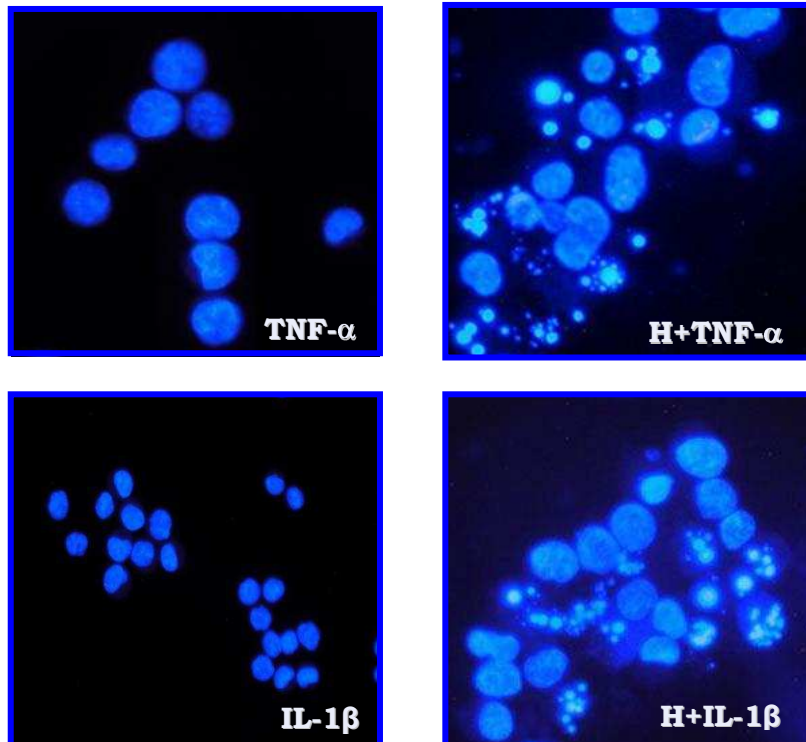


Figura 1: Análisis de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia (Hoechst). Células K562 fueron incubadas en ausencia o en presencia de citoquinas proinflamatorias (TNF- α 30 ng/ml ; IL-1 β 30 U/ml y 100 U/ml) por 48 h. Otro set de células fue inducido a diferenciación eritroide con hemina 30 μ M previo al cultivo en presencia de citoquinas por 48 h. **A)** Las barras representan Media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Las células diferenciadas en presencia de TNF- α e IL-1 β mostraron un aumento significativo (*P<0,05, n=3) del porcentaje de células apoptóticas respecto de las células control (células indiferenciadas en presencia de las mismas citoquinas y células diferenciadas sin el agregado de citoquinas). **B)** Fotografías representativas de ensayos con células indiferenciadas y diferenciadas con hemina (H) en presencia de TNF- α 30 ng/ml e IL-1 β 100 U/ml.

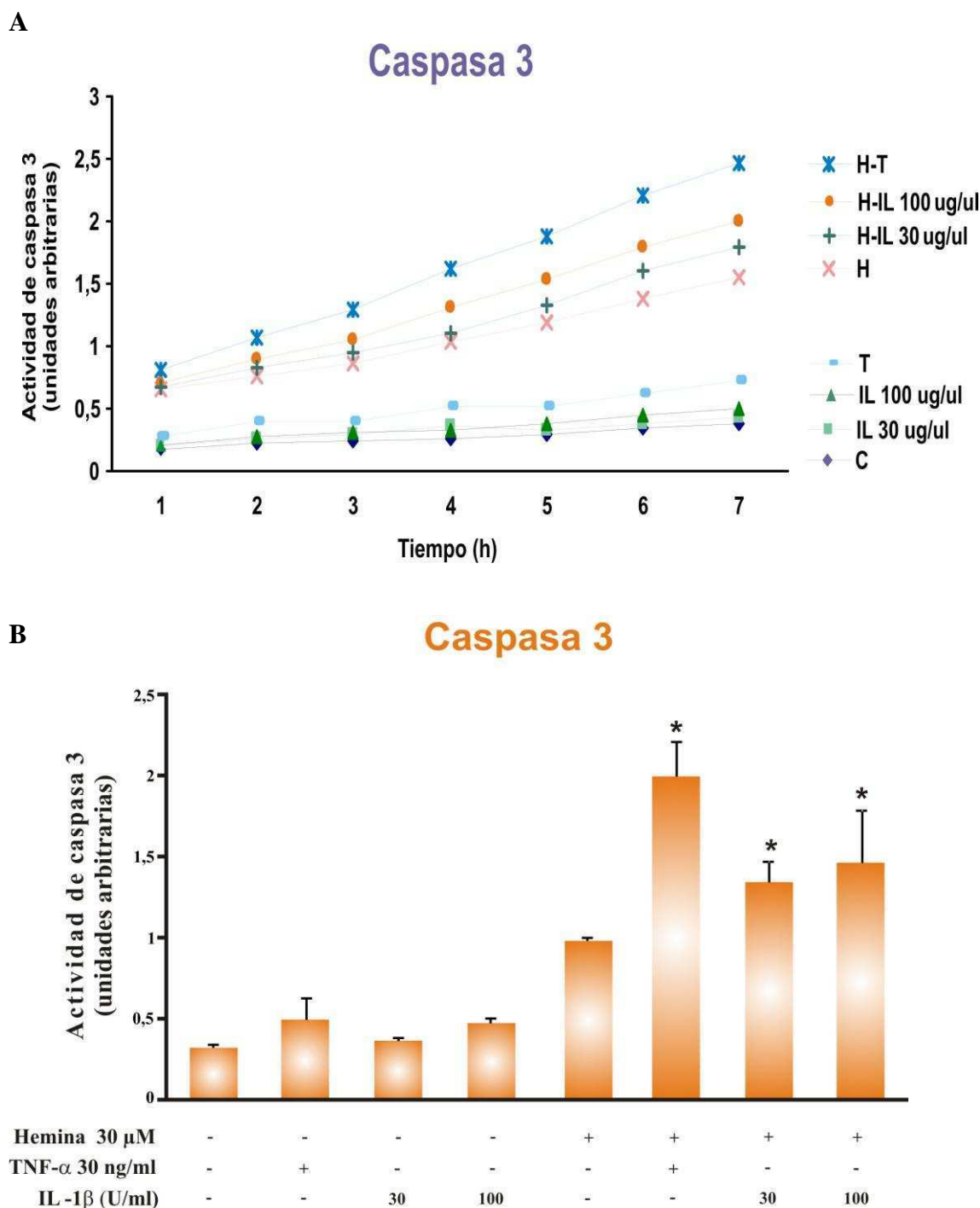


Figura 2: Determinación de la actividad de caspasa 3. Células K562 fueron incubadas sin tratamiento o con el agregado de TNF- α o IL-1 β por 48 h. Otro set de células fue inducido a diferenciación eritroide con hemina en ausencia o en presencia de TNF- α por 48 h. **A)** Cinética de la actividad enzimática medida cada hora durante 7 h luego del agregado del sustrato de la enzima. Resultado representativo de 3 ensayos independientes en los que se obtuvieron resultados similares. **B)** Las barras representando Media \pm SEM de 3 ensayos independientes muestran las diferencias de actividad detectadas a las 6 h de incubación con el sustrato. Las células diferenciadas, en presencia de TNF- α e IL-1 β por 48 h, mostraron un aumento significativo (* $P < 0,05$) de la actividad de caspasa 3 respecto de las células control (células indiferenciadas, células indiferenciadas en presencia de las mismas citoquinas y de las células diferenciadas en ausencia de citoquinas). En ambos gráficos los valores de D.O. obtenidos por lectura a 405 nm fueron relativizados a la concentración de proteínas cuantificada en cada muestra.

I.1.a.iii. Clivaje de la proteína PARP

PARP (*poly-adenosin ribose polymerase*) es una proteína nuclear que protege el ADN. El clivaje de esta proteína es signo de apoptosis debido a que es sustrato de la caspasa 3 activada.

Los resultados obtenidos por *Western blotting* (Fig. 3) avalan lo observado por las técnicas de Hoechst y la medición de la actividad de caspasa 3. Las células indiferenciadas en presencia de las citoquinas (T e IL100) presentaron una banda de clivaje de intensidad similar a la de las células control (C), mientras que la presencia de citoquinas proinflamatorias en cultivos de células diferenciadas (HT e HIL100) produjeron una banda de clivaje de PARP (85 kDa) claramente más intensa. A su vez, en coincidencia con los resultados de fluorescencia y de la medición de la actividad de caspasa 3, la acción de TNF- α sobre células en etapa de diferenciación eritroide produjo una banda de clivaje más pronunciada que la obtenida en presencia de IL-1 β . En presencia de H y ausencia de citoquinas, se observó una banda de clivaje un poco más intensa que en el control lo que, en conjunto con el resultado de caspasa 3, indicaría nuevamente, un pequeño aumento de apoptosis debido al tratamiento de las células con el agente de diferenciación.

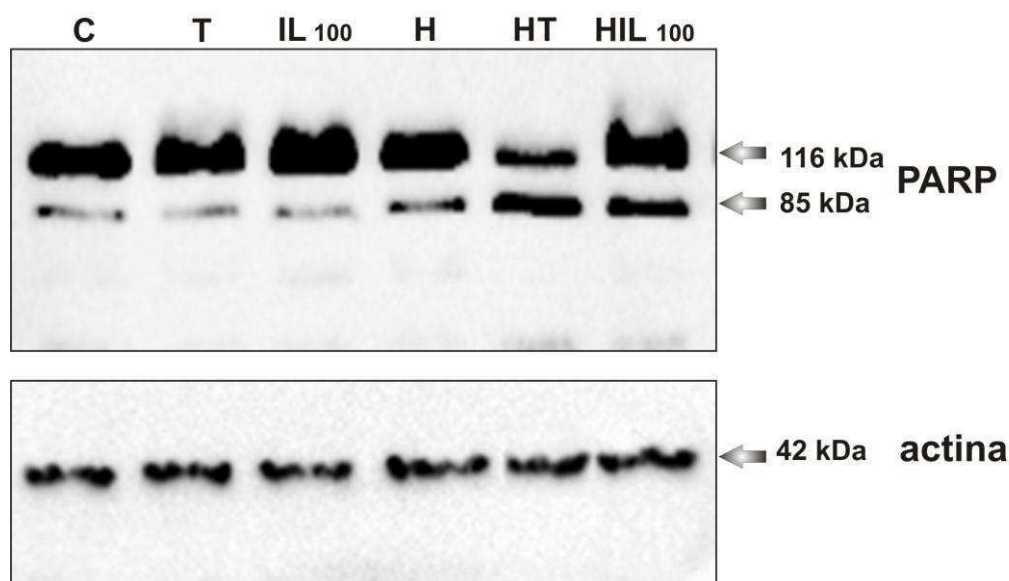


Figura 3: Análisis de proteína PARP. Células K562 fueron incubadas en ausencia (C) o presencia de citoquinas proinflamatorias: TNF- α 30 ng/ml (T) o IL-1 β 100 U/ml (IL100) por 48 h. Otro set de células fue inducido a diferenciación eritroide con hemina 30 μ M (H) y luego cultivado en presencia de citoquinas (HT; HIL100) por 48 h. Lisados celulares (15 μ g para PARP; 40 μ g para actina) fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*. La proteína fue detectada por incubación con anticuerpo primario monoclonal anti PARP y posteriormente, con anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa y revelado por quimioluminiscencia. La detección de la proteína actina fue utilizada como control de carga proteica. El perfil presentado es representativo de 3 ensayos independientes.

1.1.b. Efectos de la diferenciación celular sobre la síntesis y expresión de c-FLIP_L

Se ha reportado que la línea celular K562 posee, en su estado basal, altos niveles de c-FLIP_L, proteína supresora de apoptosis que posee secuencia de homología con procaspasa 8 (ver Introducción). En presencia de esta proteína antiapoptótica, disminuiría la activación de procaspasa 8 y la consecuente cascada de caspasas, a pesar de la presencia de citoquinas proinflamatorias unidas a su receptor en la membrana celular.

Por este motivo, para estudiar mecanismos por los cuales las células K562 inducidas a diferenciación eritroide son más sensibles que las indiferenciadas a la acción de citoquinas proinflamatorias, se investigó la posibilidad de que los niveles de c-FLIP_L se modificaran debido al cambio celular producido en presencia de hemina. Con el fin de evaluar los niveles de ARNm y expresión de la proteína c-FLIP_L en las células indiferenciadas y en aquéllas que se encontraban en etapa de diferenciación eritroide inducida por hemina, se realizaron ensayos de *Real Time PCR*, *Western blotting* y citometría de flujo luego de 24 horas de cultivo celular (Fig. 4).

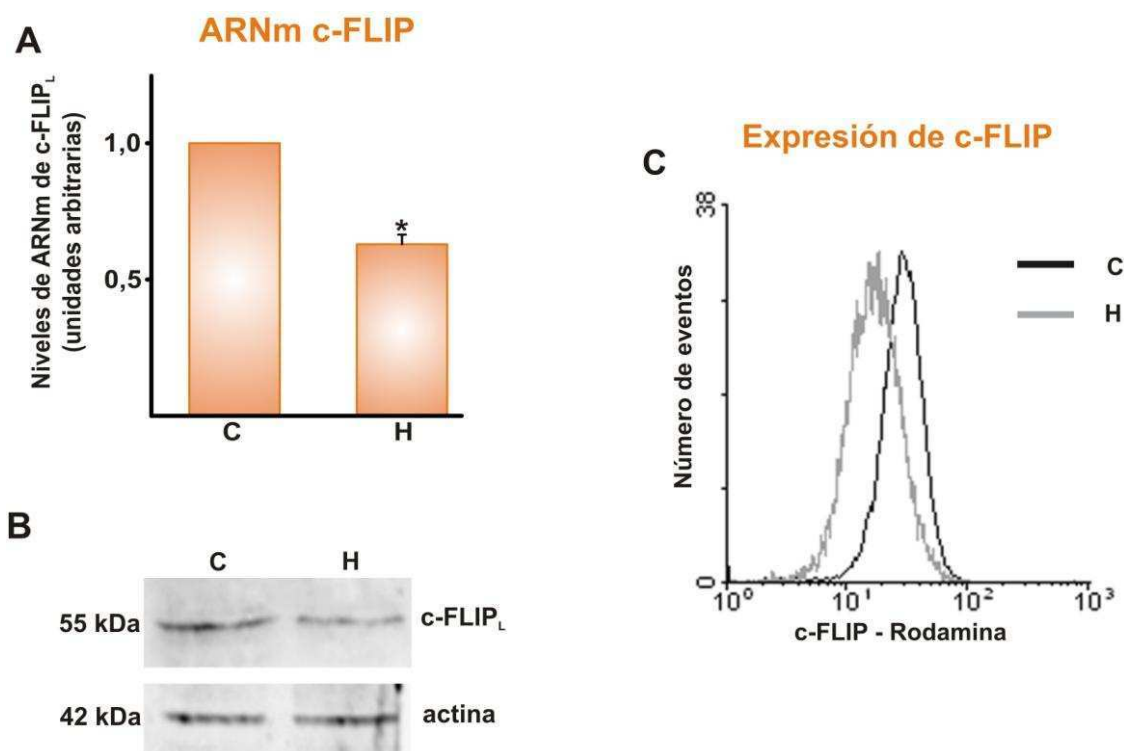


Figura 4: Niveles de ARNm y expresión de la proteína c-FLIP_L. Las células fueron incubadas en ausencia (C) o en presencia de hemina 30 μ M (H). **A**) Luego de 24 h de cultivo se midieron los niveles de ARNm de c-FLIP_L por *Real Time PCR*. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias con respecto al control. Además se determinaron los niveles de expresión de proteína por *Western blotting* (**B**) y por citometría de flujo (**C**) luego de 48 h de cultivo, los niveles de ARNm de c-FLIP disminuyeron significativamente (H vs. C, * $P < 0,01$, $n=5$) luego de la inducción de diferenciación celular con hemina). Estos resultados fueron consistentes con la disminución observada en la expresión de la proteína por *Western blotting* y citometría de flujo (B y C; $n=5$). Los resultados mostrados en B y C son representativos de 5 ensayos independientes.

De acuerdo con la información obtenida en los ensayos de *Real Time PCR*, *Western blotting* y citometría de flujo (Fig. 4), los niveles de c-FLIP_L fueron significativamente más bajos en las células que se encuentran en etapa de diferenciación eritroide (H), lo cual podría ser responsable, al menos en parte, de la modificación en la sensibilidad de estas células a la acción de TNF- α y de IL-1 β .

I.2. ACCIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS SOBRE ERITROCITOS MADUROS

Los resultados presentados en la sección I.1. de este capítulo sobre células inducidas a diferenciación eritroide sugieren una acción proapoptótica de citoquinas proinflamatorias sobre células progenitoras eritroides. Es por eso que se decidió investigar un posible efecto directo de las mismas citoquinas sobre glóbulos rojos maduros (GR).

I.2.a. *Traslocación de fosfatidilserina (PS)*

Una vez determinadas las condiciones de incubación y estandarizada la detección de fosfatidilserina (PS) en la membrana eritrocítica (ver Materiales y Métodos), se procedió al estudio del desarrollo de eriptosis por exposición de GR humanos a mediadores proinflamatorios, como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β . A diferencia del efecto observado sobre la línea K562, estas citoquinas, no indujeron traslocación de PS, detectada por la unión de anexina V-FITC por citometría de flujo, en la membrana del GR cuando las células fueron expuestas por un período de 24 h. Se ensayaron diferentes concentraciones de las citoquinas (TNF- α : 10, 30, 100 ng/ml; IL-1 β : 10, 100, 500 U/ml; IFN- γ : 50, 100, 400, U/ml) siendo las más altas las que se presentan en la figura 5, no encontrándose diferencias significativas en el rango de concentraciones analizadas.

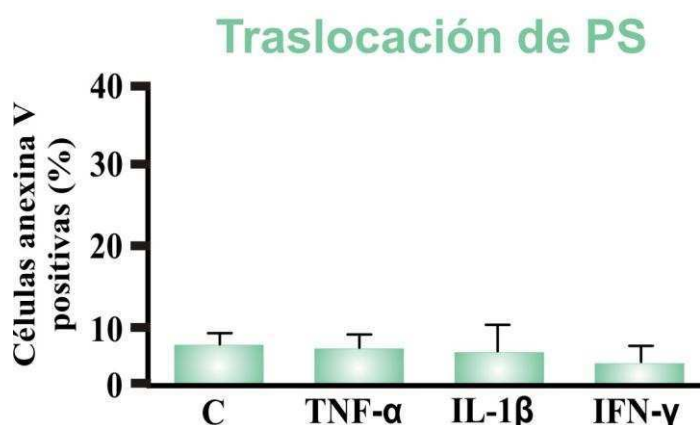


Figura 5: Detección de exposición de PS por acción de citoquinas proinflamatorias sobre eritrocitos. GR incubados durante 24 h a 37 °C en ausencia (C) o en presencia de TNF- α 100 ng/ml (TNF- α), IL-1 β 500 U/ml (IL-1 β) e IFN- γ 400 U/ml (IFN- γ) fueron marcados con anexina V-FITC y analizados por citometría de flujo (n=4). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

El fosfolípido PS es excluido normalmente de la capa lipídica externa de la membrana plasmática, por lo que su exposición hacia el espacio extracelular es un signo característico de la pérdida de asimetría lipídica, señal capaz de ser reconocida por el sistema reticuloendotelial para fagocitar a esas células y eliminarlas de circulación antes de que las mismas se vuelvan necróticas y se lisen, exponiendo todo su contenido celular y generando más inflamación.

Debido a que durante un proceso inflamatorio no sólo se encuentran aumentados los niveles de citoquinas proinflamatorias sino también los de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, se estudió si éstos podrían inducir eritrosis. La incubación con nitritos y peróxido de hidrógeno (24 h), individualmente o en combinación, provocaron traslocación del fosfolípido de membrana (Fig. 6).

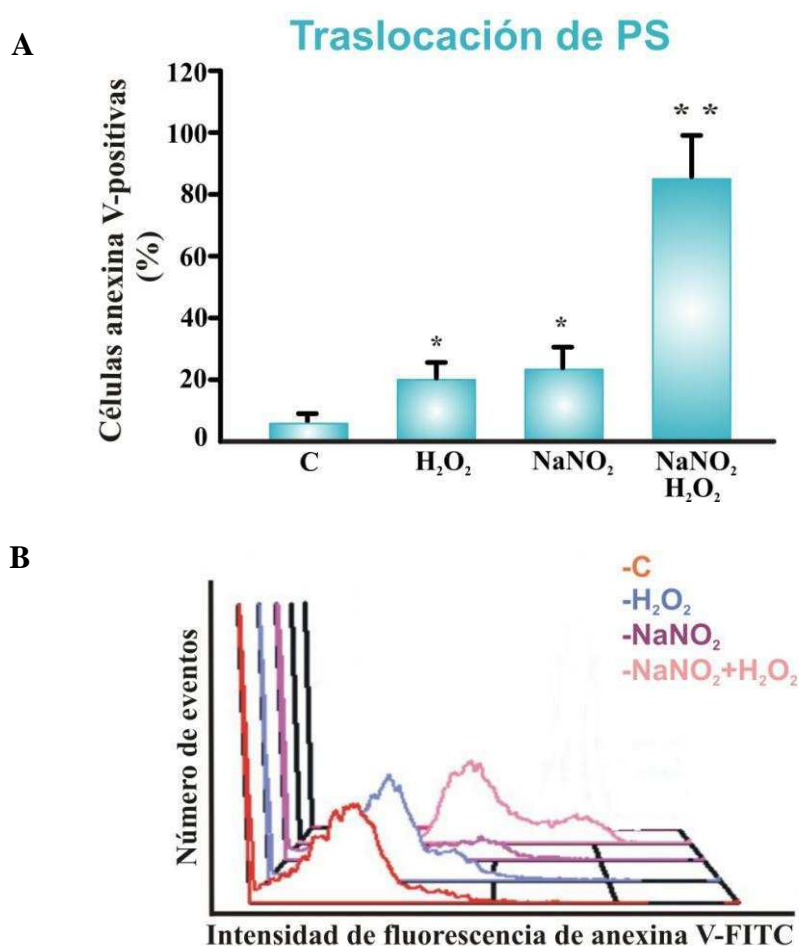


Figura 6: Detección de exposición de PS por acción de agentes oxidantes sobre eritrocitos. **A)** GR incubados durante 24 h a 37 °C en ausencia (C) o en presencia de NaNO₂ 5 mM (NaNO₂), H₂O₂ 1 mM (H₂O₂), NaNO₂ 5 mM+H₂O₂ 1 mM (NaNO₂+H₂O₂), fueron incubados con anexina V-FITC y analizados por citometría de flujo. Los resultados muestran un aumento significativo de la traslocación de PS en la membrana plasmática en presencia de los tratamientos oxidantes, observándose un efecto sinérgico en presencia de ambos reactivos. Diferencias significativas respecto de C (*P<0,05; **P<0,01; n=4). **B)** Histograma representativo de 4 ensayos independientes.

1.2.b. Hemólisis celular

Los niveles de hemólisis fueron evaluados en los sobrenadantes de las incubaciones de eritrocitos con agentes oxidantes (Fig. 7).

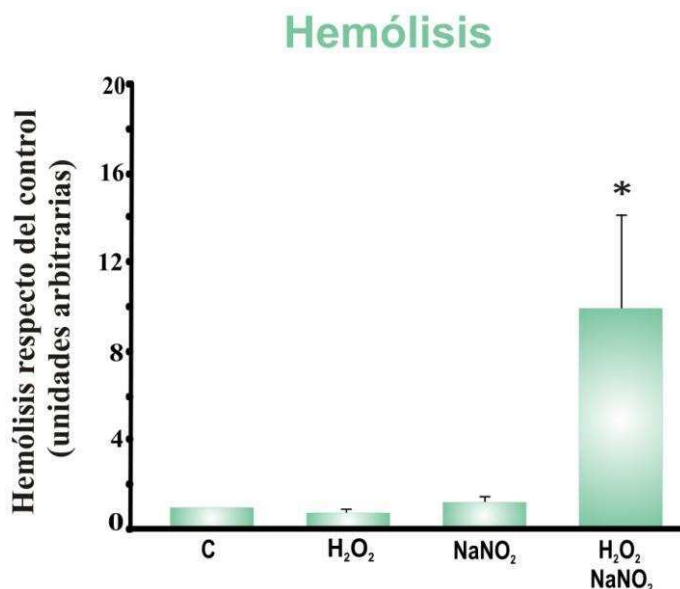


Figura 7: Determinación del grado de hemólisis por acción de agentes oxidantes. GR incubados durante 24 h a 37 °C en ausencia (C) o en presencia de NaNO₂ 5 mM (NaNO₂), H₂O₂ 1 mM (H₂O₂) o NaNO₂ 5 mM+H₂O₂ 1mM (NaNO₂+H₂O₂) fueron centrifugados y la hemoglobina liberada por lisis celular fue determinada en una alícuota de cada sobrenadante por espectrofotometría a 405 nm. Los resultados muestran que sólo en presencia de ambos agentes oxidantes los niveles de hemólisis aumentaron significativamente. Diferencia significativa respecto de C (*P<0,05; n=4).

La incubación por 24 h con ambos agentes oxidantes indujo un aumento de los niveles de hemólisis de eritrocitos humanos. Este resultado puede deberse a que en los ensayos *in vitro* no se encuentra presente el sistema retículoendotelial, encargado de reconocer a las células dañadas y eliminarlas de circulación. Por este motivo los eritrocitos culminan su transformación inducida por los agentes oxidantes hemolisándose y liberando sus componentes al medio, entre ellos la hemoglobina detectada en este ensayo.

DISCUSIÓN

Los procesos inflamatorios, frecuentemente asociados a anemia de enfermedades crónicas, podrían cumplir un rol en la inhibición de la eritropoyesis y la resistencia al tratamiento con eritropoyetina recombinante humana. La homeostasis de la eritropoyesis requiere un balance entre proliferación, diferenciación y apoptosis celular. La existencia de señales intracelulares comunes entre los procesos que regulan la eritropoyesis y la respuesta inflamatoria sugiere que la desregulación de un sistema podría explicar la disminución de la función del otro.

Con el objeto de estudiar el efecto de citoquinas proinflamatorias sobre células en etapa de diferenciación eritroide, TNF- α o IL-1 β fueron agregadas a cultivos celulares de la línea eritroleucémica K562 en presencia o ausencia de un inductor de diferenciación eritroide. En nuestro modelo experimental de progenitores eritroides, la incubación con hemina no afectó la viabilidad celular (Materiales y Métodos Fig. V), pero en cambio, sensibilizó a las células K562 a la acción de las citoquinas proinflamatorias ensayadas. Bajo estas condiciones, tanto TNF- α como IL-1 β produjeron un incremento significativo en los niveles de apoptosis. Dicha sensibilización se debe a cambios celulares producidos durante el proceso de diferenciación, ya que las citoquinas *per se* no produjeron modificaciones en los niveles de apoptosis de las células indiferenciadas (Fig. 1, 2 y 3).

Diferentes efectos biológicos han sido atribuidos a TNF- α debido a su habilidad para activar dos caminos de señalización simultáneamente, uno que conduce a apoptosis y otro que induce la activación del factor antiapoptótico NF- κ B. El balance entre ambos estaría regulado por factores tales como el estadio del ciclo y el grado de proliferación o diferenciación celular, así como por factores ambientales, y conduciría a la supervivencia o a la muerte celular. Esto explicaría el aumento de la sensibilidad a la apoptosis provocada por TNF- α que observamos cuando las células K562 son inducidas a diferenciación eritroide. Los resultados permiten sugerir que la sensibilidad de las células progenitoras eritroides fisiológicas a las citoquinas proinflamatorias podría depender también de su estadio de diferenciación.

Debido a que la apoptosis es un proceso altamente regulado, se conocen varias moléculas que actúan como inhibidores de la vía intrínseca o extrínseca. A nivel de la vía extrínseca se encuentra la proteína antiapoptótica c-FLIP, la cual posee dos variantes: c-FLIP_S y c-FLIP_L. La variante larga, c-FLIP_L, presenta secuencia de homología con procaspasa 8, lo que le permite formar parte del complejo de muerte DISC al activarse receptores de muerte, pero no posee la secuencia de autoclivaje, de forma que no puede convertirse en una caspasa

activa. De esta manera actuaría como un inhibidor de señales extracelulares proapoptóticas (Peter, 2004). En el presente trabajo, el elevado nivel constitutivo de ARNm de c-FLIP, expresado en la línea celular K562, disminuyó en respuesta a la inducción de diferenciación eritroide con hemina (Fig. 4), sugiriendo que la sensibilización celular a la acción de citoquinas proinflamatorias podría estar relacionada con la disminución de dicha proteína antiapoptótica. Existe evidencia de que c-FLIP juega un rol central en la regulación de la apoptosis mediada por receptores de muerte. En concordancia con los resultados obtenidos, han sido reportados otros trabajos en los cuales se demostró la influencia de la modulación de los niveles de c-FLIP sobre la sensibilidad celular a la acción de estímulos mediados por receptores de muerte (Perez y White, 2003; Kang *et al*, 2004; Peter, 2004; Rippo *et al*, 2004). Sin embargo, todavía no han sido totalmente demostrado cuáles son los niveles de c-FLIP requeridos para proteger a las células de la apoptosis o cuál es la proporción entre c-FLIP y caspasa 8 que determina la resistencia o la sensibilidad celular (Kreuger *et al*, 2001).

Poca información se conoce acerca de la relación compleja que existe entre maduración y sensibilidad celular a un estímulo proapoptótico. Se sabe que la perturbación del ciclo celular sensibiliza a las células a sufrir apoptosis. Además existen trabajos donde se observa la modulación de los niveles de c-FLIP durante el ciclo de células T, con un pico durante el estadio G1 seguido de una disminución en S-G2/M (Algeciras-Schimmich *et al*, 1999). En concordancia, Hietakangas y colaboradores (2003) han encontrado que, bajo diferenciación eritroide con hemina, células de la línea K562 pierden su resistencia a los efectos de TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) y que dicho efecto sería explicado por un mecanismo independiente de mitocondrias pero dependiente de la modulación de los niveles de c-FLIP. Sin embargo, en el mismo trabajo afirman que las células K562 en etapa de diferenciación eritroide, a pesar de ser sensibles a la acción de TRAIL, mantienen su resistencia a la acción de TNF- α (Hietakangas *et al*, 2003). No se pueden discutir esos resultados en comparación con los del presente trabajo porque los autores no mostraron datos ni indicaron las condiciones de los ensayos que llevaron a esa afirmación.

En conclusión, los resultados hallados demuestran que la diferenciación eritroide, inducida por hemina, aumenta la sensibilidad de las células K562 a la acción de TNF- α e IL-1 β , sugiriendo que el proceso de diferenciación celular podría desregular el balance entre señales de crecimiento y muerte celular programada inducida por citoquinas proinflamatorias (Vittori *et al*, 2010). Los niveles de c-FLIP junto con el proceso de diferenciación eritroide, parecerían ser críticos en cuanto a la protección celular frente a la apoptosis y el incremento de la sensibilidad de las células a la muerte celular mediada por la acción de TNF- α e IL-1 β .

Este mecanismo regulatorio que asocia el proceso de diferenciación eritroide con cambios en la sensibilidad a citoquinas proinflamatorias podría contribuir a comprender la patogénesis de algunas enfermedades hematológicas, particularmente aquellas relacionadas con procesos inflamatorios e inmunoregulación. El conocimiento de la existencia de una desregulación del balance estricto entre la vida y la muerte celular debido a diferentes condiciones celulares debería ser tenido en cuenta para diseñar nuevas estrategias en terapias farmacológicas.

Los resultados observados sobre las células K562 diferenciadas nos llevaron a pensar la posibilidad de que las citoquinas proinflamatorias pudieran tener un efecto proeriptótico sobre los eritrocitos maduros. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que no hubo aumento de traslocación de PS en la membrana de glóbulos rojos incubados con TNF- α , IL-1 β o IFN- γ (Fig. 5).

Peroxinitrito es un compuesto formado por la reacción entre peróxido de hidrógeno y nitrito. Por su potente capacidad de oxidación y nitrosilación, este compuesto ha sido propuesto como un mediador importante en la injuria y disfunción de los tejidos inducida por procesos inflamatorios, y es considerado la especie nitrosilante más eficiente de importancia biológica (Szabó *et al*, 2010). Por estas razones, y teniendo en cuenta que durante procesos inflamatorios crónicos los niveles de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno y compuestos como los nitritos se encuentran elevados, decidimos evaluar su efecto sobre eritrocitos maduros. Estos compuestos indujeron el aumento de la traslocación de PS y también de los niveles de hemólisis (Fig. 6 y 7). Debe ser tenido en cuenta que la exposición de PS sobre la superficie celular es una señal para que los eritrocitos sean removidos de circulación por acción de los macrófagos. De esta manera, por acción de agentes oxidantes *in vivo*, los glóbulos rojos eriptóticos serían eliminados por el sistema reticuloendotelial. En ausencia de estas células, en el presente modelo *in vitro*, las células dañadas culminan sufriendo hemólisis.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE ERIPTOSIS**II.1. SIGNOS DE ERIPTOSIS**

Como se mostró en el capítulo I (Fig. 6), los agentes oxidantes inducen exposición de fosfatidilserina (PS) en la membrana del glóbulo rojo. Se ha reportado que la entrada masiva de calcio inducida por el ionóforo A23187 también induce este signo de eriptosis (Bratosin *et al*, 2001).

Para comenzar a estudiar los posibles mecanismos involucrados en la autodestrucción prematura de los eritrocitos, y determinar si el patrón de modificaciones es similar independientemente del factor desencadenante del proceso, se analizaron cambios morfológicos y bioquímicos en el glóbulo rojo expuesto a dos condiciones proeriptóticas: aumento de calcio intracelular y exposición celular a agentes oxidantes.

II.1.a. Externalización de fosfatidilserina

Se observó una inducción similar de la exposición de PS en eritrocitos humanos tanto por ingreso masivo de calcio estimulado por el ionóforo A23187 (ICa) como por la acción de los agentes oxidantes (NaNO_2 y H_2O_2) (Fig. 8).

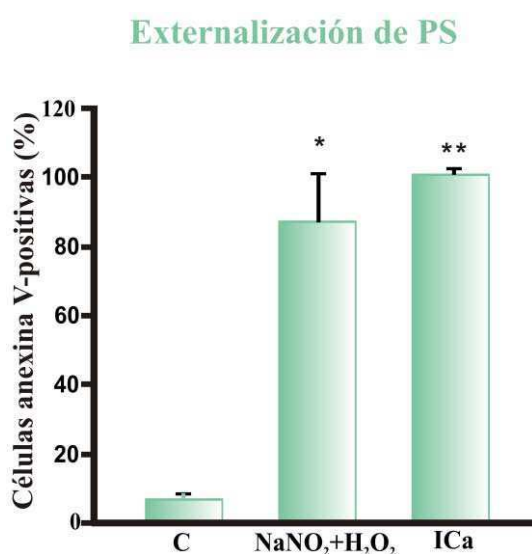


Figura 8: Detección de exposición de PS por acción de agentes oxidantes o ICa. GR incubados durante 24 h a 37°C en ausencia (C) o en presencia de NaNO_2 5 mM + H_2O_2 1 mM ($\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$) o A23187 0,15 μM (ICa) fueron incubados con anexina V-FITC y analizados por citometría de flujo. Los resultados muestran un aumento del porcentaje de células anexina V-positivas. Diferencias significativas respecto de C; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (n=4).

II.1.b. Contenido de calcio intracelular

Continuando con nuestro objetivo de estudiar los signos de eriptosis característicos, se desarrollaron ensayos evaluados por citometría de flujo para cuantificar el calcio intracelular y estudiar su implicancia en las vías de señalización desencadenadas. Los resultados indican que la eriptosis inducida por factores prooxidantes como peróxido de hidrógeno y nitritos, bajo las condiciones empleadas, involucra un aumento del calcio intracelular (Fig. 9).

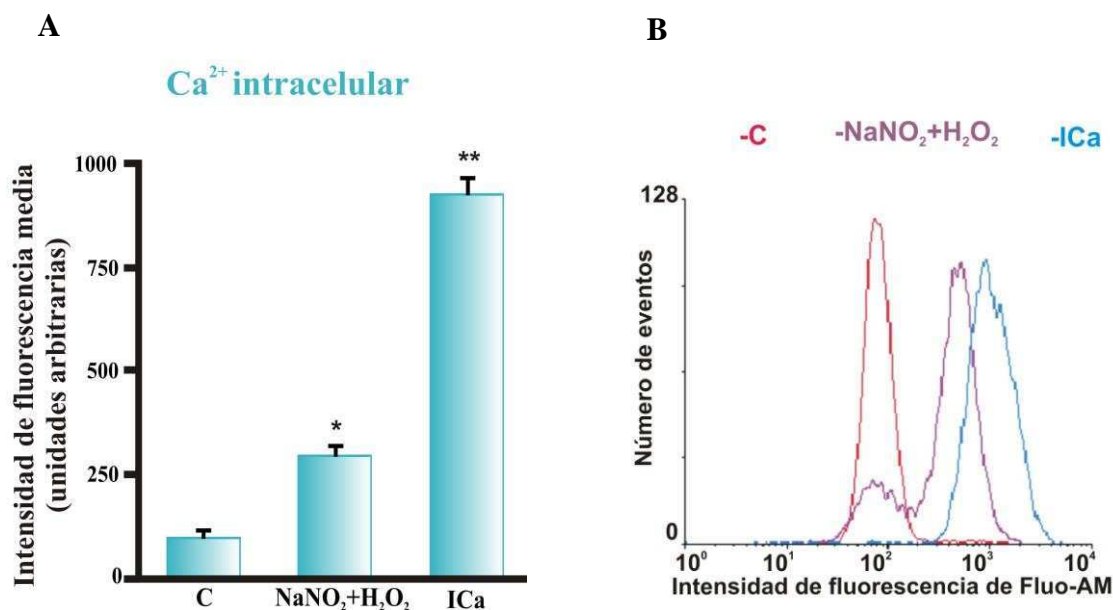
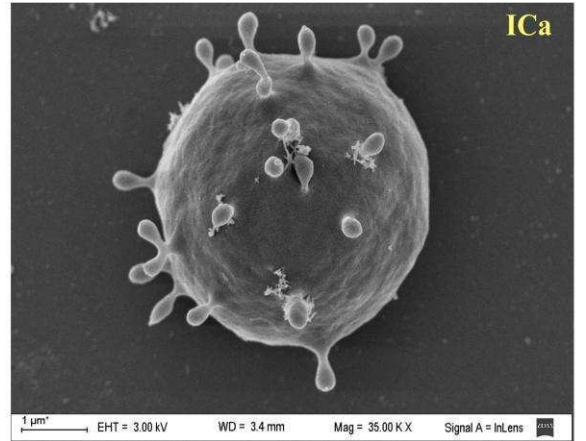
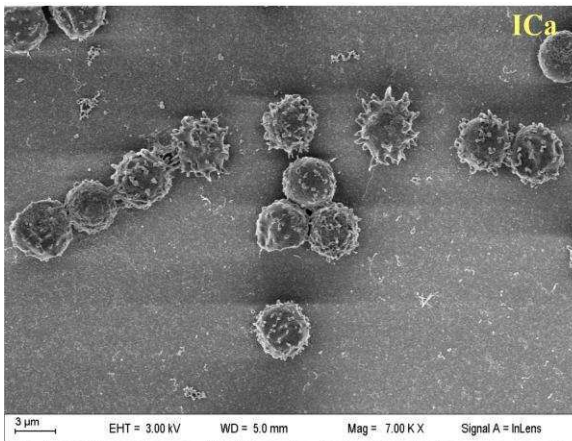
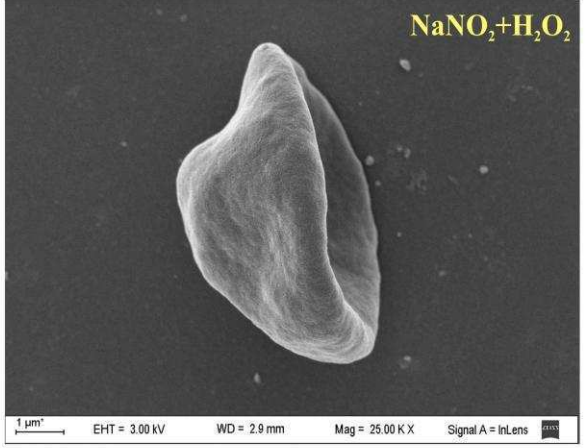
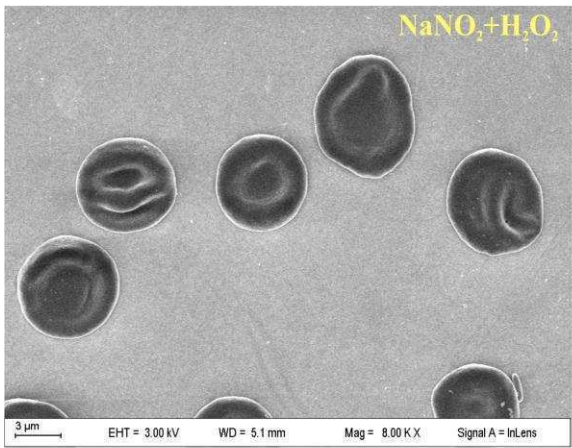
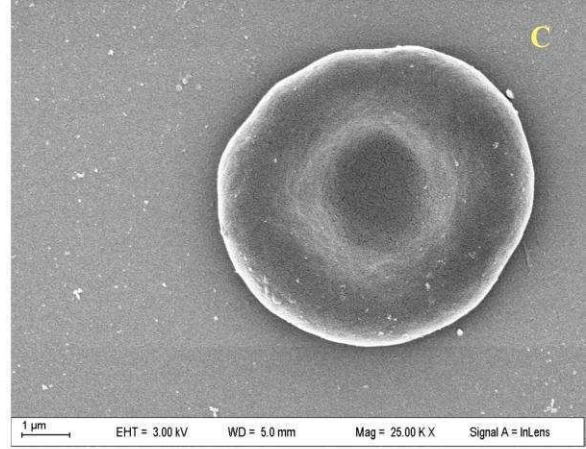
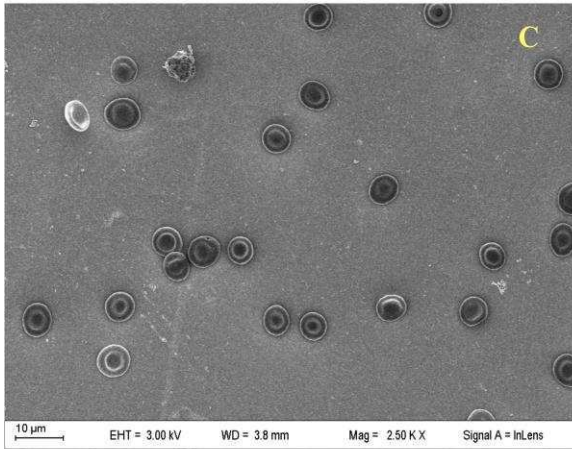


Figura 9: Cuantificación de Ca²⁺ intracelular por citometría de flujo. A) GR incubados durante 24 h a 37 °C en ausencia (C) o en presencia de NaNO₂ 5 mM + H₂O₂ 1 mM (NaNO₂+H₂O₂) o A23187 0,15 μM (ICa) fueron marcados con FLUO-4AM (Cf: 2 mM) y analizados por citometría de flujo. Los resultados muestran un aumento del calcio intracelular por ambos inductores de eriptosis. Diferencias significativas respecto de C; *P<0,05; **P<0,01 (n=4). B) Histograma representativo de 4 ensayos independientes.

II.1.c. Morfología eritrocitaria

Se realizaron ensayos para determinar la morfología de los eritrocitos por microscopía electrónica. Los resultados mostraron que tanto en presencia de ionóforo de calcio como de NaNO₂ y H₂O₂, los glóbulos rojos sufren modificaciones estructurales que afectan su morfología. Sin embargo, los cambios morfológicos observados en cada modelo fueron completamente diferentes, observándose esferocitos con microvesículas o estomatocitos, respectivamente (Fig. 10).

A



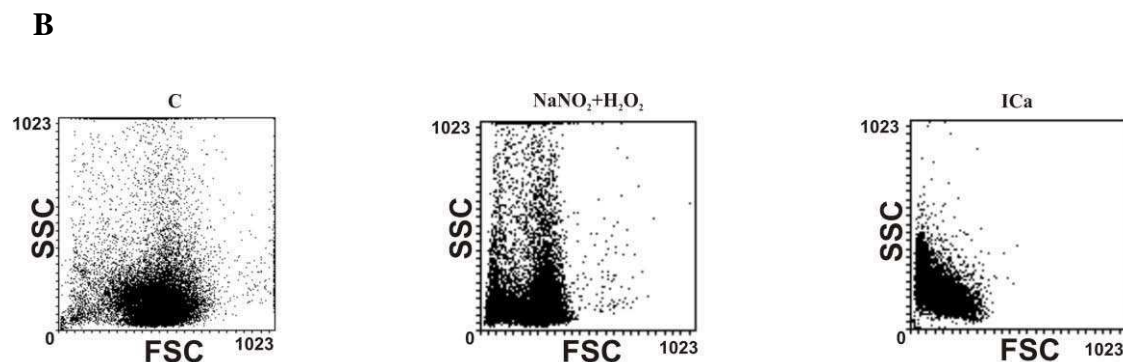


Figura 10: Análisis de la morfología celular. GR lavados fueron incubados durante 4 h a 37 °C en ausencia (C) o en presencia de NaNO_2 5 mM + H_2O_2 1mM ($\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$) o A23187 0,15 μM (ICa). **A)** Microscopía electrónica de barrido: el aumento en el cual fueron tomadas las fotografías está indicado al pie de cada una de ellas. **B)** Análisis de la morfología celular por citometría de flujo. Los gráficos muestran el tamaño de las células (FSC) vs. la complejidad de las mismas (SSC). *Dot plots* representativos de 3 ensayos independientes.

El análisis de la morfología eritrocitaria por citometría de flujo muestra una disminución en el tamaño de los eritrocitos, principalmente en el tratamiento con ICa, y un aumento en la complejidad de las células bajo ambos tratamientos (Fig. 10B).

Debido a las diferencias en los cambios morfológicos observados en los eritrocitos, dependientes del estímulo de eriptosis, a pesar de haber sido detectado en ambos casos un aumento del calcio intracelular, y siguiendo con la hipótesis de que los mecanismos implicados en cada modelo experimental podrían diferir a pesar de conducir ambos a la muerte celular prematura, se avanzó en el análisis estudiando el estado de óxido-reducción celular, cambios a nivel de la membrana plasmática, dependencia de la entrada de calcio en el proceso y cambios a nivel enzimático.

II.2. Estado celular de óxido-reducción

El estado redox en la célula indica el balance entre las especies oxidadas y las reducidas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un conjunto de moléculas reactivas, las que producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno, pueden estar involucradas en distintos tipos de procesos de oxidación y reducción. Por consiguiente, un aumento en la cantidad de ROS refleja un estado redox intracelular más oxidante. El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido que actúa como una de las principales defensas

antioxidantes presente en eritrocitos que mantiene reducidos los grupos tioles de las proteínas celulares. Durante este proceso el compuesto se oxida (GSSG) pero en condiciones normales vuelve a su forma reducida rápidamente gracias a la enzima glutathion reductasa. En condiciones de estrés oxidativo, este tripéptido es oxidado y, cuando el desbalance oxidativo es importante, la enzima glutathion reductasa no consigue mantener el equilibrio en su forma reducida. Por estos motivos, la disminución de GSH en los eritrocitos es también una medida de estrés oxidativo.

Ya que es sabido que el peroxinitrito, formado por la reacción de peróxido de hidrógeno y nitrito, es un anión de alto poder oxidante que posee varios blancos celulares, no es extraño encontrar un incremento significativo en la concentración de ROS en eritrocitos incubados con $\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Fig.11A y B). En coincidencia, la concentración de GSH disminuyó significativamente respecto del control (Fig. 11C). Sin embargo, no se observaron modificaciones en los niveles de ROS (Fig. 11A y B) y GSH (Fig. 11C) en el modelo de ingreso masivo de calcio. Este resultado sugiere que si bien el desbalance en el estado de óxido-reducción conduce a un aumento de los niveles de calcio intracelular, ambas alteraciones no estarían relacionadas directamente, debido a que el aumento de calcio intracelular *per se* (ICa) no indujo cambios en los niveles de ROS y GSH.

II.3. Modificaciones a nivel de membrana plasmática

Debido a las diferencias en los cambios morfológicos de los eritrocitos observadas entre ambos tratamientos, se decidió investigar si estos cambios se relacionaban con modificaciones a nivel de la membrana plasmática.

Como era esperado, el ambiente oxidativo generado por la presencia de peróxido de hidrógeno y nitrito de sodio incrementó los niveles de peroxidación lipídica (Fig. 12).

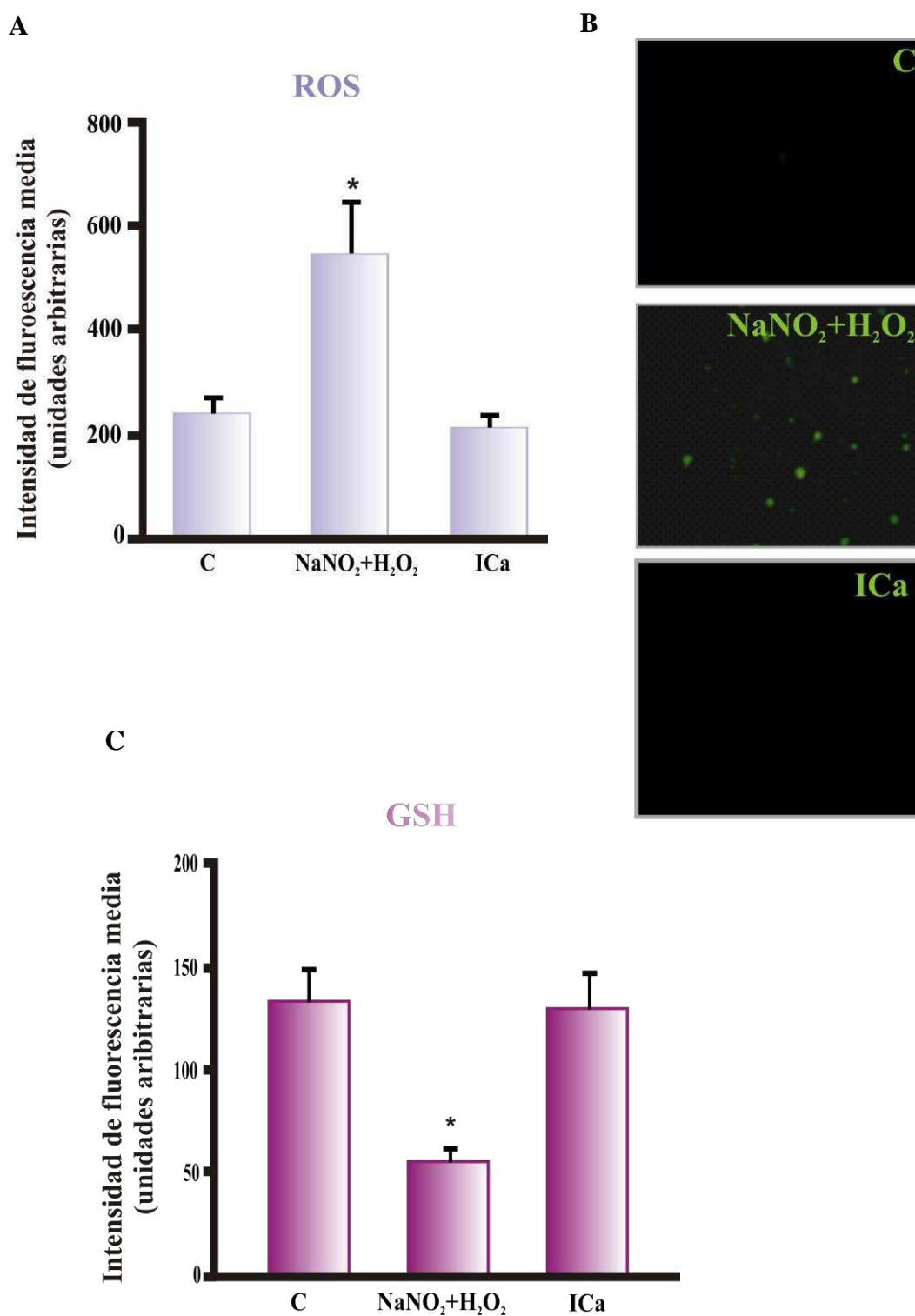


Figura 11: Medición de los niveles de ROS y GSH por citometría de flujo. GR fueron incubados durante 4 h a 37 °C en ausencia (C) o en presencia de NaNO₂ 5 mM y H₂O₂ 1mM (NaNO₂+H₂O₂) o A23187 0,15 μM (ICa). **A)** ROS: Reacción con DCFH-DA 20 mM durante 15 min en estufa a 37 °C y 5% de presión de CO₂. Los resultados muestran un aumento de ROS en presencia de agentes oxidantes. **B)** Fotos de microscopía de fluorescencia luego de incubar los eritrocitos con la sonda fluorescente DCFH-DA. **C)** GSH: Incubación con Mercury Orange 100 μM por 3 min a 0 °C. Los resultados muestran disminución en los niveles de GSH intracelular en presencia de agentes oxidantes. Diferencias significativas respecto de C; *P<0,05 (n=3).

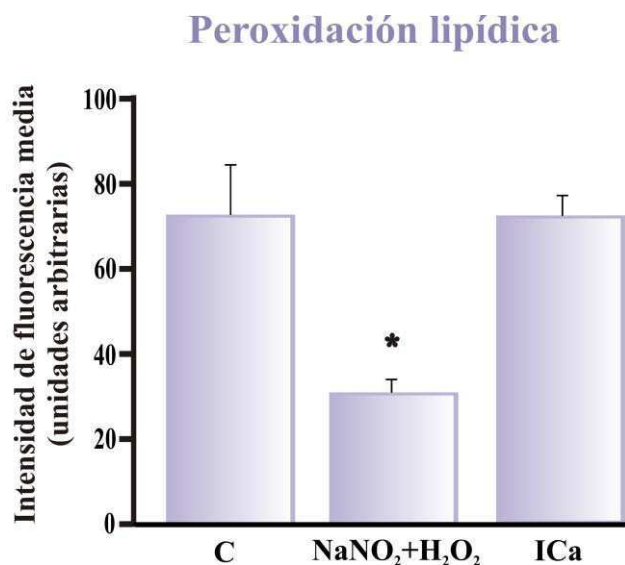


Figura 12: Oxidación de lípidos de membrana. Luego de incubar los eritrocitos con NaNO₂+H₂O₂ o ICa por 4 h, se detectó peroxidación lipídica por citometría de flujo como la disminución de intensidad de fluorescencia debido a la presencia de radicales peróxidos, usando 2,5 μM del sensor de lipoperoxidación BODIPY 665/676. La intensidad de fluorescencia disminuyó (aumento de lipoperoxidación) en presencia de agentes oxidantes. Diferencias significativas respecto de C; *P<0,05 (n=4).

La proteína transmembrana banda 3 es un canal de intercambio aniónico de gran importancia en el eritrocito, tanto a nivel funcional como estructural, participando de la red proteica que le confiere a la célula la plasticidad que la caracteriza, permitiendo su adaptación a los cambios de tamaño de los vasos sanguíneos por los cuales debe circular. En los tratamientos con agentes oxidantes no se observaron modificaciones cuantitativas (Fig. 13A y B) ni degradación de esta proteína de membrana plasmática (Fig. 13C). Sin embargo, se detectó que esta proteína se encontraba fosforilada luego de 10 min de tratamiento, característica similar a la que presentan eritrocitos senescentes (Fig. 13C).

Respecto de los eritrocitos tratados con A23187/Ca²⁺, se observó una disminución de la unión de eosin-5-maleimida a banda 3 en la membrana plasmática (Fig. 13A). Este resultado refleja una deficiencia de dicha proteína, la cual podría ser causada por pérdida de membrana celular. Este hecho podría ser explicado por el proceso de formación de vesículas que se genera en los eritrocitos bajo este tratamiento, ya que también observamos una disminución en los niveles de otras proteínas de membrana tales como: acuaporina 1 y glicoforina A (Tabla I).

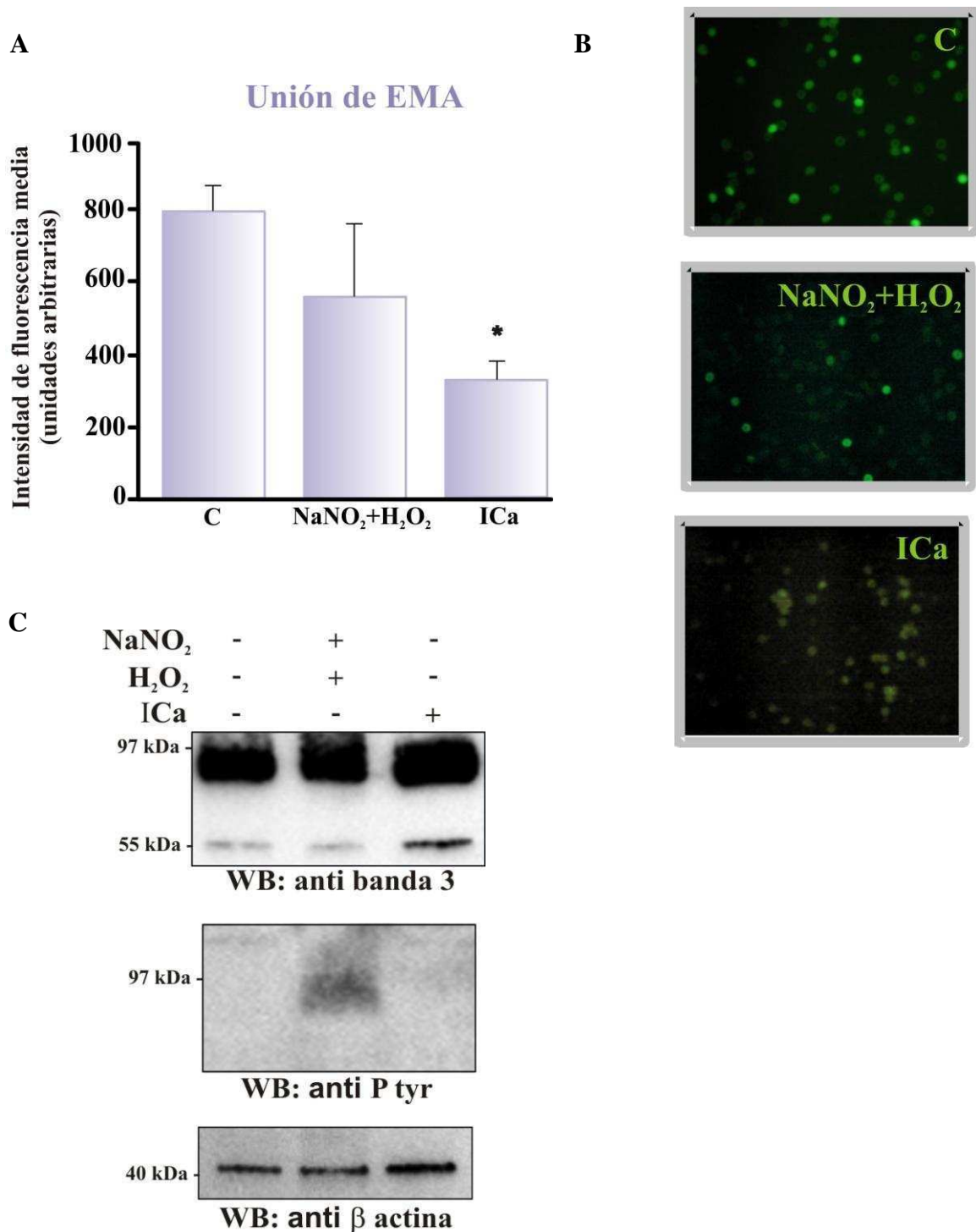


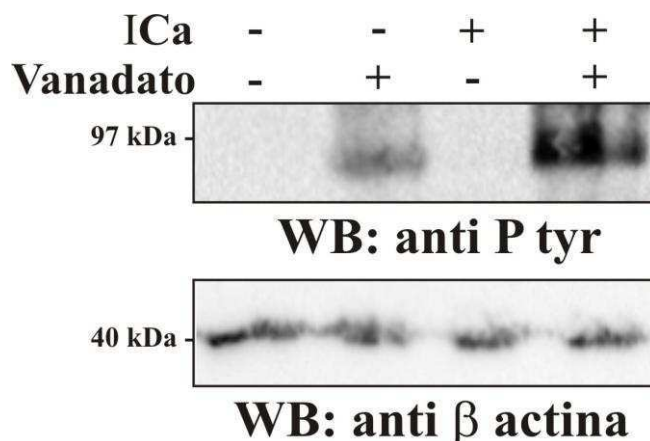
Figura 13: Alteraciones de banda 3. **A)** Se indujo eriptosis con NaNO₂ 5 mM y H₂O₂ 1 mM (NaNO₂+H₂O₂) o A23187 0,15 μM (ICa) por 24 h. Luego se incubaron los eritrocitos con 0,5 mg/ml de eosin-5-maleimida (EMA) por 15 min a temperatura ambiente y se analizaron por citometría de flujo. La fluorescencia de EMA unida a banda 3 en membrana fue significativamente menor en eritrocitos tratados con A23187 con respecto a los controles; ICa vs. C, *P<0,05 (n=3). **B)** Fotos de eritrocitos preparados para citometría. **C)** Después de inducir eriptosis por 24 h (estudio de degradación de proteínas) o por 10 min (detección de proteínas fosforiladas) banda 3, proteínas fosforiladas y β-actina fueron detectadas por SDS-PAGE y Western blotting. Resultado representativo de 3 ensayos independientes.

Proteína de membrana	Control	NaNO ₂ +H ₂ O ₂	ICa	
Acuaporina 1	55.1±6.8	60.0±12.3	36.2±6.6	ICa VS. C, P<0.05, n=4
Glicoforina A	780±5.8	800±4.5	620±4.8	ICa vs. C, P<0.05 n=3

Tabla I: Pérdida de proteínas de membrana durante el proceso de eriptosis. Eriptosis fue inducida mediante NaNO₂+H₂O₂ o ICa por 24 h. Las proteínas acuaporina 1 y glicoforina A fueron detectadas por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos. Los resultados se expresan como media geométrica de la fluorescencia detectada ± SEM de n experiencias indicadas en cada caso.

A diferencia del tratamiento oxidativo, en el modelo de sobrecarga de calcio no se produjo fosforilación de banda 3. Sin embargo, la preincubación con o-vanadato de sodio, previa al tratamiento con A23187, mostró a la banda 3 fosforilada en un nivel significativamente superior al observado en los eritrocitos control incubados con el mismo inhibidor de fosfatasas (Fig. 14A). Estos resultados sugieren un aumento de la actividad de fosfatasas en dicho modelo. Para analizar esta hipótesis, se determinó la actividad de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), enzima que, asociada a banda 3 en la membrana de eritrocitos humanos, previene la fosforilación de la misma en condiciones fisiológicas. La actividad específica de PTP1B fue significativamente mayor en inmunoprecipitados provenientes de eritrocitos tratados con A23187 con respecto al control y a aquéllos sometidos al tratamiento oxidativo (Fig. 14B). Más aún, este incremento de actividad no fue observado en eritrocitos incubados en presencia de calpeptina, un inhibidor de la cisteína proteasa calpaína, sugiriendo que esta última podría estar involucrada en las vías de señalización desencadenadas por acumulación de calcio intracelular en la célula. De hecho, la degradación de banda 3, demostrada por el incremento de una banda de menor peso molecular (alrededor de 60 kDa), observado por *Western blotting* (Fig. 13B), apoya la idea de que la activación de calpaína, la cual tiene a banda 3 entre sus sustratos, podría participar en el modelo de sobrecarga celular de calcio.

A



B

Actividad de PTP 1B

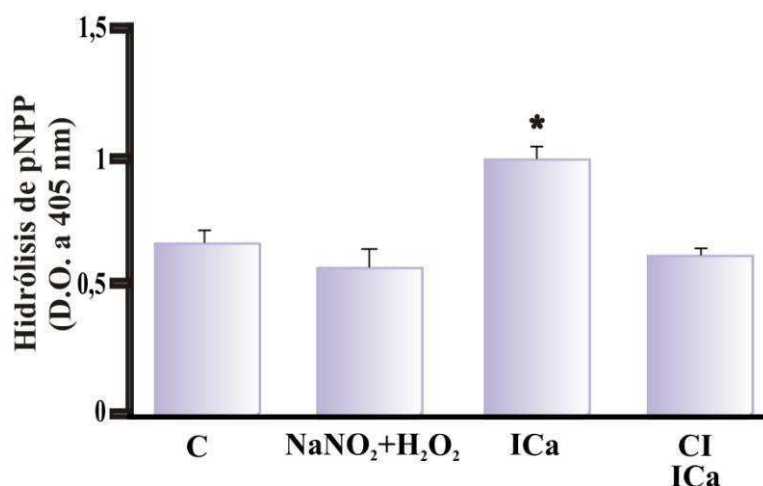


Figura 14: Rol de PTP1B. A) Después de preincubar a las células 2 h con o-vanadato de sodio 0,15 mM, se indujo eriptosis con A23187 0,15 μ M por 10 min. Las proteínas de membrana, fosforiladas en tirosina, fueron detectadas por *SDS-PAGE* y *Western blotting*. Los resultados muestran la presencia de banda 3 fosforilada en presencia de ICa sólo cuando los eritrocitos fueron preincubados con el inhibidor de fosfatasa. La figura A es representativa de 3 ensayos independientes con resultados similares. B) Después de preincubar los eritrocitos con el inhibidor de calpaína calpeptina 1 10 μ M (CI) se indujo eriptosis por 10 min con ICa y alícuotas de membranas celulares fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo monoclonal anti PTP1B. La actividad de fosfatasa fue determinada mediante la hidrólisis de p-NPP y expresada como densidad óptica del producto a 415 nm. Los resultados muestran un aumento de la actividad de PTP1B inducida por la entrada masiva de calcio (* $P < 0,05$ con respecto a C, $n=3$). Esa diferencia es impedida en presencia del inhibidor de calpaína (CI).

En ensayos de inmunodetección con anticuerpo anti hemoglobina se observó una fuerte unión de la misma a proteínas de membrana plasmática en eritrocitos incubados con agentes oxidantes. Este patrón fue similar al observado por *Western blotting* de membranas

aisladas de eritrocitos reveladas con anticuerpo anti tirosina nitrosilada, sugiriendo que la hemoglobina podría ser la proteína nitrosilada más abundante en la membrana luego del tratamiento oxidativo (Fig. 15).

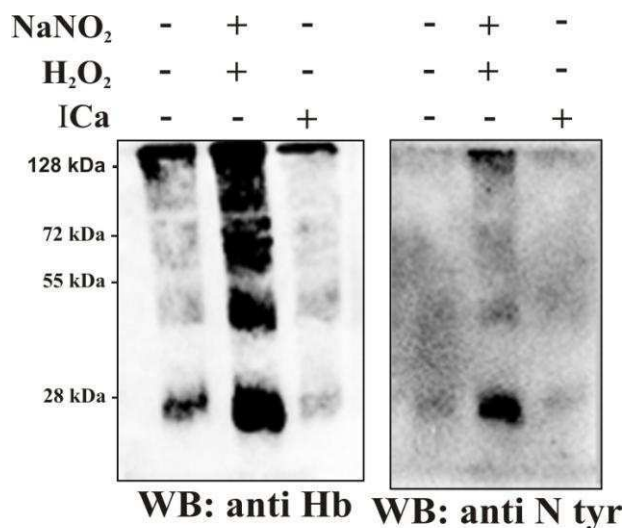


Figura 15: Unión de hemoglobina a membrana plasmática y nitrosilación de proteínas. Eritrocitos fueron incubados con NaNO₂ 5 mM + H₂O₂ 1 mM (NaNO₂+H₂O₂) o A23187 0,15 μM (ICa) por 24 h. La interacción entre hemoglobina y proteínas de membrana fue detectada por *immunoblotting* en membranas extraídas de eritrocitos luego de la inducción a eriptosis. Se muestra una comparación entre los resultados obtenidos en membranas reveladas con anticuerpos anti hemoglobina y anti nitrotirosina. Figura representativa de 3 ensayos independientes.

II.4. ROL DEL CALCIO INTRACELULAR EN LA EXTERNALIZACIÓN DE FOSFATIDILSERINA

Como ya fuera reportado en la sección II.1, los eritrocitos sufrieron traslocación de PS y un incremento de calcio intracelular bajo ambos estímulos eriptóticos, por lo cual se decidió analizar si existía una relación directa entre el aumento del catión dentro de la célula y la externalización del fosfolípido en ambos modelos. Se diseñaron ensayos en los cuales los eritrocitos fueron incubados en solución libre de calcio. Para ello, se utilizó *buffer* HEPES sin CaCl₂ y con el agregado del quelante de calcio EGTA 2 mM. Como se esperaba, la traslocación de PS fue completamente bloqueada cuando el tratamiento con A23187 fue llevado a cabo en un medio libre de calcio extracelular. Por otro lado, en ensayos con nitrito de sodio y peróxido de hidrógeno realizados en ausencia de calcio también disminuyó, aunque sólo parcialmente, el porcentaje de células anexina V-FITC positivas, sugiriendo que este tratamiento involucra también mecanismos independientes del calcio en el proceso de inducción de eriptosis (Fig. 16).

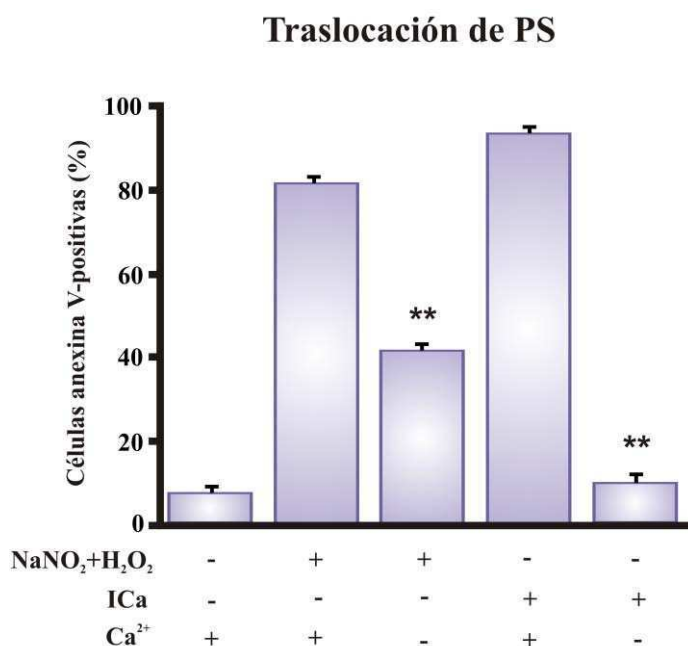


Figura 16: Rol del calcio en la traslocación de PS. Los eritrocitos fueron incubados con NaNO₂+H₂O₂ o ICa por 24 h. En varios ensayos, ambos tratamientos fueron desarrollados en *buffer* HEPES libre de calcio. La traslocación de PS fue detectada mediante la unión del fosfolípido a anexina V-FITC utilizando la técnica de citometría de flujo. Diferencias significativas fueron observadas entre ensayos llevados a cabo en medio con o sin calcio (NaNO₂+H₂O₂ vs. NaNO₂+H₂O₂/Ca²⁺ e ICa vs. ICa/Ca²⁺; ** P < 0.01 (n=3).

II.5. ROL DE KINASAS Y FOSFATASAS

El grado de fosforilación de proteínas en sus residuos tirosina está regulado mediante el balance entre la actividad de enzimas tirosina kinasas (PTKs) y la actividad opuesta de tirosina fosfatasa (PTPs). Dado que una de las características que diferenciaron a los dos modelos de eritrosis estudiados fue la fosforilación en tirosina de proteínas de membrana, se estudió a continuación el rol de kinasas y fosfatasa en estos dos modelos.

Con respecto a la actividad de residuos fosfotirosina, existe evidencia acerca de la regulación de señalización de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) por estrés oxidativo e incremento de calcio intracelular. La traslocación de PS inducida por agentes oxidantes fue completamente anulada cuando las células fueron preincubadas con Ly294002, inhibidor de PI3K. Sin embargo, la externalización del fosfolípido fue parcialmente impedida por inhibición de PI3K en células tratadas con A23187/Ca²⁺ (Fig. 17), sugiriendo que bajo la condición de sobrecarga de calcio, existen vías de señalización independientes de PI3K que participan en la traslocación de PS.

La externalización de PS observada en presencia de ambos estímulos de eriptosis fue aún mayor en presencia de inhibidores de fosfatasa. Entre las fosfatasa, el rol de PTP1B fue confirmado mediante su inhibición específica con CinnGel 2Me (Fig. 17).

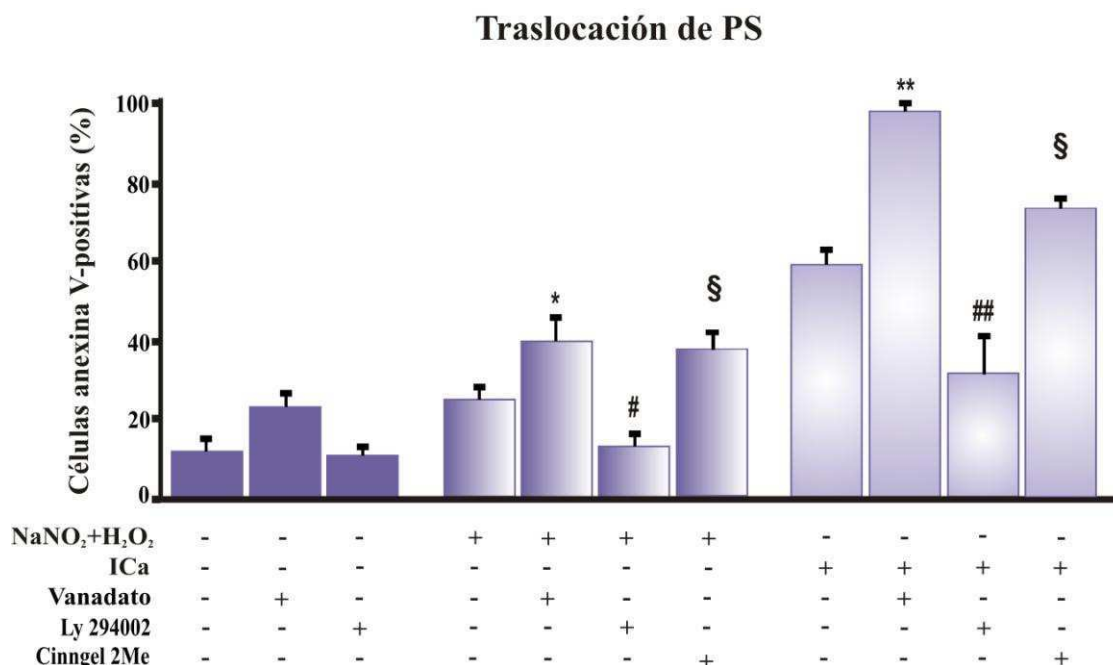


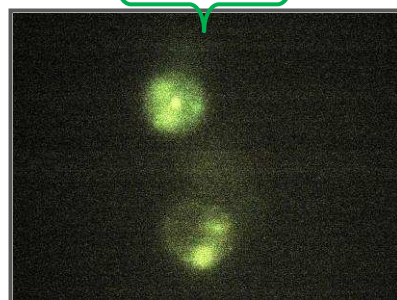
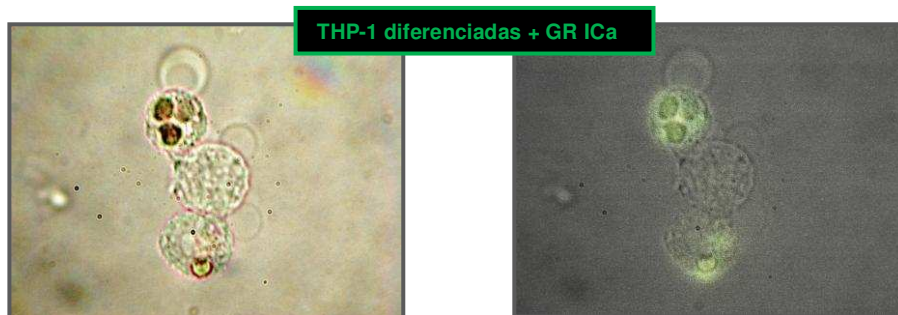
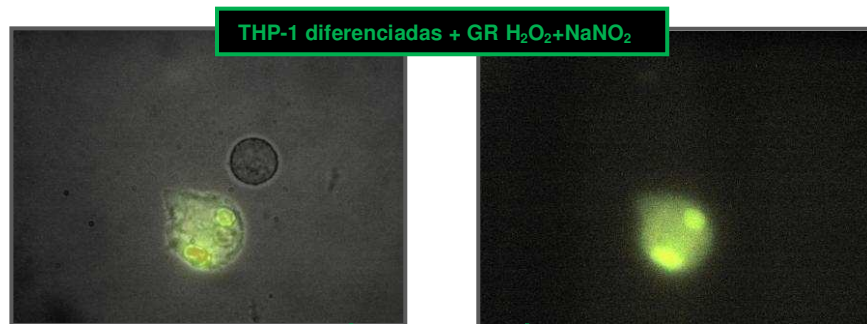
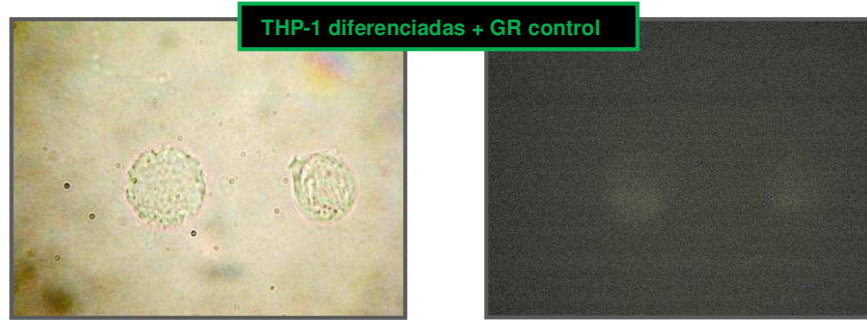
Figura 17: Rol de quinasas y fosfatasa en eriptosis inducida por agentes oxidantes y entrada masiva de calcio.

Previo a la inducción de eriptosis con NaNO₂+H₂O₂ o ICa por 4 h, los eritrocitos fueron preincubados con Ly294002 50 μM (inhibidor de PI3K), o-vanadato de sodio 0,15 mM (inhibidor inespecífico de fosfatasa) o CinnGel 2Me 10 μM (inhibidor específico de la fosfatasa PTP1B) por 2 h. La traslocación de PS fue determinada mediante la unión de anexina V-FITC a la superficie externa de la membrana celular utilizando la técnica de citometría de flujo. Un aumento (*P<0,05, **P<0,01, n=3) y una disminución (#P<0,05, ##P<0,01, n=3) estadísticamente significativos fueron detectados en la externalización de PS por inhibición de fosfatasa o de PI3K, respectivamente, con respecto a los ensayos sin inhibidores. La inhibición específica de la fosfatasa PTP1B también mostró un incremento significativo de la traslocación de PS (CinnGel/NaNO₂ + H₂O₂ vs. NaNO₂ + H₂O₂ y CinnGel/ICa vs. ICa, §P<0,05, n=3).

II.6. RECONOCIMIENTO POR EL SISTEMA RETÍCULOENDOTELIAL

Con el fin de determinar si los cambios celulares sufridos durante el proceso de eriptosis son suficientes para inducir el reconocimiento por los macrófagos y de esa manera ser fagocitados antes de su hemólisis, se realizaron ensayos de eritrofagocitosis. Para ello, se utilizaron células de la línea promonocítica humana THP-1 diferenciadas a macrófagos con PMA. Estas células fueron cocultivadas con eritrocitos humanos (previamente marcados con sonda fluorescente) control o tratados con los dos inductores de eriptosis estudiados (Fig. 18). El análisis por citometría de flujo refleja un aumento significativo de fagocitosis de los eritrocitos inducidos a eriptosis por ambos estímulos.

A



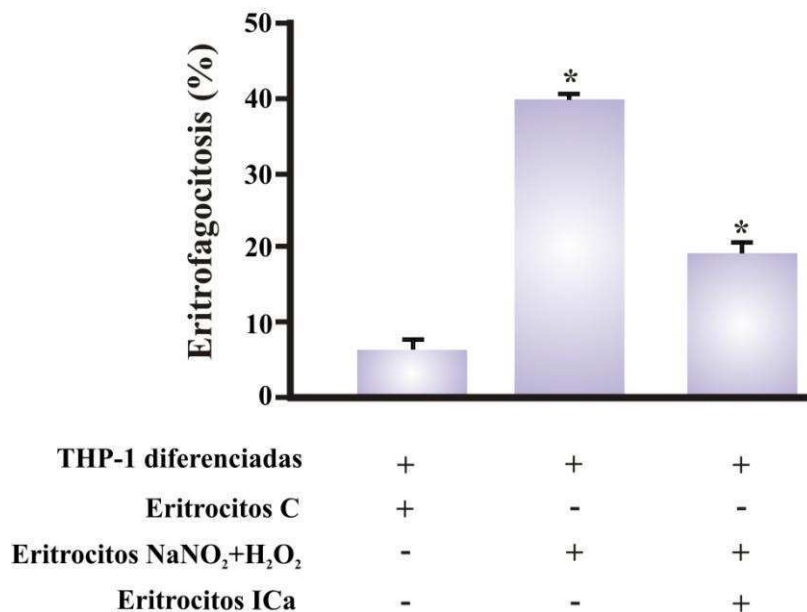
B

Figura 18: Determinación de eritrofagocitosis. GR marcados con la sonda fluorescente CFSE 0,5 μ M por 15 min a 37 $^{\circ}$ C e inducidos a eriptosis con NaNO₂+H₂O₂ o ICa por 24 h fueron cocultivados durante 4 h con células THP-1 diferenciadas a macrófagos con PMA 100 nM. **A)** Alícuotas de las células despegadas luego de la coincubación y preparadas para el análisis por citometría de flujo fueron observadas por microscopía de fluorescencia. Se muestran fotos representativas de cada tratamiento en las que se pueden observar los eritrocitos fagocitados dentro de las células THP-1 diferenciadas. Se observa el mismo campo tanto por microscopía óptica como por microscopía de fluorescencia debido a que los eritrocitos fueron teñidos con CFSE previo al ensayo, así como también la superposición de ambas fotos. **B)** Los niveles de eritrofagocitosis fueron determinados por citometría de flujo y se expresan como porcentaje de células fluorescentes respecto de las células diferenciadas que no fueron cocultivadas con eritrocitos. Diferencias significativas respecto de células diferenciadas + eritrocitos C; *P<0,05 (n=3).

Para corroborar el incremento de fagocitosis observado por citometría de flujo se realizaron ensayos de eritrofagocitosis utilizando la técnica tradicional de microscopía óptica, donde pueden observarse las células THP-1 diferenciadas adheridas a la superficie, con los eritrocitos fagocitados en su interior (Fig. 19).

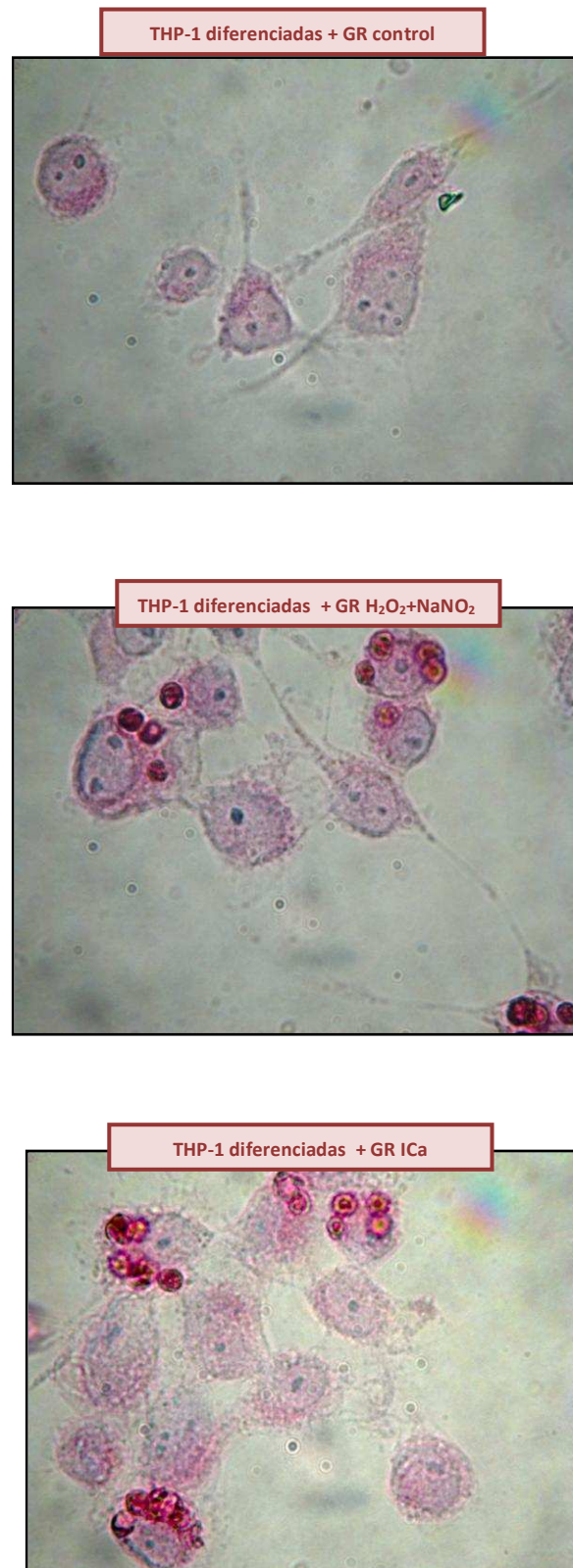


Figura 19: Eritrofagocitosis observada por microscopía óptica. GR inducidos a eritroposis con $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ o ICa por 24 h fueron cocultivados durante 4 h con células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Las células fueron fijadas y coloreadas con tinción de Giemsa para su posterior observación por microscopía. Se muestran fotos representativas de cada preparado.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se estudiaron los mecanismos involucrados en el modelo de eriptosis inducida por agentes oxidantes de forma comparativa con la generada por la entrada masiva de calcio a la célula, con el objetivo de contribuir a la elucidación de la fisiopatología de la muerte prematura de eritrocitos. En concordancia con trabajos publicados (Pietraforte *et al*, 2007; Bevers y Williamson, 2010), la incubación de eritrocitos humanos en un medio prooxidante o en presencia del ionóforo de calcio A23187 (ICa) causó la externalización de PS, característica típica de una célula en apoptosis. El catión Ca^{2+} posee un rol importante en la regulación de la traslocación lipídica. En este contexto, se encontró un aumento del calcio intracelular en ambos modelos de eriptosis. Cabe destacar que el mayor incremento fue detectado en presencia de ICa (siete veces más que en el control) (Fig. 9). Ha sido reportado que la presencia del ionóforo A23187 no podría inducir la muerte de los eritrocitos en ausencia de calcio extracelular, demostrando que la eriptosis es un proceso activo que requiere la entrada del catión a las células (Bratosin *et al*, 2001). De acuerdo con esta afirmación, nuestros experimentos con ICa en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 14), mostraron una prevención completa de la externalización de PS. Sin embargo, en el modelo de eriptosis inducida por agentes oxidantes se observó una prevención parcial de la traslocación del fosfolípido cuando los experimentos fueron desarrollados en medio libre de calcio. A raíz de ello, se hipotetizó la existencia de mecanismos adicionales independientes de calcio que pueden llevar a la externalización de PS. En concordancia con esta hipótesis, Lang y colaboradores (2006) también propusieron la existencia de vías de señalización adicionales cuando encontraron que el porcentaje de muerte prematura de eritrocitos inducida por *shock* osmótico fue disminuido pero no bloqueado completamente en ausencia de calcio extracelular.

Esta hipótesis nos llevó a investigar otros factores que podrían estar involucrados en los mecanismos de eriptosis inducida por agentes oxidantes. La incubación de los eritrocitos con nitritos y peróxido de hidrógeno indujo un incremento significativo de la producción de ROS, acompañada paralelamente por una disminución de GSH, mientras que los eritrocitos tratados con A23187/ Ca^{2+} no sufrieron modificaciones del balance óxido-reducción (Fig. 11). Este resultado confirmó que el balance *redox* celular no depende del contenido de calcio intracelular.

Ha sido sugerido que la acumulación de calcio en el citoplasma produce cambios de volumen y morfología, aumenta la rigidez celular y los niveles de hemólisis (Palek *et al*, 1974; Kirkpatrick *et al*, 1975). Por otro lado, los eritrocitos que exponen PS en su superficie se adhieren unos a otros e interactúan con células endoteliales (Daleke, 2008). Por estos

motivos, la regulación y control de la distribución asimétrica de fosfolípidos en la membrana plasmática es esencial para el mantenimiento de la estabilidad mecánica del eritrocito y un adecuado funcionamiento celular (Manno *et al*, 2002). Nuestro análisis de la morfología de eritrocitos incubados con ionóforo de calcio muestra que pierden su forma discoide para convertirse en equinocitos con microvesículas de membrana plasmática. Una de las características observadas en este modelo fue también disminución de la cantidad de la proteína de membrana banda 3 (Fig. 13). Este resultado podría ser explicado no sólo por la degradación de dicha proteína detectada por el aumento de fragmentos de menor peso molecular por *Western blotting* (Fig. 13B), sino también por pérdida de membrana plasmática durante el proceso de microvesiculación. La concomitante disminución de otras proteínas de membrana, como acuaporina 1 y glicoforina A, estaría directamente relacionada con la formación de dichas microvesículas, detectadas previamente por microscopía electrónica (Fig. 10). Otros autores concluyen que la vesiculación constituye un mecanismo de remoción de parches de la membrana en donde se encontrarían los cambios moleculares que llevarían al reconocimiento y fagocitosis de la célula, retardando la eliminación de los eritrocitos. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Hagelberg y Allan (1990) quienes demostraron la importancia del incremento del contenido intracelular de calcio para la formación de microvesículas, detectando además, la presencia de banda 3 y glicoforina A como componentes de las mismas.

En cambio, la principal morfología anómala observada luego de la exposición de los glóbulos rojos a un medio prooxidante fue el estomatocito (Fig. 10). Según Richards y colaboradores (2007), existe una alta probabilidad de que el incremento de la actividad antioxidante en el eritrocito se encuentre asociada con el cambio morfológico a estomatocito. Estos autores han expuesto evidencias acerca del rol de los radicales libres en la patogénesis del síndrome de fatiga crónica y también de la relación entre el metabolismo del eritrocito y su morfología.

La estructura y la interacción molecular de proteínas dentro del complejo proteico que forma el citoesqueleto explican las transformaciones fisiológicas particulares que experimentan estas células, por lo que el daño a dichas proteínas ha sido asociado con la presencia de morfologías anómalas y la pérdida de su plasticidad.

En este capítulo se puede observar la presencia de dos morfologías determinadas: equinocitos asociados a la sobrecarga de calcio y estomatocitos inducidos por acción de agentes oxidantes. Teniendo en cuenta las diferencias marcadas de las alteraciones morfológicas en cada caso, se decidió investigar posibles modificaciones en la membrana plasmática que estarían involucradas en cada modelo.

En eriptosis inducida por agentes oxidantes, los lípidos de membrana fueron susceptibles a peroxidación como producto del ataque de radicales libres (Fig. 12). En concordancia con nuestros resultados, se han reportado ensayos *in vitro* e *in vivo* en los cuales alteraciones metabólicas eritrocitarias asociadas a un ambiente prooxidante indujeron lipoperoxidación (Quintanar-Escorza *et al*, 2010; Calderón-Salinas *et al*, 2011).

Es sabido que el dominio citoplasmático de banda 3 sirve como centro organizador de las interacciones proteicas en membrana y es también el mayor sustrato, tanto de fosfotirosina kinasas como de fosfotirosina fosfatasas (Mallozi *et al*, 2001). En este contexto, la fosforilación de tirosinas de banda 3 solo fue observada en el modelo de eriptosis inducida por agentes oxidantes (Fig. 13). Por otro lado, también se detectó la presencia de la proteína citoplasmática hemoglobina en preparados de membrana plasmática. La hemoglobina es un potente *scavenger* de óxido nítrico debido a su rápida reacción con este compuesto (Chen *et al*, 2008). Esta propiedad explica el hallazgo de un producto estable de reacción que es la nitrosil-hemoglobina en la membrana de eritrocitos expuestos a agentes oxidantes, (Fig. 15). Ha sido reportado que la nitrosilación en residuos tirosina de proteínas ocurre a través de la acción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como peroxinitrito. La nitrosilación de péptidos, que es capaz de activar a una src tirosina kinasa eritrocitaria denominada Lyn, sugiere un mecanismo de señalización mediado por peroxinitrito, el cual podría estar relacionado con la regulación positiva de la fosforilación en tirosina (Mallozi *et al*, 2001).

En cuanto a la participación de fosfatasas en los mecanismos involucrados en el proceso de eriptosis, se estudió la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), la cual se encuentra asociada a banda 3 en membrana. Esta enzima está normalmente activada y previene la acumulación de banda 3 fosforilada para que los eritrocitos sanos en circulación no sean fagocitados. El tratamiento con A23187 indujo un incremento significativo de la actividad de PTP1B (Fig. 14), explicando la ausencia de fosforilación de banda 3 en este modelo. Es sabido que uno de los mecanismos de activación de esta fosfatasa es a través de la acción de la enzima calpaína, quien cliva a PTP1B (Frangioni *et al*, 1993). El bloqueo del incremento de actividad de esta fosfatasa en presencia del inhibidor específico de calpaína, calpepetina I, sugiere la participación de esta proteasa dependiente de calcio dentro de los mecanismos involucrados en la eriptosis inducida por A23187. Por el contrario, la actividad de PTP1B no aumentó por acción de agentes oxidantes. En este caso, el efecto de la activación de calpaína mediada por el incremento de calcio intracelular, podría haber sido contrareestado por la inactivación de la fosfatasa generada por el ambiente prooxidante (Ciara *et al*, 2004; Metere *et al*, 2009).

Estos resultados son consistentes con la idea de que, en ambos modelos de eriptosis, ocurre un desbalance en la fosforilación-desfosforilación de proteínas. En los dos modelos la

activación de una enzima traslocasa vía fosforilación parecería ser necesaria para la externalización de PS. Sin embargo, cada modelo de eriptosis fue asociado a diferentes alteraciones homeostáticas entre fosfokinasas y fosfatasas. La activación de kinasas pareció ser una característica importante en el desarrollo de eriptosis inducida por estrés oxidativo, mientras que la activación de fosfatasas tendría un rol más relevante en el modelo de entrada masiva de calcio.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III**EFFECTO DE LA ERITROPOYETINA SOBRE CÉLULAS EN ETAPA DE DIFERENCIACIÓN ERITROIDE Y ERITROCITOS MADUROS****III.1. ACCIÓN DE LA ERITROPOYETINA SOBRE CÉLULAS K562 HEMOGLOBINIZADAS CULTIVADAS EN UN MEDIO PROINFLAMATORIO**

La eritropoyetina (Epo) representa la principal citoquina involucrada en el control de la eritropoyesis. Su efecto positivo en la supervivencia de progenitores eritroides es también una de las funciones fisiológicas comprobadas de la hormona.

Recientemente, la notable actividad de protección tisular de Epo en modelos de isquemia neuronal, renal y cardíaca ha sido revisada e informada en varias publicaciones (Grasso *et al*, 2004; Jelkmann, 2004; Rossert y Eckardt, 2005). La alta eficacia de la Epo observada en esos modelos depende de la activación de múltiples caminos de protección que incluyen inhibición de apoptosis, restauración de la autorregulación vascular, atenuación de respuestas inflamatorias e incremento de funciones reconstituyentes (Grasso *et al*, 2004).

Como se demostró en el capítulo I, células K562 inducidas a diferenciación eritroide son sensibles a la acción proapoptótica de citoquinas proinflamatorias, evidenciando un aumento de núcleos apoptóticos, actividad de caspasa 3 y clivaje de la proteína PARP acompañados de una disminución de la proteína antiapoptótica c-FLIP.

Se sabe que las células de la línea K562 expresan receptor para eritropoyetina (EpoR) (Vittori *et al*, 2005), entonces, se evaluó si la Epo tiene un efecto protector frente a la acción proapoptótica de las citoquinas proinflamatorias en el modelo de células K562 en etapa de diferenciación. Para ello, las células eritroides las células fueron incubadas en presencia de Epo, a continuación se agregó hemina para inducir la diferenciación celular y 1 h después se adicionó TNF- α al medio, desarrollando los cultivos durante 48 h. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se llevaron a cabo ensayos para evaluar el desarrollo de apoptosis.

III.1.a. Determinación de células apoptóticas

Se evaluaron los cambios de morfología nuclear utilizando el colorante Hoechst y se visualizaron los núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia (Fig. 20).

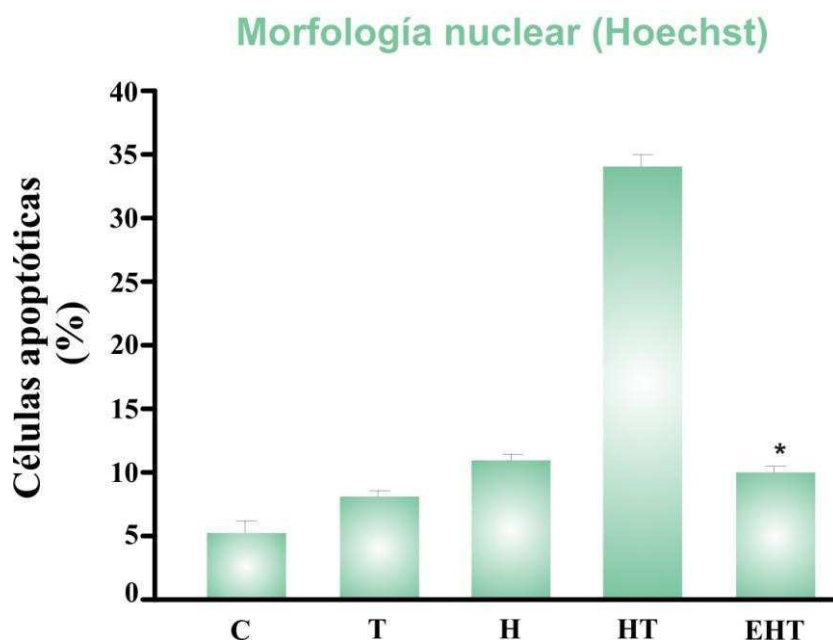


Figura 20: Análisis de morfología nuclear. Células K562 fueron incubadas sin tratamiento (C) o con el agregado de TNF- α 30 ng/ml (T) por 48 h. Otro set de células, inducido a diferenciación eritroide con hemina 30 μ M, fue cultivado en presencia (HT) o en ausencia (H) de 30 ng/ml de TNF- α por 48 h. Un grupo de células fue incubado 18 h con Epo 20 U/ml previo al agregado de H y TNF- α al medio (EHT). Se evaluó la apoptosis por microscopía de fluorescencia (Hoechst). Los cultivos EHT mostraron una disminución significativa (* $P < 0,01$; $n=3$) de los niveles de apoptosis respecto de los incubados en iguales condiciones pero en ausencia de Epo (HT).

La Epo previno la inducción de apoptosis por TNF- α en las células en proceso de diferenciación eritroide (EHT vs. HT).

III.1.b. Determinación de la actividad de caspasa 3

La actividad de caspasa 3 fue determinada cada hora durante 7 horas a partir del momento en que comenzó la incubación con el sustrato. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para el ensayo de morfología nuclear presentado en el Capítulo III (1.a).

La Figura 21 muestra que, al igual que en el ensayo de Hoechst, la incubación con Epo previno la activación de caspasa 3 producida por la citoquina proinflamatoria sobre las células en proceso de diferenciación.

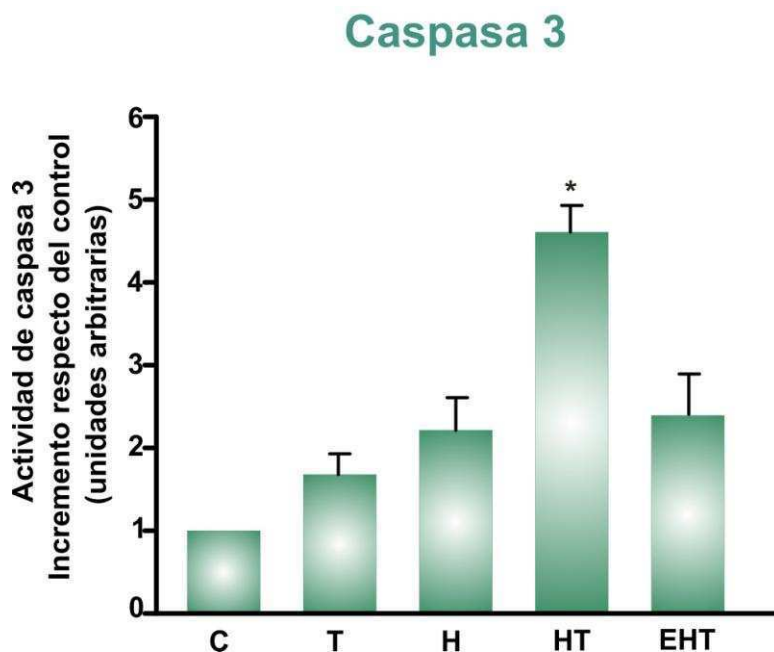


Figura 21: Actividad de caspasa 3. Células K562 fueron incubadas sin tratamiento (C) o con el agregado de TNF- α 30 ng/ml (T) por 48 h. Otro set de células fue inducido a diferenciación eritroide con hemina 30 μ M en ausencia (H) o en presencia de TNF- α 30 ng/ml (HT) por 48 h. Un grupo de células fue incubado 18 h con Epo 10 U/ml previo al agregado de hemina y TNF- α (EHT). Las barras muestran diferencias de actividad detectadas a las 6 h de incubación con el sustrato. Las células diferenciadas en presencia de Epo y T (EHT), mostraron una disminución significativa (* $P < 0,05$; $n = 3$) de la actividad de caspasa 3 respecto de las células incubadas en iguales condiciones pero en ausencia de Epo (HT).

En conjunto, los resultados obtenidos en ensayos en los que se realizó el pretratamiento con Epo sugieren que el factor de crecimiento tendría un efecto protector sobre las células K562 contrarrestando la sensibilización a las citoquinas proinflamatorias observada durante el proceso de diferenciación.

III.1.c. Síntesis y expresión de c-FLIP_L en presencia de eritropoyetina

En el Capítulo I se mostró que los niveles de la proteína antiapoptótica c-FLIP_L disminuyeron durante el proceso de diferenciación eritroide, por lo que se formuló la hipótesis de que esta modificación podría estar relacionada con el aumento de la sensibilidad a citoquinas proinflamatorias de las células diferenciadas. A raíz de estos

resultados, y observando que la Epo tiene una acción protectora frente a la apoptosis generada por $\text{TNF-}\alpha$, se decidió estudiar los niveles de síntesis y expresión de c-FLIP_L en células incubadas con Epo durante el proceso de diferenciación eritroide. Los ensayos de *Real Time PCR* y citometría de flujo indican que la presencia de Epo en los cultivos permite mantener dentro de los niveles del control la expresión de la proteína antiapoptótica, previniendo el efecto negativo de la hemina sobre células en etapa de diferenciación eritroide (Fig. 22).

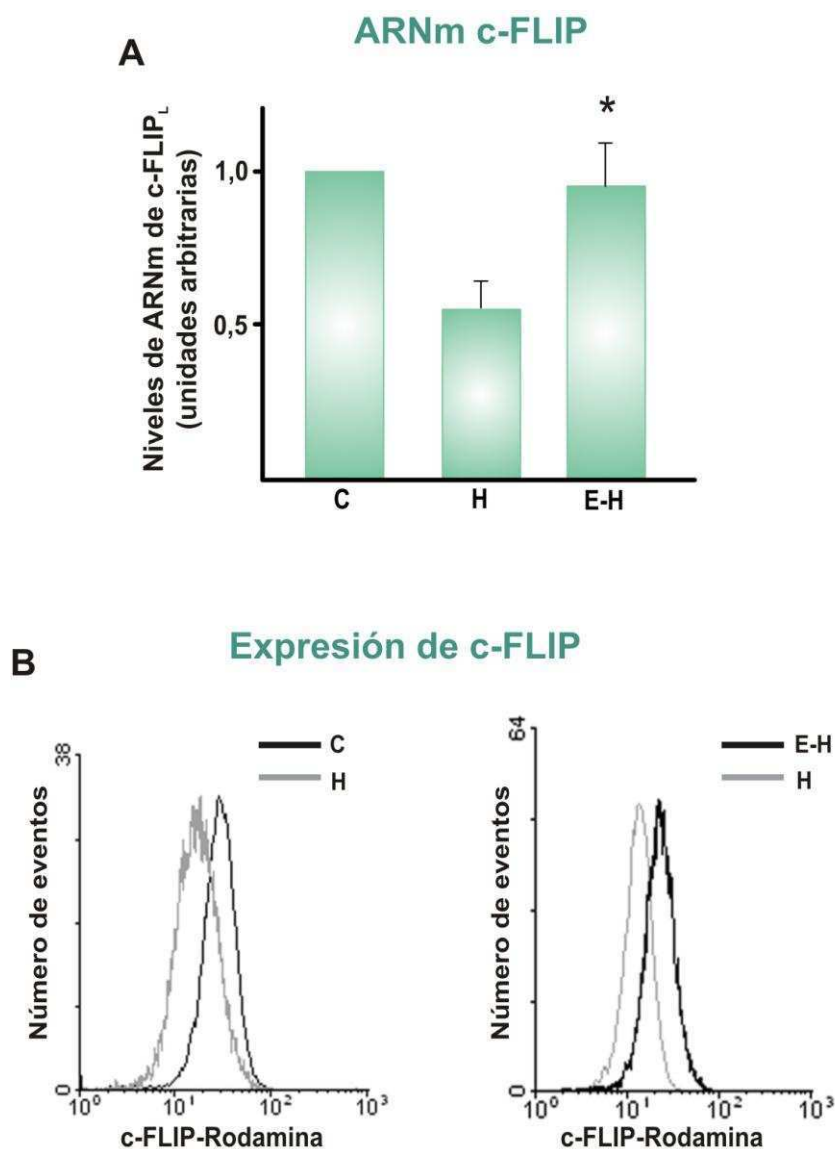


Figura 22: Niveles de ARNm y expresión de la proteína c-FLIP en presencia de eritropoyetina. Las células K562 fueron preincubadas con Epo 10 U/ml durante 18 h antes de la exposición a hemina (H) 30 μM y $\text{TNF-}\alpha$ 30 ng/ml por 48 h. **A)** Los niveles de ARNm de c-FLIP_L fueron cuantificados por *Real Time PCR*. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias respecto del control. **B)** La expresión de c-FLIP a nivel de proteína fue determinada por citometría de flujo empleando anticuerpo primario específico y anticuerpo secundario conjugado con rodamina. Los gráficos son representativos de 3 ensayos independientes. La disminución de los niveles de c-FLIP inducida por H fue prevenida en presencia de Epo a nivel de ARNm (E-H vs. H, $*P < 0.05$; $n = 3$) y de la expresión de proteína.

III.2. ACCIÓN DIRECTA DE ERITROPOYETINA SOBRE ERITROCITOS MADUROS INDUCIDOS A ERIPTOSIS

La función conocida de la Epo está relacionada con la estimulación de la eritropoyesis a nivel de células eritroides inmaduras. En la actualidad, como se ha demostrado en la sección III.1. y ha sido reportado en trabajos de otros autores y de nuestro laboratorio, esta hormona tiene un efecto antiapoptótico sobre progenitores eritroides (Vittori *et al*, 2010) y diferentes tejidos no hematopoyéticos como el neuronal (Pregi *et al*, 2006; Pregi *et al*, 2009, Wenker *et al*, 2010).

Escasa información existe acerca de una posible acción directa de la Epo sobre glóbulos rojos, aunque ha sido sugerido que podría estar asociada a la supervivencia de eritrocitos maduros en ciertas condiciones (Myssina *et al*, 2003). Por ello, se investigó si glóbulos rojos preincubados con Epo podrían ser más resistentes a la acción de diferentes estímulos proeriptóticos.

III.2.a. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Debido a que se ha reportado un efecto antioxidante de la Epo sobre tejidos no hematopoyéticos, como el nervioso y cardíaco (Caló *et al*, 2006; Katavetin *et al*, 2007), en primer lugar se evaluó qué ocurría a nivel oxidativo en presencia de la hormona,. Para ello, los eritrocitos fueron preincubados con Epo durante 2 h antes de la inducción de eriptosis con peróxido de hidrógeno y nitrito de sodio por 4 h. Se observó que a mayor concentración de hormona menor era la producción de ROS, siendo suficiente 5 U/ml de Epo para alcanzar los valores del control. Cuando las células fueron preincubadas en presencia del antioxidante N-acetilcisteína (NAC), se obtuvieron resultados similares a los observados con Epo (Fig. 23).

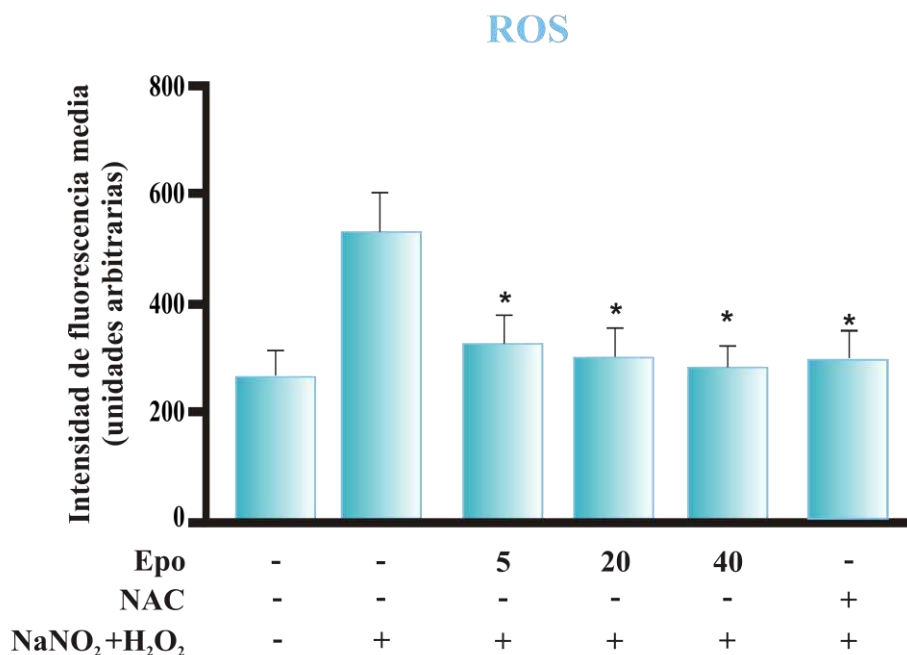


Figura 23: Efecto de la eritropoyetina sobre la producción de ROS inducida en eritrocitos por agentes oxidantes.

Eritrocitos fueron incubados con 5, 20 ó 40 U/ml de Epo o 10 mM de NAC por 2 h, previamente al tratamiento con NaNO₂ 5mM + H₂O₂ 1 mM, por 4 h. Luego de incubar con la sonda DFCH-DA, los niveles de ROS fueron analizados por citometría de flujo. Tanto Epo como el antioxidante NAC previnieron la producción de ROS en forma significativa (*P<0.05 con respecto a NaNO₂+H₂O₂, n=5).

III.2.b. Peroxidación lipídica

El análisis de lipoperoxidación fue realizado para evaluar si el efecto antioxidante de la Epo podía prevenir el daño oxidativo sobre la membrana plasmática. Se observó que si bien la hormona era capaz de reducir los niveles de lipoperoxidación producidos por los agentes oxidantes, se necesitaba una concentración de 20 U/ml para detectar diferencias significativas (Fig. 24).

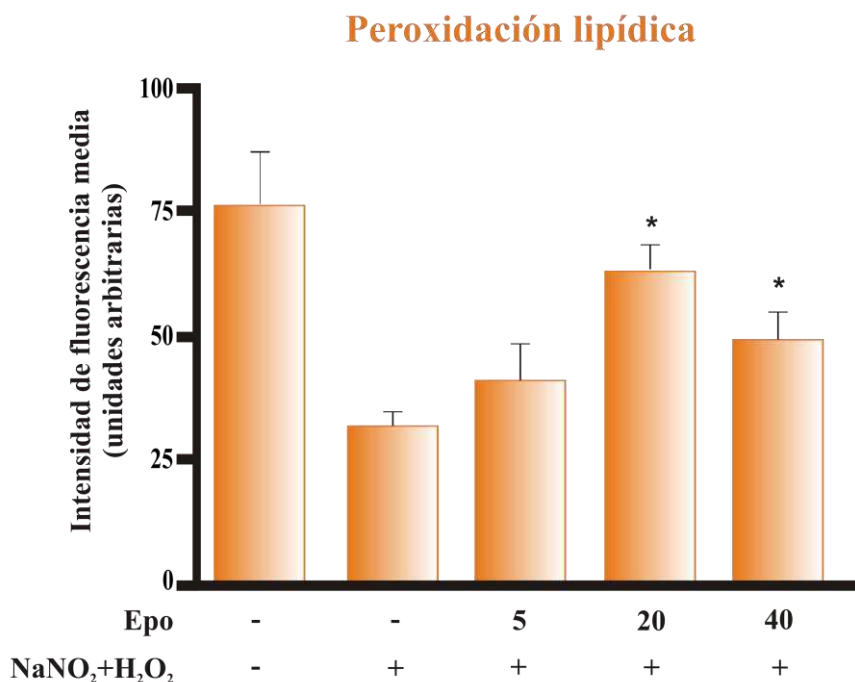


Figura 24: Efecto de la eritropoyetina sobre la peroxidación lipídica en eritrocitos inducidos a eritosis por agentes oxidantes. Eritrocitos fueron incubados con 5, 20 ó 40 U/ml de Epo por 2 h previamente al tratamiento con NaNO₂ 5mM + H₂O₂ 1 mM por 4 h. Luego fueron incubados con el sensor de lipoperoxidación BODIPY665/676 y analizados por citometría de flujo. La disminución de la intensidad de fluorescencia indica aumento de lipoperoxidación. Epo disminuyó significativamente los niveles de peroxidación lipídica (Epo 20 ó 40 U/ml/NaNO₂ + H₂O₂ vs. NaNO₂ + H₂O₂, *P<0.05, n=5).

III.2.c. Traslocación de fosfatidilserina

Respecto de la traslocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática, la presencia de Epo disminuyó significativamente la externalización del fosfolípido estimulada por estrés oxidativo, aunque no se alcanzaron los niveles del control. En el caso del modelo de entrada masiva de calcio, Epo no fue capaz de modificar la traslocación de PS (Fig. 25).

Como se mencionó en la sección III.2.a., el efecto de la Epo fue comparado con la acción de un antioxidante conocido como es NAC. A diferencia de Epo, NAC fue capaz de prevenir completamente no sólo la producción de ROS (Fig. 23) sino también la traslocación de PS (Fig. 25).

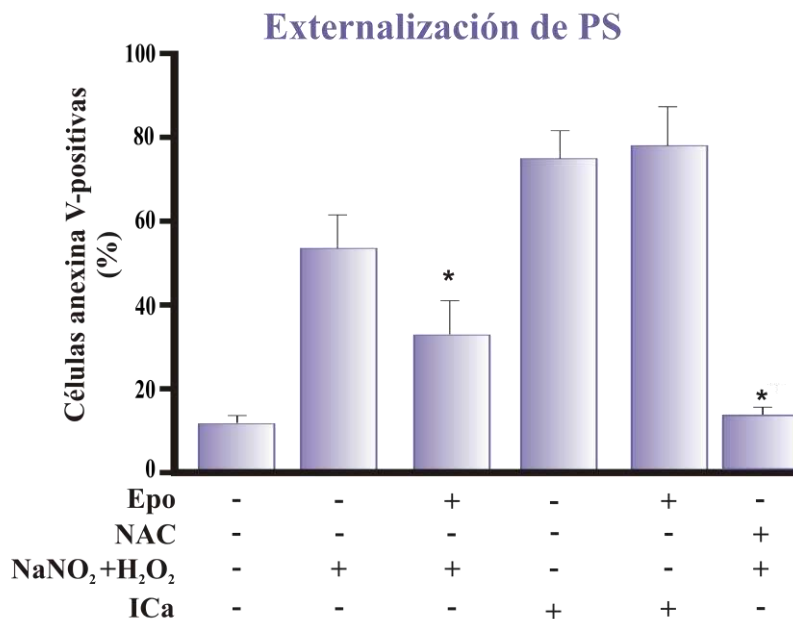


Figura 25: Efecto de la eritropoyetina sobre la traslocación de fosfatidilserina en eritrocitos inducidos a eriptosis. Eritrocitos fueron incubados con Epo 20 U/ml o NAC 10 mM por 2 h previamente al tratamiento con NaNO₂+H₂O₂ o ICa por 24 h. Luego de ser marcados con Anexina V-FITC, fueron analizados por citometría de flujo. La presencia de Epo produjo una disminución significativa de los niveles de traslocación de PS inducida por agentes oxidantes (Epo-NaNO₂+H₂O₂ vs. NaNO₂+H₂O₂, *P<0.05, n=5) mientras que no tuvo efecto sobre los eritrocitos tratados con ICa (Epo-ICa vs. ICa, NS; n=5). En los ensayos con NAC se observó completa prevención de la externalización de PS (*P<0,05, n=5).

Este resultado sugiere la implicancia de un mecanismo diferente de la acción de Epo en comparación con un antioxidante tradicional.

III.2.d. Calcio intracelular

Teniendo en cuenta que Epo induce un incremento de calcio intracelular en progenitores eritroides humanos (Mladenovic y Kay, 1988; Imagawa *et al*, 1989), y que en eritrocitos maduros la traslocación de PS resultó dependiente de Ca²⁺ (Fig. 16), se decidió investigar si la Epo afectaba la entrada de calcio en los glóbulos rojos. Como se puede ver en la Figura 26, Epo *per se* induce un aumento significativo del influjo de calcio. Más aún, el contenido de calcio intracelular también fue incrementado por pretratamiento con Epo en el modelo de eriptosis inducido por agentes oxidantes. Este efecto no pudo ser apreciado en el modelo de A23187/Ca²⁺, probablemente por el elevado nivel de calcio intracelular generado por el agente eriptótico utilizado en este último modelo.

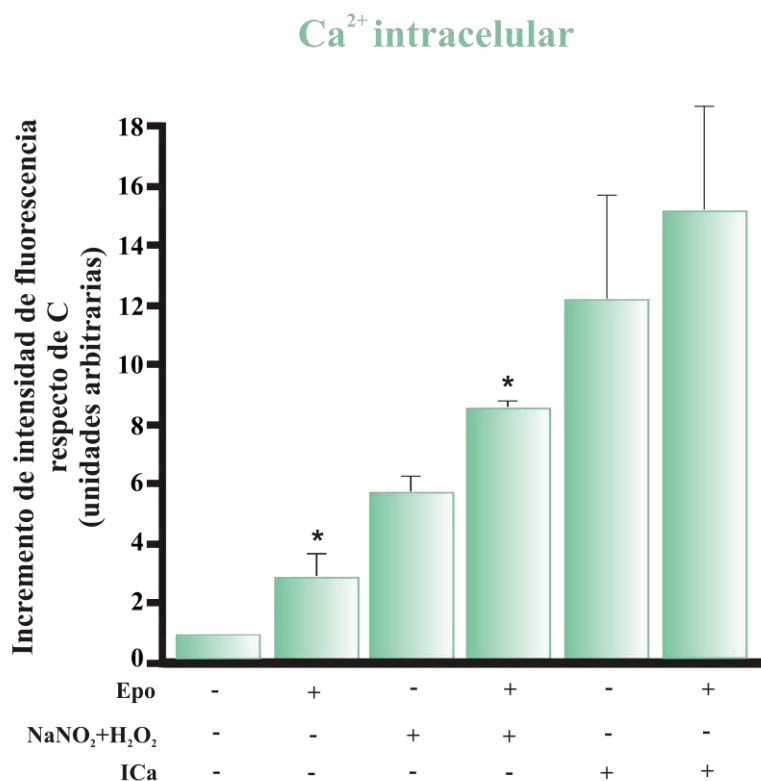


Figura 26: Efecto de la eritropoyetina sobre los niveles de calcio intracelular en eritrocitos inducidos a eriptosis.

Eritrocitos fueron incubados con Epo 10 U/ml por 2 h previamente al tratamiento con NaNO₂ 5 mM + H₂O₂ 1 mM o ICa 0,15 μM por 24 h. A continuación se incubaron los eritrocitos con la sonda fluorescente FLUO 4-AM y los niveles de calcio intracelular fueron evaluados por citometría de flujo. Los niveles de calcio intracelular aumentaron significativamente en presencia de Epo tanto en los controles como en el modelo de eriptosis inducida por agentes oxidantes (*P<0.05, n=3).

Como fue demostrado en el capítulo II, el tratamiento con NaNO₂+H₂O₂ induce eriptosis a través de mecanismos desencadenados por estrés oxidativo, los que involucran la señalización mediada por calcio en las células, además de activar vías independientes de este catión que también llevan a la traslocación de PS. Para determinar si el aumento de calcio intracelular inducido por Epo podía ser la razón por la cual su efecto antioxidante no fuera suficiente para bloquear completamente la traslocación de PS en eritrocitos tratados con agentes oxidantes, fueron realizadas incubaciones en medio libre de calcio y luego se midió la unión de anexina V a PS en la superficie celular por citometría de flujo (Fig. 27).

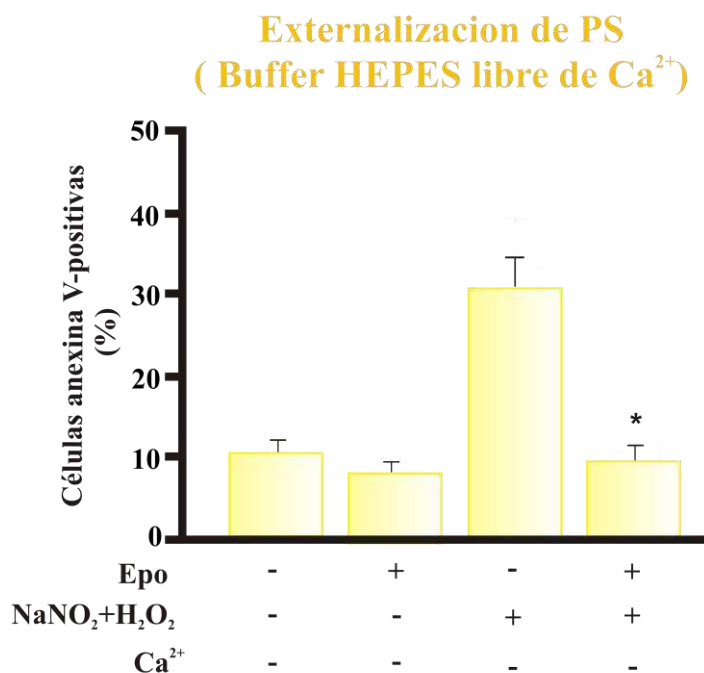


Figura 27: Efecto de la presencia de eritropoyetina sobre la traslocación de PS de eritrocitos inducidos a eriptosis en medio libre de calcio. Eritrocitos fueron incubados con Epo 20 U/ml por 2 h previo al tratamiento con NaNO₂ 5 mM + H₂O₂ 1 mM o ICa 0,15 μM por 24 h en *buffer* HEPES libre de calcio. La traslocación de PS fue determinada por citometría de flujo. La presencia de Epo impidió por completo la traslocación de PS inducida por agentes oxidantes (Epo-NaNO₂+H₂O₂ vs. NaNO₂+H₂O₂, *P<0.05; Epo-NaNO₂+H₂O₂ vs. C, NS; n=5).

Resultó interesante que, bajo las condiciones empleadas en estos ensayos, la externalización de PS fue completamente prevenida por Epo, apoyando, así, la hipótesis de que el efecto antioxidante de la hormona no fue suficiente para bloquear la traslocación del fosfolípido inducida por agentes oxidantes (Fig. 25) debido a su efecto sobre la entrada de calcio a la célula.

III.2.e. Expresión del receptor de eritropoyetina en eritrocitos maduros

Existe controversia acerca de si los eritrocitos presentan o no el receptor de eritropoyetina (EpoR) en su membrana plasmática. Uno de los mecanismos reportados sobre una acción directa de la Epo sobre eritrocitos maduros involucra la vía del receptor de la hormona (Myssina *et al*, 2003), por lo que se decidió analizar por citometría de flujo su presencia/ausencia (Fig. 28).

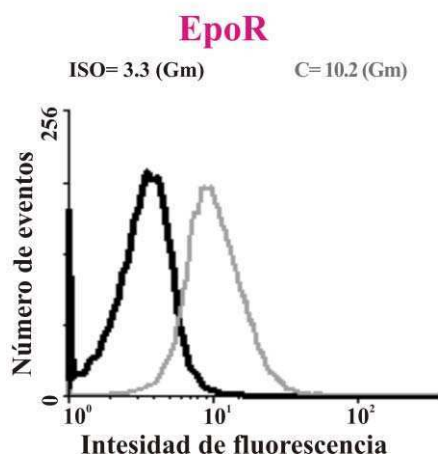


Figura 28: Expresión de EpoR en eritrocitos maduros. Eritrocitos humanos lavados fueron incubados con anticuerpo anti receptor de Epo humano y su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. Se analizaron las células por citometría de flujo. La figura es representativa de 3 ensayos independientes, con resultados similares.

En concordancia con Myssina *et al.* (2003), detectamos por citometría de flujo la expresión del receptor de Epo en los eritrocitos maduros.

III.3. ACCIÓN DE ERITROPOYETINA SOBRE LA FAGOCITOSIS DE ERITROCITOS INDUCIDOS A ERIPTOSIS

Debido a que resultados previos demuestran que el pretratamiento con Epo disminuye considerablemente los niveles de exposición de PS, y suprime por completo la producción de ROS, se evaluó si este efecto protector de la hormona era suficiente para disminuir los niveles de eritrofagocitosis observados en presencia de eritrocitos tratados con agentes oxidantes.

Se encontró una disminución significativa en el porcentaje de eritrofagocitosis de eritrocitos pretratados con Epo e inducidos a eriptosis con agentes oxidantes respecto de la eritrofagocitosis de aquellas células no preincubadas con la hormona. Resultados similares fueron observados cuando la preincubación de los glóbulos rojos se realizó con el compuesto antioxidante NAC.

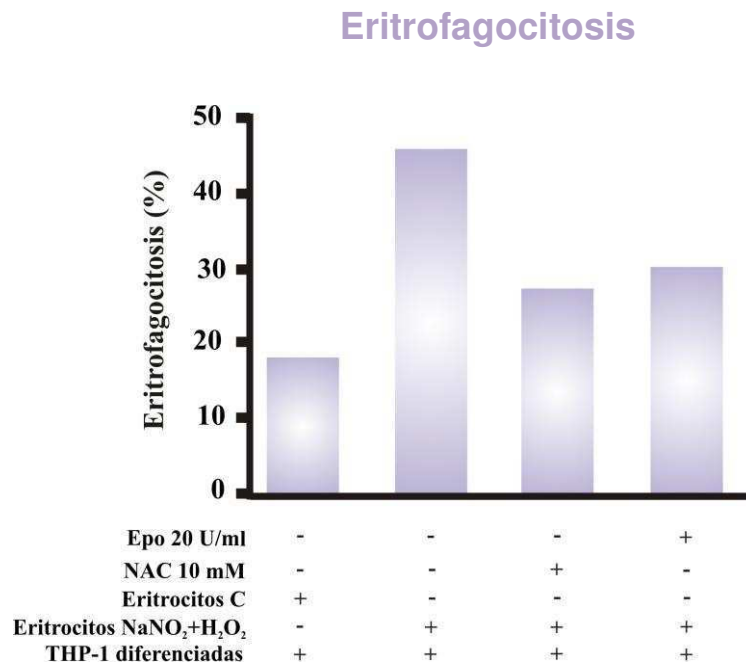


Figura 29: Eritrofagocitosis de células inducidas a eriptosis con agentes oxidantes post tratamiento con eritropoyetina. Eritrocitos marcados con CFSE fueron preincubados por 2 h con Epo 10 U/ml o NAC 10 mM, e inducidos a eriptosis con NaNO₂ + H₂O₂ o ICa por 24 h. A continuación fueron co-cultivados durante 4 h con células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Los niveles de eritrofagocitosis fueron determinados por citometría de flujo como el porcentaje de células fluorescentes respecto de las células diferenciadas que no fueron co-cultivadas con eritrocitos.

DISCUSIÓN

La Epo, es el principal factor de regulación de la producción de células rojas de la sangre. Tiene tres efectos sobre sus células blanco. Promueve proliferación y diferenciación de progenitores eritroides (Krantz, 1991), mientras previene la muerte celular programada (Koury y Bondurant, 1990).

En el presente trabajo se observó que la incubación con Epo, previo al agregado de hemina y citoquinas, protegió a las células K562 en etapa de diferenciación eritroide frente a la acción de las citoquinas proinflamatorias (Fig. 20 y 21). Como se discutió en el capítulo I, los niveles de ARNm de c-FLIP junto durante el proceso de diferenciación eritroide, parecerían ser críticos en cuanto a la protección celular frente a apoptosis y el incremento de la sensibilidad de las células a la muerte celular mediada por la acción de TNF- α e IL-1 β . La Epo prevendría los cambios en las vías de señalización producidos durante el proceso de diferenciación eritroide (por ejemplo, disminución de los niveles de c-FLIP) permitiendo a las células K562 mantener su resistencia a la apoptosis mediada por citoquinas proinflamatorias.

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos involucrados en la acción directa de Epo sobre eritrocitos maduros, glóbulos rojos fueron incubados en presencia de diferentes concentraciones de la hormona previo a la inducción de eriptosis. Epo previno el desbalance oxidativo (producción de ROS y peroxidación lipídica, Figs. 22 y 23) inducido por nitritos y peróxido de hidrógeno. En este contexto, Chattopadhyay *et al* (2000) reportó que Epo era capaz de proteger la membrana plasmática del daño oxidativo causado por ascorbato cúprico sobre eritrocitos a través de la captación de radicales hidroxilos. Epo podría tener un efecto directo sobre los glóbulos rojos, ya que esta hormona, así como otras proteínas, protegería a las membranas de los eritrocitos de la lipoperoxidación captando los radicales hidroxilos generados por estrés oxidativo. Los presentes resultados muestran una inhibición parcial de la traslocación de PS en presencia de Epo en un medio prooxidante mientras que la hormona fue incapaz de prevenir la externalización del fosfolípido en presencia de A23187/Ca²⁺ (Vota *et al*, 2012a).

Una posible explicación a estos resultados fue hallada cuando se investigó la relación entre el tratamiento con Epo y contenido de calcio intracelular. La concentración del catión aumentó significativamente en todos los ensayos en los cuales la hormona estaba presente. Este efecto sobre el influjo de calcio impediría la inhibición completa por Epo de la inducción de eriptosis a pesar de su efecto antioxidante. El incremento

intracelular de calcio causado por la hormona no es un hallazgo inesperado ya que se ha demostrado que Epo induce influjo de calcio en progenitores eritroides humanos cuando estas células son activadas vía la unión de Epo con su receptor (Mladenovic y Kay, 1988; Imagwa *et al*, 1989).

Myssina y colaboradores (2003) postularon que la Epo, además de su habilidad para actuar como neutralizador de radicales hidroxilo, inhibiría la muerte celular prematura vía su receptor en eritrocitos maduros. A diferencia del conocimiento general acerca de la ausencia de receptores para Epo en reticulocitos, los autores detectaron la expresión de sitios de unión de Epo en eritrocitos maduros. Nuestros resultados confirmaron la presencia del receptor de la hormona en los eritrocitos maduros (Fig. 27) y también concuerdan con lo afirmado por los mencionados autores acerca de la protección parcial de Epo. Sin embargo, los mecanismos postulados son diferentes. En un modelo de eriptosis inducida por shock osmótico, Myssina y colaboradores encontraron inhibición por Epo del canal catiónico sensible a volumen responsable de la entrada de calcio, bloqueando de esta manera la traslocación de PS. En nuestro modelo de eriptosis desencadenado por agentes oxidantes, Epo indujo el influjo de calcio a la vez que bloqueó la externalización del fosfolípido vía su efecto antioxidante. Más aún, ese movimiento de calcio explicaría la imposibilidad de prevenir la eriptosis inducida por entrada masiva de calcio al eritrocito (Vota *et al*, 2012a).

Independientemente del mecanismo, el efecto protector de Epo, observado *in vitro*, podría permitir la supervivencia de los eritrocitos *in vivo* bajo condiciones de estrés oxidativo. De acuerdo a estas observaciones cabe especular con la posibilidad de que Epo, bajo condiciones inflamatorias, no sólo inhiba la apoptosis de células progenitoras eritroides, sino también bloquee o disminuya el proceso de eriptosis. De esta manera, el tratamiento con Epo estaría enfocado por un lado al estímulo de la eritropoyesis en médula ósea y conjuntamente a la disminución de la desaparición prematura de glóbulos rojos en circulación, lo cual sería altamente beneficioso para aquellos pacientes que padecen enfermedades crónicas.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV

EFFECTO DIRECTO DE LA SOBRECARGA DE ALUMINIO EN ERITROCITOS HUMANOS

En trabajos previos de nuestro laboratorio se observó que eritrocitos expuestos en forma crónica a aluminio (Al) desarrollaban alteraciones morfológicas similares a las encontradas en los modelos de eriptosis utilizados en el presente trabajo. Tales alteraciones habían sido observadas tanto *in vivo* en un modelo de ratas *Sprague Dawley* (Vittori *et al*, 1999) como en ensayos *in vitro* sobre eritrocitos humanos (Vittori *et al*, 2001). En base a estas observaciones se estudió si los cambios morfológicos inducidos por Al podían asociarse con la aparición de signos de eriptosis.

IV.1. SIGNOS DE ERIPTOSIS

Para determinar si las modificaciones hematológicas observadas *in vivo* y los cambios morfológicos detectados *in vitro* por acción del Al podían deberse a la inducción de eriptosis, se analizaron los principales parámetros relacionados con este proceso.

IV.1.a. Cambios morfológicos inducidos por aluminio in vitro

En primer lugar, se desarrolló el modelo de exposición crónica de eritrocitos a Al *in vitro* y se investigaron los cambios morfológicos inducidos para corroborar que el modelo experimental reprodujera las alteraciones detectadas previamente en nuestro laboratorio (ver Materiales y Métodos).

En los glóbulos rojos controles no se detectaron cambios morfológicos significativos luego de 21 días de incubación con $AlCl_3$. Por otro lado, en concordancia con nuestros resultados previos y con los de Zatta y colaboradores (1989), el Al indujo cambios morfológicos marcados. Un elevado porcentaje de eritrocitos perdieron su forma típica bicóncava para convertirse en acantocitos o estomatocitos (Fig. 29).

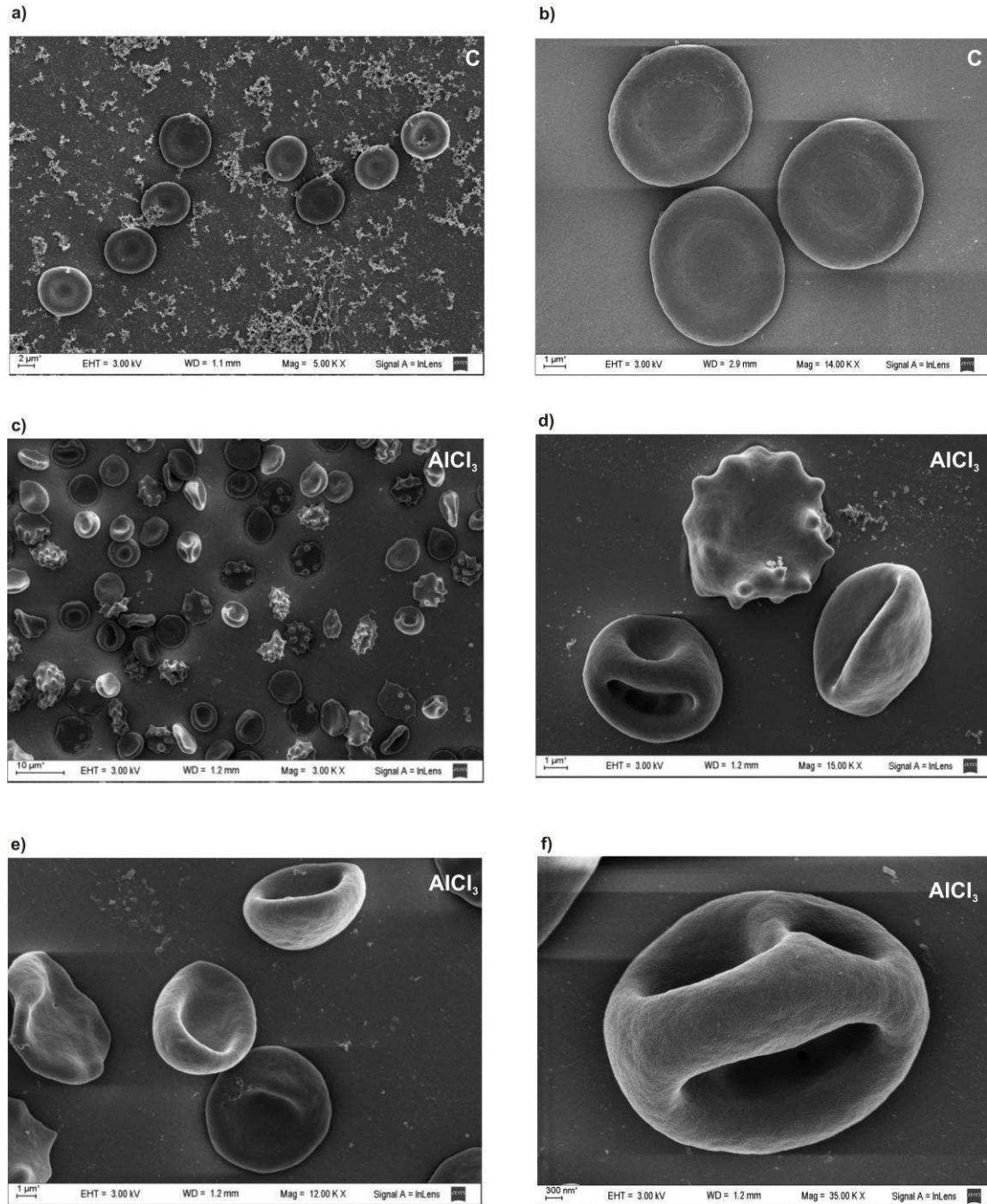


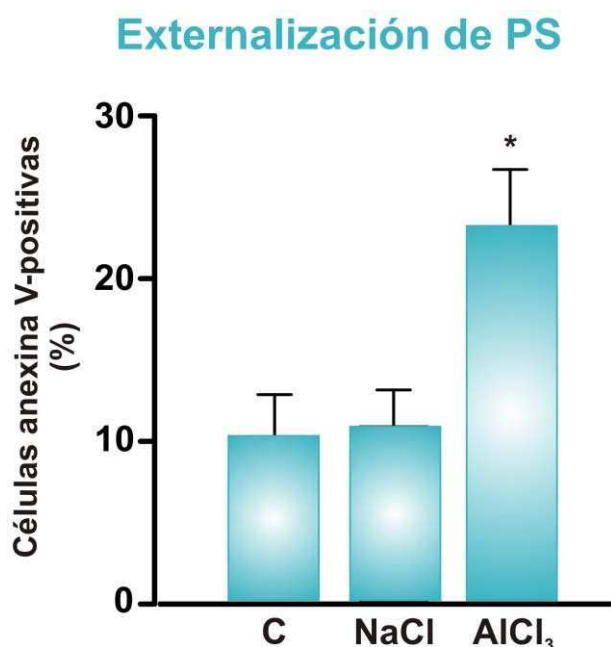
Figura 29: Alteraciones morfológicas inducidas por aluminio. Una vez finalizados los 21 días de incubación de los eritrocitos humanos con AlCl_3 100 mM a 4 °C, los cambios morfológicos fueron detectados por microscopía electrónica de barrido: (a), (b) eritrocitos control, 5.000× y 14.000× respectivamente; (c), (d), (e) eritrocitos tratados con Al, acantocitos y estomatocitos, 3.000×, 12.000× y 15.000× respectivamente; y (f) estomatocito, 35.000×.

IV.1.b. Externalización de fosfatidilserina y aumento de calcio intracelular

Después de incubar los eritrocitos con AlCl_3 por períodos prolongados, se determinaron los niveles de exposición de PS por citometría de flujo. Luego de 21 días de incubación con el metal, se observó un aumento significativo de los niveles de traslocación del fosfolípido (Fig. 30A). Como control del tratamiento, glóbulos rojos fueron incubados en presencia de NaCl en igual concentración que la de AlCl_3 . Si bien los resultados observados en estos controles sólo se muestran en la primera figura, la inclusión de los mismos en todos los experimentos demostró que el anión cloruro no tiene efecto perjudicial sobre los eritrocitos.

Existen reportes en los cuales se postula que el Al puede provocar alteración de la homeostasis del Ca^{2+} celular e interferir en sus vías de señalización. Debido a esta hipótesis y a que el influjo de Ca^{2+} es considerado una característica presente en los diferentes modelos de eriptosis, se determinaron los niveles del catión en eritrocitos tratados con Al. Como se muestra en la Figura 30B, la incubación con el metal indujo un incremento en los niveles de calcio celular.

A



B

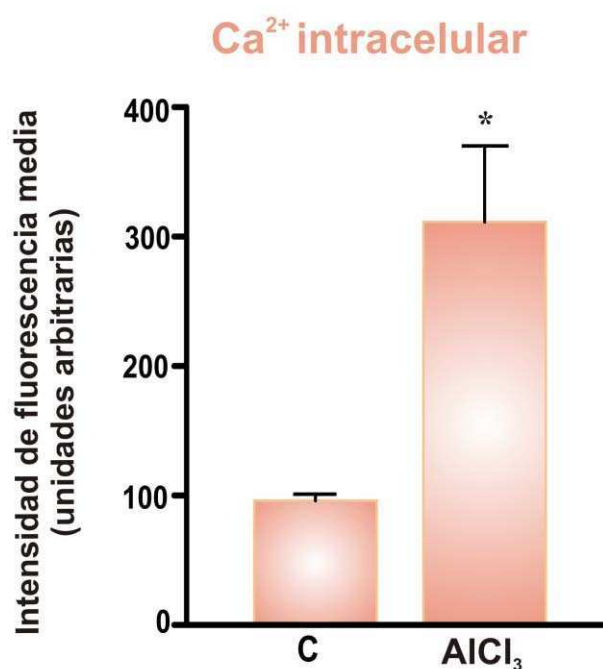


Figura 30: Signos de eritrosis inducidos por aluminio. Eritrocitos fueron incubados en presencia de AlCl₃ 100 mM (Al) o en ausencia (C) o presencia de NaCl 100 mM (NaCl) como controles, por 21 días a 4 °C. **A)** Se detectó la unión de anexina-V a PS en la superficie celular por citometría de flujo. **B)** Luego de la exposición a aluminio, los eritrocitos fueron incubados por 24 h a 37 °C e incubados con FLUO-4 AM con el objetivo de cuantificar el contenido de calcio intracelular por citometría de flujo. Diferencias significativas respecto de C: *P<0,05; n=4.

IV.2. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE ALUMINIO EN LOS ERITROCITOS

Para confirmar el ingreso del metal a las células, se realizaron ensayos cuantitativos utilizando espectrometría de absorción atómica. Los resultados mostraron que el Al se encontraba tanto en el interior de la célula como depositado en la membrana plasmática de los eritrocitos, siendo en esta última fracción su ubicación predominante (Tabla II).

Fracción celular	Al en GR Control	Al en GR tratados	
Membrana	1,7±0,2	33,0±2,5	Al vs C, P<0,05, n=3
Citosol	0,3±0,04	1,2±0,1	Al vs. C, P<0,05 n=3

Tabla II: Cuantificación de aluminio en los eritrocitos. Una vez finalizada la incubación con Al, los eritrocitos fueron lisados, realizándose el fraccionamiento celular para obtener las fracciones citosólica y de membrana. Ambas fracciones fueron analizadas por espectrometría de absorción atómica, localizándose el Al en ambas fracciones. La concentración de Al en cada fracción se expresa en ng Al/μg proteína.

IV.3. BALANCE ÓXIDO-REDUCCIÓN EN ERITROCITOS LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A ALUMINIO

Como se ha demostrado en los capítulos I y II, compuestos oxidantes inducen eriptosis. Teniendo en cuenta dichos resultados, además de la evidencia de que Al puede potenciar eventos oxidativos en diferentes tejidos, el siguiente paso fue evaluar si la exposición al metal podía alterar el balance del estado redox celular. Ensayos evaluados por citometría de flujo mostraron, un aumento significativo de los niveles de ROS (Fig. 31A) en comparación con los controles, concomitante con la disminución de los niveles de GSH, principal defensa antioxidante en los glóbulos rojos (Fig. 31B).

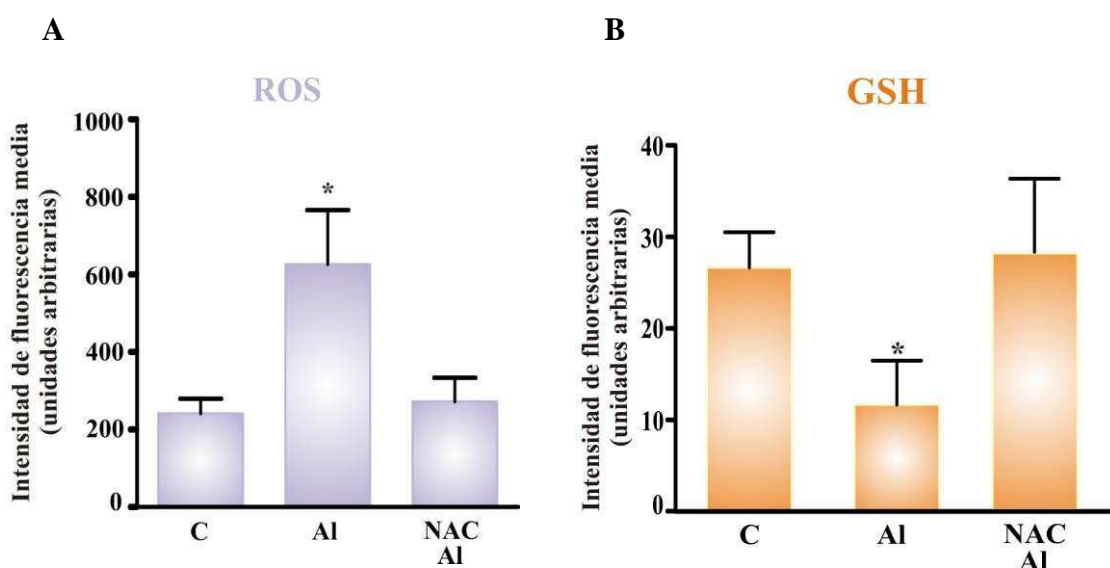


Figura 31: Modificaciones del balance del estado de óxido-reducción en eritrocitos por acción del aluminio. Los eritrocitos fueron incubados en ausencia/presencia de Al 100 μ M por 21 días a 4 $^{\circ}$ C. Ensayos paralelos fueron desarrollados en presencia de N-acetilcisteína (NAC) 5 mM. Los niveles de ROS (A) y GSH (B) fueron determinados por citometría de flujo por reacción con 2',7'-diclorofluorescina y Mercury orange, respectivamente. Diferencias significativas respecto de C y NAC + Al (*P<0,05, n=3).

IV.4. RELACIÓN ENTRE EL DESBALANCE ÓXIDO-REDUCCIÓN Y EL DESARROLLO DE SIGNOS DE ERIPTOSIS

Para confirmar la participación de un efecto oxidante en el mecanismo de acción del Al se realizaron incubaciones de eritrocitos con el metal en presencia de NAC. Este compuesto es uno de los antioxidantes que se usan más frecuentemente en ensayos *in vitro*, ya que sus grupos tioles son capaces de reducir radicales libres. Como se

puede ver en la Figura 31, el efecto oxidante del Al fue completamente prevenido en presencia de NAC, impidiéndose, al mismo tiempo, el consumo de GSH.

La presencia del antioxidante NAC también bloqueó el desarrollo de signos característicos de eriptosis, tales como traslocación de PS e incremento del contenido de calcio intracelular, inducidos por la exposición a Al (Fig. 32).

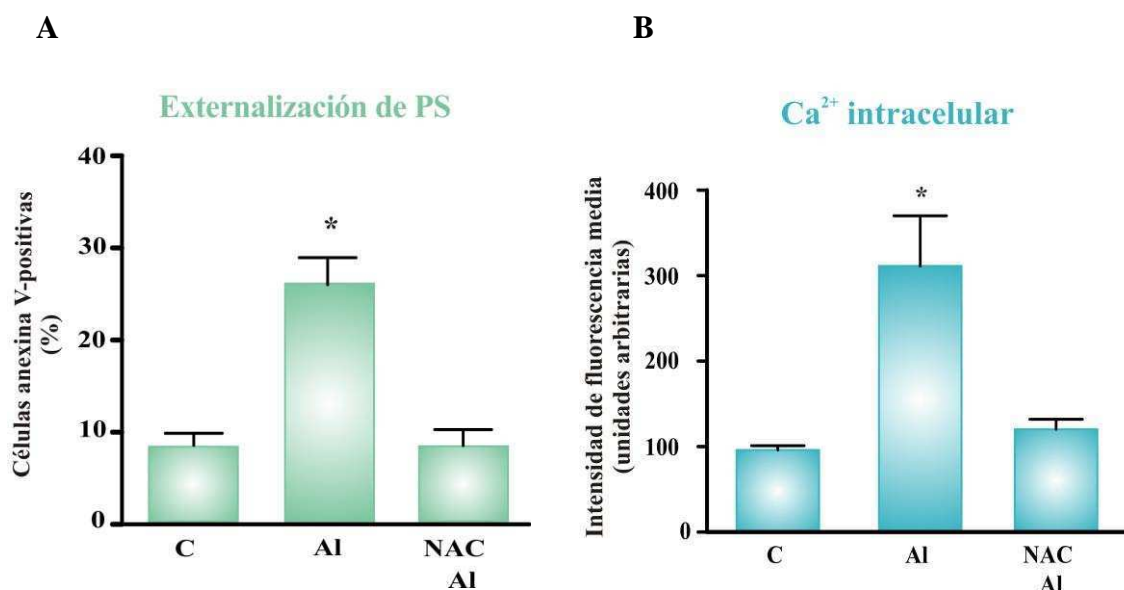


Figura 32: Desarrollo de signos de eriptosis por acción del aluminio y efecto de la presencia de antioxidante. Los eritrocitos fueron incubados en ausencia/presencia de Al 100 μ M por 21 días. Ensayos paralelos fueron desarrollados en presencia de NAC 5 mM. Traslocación de PS (A) y contenido de calcio intracelular (B) fueron determinados por citometría de flujo. Diferencias significativas respecto de C y NAC + Al (* $P < 0,05$, $n=3$).

IV.5. PARTICIPACIÓN DEL ION CALCIO EN EL EFECTO DEL ALUMINIO

Para investigar si el mecanismo de acción del Al es mediado por la movilización de calcio, se desarrollaron ensayos en ausencia de este ion en el medio. Como se esperaba, no se detectó incremento de calcio intracelular cuantificado por citometría de flujo en eritrocitos tratados con Al en ausencia de Ca²⁺ intracelular. Sin embargo, se observó un aumento de los niveles de ROS y de la traslocación de PS (Tabla III), a pesar de que este último signo no alcanzó los niveles inducidos por Al en un medio rico en calcio (Fig. 32).

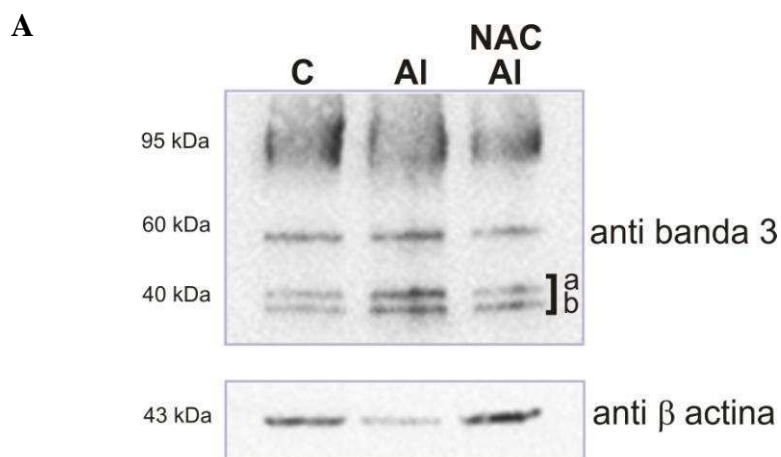
	Niveles de ROS (U.A.)	Traslocación de PS (% cél. anexina V-pos)
Control	264±19	8,4±1,5
Aluminio	490±28*	15,4±0,9*

Tabla III: Acción del aluminio sobre los eritrocitos en ausencia de calcio extracelular. Los eritrocitos fueron incubados por 21 días en un medio libre de calcio en ausencia/presencia de Al. Se determinaron los niveles de ROS y la traslocación de PS por citometría de flujo. * P<0,05, Al vs. C; n=3.

Estos resultados sugieren que el metal es capaz de inducir externalización de PS a través de un efecto oxidante independiente de la señalización por aumento de calcio intracelular.

IV.6. DEGRADACIÓN DE LA PROTEÍNA BANDA 3 DE MEMBRANA LUEGO DEL TRATAMIENTO CON ALUMINIO

Como se mencionó en la Introducción, banda 3 es una proteína integral de membrana que funciona como intercambiador aniónico en el eritrocito, así como también forma parte de un complejo mayor de proteínas encargado de otorgarle al eritrocito su morfología bicóncava y flexibilidad de la membrana. El tratamiento crónico con Al indujo degradación de banda 3 detectada por un incremento en la intensidad de las bandas de fragmentos de bajo peso molecular, particularmente los cercanos a 40 kDa. Esta modificación proteica fue prevenida en los eritrocitos incubados simultáneamente con Al y NAC (Fig. 33).



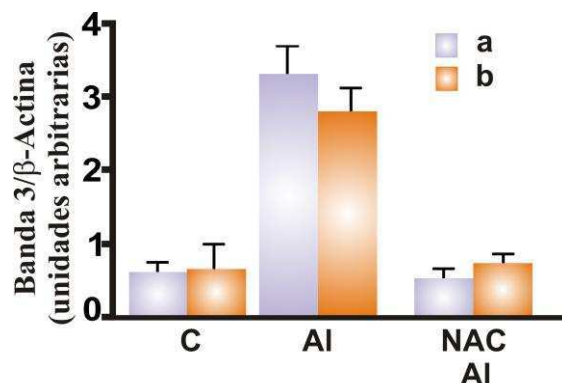
B

Figura 33: Efecto del aluminio sobre la proteína banda 3 de la membrana eritrocitaria. Luego de tratar a los eritrocitos con Al 100 mM o Al + NAC 5 mM por 21 días, las proteínas de membrana fueron aisladas y separadas mediante electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida de gradiente 4-15% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Banda 3 y β -actina fueron detectadas por *immunoblotting*. **A)** El incremento de la densidad en las bandas de 40 kDa (a,b) indica degradación de banda 3 debido a la exposición a Al, efecto que fue prevenido en eritrocitos que fueron co-incubados con NAC. La figura es representativa de 3 ensayos independientes con resultados similares. **B)** Las barras representan la densidad promedio de las bandas de degradación de, aproximadamente, 40 kDa con respecto a la de β -actina.

IV.7. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS ERITROCITOS EXPUESTOS A ALUMINIO A SUFRIR ESTRÉS OXIDATIVO

A partir de la demostración de que un ambiente oxidante induce eritrosis de eritrocitos maduros humanos, resultó interesante determinar si los glóbulos rojos expuestos crónicamente a Al son más susceptibles frente a eventos oxidantes subsecuentes. Para ello, luego de su exposición a Al por 21 días, los eritrocitos fueron incubados con peróxido de hidrógeno y nitrito de sodio durante 90 min. A continuación se evaluó la traslocación de PS (Fig. 34A), el contenido de calcio intracelular (Fig. 34B) y los niveles de ROS (Fig. 34C) por citometría de flujo. Los resultados muestran que los eritrocitos incubados previamente con Al sufren un incremento del daño generado por agentes oxidantes con respecto a aquellos eritrocitos preincubados en un medio libre de Al.

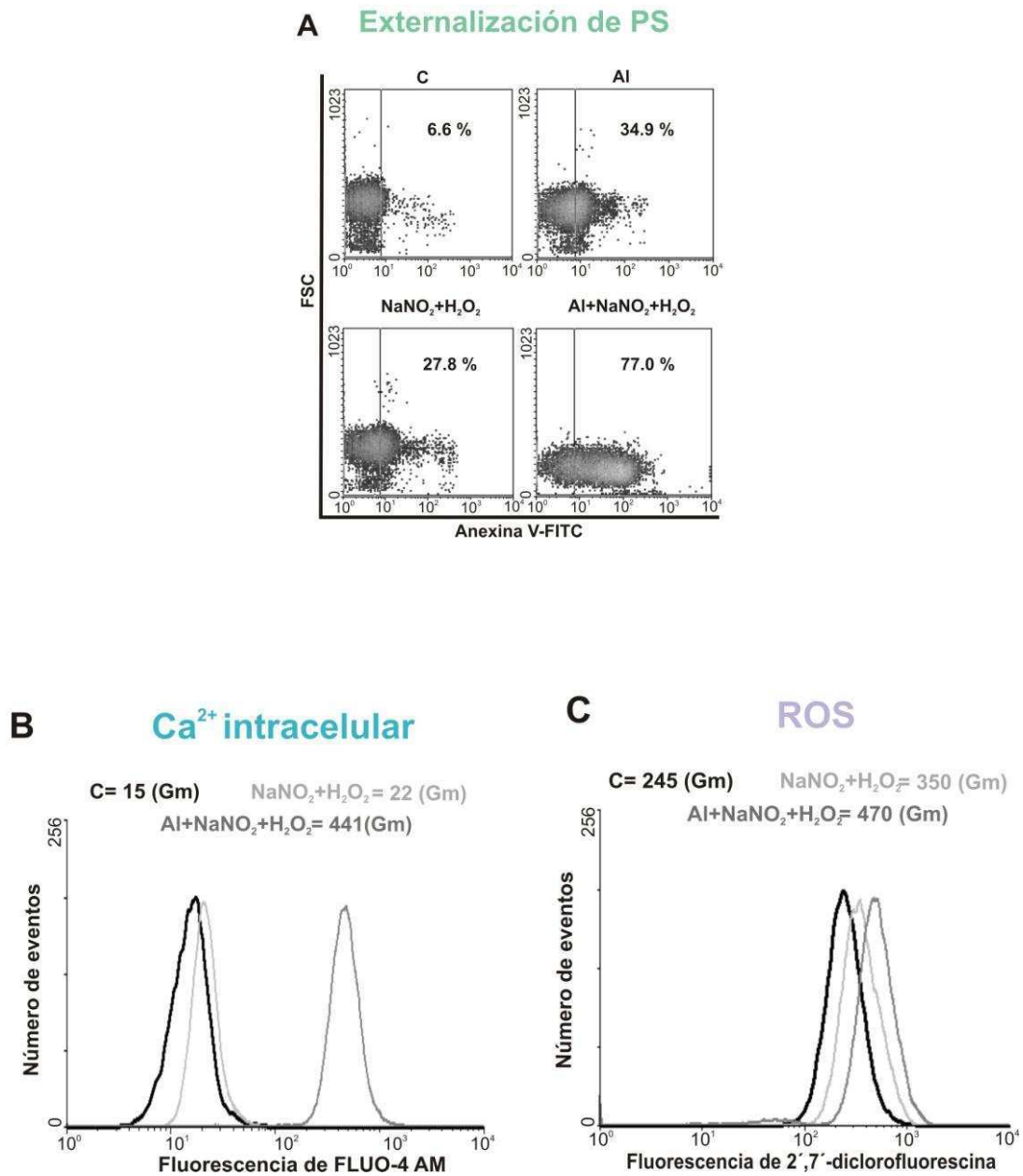
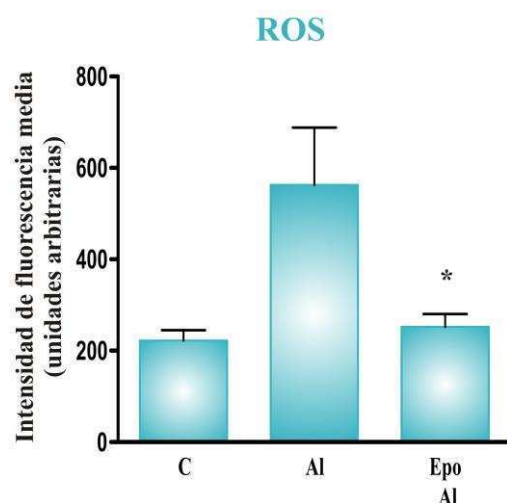
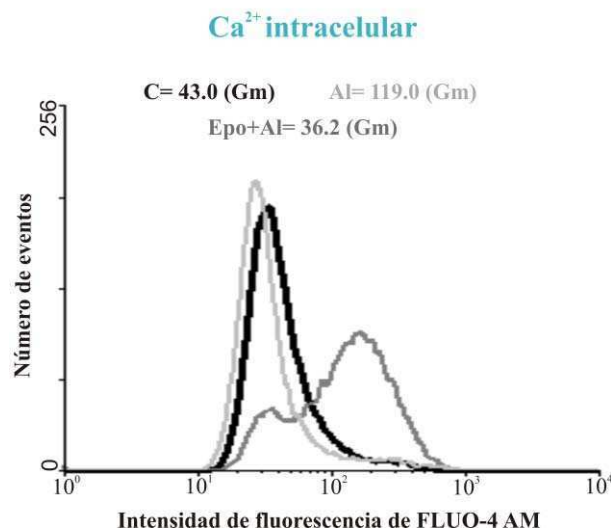


Figura 34: Susceptibilidad a agentes oxidantes de eritrocitos pretratados con aluminio. Luego de la incubación con AlCl_3 por 21 días y posterior remoción del metal de los cultivos, los eritrocitos fueron incubados en presencia de NaNO_2 5 mM + H_2O_2 1 mM durante 90 min a 37 °C. Inmediatamente después, traslocación de PS (A), calcio intracelular (B) y ROS (C) fueron determinados por citometría de flujo. Los resultados están expresados como porcentaje de células Anexina-V positivas (A) o histogramas que representan la media geométrica de valores de fluorescencia en las determinaciones de Ca^{2+} (B) y de ROS (C). Las figuras son representativas de 3 ensayos independientes con resultados similares.

IV.8. ACCIÓN DE ERITROPOYETINA SOBRE ERITROCITOS EXPUESTOS A ALUMINIO

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que no se han descrito funciones de la Epo sobre células eritroides maduras, eritrocitos de pacientes hemodializados parecerían ser menos susceptibles al *shock* hiperosmótico luego del tratamiento con Epo recombinante humana (Myssina *et al*, 2003). Teniendo en cuenta estas observaciones y los resultados mostrados en el capítulo anterior, se investigó si la presencia de Epo en los cultivos podía ser capaz de prevenir el efecto deletéreo del Al sobre eritrocitos expuestos al metal por períodos prolongados. Como se puede observar en la Figura 35, el tratamiento de las células con Epo durante la exposición a Al previno completamente la inducción de ROS (A), del influjo de calcio (B) y de la traslocación de PS (C).

A**B**

C

Externalización de PS

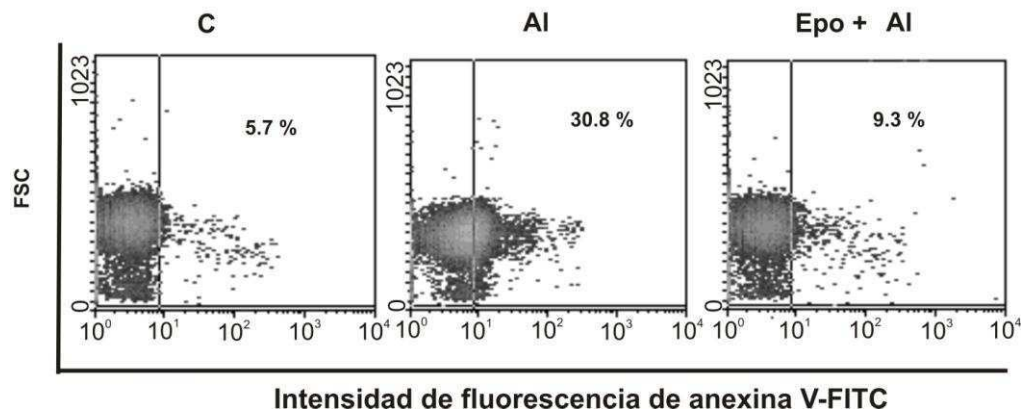


Figura 35: Efecto protector de eritropoyetina sobre eritrocitos expuestos crónicamente a aluminio. Epo, en concentración de 10 U/ml, fue adicionada a las suspensiones de eritrocitos 30 min antes del agregado de AlCl₃. Luego de 21 días de incubación, los eritrocitos fueron sometidos a ensayos de citometría de flujo para determinar los niveles de ROS (A), contenido de calcio intracelular (B) y traslocación de PS (C). Diferencias significativas: Epo-Al vs. Al, *P<0,05; n=3). Las figuras B y C son representativas de 3 ensayos independientes con resultados similares.

DISCUSIÓN

El modelo experimental usado en este trabajo empleando eritrocitos humanos expuestos crónicamente a Al *in vitro* había sido previamente desarrollado en nuestro laboratorio (Vittori *et al*, 2002) para reproducir los efectos tóxicos inducidos en ratas por la ingesta del metal (Vittori *et al*, 1999). La dosis de Al y el tiempo de incubación usados en este modelo, requeridos para reproducir los efectos ocasionados por Al *in vivo*, representan *in vitro* la toxicidad esperada.

En este capítulo se demuestra que el tratamiento prolongado con Al *in vitro* induce, en los eritrocitos, el desbalance del estado de óxido-reducción y el desarrollo de características típicas de eriptosis.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha reportado la sensibilidad a Al de los eritrocitos de animales expuestos crónicamente al metal, representada por los cambios morfológicos experimentados por las células. Los eritrocitos de dichos animales perdían su típica forma bicóncava para convertirse en acantocitos o estomatocitos (Vittori *et al*, 1999; Nesse y Garbossa, 2001). Nuestros resultados *in vitro* mostraron que además de sufrir los mismos cambios morfológicos observados *in vivo*, los eritrocitos sufrían, paralelamente, un incremento de la exposición de PS en la capa lipídica externa de la membrana plasmática. De acuerdo con Suwalsky y colaboradores (1999), los cambios morfológicos inducidos por el metal sugieren que el Al interaccionaría con ambas capas de la membrana. El hecho de que detectáramos altas concentraciones de Al en el interior de los eritrocitos y también depositado en la membrana apoya la hipótesis de la interacción del metal con la membrana de eritrocitos humanos.

La pérdida de asimetría de los fosfolípidos de membrana con la subsecuente externalización de fosfatidilserina luego de 24 h de exposición a Al, ha sido previamente reportada por otros autores (Niemoeller *et al*, 2006). Sin embargo, parecería que los mecanismos involucrados en la intoxicación aguda y crónica con el metal serían diferentes. El desarrollo de eriptosis, luego de exposiciones cortas a Al, no involucraría la producción de estrés oxidativo (Niemoeller *et al*, 2006). A diferencia de ello, nuestros resultados demuestran un rol oxidativo del Al en la inducción de muerte programada de eritrocitos luego de un tratamiento crónico con el metal, con características similares a las de la acción de compuestos prooxidantes como peróxido de hidrógeno y nitrito de sodio. La acción del Al también parece estar relacionada con estrés oxidativo en otros tejidos no hematopoyéticos (Bondy y Campbell, 2001).

La fosforilación-desfosforilación de proteínas en residuos tirosina es uno de los mecanismos involucrados en la regulación de varias funciones eritrocitarias. En este contexto, ha sido reportado que la fosforilación de la proteína de membrana banda 3 es uno de los signos observados durante un proceso oxidativo/inflamatorio (Metere *et al*, 2009; Bordin *et al*, 2010). Ya que la fosforilación y defosforilación de proteínas son eventos dinámicos, no se ha podido investigar la fosforilación de banda 3 en este modelo de toxicidad por Al debido a que las experiencias se desarrollan por tiempos prolongados. Sin embargo, la exposición de los eritrocitos a Al provocó la degradación de dicha proteína. En concordancia con estos resultados, otros autores han propuesto que la degradación de banda 3 sería una de las señales de senescencia durante el proceso fisiológico de envejecimiento eritrocitario, lo cual permitiría la identificación y remoción de circulación de eritrocitos viejos (Kay *et al*, 1989).

Otros mecanismos como la peroxidación lipídica y la activación de enzimas traslocasas podría contribuir a la externalización de PS. Ha sido propuesto que metales sin capacidad redox, como el Al, pueden hacer que los ácidos grasos estén más expuestos al ataque por radicales libres, facilitando de esta manera la propagación de la peroxidación lipídica (Oteiza *et al*, 1993; Ohyashiki *et al*, 1998). Cuando la producción de radicales libres supera la capacidad del sistema de defensa antioxidante, se genera estrés oxidativo. Luego de exponer los eritrocitos a Al, se observó un incremento de los niveles de ROS y una disminución paralela de la concentración de GSH, la defensa antioxidante no enzimática más importante en la célula.

Ha sido reportado que la asimetría lipídica de la membrana plasmática colapsa por la activación de enzimas escramblasas, las cuales catalizan el movimiento bidireccional transmembrana de la mayoría de las clases de fosfolípidos (Beverly y Williamson, 2010). La proteína involucrada en esta actividad no ha sido descubierta aún, sin embargo se cree que existen múltiples vías de señalización que convergen en la activación de la escramblasa. En este contexto, existen dudas acerca de si los mecanismos activados por calcio podrían ser de relevancia fisiológica. El incremento significativo del contenido intracelular de calcio, detectado en eritrocitos luego de incubarlos con Al, sugiere que la vía de señalización del calcio no puede ser despreciada. Niemoeller y colaboradores (2006) han reportado que la concentración del catión aumentaba luego de 6 h de exposición a Al, sin embargo los autores no observaron una disminución de los niveles de GSH, aún luego de 24 h de tratamiento. De acuerdo a nuestros resultados, parecería que es necesaria una exposición crónica

al metal para alcanzar una concentración de radicales libres tal que genere un desbalance del estado de óxido-reducción celular. Hay que tener en cuenta que en principio, la respuesta del sistema de defensa antioxidante es generar un aumento de GSH para contrarrestar la producción de especies reactivas y si las mismas superan la capacidad de amortiguación del sistema, con el transcurso del tiempo comienzan a generarse los daños oxidativos celulares y la disminución tanto de GSH como de la actividad enzimática del sistema antioxidante.

En cuanto a los mecanismos involucrados en la toxicidad por Al, ensayos llevados a cabo en presencia del antioxidante NAC confirmaron el daño prooxidante generado por el metal sobre eritrocitos humanos. El tratamiento simultáneo de glóbulos rojos con NAC protegió efectivamente a las células del efecto tóxico del Al impidiendo la disminución de GSH. También previno la producción de ROS y la acumulación de calcio intracelular inducidos por exposición prolongada a Al. Más aún, NAC previno la externalización de PS, el signo principal de eriptosis. Los resultados sugieren que la producción intracelular de ROS sería una de las primeras alteraciones inducidas por Al, mientras que el mantenimiento de los niveles de GSH formarían parte de la señalización involucrada en la protección de la viabilidad celular. No es sorprendente que la disminución de la protección contra el daño oxidativo incremente significativamente la susceptibilidad celular a un ambiente oxidativo adicional. A pesar de la remoción del Al del medio, los eritrocitos expuestos crónicamente al metal fueron más sensibles que los controles a tratamientos breves con agentes oxidantes. Este resultado debe ser tenido en cuenta especialmente cuando la sobreexposición crónica a Al ocurre en patologías que involucran daño oxidativo, como por ejemplo enfermedades renales crónicas.

El reciente reporte de la primera evidencia computacional acerca de la fuerte probabilidad de la formación de un anión radical superóxido de Al semireducido, refuerza la idea de que el Al en sistemas biológicos tendría actividad prooxidante a través de un mecanismo de formación de aniones superóxido (Mujika *et al*, 2011).

Eritrocitos maduros de pacientes con insuficiencia renal crónica exhibieron un incremento del *binding* de anexina V en comparación con eritrocitos de individuos sanos (Bonomini *et al*, 1999). Más aún, Missyna y colaboradores (2003) observaron que el número de células anexina V positivas disminuyó luego de diálisis sólo en pacientes que habían recibido Epo inmediatamente antes del tratamiento. En este trabajo (capítulo III) se observó que Epo inducía la entrada del catión a los eritrocitos y por ello, no podía prevenir completamente el desarrollo de eriptosis a pesar de su

efecto antioxidante frente a la acción de peróxido de hidrógeno y nitrito de sodio. Recientemente se ha publicado un trabajo en el cual se demostró la interacción química entre aluminio y Epo, lo cual podría sugerir un efecto de la hormona por retención del metal y su consecuente incapacidad de actuar sobre las células (Veiga *et al*, 2011).

En conclusión, el estrés oxidativo está involucrado en la activación de las vías de señalización desencadenadas por Al, lo que podría explicar los cambios morfológicos y bioquímicos inducidos en eritrocitos expuestos crónicamente *in vitro* al metal. El incremento de ROS y disminución de GSH parecerían ser responsables de la alteración de la homeostasis del calcio y harían a los glóbulos rojos potencialmente más susceptibles a daños de otro origen. La activación de mecanismos mediados por enzimas, que causan modificaciones oxidativas de lípidos y degradación de proteínas podría desestabilizar el esqueleto proteico de la membrana de la célula con la aparición de alteraciones morfológicas y *scrambling* de membrana, signos típicos de eriptosis (Vota *et al*, 2012a).

La observación de que los efectos del Al son prevenidos por la presencia de un compuesto antioxidante, es un argumento fuerte para postular al Al como un metal con habilidad prooxidante. Este hallazgo resultaría importante en relación a la acción del metal no sólo sobre el sistema eritropoyetico sino también sobre otros tejidos en los cuales se deposita Al, como por ejemplo el tejido nervioso.

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

En diversas enfermedades crónicas, la inflamación es un importante componente patogénico y se presenta con un aumento en la producción de citoquinas. Algunos autores apoyan una acción antiinflamatoria directa de la eritropoyetina impidiendo la activación celular y la liberación de citoquinas, mientras otros sostienen que ejercería su efecto a través de una acción antiapoptótica directa protegiendo a las células del daño inflamatorio. Probablemente, ambos efectos coexisten. Las asociaciones entre efectos de citoquinas y eritropoyetina son probables si se tiene en cuenta que la activación de algunos factores está involucrada tanto en el proceso inflamatorio como en la eritropoyesis. La existencia de señales intracelulares comunes entre los procesos que regulan la eritropoyesis y la respuesta inflamatoria sugiere que la desregulación de un sistema podría explicar la disminución de la función del otro. El estudio de factores que pueden afectar la sensibilidad de las células eritroides a las diferentes señales recibidas permitiría un mayor conocimiento de la interferencia de la inflamación en la eritropoyesis.

En el presente trabajo se observó que células de la línea eritroleucémica humana K562, en estadio de diferenciación eritroide, son más sensibles a una acción proapoptótica de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β que las células indiferenciadas. El efecto tanto de TNF- α como de IL-1 β fue incrementar la apoptosis, proceso que podría explicarse por la disminución de los niveles de la proteína antiapoptótica c-FLIP, producto de la diferenciación celular con hemina. Un tratamiento previo de las células inducidas a diferenciación eritroide con el factor de crecimiento eritropoyetina las protegió de la acción de citoquinas proinflamatorias, a la vez que mantuvo los niveles intracelulares de c-FLIP.

Los resultados sugieren, por primera vez, que células en etapa de diferenciación eritroide se sensibilizan a la acción de citoquinas proinflamatorias aumentando los niveles de apoptosis y que dicha sensibilidad celular es dependiente de la modulación de c-FLIP. La eritropoyetina contrarrestaría los cambios en las vías de señalización producidos durante el proceso de diferenciación eritroide permitiendo a las células mantener su resistencia a la apoptosis mediada por citoquinas proinflamatorias.

Por otra parte, un daño directo sobre los eritrocitos en circulación, causado por factores generados en un proceso inflamatorio, podría contribuir también al desarrollo de anemia.

En ensayos con eritrocitos humanos maduros sometidos a un ambiente proinflamatorio *in vitro* no se vio afectada la supervivencia celular por la presencia de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, otros factores que también pueden encontrarse presentes en procesos inflamatorios, como agentes oxidantes o nitritos, indujeron muerte prematura programada de los eritrocitos. Entre los signos que caracterizan este proceso denominado eriptosis, se destacan el aumento intracelular de los niveles de calcio, un desbalance del estado de óxido-reducción celular, modificaciones morfológicas y alteraciones de proteínas de membrana, todos ellos con importantes funciones relacionadas con el mantenimiento de la plasticidad de la membrana plasmática y con el metabolismo de los eritrocitos.

Con el objeto de profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desencadenamiento de eriptosis se analizaron, en forma comparativa, dos modelos, uno inducido por agentes prooxidantes (NaNO_2 y H_2O_2) y otro generado por el ingreso masivo de calcio a la célula inducido por ionóforo de calcio (ICa).

Si bien los dos modelos compartían vías de señalización, inducidas probablemente por el aumento de calcio intracelular, también se observaron modificaciones celulares diferentes en cada uno. Las alteraciones morfológicas observadas en los eritrocitos, con predominio de estomatocitos en el modelo de estrés oxidativo y de esferocitos con microvesículas en el modelo de sobrecarga de calcio, sugirieron una participación diferencial de las proteínas responsables de la integridad celular.

Los resultados indican que en la eriptosis por sobrecarga de calcio se activaría calpaína produciendo degradación de la proteína banda 3 en la membrana plasmática y aumento de la actividad de la fosfatasa PTP1B, impidiendo la fosforilación de banda 3 por activación de kinasas. Por otra parte, los agentes oxidantes activarían vías de señalización dependientes e independientes de calcio, las cuales conducirían a la exposición de fosfatidilserina en la membrana celular. En ambos modelos la inducción de traslocación de fosfatidilserina es dependiente de la activación de la kinasa PI3K, sin embargo en el modelo de sobrecarga de calcio existen vías de señalización independientes de esta kinasa que conducirían también a la traslocación del fosfolípido.

Por este motivo se puede inferir que los mecanismos que conducen a un proceso de autodestrucción temprana de los glóbulos rojos difieren dependiendo del inductor de eriptosis involucrado (Figura A).

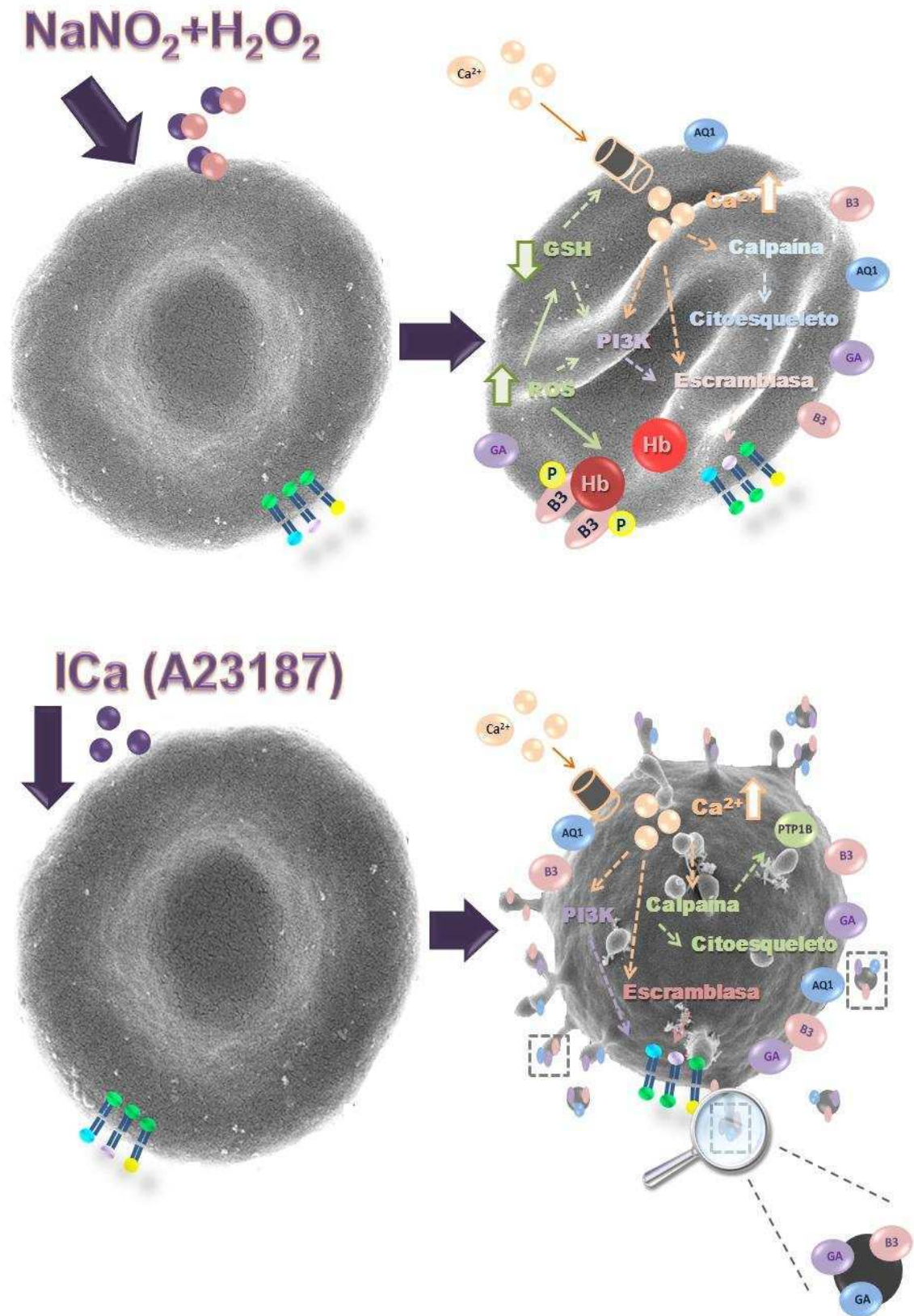


Figura A: Efecto de agentes oxidantes y de la entrada masiva de calcio en los eritrocitos humanos.

Debido a que en cuadros inflamatorios que acompañan a la anemia de enfermedades crónicas los niveles de nitritos se encuentran elevados, los datos obtenidos en presencia de NaNO_2 y H_2O_2 sugieren que estos últimos pueden no sólo contribuir a la producción de anemia actuando sobre los progenitores eritroides sino también produciendo un efecto directo sobre los glóbulos rojos.

En el modelo de eriptosis inducida por agentes oxidantes, la eritropoyetina fue capaz de prevenir el desbalance oxidativo generado por NaNO_2 y H_2O_2 , disminuyendo los niveles de traslocación de fosfatidilserina. Sin embargo, la hormona indujo también un incremento del calcio intracelular lo cual podría explicar su incapacidad para impedir completamente la externalización del fosfolípido. A diferencia de lo observado en el modelo de estrés oxidativo, eritropoyetina no fue capaz de inhibir la traslocación de fosfatidilserina en el modelo de sobrecarga de calcio. Las diferencias de los mecanismos involucrados de los dos modelos estudiados podrían explicar la acción diferencial de la eritropoyetina sobre los eritrocitos inducidos a eriptosis por los diferentes agentes.

Experiencias *in vivo* e *in vitro* realizadas previamente en nuestro laboratorio han sugerido que compuestos de aluminio podrían tener un efecto directo sobre los glóbulos rojos circulantes. El amplio uso del aluminio provee una fácil exposición de los humanos al metal y su acumulación en el organismo continúa siendo un potencial problema. Por este motivo y debido a la evidencia de signos de anemia en pacientes con sobrecarga de aluminio, se investigó al metal como posible agente eriptótico.

La exposición crónica *in vitro* de eritrocitos humanos a aluminio indujo un desbalance del estado de óxido-reducción celular generando daños oxidativos. Los resultados permiten inferir que el efecto oxidante del aluminio sería el desencadenante de los cambios bioquímicos y estructurales observados en los glóbulos rojos. Por otro lado, los eritrocitos expuestos en forma crónica a aluminio mostraron mayor susceptibilidad a la acción de otros agentes oxidantes.

La presencia de eritropoyetina en el medio protegió a los eritrocitos frente al daño oxidativo del aluminio (Figura B), evitando el desarrollo prematuro de signos de eriptosis.

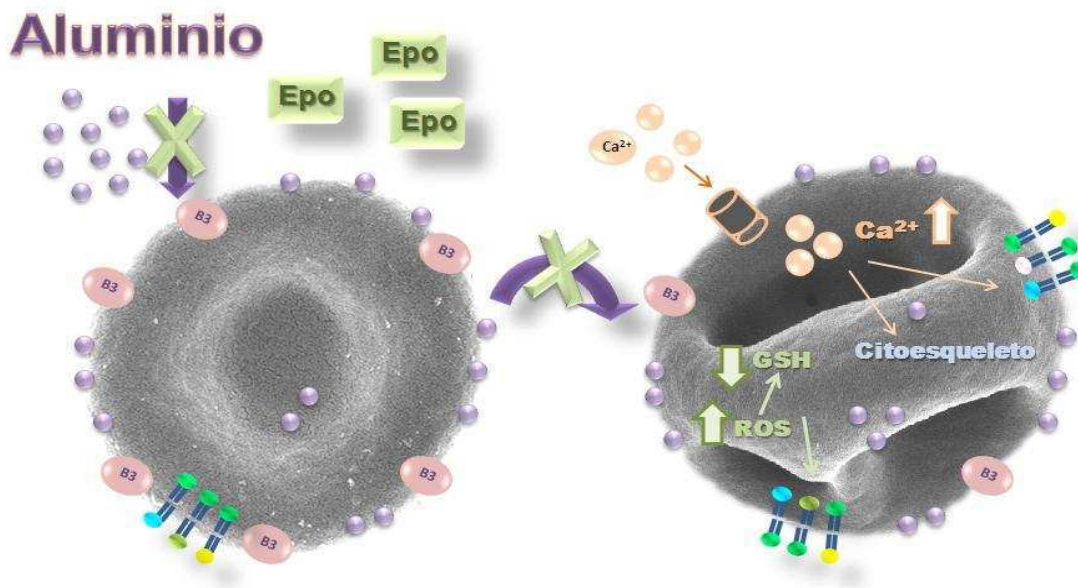


Figura B: Acción del aluminio sobre GR humanos y efecto protector de la eritropoyetina.

Los resultados muestran que los eritrocitos humanos son capaces de sufrir muerte programada a pesar de carecer de núcleo, mitocondrias y otras organelas. Este proceso de eriptosis puede ser desencadenado por diversos factores que modifican la homeostasis e inducen signos de envejecimiento prematuro.

Continuamente las células del sistema retículoendotelial detectan los glóbulos rojos con signos de senescencia para depurarlos de la sangre por fagocitosis y, así, prevenir la hemólisis intravascular. Los cambios producidos prematuramente por eriptosis hacen a los glóbulos rojos más susceptibles para su remoción por los macrófagos. Se producirá, entonces, un desbalance entre la producción y destrucción de eritrocitos que puede llevar a la aparición de anemia.

El conocimiento de los mecanismos de desarrollo de eriptosis puede permitir la identificación de agentes que inducen envejecimiento prematuro de los eritrocitos así como la de factores capaces de retrasar ese proceso y preservar la sobrevivencia de los glóbulos rojos circulantes. Esto puede significar un aporte a corto plazo para un desarrollo farmacológico que permita beneficiar a la cada vez más creciente población de pacientes con anemia de enfermedades crónicas.

REFERENCIAS

-
- Alfrey AC, Le Gendre GR, Kaehny WD. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication, *N Engl J Med* 294:184-188, 1976.
 - Alfrey AC. Phosphate, aluminum, and other elements in chronic renal disease. En: Schrier RW and Gottschalk CW (eds.), *Diseases of the kidney*, Little, Brown & Co, Boston, vol III, pp 3153-3166, 1994.
 - Algeciras-Schimmich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya CV. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis, *J Immunol* 162:5205-5211, 1999.
 - Allen DA, Breen C, Yagoob M, Macdougall C. Inhibition of CFU-E colony formation in uremic patients with inflammatory disease: role of IFN-gamma and TNF-alpha, *J Investig Med* 47:204-211, 1999.
 - Altmann P, Plowman D, Marsh F, Cunningham J. Aluminium chelation therapy in dialysis patients: evidence for inhibition of haemoglobin synthesis by low levels of aluminium, *Lancet* i:1012-1015, 1988.
 - Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells, *Proc Natl Sci USA* 91:3974-3978, 1994.
 - Atwood DA, Yearwood BC. The future of aluminum chemistry *J Organomet Chem* 600:186-197, 2000.
 - Bahlmann FH, de Groot Kirsten, Haller H, Fliser D. Erythropoietin: is it more than correcting anemia, *Nephrol Dial Transplant* 19:20-22, 2004.
 - Benn S, Woolf C. Adult neuron survival strategies – Slamming on the brakes, *Nature Rev* 5:686-700, 2004.
 - Berend K, van der Voet G, Boer WH. Acute aluminum encephalopathy in a dialysis center caused by cement mortar water distribution pipe, *kidney Int* 59:746-753, 2001
 - Bevers EM, Williamson PL. Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett.*, 584 (13): 2724-30, 2010.
 - Bia MJ, Cooper K, Schnall S, Duffy T, Hendler E, Malluche H, Solomon L. Aluminum induced anemia: Pathogenesis and treatment in patients on chronic hemodialysis, *Kidney Int* 36:852-858, 1989.
 - Bohrer D, Oliveira SM, Garcia SC, Nascimento PC, Carvalho LM. Aluminum loading in preterm neonates revisited. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 51(2):237-41, 2010.

-
- Bondy SC, Campbell A, Oxidative and inflammatory properties of aluminium: possible relevance in Alzheimer's Disease. En: Exley C (ed.), Aluminium and Alzheimer's Disease. The science that describes the link, Elsevier Science Inc., Amsterdam, pp 311-321, 2001.
 - Bonomini M, Sirolli V, Settefrati N, Dottori S, Di Liberato L, Arduini A., J Am Soc Nephrol 10(9):1982-90, 1999.
 - Bosman GJ, Klaarenbeek JM, Luten M, Bos HJ., Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 51(2):195-200, 2005.
 - Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier J-P et al. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria, Cell Death Differ 8:1143-1156, 2001.
 - Buchet JP, Lauwerys R, Hassoun A, Dratwa M, Wens R, Collart F, Tielemans C. Effect of aluminum on porphyrin metabolism in hemodialyzed patients, Nephron 46:360-363, 1987.
 - Burrell SA, Exley C. There is (still) too much aluminium in infant formulas, BMC Pediatrics 10:63-66, 2010.
 - Busler WR. Aluminum compounds: Aluminates. En: Kirk RE, Othmer DF, Grayson M, Eckroth D (eds.), Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, John Wiley & Sons, New York, vol 2, pp 197-202, 1979.
 - Buys SS, Kushner JP. Hematologic effects of aluminum toxicity. En: Gitelman HJ (ed.), Aluminum and Health. A Critical Review. Marcel Dekker, New York, pp 235-256, 1989.
 - Calderón-Salinas JV, Muñoz-Reyes EG, Guerrero-Romero JF, Rodríguez-Morán M, Bracho-Riquelme RL, Carrera-Gracia MA, Quintanar-Escorza MA. Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease, Mol and Cell Biochem 357:171-179, 2011.
 - Callero M, Pérez G, Vittori D, Pregi N, Nesse A. Modulation of Protein Tyrosine Phosphatase 1B by erythropoietin in UT-7 cell line, Cell Physiol and Biochem 20:319-328., 2007.
 - Caló LA, Davis PA, Piccoli A, Pessina AC. A role for heme oxygenase-1 in the antioxidant and antiapoptotic effects of erythropoietin: the start of a good news/bad news story?, Nephron Physiol 103: 107-111, 2006.
 - Chattopadhyay A, Das Choudhury T, Bandyopadhyay D, Datta A. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical, Biochem Pharmacol 59:419-425, 2000.

-
- Chen K, Pikhova B, Pittman RN, Schechter AN, Popel AS. Nitric oxide from nitrite reduction by hemoglobin in the plasma and erythrocytes, *Nitric Oxide* 18:47-60, 2008.
 - Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
 - Ciana A, Minetti G, & Balduini C. Phosphotyrosine phosphatases acting on band 3 in human erythrocytes of different age: PTP1B processing during cell ageing, *Bioelectrochemistry* 62:169-173, 2004.
 - Daleke DL. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane, *Current Opinion in Hematology* 15:191-195, 2008.
 - Daugas E, Candé C, Kroemer G. Erythrocytes: death of a mummy, *Cell Death Differ* 8:1131-1133, 2001.
 - de Broe ME, D'haese PC, Elseviers MM, Clement J, Visser WJ, van de Vyver FL, Aluminium and end-stage renal failure. En: Davison AM (ed.), *Nephrology. Proceedings of the Xth International Congress of Nephrology*, vol II, pp 1086-1116. Baillière Tindall, Londres, 1988.
 - Donovan M, Cotter T. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death, *Biochim Biophys Acta* 1644:133-147, 2004.
 - Drüeke T, Lacour B, Touam M, Jucquel JP, Plachot JJ, Cournot-Witmer G, Galle P. Effect of aluminum on hematopoiesis, *Kidney Int* 29 (Suppl 18): s45-s48, 1986.
 - Eschbach JW, Adamson JW. Anemia of end-stage renal disease (ESRD), *Kidney Int* 28:1-5, 1985.
 - Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Result of a combined phase I and II clinical trial, *N Engl J Med* 316:73-78, 1987.
 - Eschbach JW. The anemia of chronic renal failure: Pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin, *Kidney Int* 35:134-148, 1989.
 - Exley C, Birchall JD. The cellular toxicity of aluminium, *J theor Biol* 159:83-98, 1992.
 - Feirbanks G, Steck TL, Wallach DF. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry* 10:2606-2617, 1971.
 - Fisher Jw. Erythropoietin: physiology and pharmacology update, *Exp Biol Med* 228:1-14, 2003.

-
- Flarend R. Absorption of aluminum from antiperspirants and vaccine adjuvants. En: Exley C (ed.), Aluminium and Alzheimer's disease. The science that describes the link. Elsevier, Amsterdam, 2001.
 - Frangioni, JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, & Neel BG. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets, EMBO Journal 12:4843-4846, 1993.
 - Fraser JK, Lin F, Berridge MV. Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562, Blood 71:104-109, 1988.
 - Garbossa G, Gutnisky A, Castro ME, Rizzo N, Nesse A. Depressed erythroid progenitor cell activity in aluminium-overloaded mice, Miner Electrolyte Metab 22:214-218, 1996.
 - Garbossa G, Gálvez G, Castro ME, Nesse A. Oral aluminum administration to rats with normal renal function. 1. Impairment of erythropoiesis, Human Exper Toxicol 17:312-317, 1998a.
 - Garbossa G, Gálvez G, Pérez G, Stripeikis J, Tudino M, Nesse A. Oral aluminum administration to rats with normal renal function. 2. Body distribution, Human Exper Toxicol 17:318-322. 1998b.
 - Ghoti H, Amer J, Winder A, Rachmilewitz E, Fibach E. Oxidative stress in red blood cells, platelets and polymorphonuclear leukocytes from patients with myelodysplastic syndrome, Eur J Haematol 79:463-467, 2007.
 - Goicoechea M, Martín J, de Sequera P, Quiroga JA, Ortiz A, Carreno V, Caramelo C. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodiálisis patients, Kidney Int 54:1337-1343, 1998.
 - Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Immunology, pp 303-315, W.H. Freeman and company, New York, 2000.
 - Grasso G, Sfacteria A, Cerami A, Brines M. Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go?, Neuroscientist 10(2):93-8, 2004. Review.
 - Hagelberg C, & Allan D. Restricted diffusion of integral membrane proteins and polyphosphoinositides leads to their depletion in microvesicles released from human erythrocytes, Biochemical Journal 271:831-834, 1990.
 - Hail N, Carter B, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys, Apoptosis 11:889-904, 2006.

-
- Harris WR, Berthon G, Day JP, Exley C, Flaten TP, Forbs WF, Kiss T, Orvig C, Zatta PF. Speciation of aluminum in biological system, *J Toxicol Environ Health* 48:543-568, 1996.
 - Hay RJ, Cell line preservation and characterization. En: Freshney RI (ed.) *Animal cell culture. A practical approach.*. Oxford University Press, New York, 2nd Edition, pp 95-148, 1992.
 - Hem JD. Geochemistry and aqueous chemistry of aluminum, *Kidney Int* 29 (Suppl 18): s3-s7, 1986.
 - Hietakangas V, Poukkula M, Heiskanen KM, Karvinen JT, Sistonen L, Eriksson JE. Erythroid differentiation sensitizes K562 leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by downregulation of c-FLIP, *Mol Cell Biol* 4:1278-91, 2003.
 - Imagawa S, Smith BR, Palmer-Crocker R, Bunn F. The effect of recombinant erythropoietin on intracellular free calcium in erythropoietin-responsive cells, *Blood* 73:1452-1457, 1989.
 - Jelkmann W. Erythropoietin, *J Endocrinol Invest.*, 26(9):832-7, 2003. Review
 - Jongen-Lavrencic M, Peeters HR, Wognum A, Vreugdenhil G, Breedveld FC, Swaak AJ. Elevated levels of inflammatory cytokines in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis and anemia of chronic disease, *J Rheumatol* 24:1504-1509, 1997.
 - Kaiser L, Schwartz KA, Burnatowska-Hledin MA, Mayor GH. Microcytic anemia secondary to intraperitoneal aluminum in normal and uremic rats, *Kidney Int* 26: 269-274, 1984.
 - Kang YC, Kim KM, Lee KS, Namkoong S, Lee SJ, Han JA, Jeoung D, Ha KS, Kwon YG, Kim YM. Serum bioactive lysophospholipids prevent TRAIL-induced apoptosis via PI3K/Akt-dependent c-FLIP expression and Bad phosphorylation, *Cell Death Differ* 11:1287-1298, 2004.
 - Katavetin P, Inagi R, Miyata T, Shao J, Sassa R, Adler S, Eto N, Kato H, Fujita T, Nangaku M. Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress, *Biochem Biophys Res Commun* 359:928-934, 2007.
 - Kay MM, Flowers N, Goodman J, Bosman G. Alteration in membrane protein band 3 associated with accelerated erythrocyte aging, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5834-5838, 1989.
 - Kempe D, Akel A, Lang P, Hermle T, Biswas R, Muresanu J et al. Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med* 85:273-281, 2007.

-
- Kempe D, Lang P, Durantón C, Akel A, Lang K, Huber S, et al. Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J*, publicado on line, 21-12-05.
 - Kirkpatrick FH, Hillman DG, & La Celle PL. A23187 and red cells: changes in deformability, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ and ATP, *Experientia* 31:653-654, 1975.
 - Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells, *Science* 248:378-381, 1990.
 - Koury MJ. The anemia of chronic disease: TNF- α involvement in erythroid apoptosis, *Blood* 100:373-374, 2002.
 - Krantz S. Erythropoietin, *Blood* 77:419-434, 1991.
 - Krebs D, Hilton D. SOCS: physiological suppressors of cytokine signalling, *J Cell Sci* 113:2813-2819, 2000.
 - Kreuger A, Baumann S, Krammer P, Kirchhoff S. FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis, *Mol Cell Biol* 21:8247-8254, 2001.
 - Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680-685, 1970.
 - Lang F, Lang K, Lang P, Huber S, Wieder T. Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiol* 187:191-198, 2006.
 - Lang K, Lang P, Bauer C, Durantón C, Wieder T, Huber S, Lang F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15:195-202, 2005.
 - Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7580-7584, 1985.
 - López-Carballo G, Moreno L, Masiá S, Perez P, Baretino D. Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic Acid Is Required for Neural Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells, *J Biol Chem* 277:297-304, 2002.
 - Lowry OR, Roseborough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
 - Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood* 45: 321-334, 1975.
 - Macdougall IC. Poor response to erythropoietin: practical guidelines on investigation and management, *Nephrol Dial Transpl* 10:607-614, 1995.
 - Mallozi C, Di Stasi AM, & Minetti M. Nitrotyrosine mimics phosphotyrosine binding to the SH2 domain of the src family tyrosine kinase lyn, *FEBS Letters* 503:189-195, 2001.

-
- Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role of lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:1943-1948., 2002.
 - Martyn CN, Osmond C, Edwardson JA, Barker DJP, Harris EC, Lacey RF. Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water, *Lancet* i:59-62, 1989.
 - McAteer JA, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. En: Davis JM (ed.), *Basic cell culture. A practical approach*, Oxford University Press, New York, pp 93-148, 1994.
 - Metere A, Iorio E, Pietraforte D, Podo F, & Minetti M. Peroxynitrite signaling in human erythrocytes: synergistic role of hemoglobin oxidation and band 3 tyrosine phosphorylation, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 484:173-182., 2009.
 - Minetti G, Ciana A, Balduini C. Differential sorting of tyrosine kinases and phosphotyrosine phosphatases actino on band 3 during vesiculation of human erythrocytes, *Biochem J* 377:489-497, 2004.
 - Mladenovic J, Kay NE. Erythropoietin induces rapid increases in intracellular free calcium in human bone marrow cells, *J. Lab Clin Med* 112:23-27, 1988.
 - Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids, *Semin Hematol* 30:171-192, 1993.
 - Mohandas N, Groner W. Cell membrane and volume changes during red cell development and aging., *Ann N Y Acad Sci.* 554:217-24, 1989. Review.
 - Morgan J, Morton H, Parker R. Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium, *Proc Soc Exp Biol Med* 73:1-8, 1950.
 - Mujika JI, Ruiperez F, Infante I, Ugalde JM, Exley C, Lopez X. Prooxidant activity of aluminium: Stabilization of the aluminum superoxide radical ion, *J Phys Chem* 115:6717–6723, 2011.
 - Mulcahy L. The erythropoietin receptor, *Sem Oncol* 28:19-23, 2001.
 - Myssina S, Huber S, Birka C, Lang P, Lang K, Friedrich B et al. Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 14:2750-2757, 2003.
 - Nagy E, Jobst K. Aluminium dissolved from kitchen utensils, *Bull Environ Contam Toxicol* 52:396-399, 1994.
 - Nayak P. Aluminum: Impacts and disease, *Environ Res* 89:101-115, 2002.

-
- Nelson DA, Davey FR. Hematopoyesis. En: Henry JB (ed.). Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Masson-Salvat Medicina, Barcelona, 9ª Edición, pp 623-640, 1993.
 - Nesse A, Garbossa G. Aluminium toxicity in erythropoiesis, Mechanisms related to cellular dysfunction in Alzheimer's disease, in: C. Exley (Ed.), Aluminium and Alzheimer's Disease. The Science that describes the link, Amsterdam: Elsevier, p. 261-277, 2001.
 - Nesse A, Garbossa G, Stripeikis J, Gálvez G, Castro ME, Rizzo N, Lauricella AM, Gutnisky A. Aluminum accumulation in chronic renal failure affects erythropoiesis, *Nephrology*, 3:347-351, 1997.
 - Niemoeller O, Kiedaisch V, Dreischer P, Wieder T, Lang F. Stimulation of eryptosis by aluminium ions, *Toxicol Applied Pharmacol* 217:168-175, 2006.
 - Ohyashiki T, Suzuki S, Satoh E, Uemori Y. A marked stimulation of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in phospholipid liposomes by a lipophilic aluminum complex, aluminum acetylacetonate, *Biochim Biophys Acta* 1389:141-149, 1998.
 - Oteiza PI, Fraga CG, Keen CL. Aluminum has both oxidant and antioxidant effects in mouse brain membranes, *Arch Biochem Biophys* 300:517-52, 1993.
 - Palek, J., Stewart, G., & Lionetti, F.J. The dependence of shape of human erythrocyte ghosts on calcium, magnesium, and adenosine triphosphate, *Blood* 44:583-597, 1974.
 - Panka D, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier J. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells, *J Biol Chem* 276:6893-6896, 2000.
 - Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor antibody therapy, *Blood* 100:474-482, 2002.
 - Pennington JA, Schoen SA. Estimates of dietary exposure to aluminium. *Food Addit Contam* 12:119-128, 1995.
 - Perez D, White E. E1A sensitises cells to Tumor Necrosis Factor Alpha by downregulating c-FLIP, *J Virol* 77:2651-2662, 2003.
 - Pérez G, Garbossa G, Sasseti B, Di Risio C, Nesse A. Interference of aluminium on iron metabolism in erythroleukaemia K562 cells, *J Inorg Biochem* 76:105-112, 1999.
 - Pérez G, Garbossa G, Di Risio C, Vittori D, Nesse A. Disturbance of cellular iron uptake and utilization by aluminium, *J Inorg Biochem* 87:21-27, 2001.

-
- Pérez G, Pregi N, Vittori D, Garbossa G, Nesse A. Interferencia del aluminio con el metabolismo del hierro. Estudio de receptores involucrados, *Medicina* 62:443, 2002.
 - Pertosa G, Grandaliano G, Gesualdo L, Schena FP. Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis, *Kidney Int* 76:S104-111, 2000.
 - Peter M. The flip side of FLIP, *Biochem J* 382:e1-3, 2004.
 - Pietraforte D, Matarrese P, Straface E, Gambardella L, Metere A, Scorza G, Leto T, Malorni W, & Minetti M. Two different pathways are involved in peroxynitrite-induced senescence and apoptosis of human erythrocytes, *Free Radical Biology & Medicine* 42: 202-214, 2007.
 - Quintanar-Escorza MA, González-Martínez MT, Intriago-Ortega MP, & Calderón-Salinas JV. Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca²⁺]_i concentration in human erythrocytes incubated with lead, *Toxicology In Vitro* 24:1338-1346, 2010.
 - Richards RS, Wang L, & Jelinek H. Erythrocyte Oxidative Damage in Chronic Fatigue Syndrome, *Archives of Medical Research* 38:94-98, 2006.
 - Rippo MR, Moretti S, Vescovi S, Tomasetti V, Orecchia S, Amici G, Catalano A, Procopio A. FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells, *Oncogene* 23:7753-7760, 2004.
 - Rodríguez Suárez C, Serrano M, Rodríguez Roza R, Peral V, Cannata JB. Fuentes de exposición al aluminio en la insuficiencia renal crónica, *Nefrología* 6:75-78, 1986.
 - Rossert J, Eckardt KU. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis, *Nephrol Dial Transplant* 20(6):1025-8, 2005.
 - Rusten L, Jacobsen S. Tumor Necrosis Factor (TNF- α) directly inhibits human erythropoiesis in vitro: Role of p55 and p75 TNF receptors, *Blood* 85:989-996, 1995.
 - Salusky IB, Foley J, Nelson P, Goodman WG. Aluminum accumulation during treatment with aluminum hydroxide and dialysis in children and young adults with chronic renal disease, *N Engl J Med* 324:527-531, 1991.
 - Sambrook J, Russell D, Chapter 7: Extraction, purification, and analysis of mRNA from eukaryotic cells. En: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 3rd. Ed., pp. 7.1-7.88, 2001.
 - Sanai T, Okuda S, Onoyama K, Motomura K, Osato S, Hori K, Iseki K, Fujishima M. Effect of different doses of aluminium hydroxide on renal deterioration and nutritional state in experimental chronic renal failure, *Miner Electrolyte Metab* 17: 160-165, 1991.

-
- Shakibaei M, John T, Seifarth C, Mobasheri A. Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro, *Ann N Y Acad Sci* 1095:554-63, 2007.
 - Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4044-4049, 2001.
 - Stenvinkel P. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease, *Nephrol Dial Transplant* 16:6-40, 2001.
 - Suwalsky M, Ungerer B, Villena F, Norris B, Cardenas H, Zatta P. Interactions of Al(acac)₃ with cell membranes and model phospholipid bilayer, *J Inorg Biochem* 75:263-268, 1999.
 - Szabó C, Ischiropoulos H, & Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery* 6:662-680, 2007.
 - Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis, *Leukemia* 18:1176-1199, 2004.
 - Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979.
 - Trapp GA. Interactions of aluminum with cofactors, enzymes, and other proteins, *Kidney Int* 29 (Suppl 18): s12-s16, 1986.
 - Veiga M, Bohrer D, NoreMBERG S, do Nascimento PC, de Carvalho LM. Evidence for aluminum-binding erythropoietin by size-exclusion chromatography coupled to electrothermal absorption atomic spectrometry, *J Inorg Biochem* 105(11):1500-4, 2011.
 - Vittori D, Nesse A, Pérez G, Garbossa G. Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminium, *J Inorg Biochem* 76:113-120, 1999.
 - Vittori D, Garbossa G, Lafourcade C, Pérez G, Nesse A. Human erythroid cells are affected by aluminium. Alteration of membrane band 3 protein, *Biochim Biophys Acta* 1558:142-150, 2002.
 - Vittori D, Pregi N, Pérez G, Garbossa G, Nesse A. The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminum exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor, *Biochim Biophys Acta* 1743:29-36, 2005.

-
- Vittori D*, Vota D*, Callero M, Chamorro ME, Nesse A. c-FLIP is involved in erythropoietin-mediated protection of erythroid-differentiated cells from TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell Biol Int.*;34 (6):621-30, 2010. *This authors contributed equally to this work.
 - Vittori D, Vota D, Nesse A. Erythrocyte : Programmed Cell Death, in: D. Silverberg (Ed.), *Anemia*, Croacia: Intech, p. 21-38, 2012.
 - Vota D, Crisp R, Nesse A, Vittori D. Oxidative stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin, *J Cell Biochem* 113:1581–1589, 2012a.
 - Vota D, Maltaner R, Wenker S, Nesse A, Vittori D. Cells induced to eryptosis by different agents, *Cell Biochem Biophys*, En prensa, publicado online DOI 10.1007/s12013-012-9408-4, 2012b.
 - Vives Corrons J. Estructura de la membrana eritrocitaria y clasificación de sus trastornos. En: López Borrascas A (ed.), *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*, Ediciones Universidad Salamanca, Salamanca, Volumen I, pp 301-312, 1992.
 - Wenker SD, Chamorro ME, Vota DM, Callero MA, Vittori DC, Nesse AB. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells, *J Cell Biochem* 110 (1):151-61, 2010.
 - Wills MR, Savory J. Aluminium poisoning: Dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia, *Lancet* ii:29-34, 1983.
 - Worthington RE, Bossie-Codreanu J, van Zant G. Quantitation of erythroid differentiation in vitro using a sensitive colorimetric assay for hemoglobin, *Exp Hematol* 15:85-92, 1987.
 - Yang B, Ma T, Verkman AS. Erythrocyte water permeability and renal function in double knockout mice lacking aquaporin-1 and aquaporin-3, *J Biol Chem* 276 (1):614-628, 2001.
 - Zatta P, Perazzollo M, Corain B. Tris acetylacetonate aluminium (III) induces osmotic fragility and acanthocyte formation in suspended erythrocytes, *Toxicol Lett* 45:15-21, 1989.
 - Zhang MY, Sun SC, Bell L, Miller B. NF- κ B transcription factors are involved in normal erythropoiesis, *Blood* 91:4136-4144, 1998.
 - Zhao W, Kitidis C, Fleming M, Lodish H, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway, *Blood* 107:907-915, 2006.

- Zipser Y, Kosower N. Phosphotyrosine phosphatase associated with band 3 protein in the human erythrocyte membrane. *Biochem J* 314:881-887, 1996.