



AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN

# **Informe final publicable de proyecto Estrategias para mejorar la manufactura, conservación y calidad de los preparados de hemocomponentes para transfusión**

**Código de proyecto ANII: FMV\_1\_2019\_1\_155597**

25/10/2022

## Resumen del proyecto

La transfusión de glóbulos rojos y de otros hemoderivados son una herramienta de extremo valor para la práctica clínica. Sin embargo, las reacciones adversas a la transfusión de hemo componentes son una complicación relativamente frecuente. La presencia de leucocitos y de los mediadores solubles generados por estas células en la bolsa de transfusión ha sido señalada como responsable de cambios estructurales y metabólicos en los glóbulos rojos durante el almacenamiento. El empleo de técnicas de leucorreducción en la Unión Europea y en parte de los Estados Unidos ha disminuido la incidencia de estas reacciones desfavorables. En nuestro país, de los 160.000 volúmenes de concentrados de glóbulos rojos trasfundidos al año, sólo un 15% se leucorreducen. Además, este proceso se realiza sobre preparados almacenados por un tiempo variable, lo que lleva a la acumulación de mediadores inflamatorios y la aparición de un fenotipo senescente en los eritrocitos. Este proyecto se origina a partir de la colaboración entre la Cátedra de Medicina Transfusional del Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina e investigadores del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias, con el fin de colaborar en la instauración de políticas sanitarias tendientes a mejorar la provisión de esta importante herramienta terapéutica. De los resultados obtenidos en el proyecto podemos concluir: 1. Que la leucorreducción es una herramienta efectiva para prevenir la acumulación de mediadores proinflamatorios en el preparado, 2. Que la remoción de leucocitos enlentece el desarrollo del fenotipo envejecido en los glóbulos rojos almacenados. 3. Que la presencia de lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de los preparados es un índice sensible para evaluar el estado de los preparados para transfusión. 4. La financiación obtenida permitió además el dictado de dos cursos en el área, la realización de un simposio internacional y la formación de recursos humanos.

**Ciencias Médicas y de la Salud / Ciencias de la Salud / Ciencias y Servicios de Cuidado de la Salud / Hemoterapia**

**Palabras clave: hemoterapia / leucorreducción / calidad /**

## Introducción

La transfusión sanguínea es una herramienta terapéutica imprescindible. En nuestro país se emplean ~160.000 volúmenes de concentrados de glóbulos rojos (GR) al año. La provisión de hemocomponentes depende de donantes voluntarios y de la preservación de estos productos. Los medios de preservación actuales aseguran la conservación de los GR por 42 días [1,2]. Pero, los glóbulos rojos (GR) almacenados aún por corto tiempo sufren cambios estructurales y bioquímicos que tienen repercusiones clínicas. Estos cambios conducen a la pérdida paulatina de funciones relevantes y a la ganancia de funciones perjudiciales, lo que conduce al fenotipo de envejecimiento [3]. En el caso particular de los GR almacenados para transfusión, el envejecimiento involucra modificaciones tanto a nivel de las moléculas citosólicas como de membrana, denominadas colectivamente "lesiones por almacenamiento". Al menos en parte, estas lesiones son promovidas por oxidantes producidos por los propios GR [4,5] y por los leucocitos presentes en el preparado. La acumulación progresiva de GR senescentes en la bolsa de transfusión se debe a la falta de contacto con el sistema de remoción con el que entra en contacto en la circulación, que prolonga en el interior de la bolsa la sobrevivencia de una célula programada para durar 120 días [2].

Resultados previos de nuestro grupo demostraron una disminución importante y progresiva en la capacidad de metabolizar peróxido de hidrógeno agregado al medio extracelular por parte de los GR almacenados para transfusión [6]. Esto no se debería a cambios inducidos por el almacenamiento en la maquinaria antioxidante que presentan los GR [7], como lo indica la simulación realizada en base a los resultados reportados en [6]. Alteraciones a nivel de la permeabilidad de la membrana del GR podrían entonces explicar las diferencias encontradas en el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conociendo que en otros tipos celulares el transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende de acuaporinas [8–10] y conociendo la existencia de alteraciones también a nivel del componente lipídico de la membrana [11,12], se puede hipotetizar que cambios moleculares tanto en proteínas y lípidos de la membrana inducidos por el almacenamiento serían los responsables de los cambios en el transporte de solutos.

En este sentido, estudios de proteómica de la fracción de membrana de GR evidenciaron cambios proteicos a partir del día 14 de almacenamiento, incluyendo la fragmentación de proteínas estructurales y acumulación de proteínas citosólicas que se asocian fundamentalmente a la banda 3 [13]. Esta acumulación proteica precede y se asocia con la formación de vesículas de membrana y la liberación de micro vesículas (MV), una de las características del envejecimiento eritrocítico [14]. Se ha demostrado que al igual que sucede con la banda 3, el número de moléculas de acuaporina 1 (AQP1) presentes

en la membrana disminuye con el almacenamiento [15]. Las AQP son una familia de proteínas de membrana especializadas en el transporte de agua (AQP ortodoxas) y de otros solutos pequeños no cargados. La AQP1 representa la isoforma mayoritaria en el GR (58.000 copias/célula) [16] y es la encargada del intercambio rápido de agua [17]. Si bien el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podía utilizar acuaporinas para atravesar membranas celulares, la AQP1 humana no permitiría su permeación [10]. Por su parte, la AQP3 (una acuagliceroporina) menos representada en la membrana del GR (1.700 copias/cel) se ha relacionado con el transporte y la señalización mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en otros tipos celulares [9], aunque no se conoce su rol en el GR. En un intento por identificar a la AQP involucrada en el transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en GR se empleó una serie de inhibidores específicos de estos transportadores, sin lograr identificar de forma convincente a la molécula responsable, por lo que continuamos ahondando en esta investigación [18], como describiremos en las secciones siguientes.

Además de afectar el transporte del solvente y solutos, los cambios a nivel de la membrana plasmática de los GR y las MV liberadas podrían actuar como “patrones moleculares asociados a daño” (DAMP) induciendo una respuesta de tipo inflamatorio tanto en el receptor como en los leucocitos presentes en la bolsa de transfusión. En este sentido, una estrategia relevante para mejorar la conservación de los GR para transfusión es la remoción de los leucocitos [19]. Este procedimiento disminuye la formación y las propiedades proinflamatorias de las MV, así como la injuria pulmonar post transfusión (TRALI) [20]. En nuestro país, la leucorreducción (L) se realiza sólo al 15% de los volúmenes perfundidos y luego de un período variable después de la fecha de extracción. Esta LR tardía no aporta los beneficios clínicos del procedimiento realizado tempranamente, que incluyen una disminución en la frecuencia y severidad de las reacciones adversas como el TRALI, la reacción febril no hemolítica transfusional (RFNHT), una reducción del riesgo de aloinmunización HLA, menor mortalidad y disfunción orgánica [21,22]. El TRALI es una complicación potencialmente letal de la transfusión de productos sanguíneos alogénicos. Las estimaciones de la incidencia de TRALI varían notablemente entre 0,08 y 15 % por paciente transfundido y 0,0002-1,12 % por producto transfundido [23,24]. TRALI tiene una tasa de mortalidad estimada entre 5-25% [24], pero puede ser mayor entre pacientes críticos y quirúrgicos, con una tasa de 47% reportada en pacientes de cuidados intensivos [24]. La patogénesis de TRALI se ha atribuido a la transferencia pasiva de anticuerpos del donante [25] y el manejo clínico de TRALI es de apoyo y, en consecuencia, los esfuerzos para reducir TRALI se han centrado en estrategias preventivas [26]. La frecuencia de RFNHT generadas por transfusiones de GR sin leucorreducción (N) es de 0,5 a 6,8 % de todas las unidades transfundidas [27,28]. Los pacientes con antecedentes de RFNHT tienen un riesgo de 15 % de recurrencia de este tipo de reacción [29]. La mayoría de los RFNHT son autolimitados y no se consideran potencialmente mortales [27], pero generan más tiempo de internación y costos asistenciales. Las citoquinas generadas por los leucocitos presentes en las bolsas N se consideran responsables de la reacción [4], y su eliminación antes del almacenamiento evita el riesgo de RFNHT [30,31].

A pesar de las evidencias a favor de la leucorreducción existen dudas en la colectividad académica uruguaya sobre la necesidad de universalización de este procedimiento, por lo cual nos propusimos analizar el efecto de la LR sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática y sobre el metabolismo de los de los GR almacenados para transfusión, así como la capacidad del preparado para activar una respuesta inflamatoria celular, de modo de aportar datos tendientes a la toma de decisiones sustentadas en información científica sólida.

En este sentido, se obtuvieron en el marco del presente proyecto evidencias que nos permiten afirmar:

1. Que la leucorreducción disminuye la generación de inmunoglobulinas y citoquinas en los preparados de GR para transfusión, disminuyendo las chances de generar complicaciones inmunológicas (RFNHT y TRALI), en los pacientes transfundidos. Reporte al MSP y artículo científico en preparación.
2. Que la presencia de LDH en el sobrenadante de las bolsas de transfusión es un indicador robusto y económico de la calidad del preparado. Reporte enviado al Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas para la implementación de la técnica de control.
3. Que el coeficiente de permeabilidad para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la membrana del GR humano, que no había sido reportado previamente, tiene un valor de  $1.6 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  a 37° C. Resultado publicado en [18].
4. Que la permeabilización del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la membrana del GR humano, a diferencia de otras células y GR de otros organismos [8–10], es independiente de acuaporinas. Resultados publicados en [18].
5. Además de la publicación de dos artículos originales en el área del proyecto [18,35], una revisión [36], dos capítulos de libro [37,38], y varios reportes a reuniones científicas internacionales [39–42]. Estamos completando los resultados para (al menos) un tercer artículo original además de una revisión para ACS-Omega por invitación.

Por otro lado, el presente proyecto ha servido de base para la formación de recursos humanos de grado y posgrado, dos culminados y siete en marcha.

1. La Mag. Ana Clara López culminó la maestría en Ciencias Biológica (PEDECIBA-UdelaR) en 2020, con beca del SNB-ANII. Ingresó al doctorado en abril 2022, obtuvo una beca de la CAP-UdelaR. Dirección Matías Möller y Leonor Thomson.
2. La Lic. Florencia Orrico defendió el pasaje a doctorado 2019, con beca de posgrado de la CAP-UdelaR. Realizó dos pasantías en el Laboratorio del Prof. Mariano Ostuni en Université Paris Diderot en Francia, en 2020 y 2022. Dirección Leonor Thomson y Matías Möller.
3. La doctora Cecilia Acosta y culminó la especialidad en Medicina Transfusional y continúa sus estudios de maestría (PROINBIO). Dirección Leonor Thomson e Ismael Rodríguez.
4. La Dra. Daniela Saliwonkzyc culminó la especialidad en Medicina Transfusional y continúa sus estudios de maestría (PROINBIO). Dirección Leonor Thomson e Ismael Rodríguez.
5. El Técnico en Hemoterapia Nicolas Silva, G2 de la Tecnicatura en Hemoterapia de la EUTM, es estudiante de posgrado (PEDECIBA-UdelaR) con beca del SNB-ANII. Realizó una pasantía de investigación en el laboratorio del Prof. Pablo Schwarzbaum en la UBA, Argentina. Dirección Matías Möller y Leonor Thomson.
6. El Técnico en Hemoterapia Eric Alarcón, G1 de la Tecnicatura en Hemoterapia de la EUTM, se inscribió al programa de posgrado PROINBIO en 2022. Dirección Gabriela Rivas y Matías Möller.
7. El Br. Marcel Donzé, se encuentra desarrollando su tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica. Dirección Matías Möller Florencia Orrico.

Gracias a las colaboraciones implementadas durante el desarrollo del proyecto, al grupo inicial constituido por los investigadores Leonor Thomson (G4), Matías Möller (G3) y Ana Denicola (G5), Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República e Ismael Rodríguez (G5, director), Departamento de Medicina Transfusional del Hospital de Clínicas, se han sumado investigadores especializados en diferentes áreas de la investigación biomédica y la hemoterapia, lo que ha llevado a la conformación de un Núcleo Interdisciplinario Centrado en Eritrocitos (NICE), entre ellos:

- Gabriela Rivas, directora de la Tecnicatura en Hemoterapia de la Escuela Universitaria de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina y Profesora Agregada (G4) del Departamento de Medicina Transfusional del Hospital de Clínicas, Universidad de la República.
  - Guillermo Moyna, Profesor Titular (G5) del Departamento de Química del Litoral en el Centro Universitario Litoral Norte Sede Paysandú, Universidad de la República.
  - Julio da Luz, Profesor Agregado (G4) del Departamento de Ciencias Biológicas en el Centro Universitario Litoral Norte Sede Salto, Universidad de la República.
  - Lía Randall, Asistente (G2) PDU de Moléculas Bioactivas en el Centro Universitario Litoral Norte Sede Paysandú, Universidad de la República.
  - Fernanda Sánchez, Profesora Adjunta (G3) del Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina, Universidad de la República.
  - Carlos Agostini, Asistente (G2) del Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina.
  - Gerardo Ferrer-Sueta, Profesor Adjunto (G3) del Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
  - Sebastián Villar, Ayudante (G1) del Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias.
  - Homero Rubbo, Profesor Titular (G5) del Departamento de Bioquímica, CEINBIO, Facultad de Medicina.
  - Mauricio Mastrogiovanni, Asistente (G2) del Departamento de Bioquímica, CEINBIO, Facultad de Medicina, Universidad de la República.
  - Pablo Schwarzbaum, Investigador del CONICET y Profesor Titular de la Cátedra de Físicoquímica Biológica la Universidad de Buenos Aires, Argentina.
  - María Florencia Leal Denis, Investigadora del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
  - Mariano Ostuni, Profesor Titular Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Université Paris Cité, Francia.
  - Angelo D'Alessandro, Director of the Metabolomics Core of the University of Colorado School of Medicine and the Colorado Cancer Center, CO, Estados Unidos.
  - Rakesh Patel, Professor and Vice Chair for Research, Department of Pathology, and Director of the UAB Center for Free Radical Biology, AL, Estados Unidos.
  - Thelma Pertinhez, Associate Professor, Department of Medicine and Surgery, University of Parma, Italia.
- Estos investigadores han colaborado en investigación y participado en las actividades académicas organizadas por el

NICE, en particular en el curso "Glóbulos rojos del metabolismo oxidativo a la medicina transfusional", que se dictó en 2019 y 2022, y en el Simposio "Hemotrapy, from basic to bedside" que se llevó a cabo en Montevideo en 2019 y realizaremos en 2023.

## Metodología/diseño del estudio

### 1. Obtención y caracterización hematológica de las muestras.

Los filtros tuvieron una efectividad mayor al 99.7% para la remoción de los leucocitos, ya que el número de estas células descendió desde 7306 (4323-10290) células/ $\mu$ L en el preparado N a 15 (0-20) células/ $\mu$ L en el preparado L (Fig. 1). Los leucocitos disminuyeron rápida y significativamente en la bolsa N, llegando a un plateau al día 7 de almacenamiento de  $\sim$ 1271 células/ $\mu$ L. El análisis hematológico no mostró variaciones durante el almacenamiento ni diferencias entre las muestras L y N en: el número de GR, hematocrito (Ht), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina (Hb), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) (Figura 1).

### 2. Análisis del potencial proinflamatorio:

a. La leucorreducción disminuyó la concentración de inmunoglobulinas liberadas hacia el espacio extracelular por los linfocitos presentes en el preparado (Figura 2). La concentración IgG día 1 fue  $509 \pm 34$  g/L para la muestra N y  $251 \pm 8$  g/L para L ( $p < 0.0001$ ). La concentración de IgM fue de  $15 \pm 3$  g/L y de  $11 \pm 0.4$  g/L para las muestras N y L ( $p < 0.01$ ), respectivamente. IgA para la fracción N fue de  $147 \pm 10$  g/L y de  $28 \pm 0.6$  ( $p < 0.0001$ ) para L (Figura 2). Estos valores se mantuvieron relativamente estables durante el almacenamiento. Esta mayor concentración de inmunoglobulinas en las muestras N están de acuerdo al mayor potencial proinflamatorio reportado [31].

b. La concentración de IL-1 $\beta$  aumentó en el sobrenadante de las bolsas durante el almacenamiento. Este aumento fue más marcado en la muestra N (Fig. 3). Fue demostrado por otros autores que la presencia de esta citoquina proinflamatoria se relaciona con la probabilidad de desarrollo de reacciones adversas transfusionales[53].

c. La concentración de IL-6 mostró valores por debajo del límite de sensibilidad del kit (1,5 pg/mL) en todas las condiciones, apoyando reportes previos [53].

d. La capacidad del sobrenadante de las bolsas de transfusión para activar la polarización de monocitos/macrófagos humanos (THP-1), se analizó estudiando la expresión y migración nuclear del factor nuclear NF $\kappa$ B. En las imágenes de microscopía de fluorescencia se observó un aumento en la señal de NF $\kappa$ B y de la migración nuclear en las células tratadas con los sobrenadantes (Figura 4). El índice de colocalización aumentó de  $0.52 \pm 0.05$  en las células no tratadas a  $0.60 \pm 0.01$  y  $0.63 \pm 0.03$  para las células incubadas con el sobrenadante de bolsas almacenadas por 42 días en ausencia (L) y en presencia (N) de leucocitos, respectivamente. Estos resultados apoyan los datos mostrados más arriba respecto a una menor actividad proinflamatoria de los preparados leucorreducidos.

### 3. Análisis de "lesiones por almacenamiento".

#### A. Efecto sobre la estructura de la membrana

a. Se puso a punto el análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB)[44] de los GR almacenados (Figura 5). En setiembre de 2020 falleció el Dr. Alejandro Márquez, coordinador del MEB, por lo que se suspendió el análisis morfológico de los GR.

Los cambios estructurales en la membrana del GR se estudiaron utilizando la fluorescencia del laurdan (Figura 6). En las imágenes de microscopía confocal observamos un incremento en el desorden de la membrana que pasó de un estado predominantemente gel a un estado líquido cuando se comparó el almacenamiento de 21 y 32 días. El agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M sobre GR almacenados por 21 días llevó a un fenotipo similar al de las muestras almacenadas por 32 días, mientras que el efecto del oxidante fue más deletéreo en las muestras almacenadas por 32 días con la aparición de GR crenados (Figura 6). Si bien estos son resultados preliminares, la técnica se mostró muy útil para evaluar el efecto del envejecimiento y de la exposición a oxidantes sobre la membrana del GR.

#### d. Análisis del efecto del almacenamiento sobre la banda 3.

Luego de aislar fantasmas de GR almacenados durante 1, 7, 14, 21 y 42 días en las condiciones del banco de sangre, en muestras L y N, se analizó la de banda 3 por western blot. La proteína apareció como una banda robusta de  $\sim$ 95 kDa y bandas de menor peso molecular en el día 1 (Figura 7). Estas bandas de menor peso fueron más abundantes y se incrementaron durante el almacenamiento sólo en las muestras L. En las muestras almacenadas se observó un incremento en la señal a mayores pesos moleculares, reflejando la formación de agregados macromoleculares resistentes a la reducción de disulfuros, ya que aparecieron en muestras tratadas con BME (Figura 9). Este patrón de modificaciones más intenso de la banda 3 en las muestras N estarían señalando un efecto protector de la leucorreducción también a nivel de la membrana plasmática de los GR. Las proteínas se están analizando por espectrometría de masa en el IPMon.

#### B. Efecto sobre la funcionalidad de la membrana:

a. El efecto del almacenamiento sobre la permeabilidad al agua de la membrana de los GR almacenados en presencia y en ausencia de leucocitos se analizó evaluando los cambios de dispersión de la luz ante cambios de la osmolaridad del medio. La constante de permeabilidad al agua ( $K_p$ ) no mostró variaciones significativas durante el almacenamiento (Figura 8). Sin embargo, la permeabilidad independiente de acuaporinas, analizada en presencia de  $\text{HgCl}_2$  0.5 mM aumentó significativamente en las muestras N. Como la fracción lipídica de la membrana sería la principal vía de permeabilización del agua ante la inhibición de las acuaporinas estos resultados señalan hacia una mayor desorganización de las interacciones moleculares de los lípidos de la membrana en las muestras N, una eventualidad que necesitamos corroborar con estudios de fluidez de membrana como los descritos más arriba.

c. Como indicadores de lesión de membrana se determinó la concentración de hemoglobina, LDH,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el sobrenadante de las bolsas (Figura 10). Se observó un aumento progresivo de la concentración de hemoglobina extracorpúscular, que al día 42 de almacenamiento fue significativamente mayor en las muestras N. Un resultado similar se obtuvo para la concentración de LDH en el medio extracelular, que mostró un aumento mayor para la muestra N. Se observó además una disminución en la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y un aumento en la concentración de  $\text{K}^+$  en el medio extracelular, sin diferencias entre las muestras N y L (Figura 10). La presencia de una mayor concentración de hemoglobina y LDH en el medio extracelular en las muestras N demuestran la efectividad de la leucorreducción en mejorar las condiciones de conservación de los GR para transfusión.

#### C. Permeabilidad de la membrana al $\text{H}_2\text{O}_2$ y efecto del almacenamiento sobre Prx2

a. Se determinó el coeficiente de permeabilidad para  $\text{H}_2\text{O}_2$  en membranas de GR humanos ( $1.6 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ,  $37^\circ \text{ C}$ ). Esta permeabilidad no se vio afectada por inhibidores de las acuaporinas 1 y 3. Tampoco se observaron diferencias en la permeabilidad al  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre GR normales y deficientes en acuaporinas 1 y 3. En la figura 10 se muestra una parte de los resultados publicados[18], remitiendo por razones de espacio a la publicación.

b. Se analizó el efecto del almacenamiento sobre la oxidación de la principal enzima antioxidante de los GR, la peroxiredoxina 2 (Figura 9). La banda correspondiente a la enzima reducida (monomérica) disminuyó significativamente durante el almacenamiento, confirmando datos de otros autores sobre la relevancia del estado redox de esta enzima como indicador de sufrimiento eritrocitario durante el almacenamiento[54]. Observamos además una disminución mayor del monómero en las muestras N al día 42 de almacenamiento (Figura 11). Estos datos soportan un rol protector de la leucorreducción también sobre los sistemas antioxidantes enzimáticos del GR.

#### D. Efecto sobre el metabolismo celular.

a. La concentración de ATP determinada mediante HPLC mostró una disminución progresiva durante el almacenamiento (Figura 12). Esta disminución no mostró diferencias significativas entre las muestras L y N.

b. La glucosa también disminuyó progresivamente durante el almacenamiento, sin mostrar diferencias significativas entre las muestras L y N (Figura 9).

c. Por su parte, las concentraciones de  $\text{NADP}^+$  y  $\text{NADPH}$  se mantuvieron constantes durante el almacenamiento, sin cambios significativos en las muestras N y L (Figura 13).

#### E. Análisis de microvesículas (MV)

a. El número de plaquetas disminuyó linealmente hasta el día 21 y un aumentó posteriormente en los preparados N. En el caso del preparado L hubo un aumento lineal en de estas partículas con el tiempo de almacenamiento. El volumen plaquetario medio (VPM) también mostró diferencias significativas entre ambos preparados. Estas diferencias y el aumento en el número de estructuras medidas como plaquetas en la muestra L apuntan hacia la posibilidad de estar observando la formación de MV. En efecto el volumen de estas partículas ( $2.3 \pm 0.6 \text{ fL}$ ) fue menor al límite de sensibilidad del equipo (Figura 14).

b. Se puso a punto la purificación de la fracción de MV como se muestra en la Figura 15. La concentración de colesterol en las fracciones MV1 y MV2 fue de  $0.15 \pm 0.06 \text{ mg/mL}$  y  $0.06 \pm 0.01 \text{ mg/mL}$ , respectivamente. Nos encontramos evaluando la evolución del número de MV en el almacenamiento y su estructura molecular mediante espectrometría de masa en colaboración con el Prof. Homero Rubbo y el Dr. Mauricio Mastragiovani.

## Resultados, análisis y discusión

### 1. Obtención y caracterización hematológica de las muestras.

Los filtros tuvieron una efectividad mayor al 99.7% para la remoción de los leucocitos, ya que el número de estas células descendió desde 7306 (4323-10290) células/ $\mu\text{L}$  en el preparado N a 15 (0-20) células/ $\mu\text{L}$  en el preparado L (Fig. 1). Los leucocitos disminuyeron rápida y significativamente en la bolsa N, llegando a un plateau al día 7 de almacenamiento de  $\sim 1271$  células/ $\mu\text{L}$ . El análisis hematológico no mostró variaciones durante el almacenamiento ni diferencias entre las

muestras L y N en: el número de GR, hematocrito (Ht), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina (Hb), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) (Figura 1).

## 2. Análisis del potencial proinflamatorio:

a. La leucorreducción disminuyó la concentración de inmunoglobulinas liberadas hacia el espacio extracelular por los linfocitos presentes en el preparado (Figura 2). La concentración IgG día 1 fue  $509 \pm 34$  g/L para la muestra N y  $251 \pm 8$  g/L para L ( $p < 0.0001$ ). La concentración de IgM fue de  $15 \pm 3$  g/L y de  $11 \pm 0.4$  g/L para las muestras N y L ( $p < 0.01$ ), respectivamente. IgA para la fracción N fue de  $147 \pm 10$  g/L y de  $28 \pm 0.6$  ( $p < 0.0001$ ) para L (Figura 2). Estos valores se mantuvieron relativamente estables durante el almacenamiento. Esta mayor concentración de inmunoglobulinas en las muestras N están de acuerdo al mayor potencial proinflamatorio de las muestras N[4].

b. La concentración de IL-1 $\beta$  aumentó en el sobrenadante de las bolsas durante el almacenamiento. Este aumento fue más marcado en la muestra N (Fig. 3). Fue demostrado por otros autores que la presencia de esta citoquina proinflamatoria se relaciona con la probabilidad de desarrollo de reacciones adversas transfusionales[19].

c. La concentración de IL-6 mostró valores por debajo del límite de sensibilidad del kit (1,5 pg/mL) en todas las condiciones, apoyando reportes previos [19].

d. La capacidad del sobrenadante de las bolsas de transfusión para activar la polarización de monocitos/macrófagos humanos (THP-1), se analizó estudiando la expresión y migración nuclear del factor nuclear NF $\kappa$ B. En las imágenes de microscopía de fluorescencia se observó un aumento en la señal de NF $\kappa$ B y de la migración nuclear en las células tratadas con los sobrenadantes (Figura 4). El índice de colocalización aumentó de  $0.52 \pm 0.05$  en las células no tratadas a  $0.60 \pm 0.01$  y  $0.63 \pm 0.03$  para las células incubadas con el sobrenadante de bolsas almacenadas por 42 días en ausencia (L) y en presencia (N) de leucocitos, respectivamente. Estos resultados apoyan los datos mostrados más arriba respecto a una menor actividad proinflamatoria de los preparados leucorreducidos.

## 3. Análisis de "lesiones por almacenamiento".

### A. Efecto sobre la estructura de la membrana

a. Se puso a punto el análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) [9] de los GR almacenados (Figura 5). En setiembre de 2020 falleció el Dr. Alejandro Márquez, coordinador del MEB, por lo que se suspendió el análisis morfológico de los GR.

Los cambios estructurales en la membrana del GR se estudiaron utilizando la fluorescencia del laurdan (Figura 6). En las imágenes de microscopía confocal observamos un incremento en el desorden de la membrana que pasó de un estado predominantemente gel a un estado líquido cuando se comparó el almacenamiento de 21 y 32 días. El agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M sobre GR almacenados por 21 días llevó a un fenotipo similar al de las muestras almacenadas por 32 días, mientras que el efecto del oxidante fue más deletéreo en las muestras almacenadas por 32 días con la aparición de GR crenados (Figura 6). Si bien estos son resultados preliminares, la técnica se mostró muy útil para evaluar el efecto del envejecimiento y de la exposición a oxidantes sobre la membrana del GR.

### d. Análisis del efecto del almacenamiento sobre la banda 3.

Luego de aislar fantasmas de GR almacenados durante 1, 7, 14, 21 y 42 días en las condiciones del banco de sangre, en muestras L y N, se analizó la de banda 3 por western blot. La proteína apareció como una banda robusta de  $\sim 95$  kDa y bandas de menor peso molecular en el día 1 (Figura 7). Estas bandas de menor peso fueron más abundantes y se incrementaron durante el almacenamiento sólo en las muestras L. En las muestras almacenadas se observó un incremento en la señal a mayores pesos moleculares, reflejando la formación de agregados macromoleculares resistentes a la reducción de disulfuros, ya que aparecieron en muestras tratadas con BME (Figura 9). Este patrón de modificaciones más intenso de la banda 3 en las muestras N estarían señalando un efecto protector de la leucorreducción también a nivel de la membrana plasmática de los GR. Las proteínas se están analizando por espectrometría de masa en el IPMon.

### B. Efecto sobre la funcionalidad de la membrana:

a. El efecto del almacenamiento sobre la permeabilidad al agua de la membrana de los GR almacenados en presencia y en ausencia de leucocitos se analizó evaluando los cambios de dispersión de la luz ante cambios de la osmolaridad del medio. La constante de permeabilidad al agua (K<sub>p</sub>) no mostró variaciones significativas durante el almacenamiento (Figura 8). Sin embargo, la permeabilidad independiente de acuaporinas, analizada en presencia de HgCl<sub>2</sub> 0.5 mM aumentó significativamente en las muestras N. Como la fracción lipídica de la membrana sería la principal vía de permeabilización del agua ante la inhibición de las acuaporinas estos resultados señalan hacia una mayor desorganización de las interacciones moleculares de los lípidos de la membrana en las muestras N, una eventualidad que necesitamos corroborar con estudios de fluidez de membrana como los descriptos más arriba.

c. Como indicadores de lesión de membrana se determinó la concentración de hemoglobina, LDH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en el

sobrenadante de las bolsas (Figura 10). Se observó un aumento progresivo de la concentración de hemoglobina extracorpúscular, que al día 42 de almacenamiento fue significativamente mayor en las muestras N. Un resultado similar se obtuvo para la concentración de LDH en el medio extracelular, que mostró un aumento mayor para la muestra N. Se observó además una disminución en la concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y un aumento en la concentración de K<sup>+</sup> en el medio extracelular, sin diferencias entre las muestras N y L (Figura 10). La presencia de una mayor concentración de hemoglobina y LDH en el medio extracelular en las muestras N demuestran la efectividad de la leucorreducción en mejorar las condiciones de conservación de los GR para transfusión.

#### C. Permeabilidad de la membrana al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y efecto del almacenamiento sobre Prx2

a. Se determinó el coeficiente de permeabilidad para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en membranas de GR humanos ( $1.6 \times 10^{-3}$  cm s<sup>-1</sup>, 37° C). Esta permeabilidad no se vio afectada por inhibidores de las acuaporinas 1 y 3. Tampoco se observaron diferencias en la permeabilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre GR normales y deficientes en acuaporinas 1 y 3. En la figura 10 se muestra una parte de los resultados publicados[14], remitiendo por razones de espacio a la publicación.

b. Se analizó el efecto del almacenamiento sobre la oxidación de la principal enzima antioxidante de los GR, la peroxiredoxina 2 (Figura 9). La banda correspondiente a la enzima reducida (monomérica) disminuyó significativamente durante el almacenamiento, confirmando datos de otros autores sobre la relevancia del estado redox de esta enzima como indicador de sufrimiento eritrocitario durante el almacenamiento[20]. Observamos además una disminución mayor del monómero en las muestras N al día 42 de almacenamiento (Figura 11). Estos datos soportan un rol protector de la leucorreducción también sobre los sistemas antioxidantes enzimáticos del GR.

#### D. Efecto sobre el metabolismo celular.

a. La concentración de ATP determinada mediante HPLC mostró una disminución progresiva durante el almacenamiento (Figura 12). Esta disminución no mostró diferencias significativas entre las muestras L y N.

b. La glucosa también disminuyó progresivamente durante el almacenamiento, sin mostrar diferencias significativas entre las muestras L y N (Figura 9).

c. Por su parte, las concentraciones de NADP<sup>+</sup> y NADPH se mantuvieron constantes durante el almacenamiento, sin cambios significativos en las muestras N y L (Figura 13).

#### E. Análisis de microvesículas (MV)

a. El número de plaquetas disminuyó linealmente hasta el día 21 y un aumentó posteriormente en los preparados N. En el caso del preparado L hubo un aumento lineal en de estas partículas con el tiempo de almacenamiento. El volumen plaquetario medio (VPM) también mostró diferencias significativas entre ambos preparados. Estas diferencias y el aumento en el número de estructuras medidas como plaquetas en la muestra L apuntan hacia la posibilidad de estar observando la formación de MV. En efecto el volumen de estas partículas ( $2.3 \pm 0.6$  fL) fue menor al límite de sensibilidad del equipo (Figura 14).

b. Se puso a punto la purificación de la fracción de MV como se muestra en la Figura 15. La concentración de colesterol en las fracciones MV1 y MV2 fue de  $0.15 \pm 0.06$  mg/mL y  $0.06 \pm 0.01$  mg/mL, respectivamente. Nos encontramos evaluando la evolución del número de MV en el almacenamiento y su estructura molecular.

#### 4. Fortalecer y difundir la investigación:

##### a. Formación de recursos humanos:

i. Se realizaron dos ediciones del curso "Glóbulos rojos del metabolismo oxidativo a la medicina transfusional" en 2019 y 2022, con financiación de CABBIO, PEDECIBA, CSIC y del Espacio Interdisciplinario (EI) de la UdelaR.

ii. La Mag. Ana Clara López culminó la maestría en Ciencias Biológica (PEDECIBA-UdelaR) en diciembre de 2020, con beca del SNB-ANII. Ingresó al doctorado en abril 2022, obtuvo una beca de la CAP-UdelaR. Dirección Matías Möller y Leonor Thomson.

iii. La Lic. Florencia Orrico defendió el pasaje a doctorado en diciembre de 2019, con beca de posgrado de la CAP-UdelaR. Realizó dos pasantías en el Laboratorio del Prof. Mariano Ostuni en Université Paris Diderot en Francia, en 2020 y 2022. Dirección Leonor Thomson y Matías Möller.

iv. Las doctoras Cecilia Acosta y Daniela Saliwonkzyc culminaron sus especializaciones en Medicina Transfusional y continúan sus estudios de maestría (PROINBIO). Dirección Leonor Thomson e Ismael Rodríguez.

v. El Técnico en Hemoterapia Nicolas Silva, G2 de la Tecnicatura en Hemoterapia de la EUTM, es estudiante de posgrado (PEDECIBA-UdelaR) con beca del SNB-ANII. Realizó una pasantía de investigación en el laboratorio del Prof. Pablo Schwarzbaum en la UBA, Argentina. Dirección Matías Möller y Leonor Thomson.

vi. El Técnico en Hemoterapia Eric Alarcón, G1 de la Tecnicatura en Hemoterapia de la EUTM, se inscribió al programa de posgrado PROINBIO en 2022. Dirección Gabriela Rivas y Matías Möller.

vii. Marcel Donzé, se encuentra desarrollando su tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica. Dirección Matías

Möller Florencia Orrico.

b. Profundizamos los lazos académicos y la difusión de la investigación.

i. Se realizó la primera edición del simposio "Hemotherapy from basic to bedside" en 2019, contamos con financiación de la ANII, a través de este proyecto, la CSIC, el EI y el PEDECIBA, lo que nos permitió invitar a investigadores de Estados Unidos, Italia, Argentina y Brasil. Planificamos la segunda edición para noviembre de 2023, para la que contamos con el apoyo del llamado a Eventos del EI y del Programa ECOS Sud para la participación de los Dres. Angelo D'Alessandro (Estados Unidos), Julio Da Luz (Salto) y Mariano Ostuni (Francia).

ii. El presente proyecto dio lugar a la publicación de 2 artículos originales, 2 revisiones y 2 capítulos de libro, y estamos completando los resultados para un tercer artículo original además de una revisión para ACS-Omega por invitación.

iii. Se generó el Núcleo Interdisciplinario Centrado en Eritrocitos integrado por investigadores de diferentes Centros de la UdelaR (Facultad de Ciencias, Facultad de Medicina, Escuela de Tecnología Médica, CENUR Litoral Norte, Sedes Salto y Paysandú) e investigadores de Argentina y Francia.

iv. Se creó la página web del proyecto <https://fqbenz.fcien.edu.uy/fmv2019/>

v. Se realizaron talleres y charlas dirigidas a escolares, liceales y público general.

vi. El Prof. Ismael Rodríguez y la Dra. Gabriela Rivas participaron en el programa Sobre Ciencia de TV Ciudad. <https://sobreciencia.uy/en-uruguay-unas-40-mil-personas-necesitan-una-transfusion-de-sangre-todos-los-anos/>

## Conclusiones y recomendaciones

Con los filtros empleados se logró un excelente nivel de leucorreducción (Fig. 1).

La leucorreducción aseguró una generación menor de moléculas capaces de inducir una respuesta inmune en el organismo del paciente receptor de la transfusión, al disminuir la concentración de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) y de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  (Fig. 2 y 3). En concordancia con una estimulación menor de la respuesta inflamatoria (expresión de p65 y migración nuclear de NF $\kappa$ B) de monocitos/macrófagos en cultivo al exponerlos al sobrenadante leucorreducido (Fig. 4). Estos resultados son lo suficientemente relevantes como para recomendar el uso universal de los filtros de leucorreducción en todos los bancos de sangre.

Adicionalmente, a nivel de la estructura de la membrana, se observó una importante afectación de la fluidez de la fracción lipídica de la membrana de los GR no leucorreducidos durante el almacenamiento, con aumento de la fragilidad (Fig. 6). La integridad estructural de la del intercambiador aniónico 1, banda 3, también se vio afectada durante el almacenamiento con mayor proteólisis y formación de complejos de alto peso molecular en las fracciones no leucorreducidas (Fig. 8). Estos cambios estructurales de la fracción lipídica y de la banda 3 podrían explicar la mayor afectación de la permeabilidad al agua independiente de acuaporinas en los GR almacenados en presencia de leucocitos (Fig. 7), al igual que la afectación de la permeabilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> descrita previamente por nosotros en glóbulos rojos almacenados de la misma manera [6].

Por su parte la concentración de LDH extracorpúscular mostró una aparición más temprana y marcada en las fracciones no leucorreducidas (Fig. 9). Este parámetro, por ser una medida de rutina en el laboratorio clínico podrían convertirse en estándar para evaluar la calidad de los preparados para transfusión.

Se analizó el efecto del almacenamiento sobre la principal enzima antioxidante del GR, la peroxiredoxina 2, encontrándose una diferencia significativa en el nivel de oxidación de la enzima entre los Gr almacenados en ausencia y presencia de leucocitos, con un efecto protector de la leucorreducción (Fig. 11).

A nivel metabólico no aparecieron diferencias significativas entre los dos tratamientos, con patrones similares de decrecimiento en la concentración de ATP/ADP y de NADPH-NADP<sup>+</sup> intracelular y de glucosa en el medio (Fig. 9, 12 y 13).

Encontramos indicios de un patrón significativamente diferente en la liberación de micro vesículas entre los preparados de GR para transfusión leucorreducidos y no leucorreducidos (Fig. 14-15) y se está abordando su cuantificación y caracterización molecular.

Se determinó el coeficiente de permeabilidad para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en membranas de GR humanos ( $1.6 \times 10^{-3}$  cm s<sup>-1</sup>, 37° C). El pasaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la membrana del GR humano resultó independiente de acuaporinas (Fig. 10) [18].

De los resultados alcanzados hasta el momento podemos afirmar:

1. Que la leucorreducción disminuye la generación de inmunoglobulinas y citoquinas en los preparados de GR para transfusión, disminuyendo las chances de generar complicaciones inmunológicas, como el síndrome febril no hemolítico y la lesión pulmonar aguda producida por transfusión, en los pacientes transfundidos. Reporte al MSP y artículo científico en preparación.
2. Que la presencia de LDH en el sobrenadante de las bolsas de transfusión es un indicador robusto y económico de la calidad del preparado. Reporte al Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas enviado.
3. Que el coeficiente de permeabilidad para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la membrana del GR humano, que no había sido reportado

previamente, tiene un valor de  $1.6 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  a  $37^\circ \text{ C}$ . Resultado publicado en [18].

4. Que la permeabilización del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la membrana del GR humano, a diferencia de otras células y GR de otros organismos [8–10], es independiente de acuaporinas. Resultados publicados en [18].

Por último, gracias a la financiación de este y otros proyectos (FCE 2017, CSIC grupos 2014 y 2018, CSIC i+d 2019, llamados a Eventos de CSIC, PEDECIBA y EI) se consolidó un grupo de investigación, integrado por docentes/investigadores de diferentes instituciones y un conjunto de estudiantes de grado y posgrado (NICE, considerado como financiable por el EI, pero sin fondos). Además, se organizaron actividades académicas (cursos y simposios) que convocaron a investigadores básicos, médicos clínicos, técnicos en hemoterapia y estudiantes de Uruguay y el exterior.

## Referencias bibliográficas

- [1] Ministerio de Salud Pública, Ordenanza 997, (2018).
- [2] World Health Organization, El uso clínico de la sangre en medicina, obstetricia, pediatría y neonatología, cirugía y anestesia, trauma y quemaduras., Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2001.
- [3] A. Bokov, A. Chaudhuri, A. Richardson, The role of oxidative damage and stress in aging, *Mechanisms of Ageing and Development*. 125 (2004) 811–826. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.009>.
- [4] R. Johnson, G. Goyette, Y. Ravindranath, Y.-S. Ho, Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes, *Free Radical Biology & Medicine*. 39 (2006) 1407–17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.002>.
- [5] A. George, S. Pushkaran, D. Konstantinidis, S. Koochaki, P. Malik, N. Mohandas, Yi Zheng, C. Joiner, T. Kalfa, Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease, *Blood*. 121 (2013). <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441188>.
- [6] F. Amen, A. Machin, C. Touriño, I. Rodríguez, A. Denicola, L. Thomson, N-acetylcysteine improves the quality of red blood cells stored for transfusion, *Arch. Biochem. Biophys.* 621 (2017) 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.02.012>.
- [7] Orrico, F., Moller, M., Cassina, A., Denicola, A., Thomson, L., Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption by red blood cells, *Free Radical Biology & Medicine*. (2018).
- [8] G.P. Bienert, A.L.B. Møller, K.A. Kristiansen, A. Schulz, I.M. Møller, J.K. Schjoerring, T.P. Jahn, Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 1183–1192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603761200>.
- [9] E.W. Miller, B.C. Dickinson, C.J. Chang, Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 15681–15686. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005776107>.
- [10] G.P. Bienert, F. Chaumont, Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide, *Biochim. Biophys. Acta*. 1840 (2014) 1596–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>.
- [11] G.J.C.G.M. Bosman, J.M. Werre, F.L.A. Willekens, V.M.J. Novotný, Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion, *Transfus Med.* 18 (2008) 335–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2008.00892.x>.
- [12] A. D'Alessandro, A.D. Gray, Z.M. Szczepiorkowski, K. Hansen, L.H. Herschel, L.J. Dumont, Red blood cell metabolic responses to refrigerated storage, rejuvenation, and frozen storage, *Transfusion*. 57 (2017) 1019–1030. <https://doi.org/10.1111/trf.14034>.
- [13] G.M. D'Amici, C. Mirasole, A. D'Alessandro, T. Yoshida, L.J. Dumont, L. Zolla, Red blood cell storage in SAGM and AS3: a comparison through the membrane two-dimensional electrophoresis proteome, *Blood Transfus.* 10 Suppl 2 (2012) s46-54. <https://doi.org/10.2450/2012.008S>.
- [14] F. Gevi, A. D'Alessandro, S. Rinalducci, L. Zolla, Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM, *J Proteomics*. 76 Spec No. (2012) 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.012>.
- [15] A.G. Kriebardis, M. Antonelou, K. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L. Margaritis, I. Papassideri, RBC-derived vesicles during storage-ultrastructure and lipid raft proteins participation, *Vox Sang.* 95 (2008) 190.
- [16] A.H. Bryk, J.R. Wiñiewski, Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome, *J. Proteome Res.* 16 (2017) 2752–2761. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00025>.
- [17] A. D'alessandro, G.M. Liunbruno, Red blood cell storage and clinical outcomes: new insights, *Blood Transfus.* 15 (2017) 101–103. <https://doi.org/10.2450/2017.0018-17>.
- [18] F. Orrico, A.C. Lopez, D. Saliwonzcyk, C. Acosta, I. Rodriguez-Grecco, I. Mouro-Chanteloup, M.A. Ostuni, A. Denicola, L. Thomson, M.N. Möller, The permeability of human red blood cell membranes to hydrogen peroxide is independent of aquaporins, *J Biol Chem.* 298 (2022) 101503. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101503>.
- [19] A.B. Narvios, F.E. Alvarez, A. Glassman, B. Lichtiger, Assessing the efficiency of leukoreduction of cellular blood components: Use of a simplified formalin-fixation and batch-counting method, *American Journal of Clinical Pathology*. 107 (1997) 111–113. <https://doi.org/10.1093/ajcp/107.1.111>.
- [20] J.R. Richter, J.M. Sutton, P. Hexley, T.A. Johannigman, A.B. Lentsch, T.A. Pritts, Leukoreduction of packed red blood cells attenuates proinflammatory properties of storage-derived microvesicles, *J. Surg. Res.* 223 (2018) 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.09.052>.
- [21] M. LaSarre, C.C. Silliman, F.B. West, S.Y. Khan, L. Ceriano, B. Mish, K.J. Land, M.R. Kelher, S. Sowemimo-Coker, Experimental prestorage filtration removes antibodies and decreases lipids in RBC supernatants mitigating TRALI in vivo,

- Blood. 123 (2014) 3488–3495. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532424>.
- [22] T. Nester, *Leukoreduction of Blood Products*, Third Edit, Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813726-0.00043-x>.
- [23] S. Vossoughi, J. Gorlin, D.A. Kessler, C.D. Hillyer, N.L. Van Buren, A. Jimenez, B.H. Shaz, Ten years of TRALI mitigation: measuring our progress, *Transfusion*. 59 (2019) 2567–2574. <https://doi.org/10.1111/trf.15387>.
- [24] A.P.J. Vlaar, N.P. Juffermans, Transfusion-related acute lung injury: a clinical review, *Lancet*. 382 (2013) 984–994. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62197-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62197-7).
- [25] R. Yomtovian, W. Kline, C. Press, M. Clay, H. Engman, D. Hammerschmidt, J. McCullough, Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of a neutrophil-specific antibody, *Lancet*. 1 (1984) 244–246. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)90124-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)90124-7).
- [26] H.C. Fong, R. Vekaria, K. Buth, D.E. Jackson, Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI) Risk Reduction Measures and The Impact on Preventing TRALI: Systematic Review and Meta-Analysis, *Journal of Blood Disorders & Transfusion*. 12 (2021) 1–11.
- [27] P.L. Perrotta, E.L. Snyder, Non-infectious complications of transfusion therapy, *Blood Rev*. 15 (2001) 69–83. <https://doi.org/10.1054/blre.2001.0151>.
- [28] N.M. Heddle, L.N. Klama, L. Griffith, R. Roberts, G. Shukla, J.G. Kelton, A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions, *Transfusion*. 33 (1993) 794–797. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1993.331094054613.x>.
- [29] J.E. Menitove, M.C. McElligott, R.H. Aster, Febrile transfusion reaction: what blood component should be given next?, *Vox Sang*. 42 (1982) 318–321. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1982.tb01106.x>.
- [30] A. Shanwell, M. Kristiansson, M. Remberger, O. Ringdén, Generation of cytokines in red cell concentrates during storage is prevented by prestorage white cell reduction, *Transfusion*. 37 (1997) 678–684. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37797369441.x>.
- [31] K. Rajesh, S. Harsh, K. Amarjit, Effects of Prestorage Leukoreduction on the Rate of Febrile Nonhemolytic Transfusion Reactions to Red Blood Cells in a Tertiary Care Hospital, *Ann Med Health Sci Res*. 5 (2015) 185–188. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.157498>.
- [32] R. Larsen, N. Sandhu, N.H.H. Heegaard, H. Ullum, J.H. von Stemann, E. Sørensen, D.S. Nellesmann, M.B. Hansen, Changes in circulating inflammatory markers following febrile non-haemolytic transfusion reactions to leucoreduced red cells, *Vox Sanguinis*. 113 (2018) 76–79. <https://doi.org/10.1111/vox.12607>.
- [33] R.R. Sharma, N. Marwaha, Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries, *Asian J Transfus Sci*. 4 (2010) 3–8. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.59384>.
- [34] R. Shukla, T. Patel, S. Gupte, Release of cytokines in stored whole blood and red cell concentrate: Effect of leukoreduction, *Asian Journal of Transfusion Science*. 9 (2015) 145. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.162708>.
- [35] D. Benchoam, J.A. Semelak, E. Cuevasanta, M. Mastrogiovanni, J.S. Grassano, G. Ferrer-Sueta, A. Zeida, M. Trujillo, M.N. Möller, D.A. Estrin, B. Alvarez, Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide, *J Biol Chem*. 295 (2020) 15466–15481. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014728>.
- [36] M. Demasi, O. Augusto, E.J.H. Bechara, R.N. Bicev, F.M. Cerqueira, F.M. da Cunha, A. Denicola, F. Gomes, S. Miyamoto, L.E.S. Netto, L.M. Randall, C.V. Stevani, L. Thomson, Oxidative Modification of Proteins: From Damage to Catalysis, Signaling, and Beyond, *Antioxid Redox Signal*. 35 (2021) 1016–1080. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8176>.
- [37] M.N. Möller, E. Cuevasanta, F. Orrico, A.C. Lopez, L. Thomson, A. Denicola, Diffusion and Transport of Reactive Species Across Cell Membranes, *Adv Exp Med Biol*. 1127 (2019) 3–19. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11488-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11488-6_1).
- [38] L. Turell, M.N. Möller, F. Orrico, L.M. Randall, M. Steglich, S. Villar, A. Denicola, L. Thomson, Chapter 25 - Thiols in blood, in: B. Alvarez, M.A. Comini, G. Salinas, M. Trujillo (Eds.), *Redox Chemistry and Biology of Thiols*, Academic Press, 2022: pp. 585–615. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90219-9.00025-X>.
- [39] M.N. Moller, F. Orrico, A.C. Lopez, A. Denicola, L. Thomson, Permeability of Human Red Blood Cell Membranes to Hydrogen Peroxide, *Biophysical Journal*. 118 (2020) 230a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.11.1359>.
- [40] F. Orrico, A.C. López, D. Saliwonzcyk, C. Acosta, I. Rodriguez, I. Mouro-Chanteloup, M.A. Ostuni, L. Thomson, M. Moller, Permeability of phospholipid membranes and human red blood cell membranes to hydrogen peroxide, *Free Radical Biology and Medicine*. 180 (2022) s65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.148>.
- [41] C. Acosta, D. Saliwonzcyk, I. Rodriguez, A. Denicola, M. Moller, L. Thomson, Leukoreduction of Red Blood Cell Concentrates for Transfusion, *Free Radical Biology and Medicine*. 159 (2020) S38. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.109>.
- [42] A.C. López, M. Moller, L. Thomson, Permeability of Lipid Membranes to Hydrogen Peroxide, *Free Radical Biology and Medicine*. 159 (2020) S27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.082>.

- [43] World Medical Association., World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects, *Bull. World Health Organ.* 79 (2001) 373–374.
- [44] M. Bessis, Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale, *Nouv Rev Fr Hematol.* 12 (1972) 721–745.
- [45] S. Sanchez, A. Tricerri, E. Gratton, Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 109 (2012) 7314–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118288109>.
- [46] J. Brahm, The permeability of red blood cells to chloride, urea and water, *J. Exp. Biol.* 216 (2013) 2238–2246. <https://doi.org/10.1242/jeb.077941>.
- [47] M.P. van Heeswijk, C.H. van Os, Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine, *J. Membr. Biol.* 92 (1986) 183–193.
- [48] H. Qiao, W. Ding, Y. Ma, S. Sun, D. Gao, Effect of the Polydispersity of RBCs on the Recovery Rate of RBCs during the Removal of CPAs, *Comput Math Methods Med.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/792302>.
- [49] C.R. Zerez, S.J. Lee, K.R. Tanaka, Spectrophotometric determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes using a single extraction procedure, *Anal Biochem.* 164 (1987) 367–373. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90506-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90506-9).
- [50] J.S. Nisselbaum, S. Green, A simple ultramicro method for determination of pyridine nucleotides in tissues, *Anal Biochem.* 27 (1969) 212–217. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90025-6).
- [51] D.B. Nguyen, T.B.T. Ly, M.C. Wesseling, M. Hittinger, A. Torge, A. Devitt, Y. Perrie, I. Bernhardt, Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells, *Cell. Physiol. Biochem.* 38 (2016) 1085–1099. <https://doi.org/10.1159/000443059>.
- [52] C.C. Allain, L.S. Poon, C.S. Chan, W. Richmond, P.C. Fu, Enzymatic determination of total serum cholesterol, *Clin Chem.* 20 (1974) 470–475.
- [53] C.-C. Chang, T.-C. Lee, M.-J. Su, H.-C. Lin, F.-Y. Cheng, Y.-T. Chen, T.-H. Yen, F.-Y. Chu, Transfusion-associated adverse reactions (TAARs) and cytokine accumulations in the stored blood components: the impact of prestorage versus poststorage leukoreduction, *Oncotarget.* 9 (2018) 4385–4394. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23136>.
- [54] S.B. Bayer, G. Maghzal, R. Stocker, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn, Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation, *FASEB J.* 27 (2013) 3315–3322. <https://doi.org/10.1096/fj.13-227298>.

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)