

Informe final publicable de proyecto

Permeabilidad de membrana y metabolización de peróxido en glóbulos rojos para transfusión

Código de proyecto ANII: FCE_1_2017_1_136043

11/03/2021

THOMSON, Leonor (Responsable Técnico - Científico)

ORRICO CAZAJOUS, Florencia (Investigador)

RODRIGUEZ, Ismael (Investigador)

SALIWONCZYK CARBALLO, Veronica Daniela (Investigador)

MALACRIDA RODRIGUEZ, Leonel Sebastian (Investigador)

MÖLLER RODRÍGUEZ, Matías Nicolás (Co-Responsable Técnico-Científico)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \ \

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA

Resumen del proyecto

El principal sumidero de peróxido de hidrógeno en la vasculatura son los glóbulos rojos (GR), debido a una sólida defensa antioxidante y una alta permeabilidad de la membrana. Respecto a estos sistemas de detoxificación, como primer resultado de este proyecto, demostramos el protagonismo de la peroxiredoxina-2 bajo condiciones fisiológicas, y la transición hacia la catalasa en condiciones experimentales habituales (Orrico et al, 2018). Ante la falta de datos sobre la permeabilidad de membrana (Pm) al H₂O₂ en GR decidimos profundizar en su análisis. El valor de Pm fue determinado (1.6×10^{-3} cm/s a 37° C), sugiriendo que la permeación de H₂O₂ podría darse tanto a través de la bicapa lipídica o de canales proteicos. También se estudió la permeabilidad de membranas formadas exclusivamente por lípidos (DOPC:POPG:Chol 4:1:5), y se encontraron valores de Pm para H₂O₂ muy similares a los de GR. En contraste, membranas compuestas por lípidos saturados mostraron una Pm 100 veces menor. Se estudió el rol de las acuaporinas, transportadores de membrana especializados en el transporte de agua y otros solutos no cargados que han sido involucrados en el transporte de H₂O₂ a través de las membranas de otras células. En el caso de los GR humanos la inhibición de las acuaporinas más abundantes no afectó el consumo del oxidante. Además, glóbulos rojos humanos carentes de acuaporinas mostraron la misma Pm que los normales, sugiriendo que el H₂O₂ entra al GR por difusión simple a través de la fracción lipídica, lo que imposibilitaría una potencial intervención farmacológica. Respecto al almacenamiento de la sangre de banco, confirmamos la indemnidad de la actividad catalasa durante el almacenamiento y adicionamos la leucorreducción como variable, lo que nos permitió observar diferencias significativas en algunas de las variables exploradas, pero falta de protección en otras. Estos aspectos requieren de mayor investigación.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Bioquímica y Biología Molecular / Bioquímica/biofísica de membranas

Palabras clave: glóbulos rojos / Permeabilidad de membrana / peróxido de hidrógeno /

Introducción

El envejecimiento celular se caracteriza por la acumulación de alteraciones degenerativas que afectan desde el nivel molecular hasta el sistémico. En este contexto, el desequilibrio entre antioxidantes y oxidantes lleva a la acumulación de modificaciones oxidativas en una gran variedad de macromoléculas, resultando en una pérdida paulatina de función en diferentes procesos celulares y a la ganancia de funciones perjudiciales, lo que conduce al fenotipo de envejecimiento (1). En el caso particular de los glóbulos rojos (GR), el envejecimiento involucra modificaciones tanto a nivel de las moléculas citosólicas como de membrana, la mayoría de las cuales no podrán ser repuestas en estas células carentes de organelos. La acumulación progresiva de modificaciones oxidativas de los componentes de membrana (2) durante el envejecimiento de los eritrocitos lleva a alteraciones en la forma y deformabilidad características de estas células (3). Los cambios celulares observados durante el envejecimiento en las condiciones de almacenamiento en el banco de sangre (llamadas "lesiones por almacenamiento") son similares a los observados en los GR en la circulación. Sin embargo, existe una diferencia significativa en la expectativa de vida de estas células, dado que los GR son removidos de la circulación por el sistema fagocítico-mononuclear, mientras que en la bolsa de transfusión esto no sucede y por tanto sobreviven por un período mayor al que están fisiológicamente programados. Esto lleva a acumulación de modificaciones típicas de GR senescentes, entre los que están la disminución del tamaño celular y el aumento de la densidad y rugosidad de la membrana celular (4), cambios que actúan como señales de destrucción en la circulación (5, 6). Dado que en Uruguay la leucorreducción no es una práctica de rutina, los glóbulos rojos almacenados para transfusión también serían blanco de los oxidantes generados por los leucocitos presentes en el preparado (4, 7). Los GR son también capaces de generar oxidantes endógenamente. La hemoglobina que es la proteína predominante en el citosol del GR (20 mM hemo) no sólo es blanco sino que además es fuente importante de intermediarios parcialmente reducidos del oxígeno, con una velocidad de auto-oxidación reportada de $4.5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (8). Bajo condiciones normales los GR mantienen el estado estacionario de H₂O₂ y superóxido a un nivel muy bajo (5×10^{-11} y 5×10^{-13} M, respectivamente) (9) porque cuentan con una maquinaria muy efectiva de enzimas antioxidantes para su remoción. Entre ellas, la peroxiredoxina-2 (Prx-2), que es la tercera proteína en abundancia en el glóbulo rojo (240-410 ?M) (10, 11), es una peroxiredoxina típica de dos cisteínas que reacciona extremadamente rápido con H₂O₂ ($k = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (12). Esta enzima depende de tioredoxina (Trx) y tioredoxina-reductasa (Tr) para su reducción. Otro sistema especializado en la remoción de H₂O₂ está constituido por la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (Gr) y el glutatión (GSH). La GPx cuya concentración intracelular es cercana a 7.3

?M (13), reacciona con H₂O₂ con una constante de reacción de $4.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (17)). Por su parte la catalasa reacciona con dos moléculas de H₂O₂ ($k=0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente) (8). Resultados previos de nuestro grupo y de otros grupos de investigación han demostrado que tanto el glutatión como la Prx-2 sufren modificaciones oxidativas durante el almacenamiento (14–16). Estos cambios se acompañaron por una disminución en la velocidad de consumo de H₂O₂ agregado al medio extracelular (16).

Estos cambios podrían deberse tanto a una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes como a alteraciones en la permeabilidad al H₂O₂. Por ello, en primer lugar se planteó caracterizar más a fondo la compleja defensa antioxidante de los glóbulos rojos, y elucidar la importancia relativa de los diferentes sistemas, Prx/Trx/Tr, Gpx/GSH/Gr y catalasa, en varias condiciones de interés, como la fisiológica y las condiciones asequibles experimentalmente.

Alteraciones a nivel de la permeabilidad de la membrana del GR también podrían explicar las diferencias encontradas en el consumo de H₂O₂. Variaciones en las características biofísicas de la membrana conducen a cambios en la permeabilidad a compuestos lipofílicos. La longitud de ácidos grasos, la relación entre los ácidos grasos saturados e insaturados, la composición proteica y el grado de fosforilación y glicosilación de los componentes de membrana influyen sobre la permeabilidad (17). De hecho, se ha descrito un aumento progresivo de sensibilidad de la membrana eritrocítica al estrés durante el almacenamiento capaz de inducir la pérdida de asimetría de la bicapa lipídica, con aumento de fosfatidilserina en la cara externa (18). 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 (espectrina, banda 3, banda 4.1), y acumulación de proteínas citosólicas (hemoglobina, Prx-2 y chaperonas) que se asocian fundamentalmente a la banda-3 (19, 20). Esta acumulación proteica precede y se asocia con la formación de vesículas de membrana y la liberación de micropartículas, una de las características patognomónicas del envejecimiento eritrocítico (21). Los GR se caracterizan por una incompleta capacidad de síntesis “de novo” de ácidos grasos de cadena larga (22), y una alteración progresiva del lipidoma durante el almacenamiento (23, 24), sin embargo, sí existe en estas células la capacidad de reciclar lípidos oxidados mediante el ciclo de Land (25).

Estudios de proteómica han demostrado que al igual que sucede con la banda 3, el número de moléculas de acuaporina (AQP) presentes en la membrana disminuye con el almacenamiento (26), sin embargo, poco se sabe sobre el efecto en la funcionalidad de estas proteínas. 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 (aprox. 200.000 copias/célula) y es la encargada del intercambio rápido de agua (27). Si bien se observó que el H₂O₂ podía utilizar acuaporinas para atravesar membranas celulares, como la hAQP8 en varios tipos celulares, la hAQP1 no permitiría su pasaje (28–31), aunque estos resultados han sido desafiados recientemente (32). Los GR de humanos (hGR) también cuentan con AQP3 (una acuagliceroporina) en menor cantidad (33) y ésta se ha relacionado con el transporte y la señalización mediada por H₂O₂ en otros tipos celulares (31), aunque no se conoce su rol en hGR.

Una de las primeras aproximaciones para estimar la permeabilidad de membranas al H₂O₂ fue hecha por Nicholls en GR de caballo (34), estudiando el retardo enzimático (la diferencia de velocidad observada de consumo de H₂O₂ en el GR entero respecto al lisado, debido a una barrera de permeabilidad). Estos estudios fueron replicados en otras células, siendo el trabajo de Antunes y Cadenas (35) el más relevante, donde demostraron la formación de un gradiente de H₂O₂ a través de la membrana plasmática, empleando células Jurkat y estudios de retardo enzimático. Encontraron importantes gradientes entre medio extracelular-citosol y citosol-peroxisoma explicando estas diferencias por dos factores fundamentales, la diferencia en las enzimas que consumen H₂O₂ en los diferentes compartimientos y las características particulares de las membranas (35). El mismo método se utilizó para determinar el valor de permeabilidad de membranas celulares al H₂O₂ en células de mamíferos, algas, levadura y bacterias (resumidos en (36)).

En GR de caballo el valor de permeabilidad (P_m) reportado para H₂O₂ es de $6 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ (33), mientras que en GR de ratas es de $1 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$, estas diferencias podrían relacionarse con diferente selectividad de las AQP (31). Hay que señalar que prácticamente todas las determinaciones se hicieron sin tener en cuenta el sistema más eficiente de consumo de H₂O₂, las peroxirredoxinas, por estar poco caracterizado el sistema completo en mamíferos en ese momento, y por lo tanto deben considerarse sobreestimaciones del valor real. En un trabajo reciente teniendo en cuenta a las peroxirredoxinas para el cálculo de P_m se estimó un valor de $4.4 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ en células HeLa (37). Desde el reporte inicial que las acuaporinas permiten el transporte de H₂O₂ (29) se desestima su pasaje por la fracción lipídica de la membrana. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que éste puede ser significativo, considerando que la permeabilidad de liposomas fosfolipídicos al H₂O₂ es similar a la reportada para membranas celulares (38). Considerando la polaridad del H₂O₂, la mayor barrera a su pasaje a través de membranas es termodinámica, debido a una baja solubilidad en la región hidrofóbica de la membrana, como lo muestran cálculos de dinámica molecular (39). Estos cálculos muestran detalles moleculares de la interacción entre H₂O₂ y los lípidos, pero por ahora no cuentan con datos experimentales de solubilidad para poder ser calibrados. Aún falta mucha información para entender el transporte de H₂O₂ a través de membranas de

fosfolípidos, incluido el efecto del colesterol, las energías de activación, y la solubilidad experimental, para poder compararlo luego con el transporte a través de canales proteicos.

En base a nuestros estudios previos y preliminares tanto las características estructurales como la permeabilidad de la membrana del glóbulo rojo se ve afectada por el almacenamiento. Considerando además que falta conocimiento valedero sobre el sistema involucrado (canal proteico o bicapa lipídica), incluyendo la velocidad de permeación de H₂O₂ en la membrana del GR, se justifica una reevaluación del tema mediante el empleo de técnicas fisicoquímicas y enzimáticas apropiadas. Para ello nos propusimos además del uso de GR (sistema completo lípido/proteína) evaluar el rol de los lípidos mediante estudio de permeabilidad en liposomas de diferente composición, de modo de obtener información mecánica y valores de P_m confiables.

En síntesis, en este proyecto nos propusimos estudiar tres objetivos. En primer lugar, la importancia relativa de los diferentes sistemas antioxidantes en los glóbulos rojos, en la detoxificación del oxidante biológico H₂O₂, para tratar de resolver reportes contradictorios en la literatura. En segundo lugar, nos propusimos estudiar la permeabilidad de membranas lipídicas y de membranas de GR humanos al H₂O₂, con interés en determinar el valor del coeficiente de permeabilidad y el mecanismo molecular de permeación en GR humanos. Finalmente queríamos ver si durante el almacenamiento de los GR humanos para transfusión ocurren cambios a nivel de los sistemas de detoxificación del H₂O₂, o a nivel de la permeabilidad de membrana al H₂O₂.

Metodología/diseño del estudio

1. Obtención de sangre desplasmada. Los preparados de glóbulos rojos se obtuvieron de donantes que asistieron voluntariamente a la Cátedra y Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de dicho hospital y los donantes fueron debidamente informados y se les solicitó la firma de un consentimiento informado. Los donantes reclutados fueron todos de sexo masculino, sin antecedentes patológicos, de entre 25 y 45 años de edad, no fumadores. Las bolsas se sometieron a centrifugación (Roto Silenta 63RS (Hettich, Germani) a 2200 rpm a 20° C) para remover plasma y plaquetas, y la fracción de glóbulos rojos se preservó en SAGM a 4° C. Al comienzo y cada semana se extrajeron muestras (5-10 mL) de las bolsas de concentrados empleando la tubuladura de las bolsas bajo condiciones asépticas (flujo laminar). En cada muestra se estudió el efecto del almacenamiento sobre la permeabilidad celular al H₂O₂.

2. Análisis de integridad y morfología de los hGR. La concentración de hemoglobina extracorpúscular, empleada como medida de integridad celular se determinó por espectrofotometría UV/Vis, calculando el porcentaje de hemólisis como: Hemólisis (%) = 100% – hematocrito (%) x Hb extra corpúscular / Hb total. La relación Oxi/Meta-hemoglobina también se determinó mediante espectrofotometría UV/Vis (16). Como indicadores de lesión celular se evaluó la liberación de LDH. La actividad de esta enzima en el medio extracelular se evaluó mediante espectrometría, midiendo el consumo de NADH en presencia de piruvato a 340 nm empleando un equipo Cobas 311/501 (Roche/Hitachi), en colaboración con el Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas. Los cambios a nivel de la morfología de los hGR durante el almacenamiento se evaluaron empleamos microscopía electrónica de barrido, en colaboración con el Dr. Alejandro Márquez de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias. Lamentablemente el Dr. Márquez falleció en setiembre de 2020. Brevemente, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5% durante 1 h, se lavaron con tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,2-7,4) y se montaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina. Las muestras se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% y se deshidrataron con etanol. Después del secado en punto crítico con CO₂ líquido en vacío las muestras se cubrieron con oro-paladio, las muestras se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido. El efecto del almacenamiento sobre la fluidez de la membrana plasmática de los hGR para transfusión se evaluó mediante el análisis de polarización generalizada mediante microscopía de fluorescencia en el Instituto Pasteur Montevideo, en colaboración con el Dr. Leonel Malacrida. Brevemente, la suspensión de hGR almacenados por diferente tiempo se preincubados con la sonda fluorescente 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (laurdan), que se intercala en la membrana y permite detectar cambios en la fluidez de la misma ya que es sensible a la polaridad del entorno (40, 41), se colocaron en portaobjetos recubiertos con polilisina para inmovilizarlos y se estudió utilizando un microscopio de fluorescencia excitando a 360 nm y obteniendo imágenes utilizando un canal con filtro a 440 nm y otro con filtro a 490 nm para luego calcular la polarización generalizada.

3. Medida del coeficiente de reparto del H₂O₂ en solventes orgánicos. Los solventes 1-octanol, hexadecano, y aceite de oliva se emplearon como modelos de la región hidrofóbica de la membrana. La técnica empleada consistió en un doble reparto. Primero se equilibró H₂O₂ entre la fase orgánica y la acuosa, y se aisló la fase orgánica a la que se le agregó fase acuosa fresca, se dejó equilibrar, y se cuantificó H₂O₂ en la segunda fase acuosa mediante ensayo de peroxidasa HRP y ABTS. Con la concentración inicial y final, y los volúmenes correspondientes a cada fase, se hizo un balance de masa y se calculó el valor del coeficiente de reparto (42). Medidas a diferentes temperaturas permitieron determinar los

parámetros termodinámicos ΔH y ΔS (Tabla Suplementaria 1). La solubilidad en diferentes solventes se utilizó para estimar la barrera termodinámica que presentaría una membrana lipídica, y calcular un coeficiente de permeabilidad teórico (Figura suplementaria 1).

4. Las medidas de permeabilidad al H₂O₂ (P_m) en liposomas. Empleamos catalasa encapsulada y el método de retardo de Nicholls (34), determinando la velocidad de consumo de H₂O₂ por la catalasa libre y la encapsulada limitada por la permeabilidad. La actividad catalasa se evaluó de dos maneras para probar diferentes concentraciones de H₂O₂. Por medida espectrofotométrica del H₂O₂ a 240 nm, y monitoreando su consumo (34) luego de mezclado por stopped-flow, utilizando concentraciones iniciales de 10 mM H₂O₂. Se generaron liposomas preparados con una composición conocida de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y colesterol en proporciones molares 9:1:0 o 4:1:5. El fosfatidilglicerol se agregó para evitar la fusión de las vesículas. Se utilizó el par dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC) y palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) para hacer las membranas con lípidos insaturados y el par dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) y dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG) para las membranas de lípidos saturados. Los liposomas se preparan en una solución de catalasa, para ser encapsulada, y luego se homogenizan y se dejan unilamelares por extrusión (42). Los liposomas encapsulando catalasa se separan de la catalasa libre por cromatografía de exclusión molecular en HPLC. El radio hidrodinámico se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS). La ruptura de los liposomas para que liberen la catalasa se realizó por extrusión a través de filtros de policarbonato de 30 nm. La permeabilidad se determinó a diferentes temperaturas en el rango 15-42°C para determinar la energía de activación del proceso (E_a).

5. Evaluación de la permeabilidad de GR enteros al agua. Para evaluar la permeabilidad al agua se utilizó la metodología descrita por Verkman (43). Por un lado, se evaluó la permeabilidad provocada por un shock osmótico (P_f), siguiendo el cambio en la luz dispersada al mezclar una suspensión de GR en buffer fosfato salino (PBS) con GR en PBS con 100 mM sacarosa por stopped flow.

6. La medida de permeabilidad de la membrana de GR humanos a H₂O₂ se realizaron mediante técnica de retardo enzimático según Nicholls (38). Si bien inicialmente se planteó seguir el protocolo de Huang (44), resultados obtenidos por nosotros tempranamente indicaron que en nuestras condiciones experimentales (alto H₂O₂ y baja densidad celular) la catalasa sería la principal enzima implicada en el consumo del H₂O₂, lo que simplificó la aproximación. Para ello se midió el consumo de H₂O₂ por las células enteras, y lisadas. Se mezclaron suspensiones de eritrocitos intactos con hematocritos crecientes, obtenidas mediante dilución de la solución madre, con H₂O₂ 10 mM en solución de HBSS. A continuación, se midió espectrofotométricamente el consumo de H₂O₂ a 240 nm ($\epsilon = 39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, (Nelson y Kiesow 1972) durante 1 minuto, en un Varioskan Flash (Thermo Scientific). El mismo procedimiento se realizó utilizando células rotas, generadas por congelación parte del stock original de glóbulos rojos. Las tasas iniciales se obtuvieron a partir de regresión lineal y se representaron como una función de la concentración de hemo, determinada mediante mediciones de absorbancia a 577 nm ($\epsilon (\text{Hb-O}_2) = 15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, (Winterbourn 1990) Las pendientes de estas parcelas secundarias (denominadas k_{RBC} y k_{dis} para RBC intactos y alterados, respectivamente) se utilizaron para calcular el P_m siguiendo la ecuación 1 (Antunes y Cadenas 2000): $P_m = k_1 Q / (A/V (1-Q))$, donde k_1 es la constante de pseudoprimer orden para la eliminación de H₂O₂ (10 mM) por catalasa dentro del RBC (determinada a partir de la constante de velocidad observada con RBC lisada (k_3) extrapolada a hemo 20 mM), Q representa la relación entre las constantes de velocidad observadas obtenido con RBC intacto y lisado (k_2 / k_3), A es el área ($1,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$) y V el volumen ($9 \times 10^{-11} \text{ cm}^3$) del RBC (Evans y Fung 1972, Park, Lee et al. .2016). Se realizaron réplicas biológicas para calcular la P_m en condiciones basales (37 ° C, pH 7,4). Con estos experimentos se determinó la permeabilidad de las membranas de los hGR frescos por un lado, y por otro el efecto del almacenamiento sobre el consumo de H₂O₂, lo que involucra tanto a alteraciones de la permeabilidad de la membrana como a los sistemas de remoción de este oxidante. Se evaluó el efecto de los inhibidores de AQP1 y ácido 4-cloromercuriobencenosulfonato (p-CMBS), mercurio (HgCl₂) y 3-(4-hidroxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil)propan-1-ona (floretilina) en el consumo de H₂O₂ por las células enteras y en el lisado. Además, se analizó la permeabilidad del H₂O₂ en GR humanos AQP1-/- y AQP3-/- (fenotipos Colton null y Gil-null) a través de una colaboración con el laboratorio del Dr. Mariano Ostuni, Université de Paris e Institut National de la Transfusion Sanguine, Francia.

7. Estadística: Cada una de las muestras se analizó por triplicado. La toma de muestras fue aleatoria. Las diferencias entre muestras se analizaron mediante el test de análisis de varianza (ANOVA) de doble vía y mediante el test de Sidak para comparar la evolución de las medias en el tiempo. Diferencias con $p < 0.05$ se consideraron significativas.

Resultados, análisis y discusión

1. En base a estudios conflictivos previos y tratando de dilucidar el rol de los sistemas de detoxificación de H₂O₂ del GR, analizamos el efecto de las condiciones de ensayo sobre el consumo de H₂O₂ por los diferentes sistemas antioxidantes de los hGR. En estos estudios publicados en la Free Radical Biology and Medicine 2018 (45), encontramos que la catalasa es la principal enzima involucrada en esta actividad en las condiciones habituales de ensayo, es decir con bajo número de

glóbulos rojos y alta concentración de peróxido. Por otro lado, bajo condiciones fisiológicas, es decir alto hematocrito, la actividad de la Prx-2 es capaz de explicar la mayor parte del consumo de H₂O₂ por hGR. Este hecho se apoya en la alta concentración intracelular de la enzima y la alta velocidad de reacción con el oxidante. Estas diferencias se observan porque tanto la Prx-2 como los otros sistemas de remoción de H₂O₂ dependientes de tior requiren para su actividad de la presencia de NADPH, cuya reducción depende del metabolismo celular, en particular del ciclo pentosa-fosfato. La velocidad de este ciclo puede transformarse en una limitante para los sistemas antioxidantes cuando la relación entre la concentración de H₂O₂ adicionada al medio y el número de células (GR en este caso) aumenta. Esta condición extrema difícilmente se produzca a nivel fisiológico, pero la hemos observado frecuentemente a nivel experimental y esto ha llevado a confusiones respecto al rol de catalasa y Prx-2 como sistemas de remoción de H₂O₂.

2. En un segundo trabajo abordamos la permeabilidad de membranas fosfolipídicas y de los hGR al H₂O₂ (Figuras Suplementarias 1-6, artículo en etapas finales de redacción). Debido a que el H₂O₂ es hidrófilo, se anticipó una gran barrera termodinámica. Para comprender mejor esta barrera, se midió la constante de partición del H₂O₂ entre el agua y los disolventes orgánicos que se utilizan con frecuencia como modelos de la membrana. Se encontró que la solubilidad en octanol, y hexadecano, fue 14 y 122000 veces menor que en agua (Tabla 1), apoyando la hipótesis de la barrera termodinámica. Luego, medimos el coeficiente de permeabilidad del H₂O₂ a través de membranas de fosfolípidos con cadenas de acilo saturadas e insaturadas, con y sin colesterol, utilizando un enfoque de latencia enzimática. Dependiendo de la composición de lípidos, el coeficiente de permeabilidad varió de 5×10^{-6} a 5×10^{-3} cm/s (Figura Suplementaria 2). También se midió el coeficiente de permeabilidad de las membranas de los glóbulos rojos humanos al H₂O₂ utilizando la técnica de latencia enzimática. A 37 ° C, el coeficiente de permeabilidad fue de $1,6 \times 10^{-3}$ cm/s (Figura Suplementaria 3). Los inhibidores de acuaporina 1 y acuaporina 3, ácido p-cloro mercurio benceno sulfónico (p-CMBS), HgCl₂ y floretina, demostraron no tener ningún efecto sobre la permeación de H₂O₂, si bien fueron efectivos en inhibir la permeabilidad al agua y al glicerol como esperábamos (Figura Suplementaria 4). Además, los glóbulos rojos humanos desprovistos de acuaporina 1 o acuaporina 3 (fenotipos Colton null y Gil-null) eran igualmente permeables al H₂O₂ como los glóbulos rojos humanos normales (Figura Suplementaria 5). Por tanto, estos resultados sugieren que el H₂O₂ penetra en la membrana de los eritrocitos humanos principalmente a través de la fracción lipídica, sin necesidad de la facilitación a través de proteínas de membrana.

3. En tercer término, abordamos el efecto del almacenamiento de los concentrados de hGR para transfusión sobre la permeabilidad y el consumo de H₂O₂. En este trabajo introdujimos la variable leucorreducción, no prevista en el proyecto original. Como se puede observar en la Figura Suplementaria 6 el almacenamiento indujo un aumento progresivo en las concentraciones de hemoglobina y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) a nivel extracelular. Al día 42 se observó un efecto significativo de la leucorreducción sobre la concentración de hemoglobina extra corpuscular, sin un efecto protector apreciable sobre la aparición de LDH en el medio extracelular. En este sentido, hemos observado un impacto importante del almacenamiento sobre la estructura (Figura Suplementaria 7) y la fluidez de la membrana plasmática durante el almacenamiento (Figura Suplementaria 8). Por su parte, la permeabilidad al agua de los hGR disminuyó durante el almacenamiento en las condiciones del banco de sangre, mientras que se observó un aumento del componente no inhibible por sales de mercurio (Figura Suplementaria 9). Este resultado apunta a un efecto compensatorio por transporte no dependientes de tior, por lo tanto diferente de acuaporina 1, en el transporte de agua por los GR estresados. Respecto a la permeabilidad y el consumo de H₂O₂, empleando concentraciones mayores de H₂O₂ (10 mM) a las empleadas en nuestro estudio previo (16), no observamos diferencias en el consumo del oxidante por los GR tanto enteros como lisados. Permaneciendo la permeabilidad también sin cambios durante el almacenamiento (Figura Suplementaria 10). Dado que catalasa es la enzima encargada de remover concentraciones altas de H₂O₂ (45), estos resultados apoyan los datos previos sobre la resistencia de la actividad catalasa al almacenamiento (46). Por tanto, el almacenamiento sólo podría estar afectando a los sistemas antioxidantes celulares dependientes de tior y/o el sistema responsable de la reposición de NADPH. De hecho, reportamos previamente la acumulación de la forma oxidada a disulfuro de la Prx-2 durante el almacenamiento (16), esto podría deberse a falla en el sistema encargado de su reciclaje, constituido por la tioredoxina y la trioredoxina reductasa, como a la limitación en el suministro de electrones por parte de NADPH. La reducción de este metabolito depende a su vez del suministro de glucosa y de su empleo por el ciclo pentosa fosfato, eventualidad que nos encontramos explorando (Figura Suplementaria 11). Debido a que el almacenamiento se realiza en condiciones idénticas a las del banco de sangre, el proyecto requiere de donaciones completas (bolsas de 400 mL de concentrados de glóbulos rojos) por lo que la obtención de muestras para esta parte del proyecto se vio seriamente dificultada por la escasez de donantes que asistieron a la institución por causa de la pandemia de Coronavirus, por lo tanto, el reclutamiento de donantes de sangre para el proyecto continúa.

4. Respecto a la formación de recursos humanos: la Lic. Florencia Orrico defendió el pasaje a doctorado en diciembre de 2019, habiendo contado con beca de maestría del contando con una beca de la Comisión Académica de Posgrados (CAP) de

la UdelaR. La Lic. Orrico se encuentra desarrollando estudios de doctorado en el área del proyecto, contando con una beca de la CAP de la UdelaR. La Lic. Orrico realizó una pasantía de investigación en el laboratorio del Dr. Mariano Ostuni, Institut National de la Transfusion Sanguine, en Paris, Francia. Por su parte, la Mag. Ana Clara López obtuvo su título de maestría del PEDECIBA en diciembre de 2020, habiendo contado con beca del SNB del presente proyecto. La Magister López se encuentra desarrollando su proyecto de doctorado en un tema derivado del presente proyecto. Además, desarrollan sus estudios de maestría PROINBIO-Facultad de Medicina en el área, las Dras. Cecilia Acosta y Daniela Saliwonczyk, ambas culminaron sus posgrados en Medicina Transfusional. El Técnico en Hemoterapia Nicolás Silva se sumó recientemente al proyecto, comenzando sus estudios de maestría en el marco del PEDECIBA, siendo becario del SNB. La Lic. Orrico y la Dra. Saliwonczyk realizaron pasantías de entrenamiento en Microscopía Electrónica de Barrido contando con la dirección académica del Dr. Alejandro Márquez, encargado de la Unidad de MEB en Facultad de Ciencias de la UdelaR, donde pusieron a punto técnicas para la evaluación morfológica de los hGR.

5. Se organizó el curso: "Development and evaluation of conservation solutions for the storage of RBC", organizado por los Dres. Ana Denicola, Ismael Rodríguez, Matías Möller y Leonor Thomson. Este curso contó con la participación de docentes de Uruguay, Argentina, Brasil, Italia y Estados Unidos. Se desarrolló en la Facultad de Ciencias y el Hospital de Clínicas y contó con el apoyo económico del presente proyecto (FCE-2017-136043), del Centro Latinoamericano de Biotecnología (CABBIO, MEC-Uruguay), del Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y del Espacio Interdisciplinario de la Universidad de la República.

6. Se organizó el simposio "Hemotherapy, from basic to bedside Montevideo 2019", organizado por los Dres. Ana Denicola, Matías Möller, Ismael Rodríguez y Leonor Thomson, se llevó a cabo entre los días 30 de noviembre y 1 de diciembre en el piso 19 del Hospital de Clínicas Manuel Quintela, Av. Italia s/n. Contó con el apoyo de las instituciones nombradas en 4, además de la colaboración de las compañías Bioerix y Teksol. En el simposio se participaron los siguientes conferencistas:

- Ismael Rodríguez, Departamento de Medicina Transfusional, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay
- Leonor Thomson, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay
- Pablo Schwarzbaum. Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini", Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Marilene Demasi. Biology Division, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil.
- Lello Zolla. Molecular Biology and the Proteomics lab, Tuscia University of Viterbo, Italy.
- Ana Denicola. Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay
- Thelma Pertinhez. Department of Medicine and Surgery, University of Parma, Italy.
- Susana Sánchez. Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Chile.
- Leonel Malacrida. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Medicina, Universidad de la Republica, Uruguay.
- Rakesh Patel. Department of Pathology, and the UAB Center for Free Radical Biology, Birmingham, Alabama, USA.

7. Los resultados de la investigación se presentaron en reuniones científicas nacionales (Congreso de Biociencias 2019 y Jornadas de la SBBM 2018) e internacionales (19th SFRRRI Biennial Meeting, 2018, Lisboa, Portugal; XLVII SAB, 2018 La Plata, Argentina; Thiols: key players in the redox regulation of cellular functions, 2019, Montevideo, Uruguay; 64th Biophys. Soc. Meeting, 2020, San Diego, California; SfrBM 27th Annual Conference, 2020, Estados Unidos (en línea)) y se publicaron los resultados de la investigación en revistas internacionales arbitradas:

- Orrico F, López AC, Saliwonczyk D, Rodríguez-Grecco I, Mouro-Chanteloup I, Ostuni M, Denicola A, Thomson L and Möller MN. Permeability of phospholipid and human red blood cell membranes to hydrogen peroxide, 2021 (en fase de redacción).
- Demasi M, Augusto O, Bechara EJH, Bicev RN, Cerqueira FM, da Cunha FM, Denicola A, Gomes F, Miyamoto S, Netto LES, Randall LM, Stevani CV, and Thomson L. Oxidative modification of proteins: from damage to catalysis, signaling and beyond. *Antiox Redox Signaling* 2021 (en prensa).
- Möller MN, Rios N, Trujillo M, Radi R, Denicola A, Alvarez B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem.* 2019; 294(40):14776-14802. doi: 10.1074/jbc.REV119.006136.
- Möller MN, Cuevasanta E, Orrico F, Lopez AC, Thomson L, Denicola A. Diffusion and Transport of Reactive Species Across Cell Membranes. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1127:3-19. doi: 10.1007/978-3-030-11488-6_1.
- Orrico F, Möller MN, Cassina A, Denicola A, Thomson L. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H₂O₂ consumption by red blood cells. *Free Radic Biol Med.* 2018; 121:231-239. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.006.
- Möller MN, Denicola A. Diffusion of nitric oxide and oxygen in lipoproteins and membranes studied by pyrene fluorescence quenching. *Free Radic Biol Med.* 2018; 128:137-143. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.553

8. Los alcances y relevancia del proyecto se comentaron en charlas a escolares y liceales en el marco del programa de puertas abiertas de la Facultad de Ciencias y se encuentra en proceso de preparación una página web a cargo de la

empresa "LuzMala".

Conclusiones y recomendaciones

1. En los estudios publicados en *Free Radical Biology and Medicine* 2018 (45), encontramos que la catalasa es la principal enzima involucrada en la remoción de H₂O₂ en las condiciones habituales de los ensayos de laboratorio, es decir con bajo número de glóbulos rojos y alta concentración de peróxido. Por otro lado, bajo condiciones fisiológicas, es decir alto hematocrito, la actividad de la Prx-2 es capaz de explicar la mayor parte del consumo de H₂O₂ por hGR. Este hecho se apoya en la alta concentración intracelular de la enzima y la alta velocidad de reacción con el oxidante. Estas diferencias se observan porque tanto la Prx-2 como los otros sistemas de remoción de H₂O₂ dependientes de tiorredoxina requieren para su actividad de la presencia de NADPH, cuya reducción depende del metabolismo celular, en particular del ciclo pentosa-fosfato. La velocidad de este ciclo puede transformarse en una limitante para los sistemas antioxidantes cuando la relación entre la concentración de H₂O₂ adicionada al medio y el número de células (GR en este caso) aumenta. Estas diferencias en la predominancia de los sistemas de remoción de peróxido según las condiciones imperantes en el medio explican y aclaran las confusiones respecto al rol de catalasa y Prx-2 como las responsables en la metabolización de H₂O₂ en sangre.

2. Estudios asociados al proyecto condujeron a la elaboración de varias revisiones publicadas en revistas internacionales arbitradas, algunas de las cuales ya cuentan con varias citas (Demasi ARS 2021, Möller JBC 2019, Möller AEMB 2019, Möller FRBM 2018).

3. Determinamos por primera vez el coeficiente de permeabilidad al H₂O₂ para los hGR, valor no reportado previamente en la literatura científica del área. La baja solubilidad en solventes orgánicos frecuentemente utilizados como modelos de membrana indica una alta barrera termodinámica al pasaje del H₂O₂ por la membrana y un valor medio de permeabilidad. Medidas de permeabilidad del H₂O₂ a través de membranas lipídicas confirma esta observación y además indica que la permeabilidad depende en gran grado de la composición lipídica. Membranas compuestas por lípidos insaturados, incluso en presencia de colesterol, fueron 100 veces más permeables al H₂O₂ que membranas compuestas por lípidos saturados, y similares en permeabilidad a hGR intactos. Esos resultados sugerían que la difusión simple sería el principal mecanismo por el cual el H₂O₂ ingresaría a los hGR. Para evaluar el rol de las acuaporinas en la permeabilidad de las membranas de los hGR al H₂O₂ se utilizaron varios inhibidores que no tuvieron ningún efecto. Ensayos realizados en hGR deficientes en acuaporina 1 o 3 mostraron permeabilidades similares a las de hGR control. Estos resultados indican que es seguro descartar las acuaporinas 1 y 3 como facilitadoras del transporte de H₂O₂. Por todo lo descrito, llegamos a la conclusión de que la permeación de H₂O₂ a través de la membrana del hGR se daría por difusión simple. Estos resultados están siendo incluidos en un manuscrito que se encuentra bastante avanzado.

4. Analizamos el efecto del almacenamiento en las condiciones del banco de sangre sobre la membrana plasmática de los hGR para transfusión. Como ha sido profusamente analizado en la bibliografía del área (ver referencias en la introducción), el almacenamiento induce cambios profundos en la morfología y características fisicoquímicas de la membrana del GR. Estos cambios llevaron a un aumento en la aparición de hemoglobina y LDH en el espacio extracelular. Adicionalmente observamos una disminución en la permeabilidad al agua, que se acompañó de un efecto compensatorio de transportadores no dependientes de acuaporina (lo que abre una serie de interrogantes nuevas que exploraremos). Cuando se analizó el efecto del almacenamiento sobre la permeabilidad al H₂O₂, trabajando a concentraciones del oxidante tales que la única enzima evaluada era la catalasa no vimos cambios en el transporte de H₂O₂. Estos resultados apuntan hacia una afectación exclusiva de los sistemas antioxidantes celulares dependientes de tiorredoxina y/o del sistema responsable de la reposición de NADPH, es decir la ruta pentosa fosfato, eventualidad que nos encontramos explorando. Estos resultados están en concordancia con los resultados reportados por nosotros en Orrico et al (45), respecto al efecto de la concentración de H₂O₂ y el número de células sobre la vía de remoción del oxidante a nivel intracelular. Si bien aún restan muestras a analizar hemos avanzado en la descripción del efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de los GR, integridad y funcionalidad de la membrana durante el almacenamiento.

Recientemente adicionamos una condición no prevista en el proyecto original, la leucorreducción, y para estas actividades hemos obtenido apoyo por parte del llamado del Fondo María Viñas de la ANII del 2019, lo que nos permitirá continuar con las investigaciones en el área. Adicionalmente han surgido nuevas hipótesis a explorar, varias de ellas actualmente contempladas en las tesis de posgrado de los estudiantes de maestría y doctorado que forman parte del grupo de investigación. También se ha obtenido apoyo de un proyecto CSIC I+D para explorar el efecto del H₂O₂ en la biomecánica de los hGR, y un proyecto ECOS Sud de colaboración con la Université de Paris para intercambio de estudiantes que trabajen en glóbulos rojos. Todo este apoyo sustenta la consolidación de un grupo de investigación multidisciplinario en glóbulos rojos que eventualmente tendrá la capacidad de traducir los descubrimientos básicos a aplicaciones clínicas.

Referencias bibliográficas

1. Bokov, A., Chaudhuri, A., and Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* 125, 811–826
2. Delobel, J., Prudent, M., Rubin, O., Crettaz, D., Tissot, J.-D., and Lion, N. (2012) Subcellular fractionation of stored red blood cells reveals a compartment-based protein carbonylation evolution. *J. Proteomics.* 76 Spec No., 181–193
3. Berezina, T. L., Zaets, S. B., Morgan, C., Spillert, C. R., Kamiyama, M., Spolarics, Z., Deitch, E. A., and Machiedo, G. W. (2002) Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 102, 6–12
4. D'Alessandro, A., Kriebardis, A., Rinalducci, S., Antonelou, M., Hansen, K., Papassideri, I., and Zolla, L. (2014) An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion (Paris)*. 10.1111/trf.12804
5. Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J. P., Estaquier, J., Huart, J. J., Ameisen, J. C., Aminoff, D., and Montreuil, J. (1998) Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie.* 80, 173–195
6. Connor, J., Pak, C. C., and Schroit, A. J. (1994) Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 269, 2399–2404
7. Antonelou, M. H., Tzounakas, V. L., Velentzas, A. D., Stamoulis, K. E., Kriebardis, A. G., and Papassideri, I. S. (2012) Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. *J. Proteomics.* 76 Spec No., 220–238
8. Johnson, R., Goyette, G., Ravindranath, Y., and Ho, Y.-S. (2006) Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H2O2 levels in erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1407–17
9. Forman, H. J., Bernardo, A., and Davies, K. J. A. (2016) What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch. Biochem. Biophys.* 603, 48–53
10. Cho, C.-S., Kato, G., Yang, S., Bae, S., Lee, J.-S., Gladwin, M., and Rhee, S. G. (2009) Hydroxyurea-Induced Expression of Glutathione Peroxidase 1 in Red Blood Cells of Individuals with Sickle Cell Anemia. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1–11
11. Moore, R. B., Mankad, M. V., Shriver, S. K., Mankad, V. N., and Plishker, G. A. (1991) Reconstitution of Ca²⁺-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J. Biol. Chem.* 266, 18964–18968
12. Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2008) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch. Biochem. Biophys.* 484, 146–54
13. Awasthi, Y., Beutler, E., and Srivastava, S. (1975) Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 250, 5144–9
14. Bayer, S. B., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2015) Accumulation of oxidized peroxiredoxin 2 in red blood cells and its prevention. *Transfusion (Paris)*. 55, 1909–1918
15. Pallotta, V., Gevi, F., D'alessandro, A., and Zolla, L. (2014) Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue.* 12, 376–387
16. Amen, F., Machin, A., Touriño, C., Rodríguez, I., Denicola, A., and Thomson, L. (2017) N-acetylcysteine improves the quality of red blood cells stored for transfusion. *Arch. Biochem. Biophys.* 621, 31–37
17. Tonnesen, A., Christensen, S. M., Tkach, V., and Stamou, D. (2014) Geometrical membrane curvature as an allosteric regulator of membrane protein structure and function. *Biophys. J.* 106, 201–209
18. Bosman, G. J. C. G. M., Cluitmans, J. C. A., Groenen, Y. A. M., Werre, J. M., Willekens, F. L. A., and Novotný, V. M. J. (2011) Susceptibility to hyperosmotic stress-induced phosphatidylserine exposure increases during red blood cell storage. *Transfusion (Paris)*. 51, 1072–1078
19. Rinalducci, S., Ferru, E., Blasi, B., Turrini, F., and Zolla, L. (2012) Oxidative stress and caspase-mediated fragmentation of cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 during blood storage. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue.* 10 Suppl 2, s55–62
20. D'Amici, G. M., Mirasole, C., D'Alessandro, A., Yoshida, T., Dumont, L. J., and Zolla, L. (2012) Red blood cell storage in SAGM and AS3: a comparison through the membrane two-dimensional electrophoresis proteome. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue.* 10 Suppl 2, s46–54
21. Kriebardis, A. G., Antonelou, M., Stamoulis, K., Economou-Petersen, E., Margaritis, L., and Papassideri, I. (2008) RBC-derived vesicles during storage-ultrastructure and lipid raft proteins participation. *Vox Sang.* 95, 190
22. Pittman, J. G., and Martin, D. B. (1966) Fatty acid biosynthesis in human erythrocytes: evidence in mature erythrocytes for an incomplete long chain fatty acid synthesizing system. *J. Clin. Invest.* 45, 165–172
23. Gevi, F., D'Alessandro, A., Rinalducci, S., and Zolla, L. (2012) Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid

storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM. *J. Proteomics*. 76 Spec No., 168–180

24. Roback, J. D., Josephson, C. D., Waller, E. K., Newman, J. L., Karatela, S., Uppal, K., Jones, D. P., Zimring, J. C., and Dumont, L. J. (2014) Metabolomics of ADSOL (AS-1) red blood cell storage. *Transfus. Med. Rev.* 28, 41–55
25. Wu, H., Bogdanov, M., Zhang, Y., Sun, K., Zhao, S., Song, A., Luo, R., Parchim, N. F., Liu, H., Huang, A., Adebisi, M. G., Jin, J., Alexander, D. C., Milburn, M. V., Idowu, M., Juneja, H. S., Kellems, R. E., Dowhan, W., and Xia, Y. (2016) Hypoxia-mediated impaired erythrocyte Lands' Cycle is pathogenic for sickle cell disease. *Sci. Rep.* 6, 29637
26. Nikolovski, Z., De La Torre, C., Chiva, C., Borràs, E., Andreu, D., Ventura, R., and Segura, J. (2012) Alterations of the erythrocyte membrane proteome and cytoskeleton network during storage--a possible tool to identify autologous blood transfusion. *Drug Test. Anal.* 4, 882–890
27. Kuchel, P. W., and Benga, G. (2005) Why does the mammalian red blood cell have aquaporins? *Biosystems*. 82, 189–196
28. Bienert, G. P., and Chaumont, F. (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*. 1840, 1596–1604
29. Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., and Jahn, T. P. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*. 1758, 994–1003
30. Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., and Jahn, T. P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282, 1183–1192
31. Miller, E. W., Dickinson, B. C., and Chang, C. J. (2010) Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15681–15686
32. Almasalmeh, A., Krenc, D., Wu, B., and Beitz, E. (2014) Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *FEBS J.* 281, 647–656
33. Roudier, N., Verbavatz, J.-M., Maurel, C., Ripoche, P., and Tacnet, F. (1998) Evidence for the Presence of Aquaporin-3 in Human Red Blood Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 8407–8412
34. Nicholls, P. (1965) Activity of catalase in the red cell. *Biochim. Biophys. Acta*. 99, 286–297
35. Antunes, F., and Cadenas, E. (2000) Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* 475, 121–126
36. Möller, M. N., Lancaster, J. R., and Denicola, A. (2008) Chapter 2 The Interaction of Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Membranes. in *Current Topics in Membranes* (Matalon, S. ed), pp. 23–42, Free Radical Effects on Membranes, Academic Press, 61, 23–42
37. Lim, J. B., Langford, T. F., Huang, B. K., Deen, W. M., and Sikes, H. D. (2016) A reaction-diffusion model of cytosolic hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 90, 85–90
38. Abuin, E., Lissi, E., and Ahumada, M. (2012) Diffusion of hydrogen peroxide across DPPC large unilamellar liposomes. *Chem. Phys. Lipids*. 165, 656–661
39. Cordeiro, R. M. (2014) Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: distribution, mobility and permeation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1838, 438–444
40. Parasassi, T., De Stasio, G., d'Ubaldo, A., and Gratton, E. (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* 57, 1179–1186
41. Vest, R., Wallis, R., Jensen, L. B., Haws, A. C., Callister, J., Brimhall, B., Judd, A. M., and Bell, J. D. (2006) Use of steady-state laurdan fluorescence to detect changes in liquid ordered phases in human erythrocyte membranes. *J. Membr. Biol.* 211, 15–25
42. Cuevasanta, E., Denicola, A., Alvarez, B., and Möller, M. N. (2012) Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes. *PLoS One*. 7, e34562
43. Ye, R. G., and Verkman, A. S. (1989) Simultaneous optical measurement of osmotic and diffusional water permeability in cells and liposomes. *Biochemistry*. 28, 824–829
44. Huang, B. K., and Sikes, H. D. (2014) Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biol.* 2, 955–962
45. Orrico, F., Möller, M. N., Cassina, A., Denicola, A., and Thomson, L. (2018) Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H₂O₂ consumption by red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* 121, 231–239
46. Jozwik, M., Szczypka, M., Gajewska, J., and Laskowska-Klita, T. (1997) Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 267, 129–42

Licenciamiento

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