

Determinación de la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos

contenidos en bolsas para transfusión sanguínea

Palabras clave: Enzimas antioxidantes, malondialdehído, paquete eritrocitario, radicales libres, transfusión sanguínea.

Key words: Antioxidants enzymes, malondialdehyde, erythrocyte package, free radicals, blood transfusion.

Recibido: 03/11/2009
Aceptado: 26/11/2009

José Gutiérrez-Salinas,* Liliana García-Ortiz,** María del Carmen Chima-Galán,** Sigrít Suástegui-Domínguez,* Martha Elena Rivera-Badillo,*** Leticia Cruz-Tovar*

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, Centro Médico Nacional «20 de Noviembre» (CMN-20N), ISSSTE.

** Laboratorio de Medicina Genómica, CMN-20N, ISSSTE.

*** Área Estomatología de la Unidad de Medicina Familiar, Hospital General de Zona No. 26, IMSS.

Correspondencia:

Dr. José Gutiérrez Salinas

Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», ISSSTE,

División de Investigación Biomédica, Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, San Lorenzo 502, 2o piso, Col. Del Valle, 03100, México, D.F.

Tel: 5200-5003, ext. 14603. E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com

223

Resumen

La transfusión de paquete globular representa un riesgo potencial para el paciente, ya que durante el almacenamiento de los paquetes, el eritrocito puede producir metabolitos que originan diversas reacciones en el organismo. En el eritrocito, los radicales libres derivados del oxígeno (RLox) se producen durante el intercambio gaseoso entre la oxihemoglobina y la metahemoglobina. *In vivo*, los RLox son eliminados por las enzimas antioxidantes; sin embargo, en los paquetes eritrocitarios, la acumulación de los RLox puede dañar la membrana del eritrocito y los sistemas antioxidantes pueden fallar. **Objetivo:** Determinar la concentración de malondialdehído y la actividad de las enzimas antioxidantes

Abstract

The transfusion of globular package represents a potential risk for the patient, because during the storage, the erythrocyte can produce metabolites that originate diverse reactions in the organism. In the erythrocyte, the free radicals derived from oxygen (RLox) take place during the gaseous interchange between the oxi-hemoglobin and metahemoglobin. *In vivo*, the RLox are eliminated by antioxidants enzymes, nevertheless, in globular packages the accumulation of the RLox can damage the membrane of the erythrocyte and the antioxidants systems can fail. **Objective:** Our objective was to determine the malondialdehyde concentration and the activity of antioxidants enzymes superoxide dismutase and glutath-

superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en los paquetes globulares preservados en un banco de sangre. **Material y métodos:** En paquetes globulares se determinó en el tiempo cero y hasta por 35 días, la concentración de malondialdehído, la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, y la concentración de la enzima lactato deshidrogenasa y de potasio, como índice de hemólisis. **Resultados:** A partir de los siete días de almacenamiento, aumentó la concentración de malondialdehído y disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes. La presencia de potasio y de lactato deshidrogenasa se incrementó gradualmente hasta un máximo a los 35 días. **Conclusiones:** El incremento en la concentración de malondialdehído en los paquetes globulares y la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes puede ser un factor que provoque reacciones adversas a quienes reciben concentrados eritrocitarios.

ione peroxidase in preserved globular packages of a blood bank. **Material and methods:** In globular packages was determined in time zero and until for 35 days, the concentration of malondialdehyde, the activity of antioxidants enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase, as well as the concentration of the enzyme lactate dehydrogenase and potassium, like hemolysis index. **Results:** As of the seven days of storage, increased in the malondialdehyde concentration and diminished the activity of antioxidants enzymes. The lactate dehydrogenase and potassium presence was increased gradually until a maximum of 35 days. **Conclusions:** The increase in the malondialdehyde concentration in globular packages and the decrease in the activity of antioxidants enzyme, being this a factor that brings about adverse reactions to the people who receive erythrocyte concentrates.

Introducción

Uno de los objetivos principales de la transfusión sanguínea es mantener una adecuada oxigenación de los tejidos en el receptor para aumentar su supervivencia ante un evento patológico determinado. Así, la transfusión sanguínea (también llamada transfusión de paquete globular o de eritrocitos) es un recurso terapéutico muy usado en personas que padecen algún tipo de anemia (por ejemplo, por leucemia); cirugías mayores (cardíaca y de grandes vasos); en niños prematuros, etcétera.^{1,2}

Sin embargo, a pesar de sus ventajas y potencial terapéutico, la transfusión de componentes sanguíneos no está exenta de riesgos y peligros para el receptor. La transfusión de paquetes globulares a sujetos adultos ha sido asociada con reacciones inmunológicas, infecciones severas (por ejemplo, neumonía y septicemia); reacciones hemolíticas, manifestaciones de intoxicación o reacción adversa a los componentes químicos incluidos en las bolsas para preservación de eritrocitos; sobrecarga circulatoria, hipercalcemia, hipercalemia, sobrecarga de sodio, entre otras.¹⁻⁶

Por otro lado, un paquete globular puede contener elementos tóxicos y/o dañinos para el re-

ceptor que pueden provenir directamente del donante (virus de la hepatitis, HIV, etcétera) o ser originados durante el proceso de almacenamiento, en donde los productos o subproductos del metabolismo normal del eritrocito tienden a acumularse y pueden ser una fuente de metabolitos tóxicos para el receptor. Así, ha sido reportado que en bolsas que contienen paquetes de eritrocitos destinados para transfusión pueden existir compuestos que potencialmente pueden representar un riesgo para la salud del individuo transfundido. De esta forma, se ha reportado la presencia en paquetes globulares de proteínas leucocitarias, factores de crecimiento, fragmentos de hemoglobina; presencia de compuestos derivados de los plásticos que rodean a las bolsas que contienen a los eritrocitos, entre otras muchas cosas más.⁷⁻¹⁴

Bajo condiciones normales del organismo, dentro de los productos y/o subproductos que pueden producirse en los eritrocitos se encuentra la generación espontánea de radicales libres derivados del oxígeno.

Un radical libre (RL) se define como una especie química que tiene un electrón desapareado en su orbital más externo, por lo que presentan alta

reactividad a moléculas vecinas.¹⁵⁻²¹ En los seres vivos, los RL provienen principalmente del oxígeno o del nitrógeno (por lo que son llamados RL derivados del oxígeno o del nitrógeno, respectivamente) y pueden dañar lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.¹⁵⁻²¹ La formación de RL se lleva a cabo como resultado del metabolismo oxidativo en todos aquellos compartimentos subcelulares en donde existe un alto intercambio metabólico, como son las mitocondrias, el retículo endoplásmico liso y el citosol.¹⁵⁻²¹ Por otro lado, es conocido el hecho de que los radicales libres derivados del oxígeno (RLox) pueden formarse *in vitro* e *in vivo* por medio de reacciones espontáneas llamadas de Haber-Weis o tipo Fenton en donde interviene como catalizador un metal de transición, siendo el más importante el hierro.¹⁵⁻²¹ La generación espontánea de RLox requiere la presencia de una molécula pro-radical y al catalizador metálico, el cual, mientras existan los sustratos y las condiciones adecuadas, seguirá generando RLox *at infinitum*, dando como consecuencia un daño importante a las estructuras celulares y subcelulares en los seres vivos.¹⁵⁻²¹

En los eritrocitos de todos los mamíferos existen reacciones tipo Fenton y Haber-Weis como consecuencia del intercambio gaseoso que ocurre cuando la oxihemoglobina pasa a ser metahemoglobina, en donde el hierro del grupo hemo de la hemoglobina reacciona en forma espontánea con el oxígeno.¹⁵⁻²⁴ Los RLox así formados reaccionan con las macromoléculas, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana eritrocitaria, en donde se lleva a cabo el fenómeno de la lipoperoxidación que da como metabolito final al malondialdehído (MDA), el cual se determina en el laboratorio como un índice de daño ocasionado por los RLox.¹⁵⁻²⁴ Por su parte, el eritrocito posee enzimas antioxidantes que evitan o minimizan el daño provocado por los RLox, siendo las más importantes la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa, las cuales actúan en conjunción para evitar el daño al eritro-

cito.²⁵⁻²⁷ Cuando en el eritrocito o la célula en general existe un aumento importante en la formación de RLox o una disminución en los mecanismos antioxidantes, se produce una condición llamada estrés oxidativo, que se caracteriza por un aumento en la lipoperoxidación y una alteración en los metabolitos antioxidantes y, si dicha condición no es controlada, puede ocasionar un daño irreparable al eritrocito.¹⁵⁻²⁸

Puesto que los eritrocitos que son preservados como paquetes globulares destinados a la transfusión sanguínea pueden ser una fuente potencial de daño al acumular sustancias reactivas o subproductos como el malondialdehído, el objetivo del presente trabajo es determinar si los paquetes globulares preservados bajo condiciones óptimas en un banco de sangre presentan alteraciones en la concentración de malondialdehído, así como en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa a lo largo de 35 días de almacenamiento, que es el tiempo máximo que se sugiere para almacenar un paquete globular en un banco de sangre.

Material y métodos

Todos los reactivos químicos fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemical Snt. Louis, USA), de Merck (Merck de México SA) o de Mallinckrot (Mallinckrot de México SA) de grado analítico y de la mejor calidad posible. Los procedimientos y técnicas fueron aprobados por los Comités de Ética y de Investigación de nuestra institución.

Obtención de paquetes globulares y diseño experimental. Se obtuvieron paquetes globulares de 34 sujetos masculinos (25 a 40 años de edad) aparentemente sanos y que acudieron al banco de sangre de nuestra institución como donadores voluntarios.

Los paquetes globulares (cerca de 400 mL de sangre total) se obtuvieron utilizando el protocolo que normalmente se sigue en esta Unidad y que ha sido reportado previamente por nuestro gru-

po de trabajo.¹⁵⁻¹⁷ La sangre fue obtenida por venopunción y se colocó en un sistema de bolsas de plástico cuádruples (Baxter-Fenwal; Unidad Bolsa con CPD/ADSOL, Opti-System PL-146), con salida superior e inferior. La sangre total fue centrifugada a 2,000 revoluciones por minuto (rpm) por 12 minutos; al término de esto, fueron colocadas en el sistema Opti-press (Baxter-Fenwal) para separar al paquete globular (eritrocitos) del plasma y del concentrado de leucocitos (buffy coat). Una vez obtenidas las bolsas que contienen a los paquetes globulares, éstas fueron almacenadas y mantenidas en refrigeración (1-6 °C) bajo las condiciones normales de almacenamiento del banco de sangre, dejándose en esas condiciones por todo el tiempo que duró el estudio. Todos los procedimientos fueron realizados acorde a normas y procedimientos establecidos para el manejo de muestras sanguíneas en el banco de sangre de nuestra institución.

Las bolsas que contienen al paquete globular fueron puncionadas por una de sus salidas con jeringa de plástico bajo condiciones estériles y se aspiró una muestra (10 mL) de eritrocitos. Una vez tomada la muestra, la salida de la bolsa fue sellada para mantener la esterilidad del sistema. La toma de muestras de eritrocitos descrita con anterioridad se llevó a cabo en el momento de ser preparados los paquetes globulares (tiempo cero) y hasta por 35 días, tomando muestras en los días noes tal como se muestra en las gráficas de la sección de resultados. Las muestras de eritrocitos así obtenidas fueron procesadas el mismo día de su obtención, de acuerdo a los procedimientos descritos previamente,¹⁵⁻¹⁷ como se detalla a continuación: La muestra de eritrocitos fue colocada en un tubo de vidrio y centrifugada a 1,500 rpm por 15 minutos. Al término de la centrifugación, el sobrenadante fue aspirado con pipeta Pasteur y reservado para determinar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y la concentración de potasio como indicadores de hemólisis.

A los eritrocitos se le agregaron tres volúmenes de solución salina isotónica con amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7) fría. Los eritrocitos fueron centrifugados nuevamente bajo las condiciones ya descritas y fueron lavados dos veces más. Una vez obtenidos los eritrocitos, se procesaron para la obtención de citosol y membranas celulares para la determinación de las enzimas antioxidantes y la concentración de malondialdehído, respectivamente.

Obtención de fracción citosólica y membranas celulares de los eritrocitos. Los eritrocitos fueron lizados de acuerdo con la técnica previamente reportada,^{17,28,29} usando un amortiguador hipotónico de fosfatos (5P8; 5 mM de buffer de fosfatos, pH 8). Brevemente, se procedió como sigue: a un volumen de paquete de eritrocitos se le agregaron 5 volúmenes de solución 5P8 con agitación moderada, dejándose reposar por 15 minutos a 4 °C. Los eritrocitos lizados fueron centrifugados a 10,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue recuperado y considerado como la fracción citosólica, mientras que el precipitado es la fracción membranal.^{17,28,29} La fracción membranal fue lavada dos veces más con 5P8 y resuspendida en solución salina isotónica (NaCl 0.9%) hasta su posterior uso.

Determinación de malondialdehído. La concentración de malondialdehído (MDA) como un índice de lipoperoxidación fue determinada en las membranas aisladas de los eritrocitos, de acuerdo con el método descrito previamente^{16,30} y basado en Ohkawa.³¹ Brevemente, se procedió de la siguiente manera: una muestra de membranas de eritrocitos (300 mg de proteína total) fue colocada en un tubo de ensayo, junto con 1 mL de amortiguador de Tris (Tris-HCl, 0.15M, pH 7.0) e incubada a 37 °C por 30 minutos. Al término de la incubación, se agregó 1.5 mL de ácido acético (5% v/v) y 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (0.8% p/v). Las muestras fueron incubadas por 60 minutos a 90 °C. Después se enfriaron y se agregaron 1 mL de KCl (2% p/v) y 3 mL de una mezcla

de butanol/piridina (1:10 v/v). La mezcla así obtenida se agitó y centrifugó durante 10 minutos a 3,000 rpm en una centrífuga clínica; al término de esto, se recuperó la interfase de butanol/piridina, la cual fue leída a 532 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal. USA). La concentración de MDA (calculada a partir del coeficiente de extinción $1.54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) fue expresada como nmol/mL.^{16,30,31}

Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes. Para llevar a cabo la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes en la fracción citosólica de los eritrocitos, se procedió a eliminar el exceso de hemoglobina de acuerdo al método reportado por Bannister y Bannister.³² Brevemente, se procedió como sigue: una muestra de fracción citosólica de eritrocitos fue mezclada con un volumen de una solución de etanol/cloroformo (5/3, v/v) con agitación continua por diez minutos. Posteriormente, se agregó 1/5 de volumen de NaCl isotónico en agitación continua. El resultado fue centrifugado a 3,000 rpm por 60 minutos, descartando el precipitado y usando el sobrenadante, el cual se considera como fracción libre de hemoglobina (FLH), que fue usado para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) fue determinada usando un kit de reactivos comercial (SOD Assay Kit, Calbiochem EMD Biosciences, Inc, USA), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante y que está basado en la técnica reportada por McCord y Fridovich,²⁶ usando un generador de radicales superóxido a partir de la reacción de la xantina con xantina oxidasa, detectando la inhibición de la reacción por medio de la formación de formazan a partir del compuesto cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (INT). Brevemente, se prosiguió como sigue: En una cubeta de cuarzo se colocó una muestra de FLH diluida 10 veces con amortiguador de fosfatos (KH_2PO_4 , 10 mM, pH 7.0), agregando 170 μL de mezcla

de reacción (xantina 0.05 mM; INT 0.025 mM). La solución fue agitada gentilmente y se inició la reacción, agregando 25 μL de xantina oxidasa (80 U/L) y 10 μL de H_2O_2 (3% en agua), monitoreando la absorbancia a 500 nm por 210 segundos. Bajo estas condiciones, una unidad de actividad de SOD se considera como la cantidad de enzima que inhibe 50% de la formación de formazan, tomando en cuenta una curva testigo con SOD pura. Dicha curva testigo fue realizada bajo las mismas condiciones ya descritas, pero usando SOD de eritrocitos de bovino (20 U/L; Sigma Chemical St. Louis, USA) en lugar de las muestras experimentales y expresando la actividad como mU/mg Hb.²⁶ La actividad de la enzima glutatión peroxidasa fue determinada por medio de un kit de reactivos (Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), siguiendo las instrucciones incluidas por el fabricante y basado en el método reportado por Paglia y Valentine.³³ Brevemente, un volumen de muestra de FLH fue diluido con un volumen de buffer de dilución (Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.5 mM, pH 8.0), agregándose 50 μL de buffer de NADPH (NADPH 5 mM; glutatión reducido 42 mM; glutatión reductasa 10 U/L) y disparando la reacción con 10 μL de ter-butilhidroperóxido (70% v/v en agua). La reacción fue seguida por 60 segundos en un espectrofotómetro a 340 nm. La actividad de la enzima fue expresada en U/g Hb.³³

Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) y potasio. Como indicadores de la hemólisis de los eritrocitos, se determinó la actividad de la enzima LDH y la concentración de potasio en el sobrenadante de los eritrocitos aspirados directamente de las bolsas (tal como fue descrito en párrafos anteriores).

La actividad de la LDH se determinó usando un kit de reactivos comerciales (LDH Cell titer, Promega Corporation, USA) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante y expresando la actividad en U/L.³⁴ La concentra-

ción de potasio fue determinada de acuerdo al procedimiento reportado por Knight,³⁵ usando un fotómetro de flama (Radiometer Copenhagen) y expresando la concentración en mmol/L.

Determinación de hemoglobina total. La concentración de hemoglobina (Hb) fue determinada en muestras de eritrocitos de acuerdo a la técnica reportada por Kohn.³⁶ Brevemente se prosigue de la siguiente manera: A un volumen de paquete eritrocitario se le agregan 5.5 volúmenes de agua bidestilada y se incuban por diez minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación, la muestra es centrifugada a 14,000 rpm por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante (hemolizado), al cual se le determinó la concentración de Hb por medio de la diferencia de absorbancias a 630 nm entre una muestra con cianuro y otra sin cianuro.³⁶

Análisis estadístico. Los resultados se expresan como promedios \pm error estándar de 34 muestras (paquetes globulares) independientes, realizando al menos tres determinaciones de metabolitos por muestra por punción. Los resultados fueron analizados usando como base una hoja de cálculo Excel (Microsoft Corporation, USA) y el programa estadístico GraphPad Prism V-4.00 (GraphPad Software, San Diego, Cal., USA). Los datos fueron analizados usando la prueba U de Mann-Whitney, tomando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

La *figura 1* muestra el curso temporal de la concentración de MDA en la membrana de los eritrocitos almacenados en condiciones óptimas para su transfusión, hasta por 35 días.

Tal como se puede observar, a los siete días de almacenamiento, existe un incremento estadísticamente significativo de 1.14 veces en la concentración de MDA con respecto a la concentración encontrada en el tiempo basal (tiempo cero) (4.2 ± 0.12 vs 3.69 ± 0.11 nmol/mL, $p < 0.05$, res-

pectivamente). Dicho incremento se mantiene de forma importante y alcanza un primer máximo a los 13 días de almacenamiento, en donde representa un incremento de 1.51 veces con respecto al tiempo cero y alcanza otro incremento importante de 1.83 veces a los 21 días de almacenamiento. Finalmente, la concentración de MDA alcanza un máximo de 1.92 veces con respecto al tiempo cero, a los 35 días de almacenamiento (7.1 ± 0.11 vs 3.69 ± 0.11 nmol/mL, $p < 0.05$, respectivamente; *figura 1*).

En las *figuras 2 y 3* se muestra la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa, respectivamente, a lo largo del tiempo de estudio. Como puede observarse, para ambas enzimas, existe una disminución gradual en sus actividades, siendo estadísticamente significativo a partir de los siete días de almacenamiento (*figuras 2 y 3*, respectivamente). En el caso de la SOD, la disminución en la actividad a los siete días de almacenamiento es de 18.28% con respecto al tiempo cero (1.01 ± 0.05 vs 1.236 ± 0.032 mU/mL,

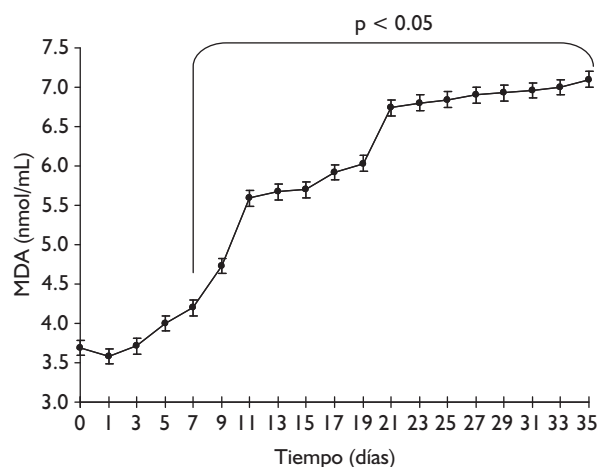


Figura 1. Concentración de malondialdehído (MDA) en la membrana plasmática de los eritrocitos provenientes de paquetes globulares preservados hasta por 35 días. Los resultados están expresados como promedios \pm el error estándar de 34 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. El paréntesis entre los datos indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre cada uno de los puntos versus el tiempo cero.

respectivamente); mientras que a los 11 y 35 días de almacenamiento, la actividad de dicha enzima alcanza únicamente 67.07 y 65.62% con respecto al tiempo cero (*figura 2*). Del mismo modo, la enzima Glut Perx presenta una disminución estadísticamente significativa en su actividad a partir de los siete días de almacenamiento, en donde la actividad que presenta es únicamente de 82.58% con respecto a la actividad que presenta a tiempo cero (28.2 ± 1.02 vs 34.15 ± 1.1 U/g Hb, $p < 0.05$, respectivamente; *figura 3*). A partir de los siete días de almacenamiento, la actividad de dicha enzima disminuye gradualmente hasta llegar a ser de 70.83% a los 35 días de almacenamiento, con respecto a la actividad mostrada a tiempo cero (24.19 ± 1.01 vs 34.15 ± 1.1 U/g Hb, $p < 0.05$, respectivamente; *figura 3*).

Como una prueba de la hemólisis de los eritrocitos, se determinó la actividad de la enzima LDH (*figura 4*) así como la concentración de potasio (*figura 5*) en los paquetes globulares a lo largo del tiempo de almacenamiento.

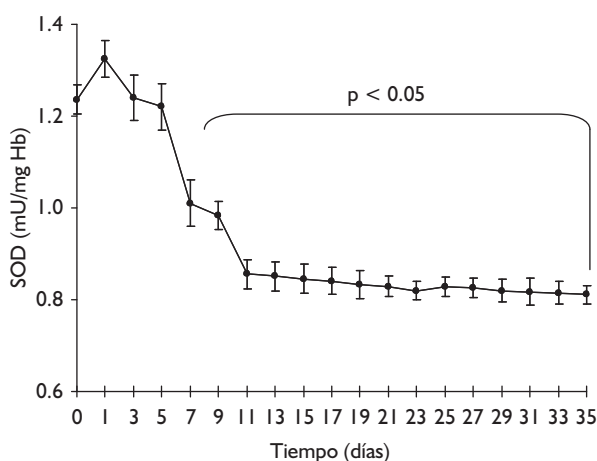


Figura 2. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos provenientes de paquetes globulares preservados hasta por 35 días. Los resultados están expresados como promedios \pm el error estándar de 34 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. El paréntesis entre los datos indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre cada uno de los puntos versus el tiempo cero.

Como puede observarse, tanto la presencia de la enzima LDH como la concentración de potasio se incrementan en los paquetes globulares conforme pasa el tiempo de almacenamiento, siendo este incremento estadísticamente significativo con respecto al tiempo cero a los cinco días en el caso de la LDH y a los siete días en el caso del potasio (*figuras 4 y 5*, respectivamente). A diferencia del comportamiento temporal de las enzimas antioxidantes, la enzima LDH presenta un incremento estadísticamente significativo de 1.35 veces (516.11 ± 18.3 U/L) con respecto al valor a tiempo cero (381.71 ± 17.4 U/L), a los cinco días de almacenamiento, alcanzando un valor máximo de 2.028 veces (774.4 ± 21.3 U/L), con respecto al tiempo cero, a los 35 días de almacenamiento (*figura 4*).

En el caso de la concentración de potasio, se observa un incremento de 1.65 veces con respecto al tiempo cero, a los siete días de almacenamiento (6.93 ± 0.25 vs 4.2 ± 0.32 mmol/L, $p < 0.05$, respectivamente), y su concentración se

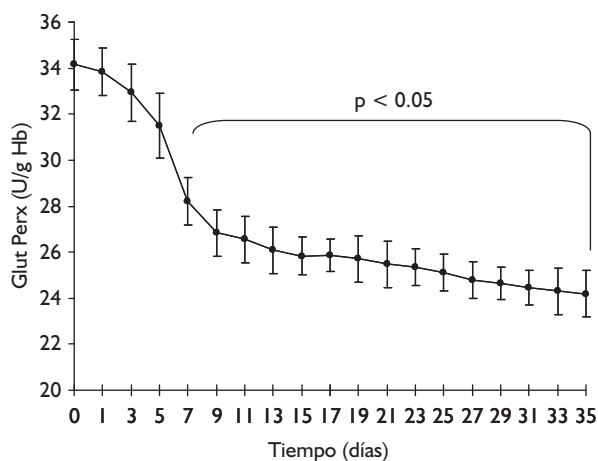


Figura 3. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GlutPerx) en eritrocitos provenientes de paquetes globulares preservados hasta por 35 días. Los resultados están expresados como promedios \pm el error estándar de 34 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. El paréntesis entre los datos indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre cada uno de los puntos versus el tiempo cero.

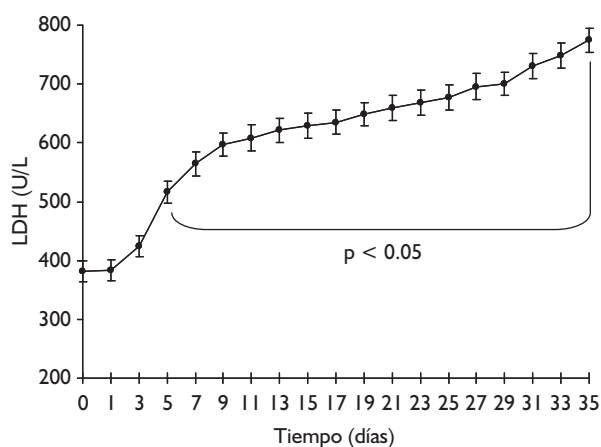


Figura 4. Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en eritrocitos provenientes de paquetes globulares preservados hasta por 35 días. Los resultados están expresados como promedios \pm el error estándar de 34 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. El paréntesis entre los datos indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre cada uno de los puntos *versus* el tiempo cero.

incrementa gradualmente hasta llegar a ser de 4.95 veces (20.78 ± 0.61 mmol/L) a los 35 días de almacenamiento (figura 5).

Discusión

La transfusión de eritrocitos preservados en bolsas como paquetes globulares y que son almacenados en un banco de sangre representan uno de los productos biológicos más frecuentemente usados en el tratamiento de diversas patologías que comprometen el estado de salud del sujeto.¹⁻⁷ Sin embargo, su uso aun bajo condiciones de extrema seguridad, puede representar un riesgo para la salud del individuo transfundido.¹⁻⁷

Un paquete globular o concentrado de eritrocitos que se almacena en el banco de sangre puede contener sustancias o metabolitos que pueden provenir, ya sea directamente del sujeto donante (por ejemplo, virus, factores de crecimiento, anticuerpos, leucocitos y tromboxanos), o ser sustancias que se producen dentro del recipiente que los contiene y que generalmente son productos del deterioro normal que sufre el eritrocito, o como resultado del metabolismo normal que lleva a cabo esta célula.^{1,6-14,24-26} En cualquier caso, ambas posibilidades representan un riesgo potencial para el receptor de dicho paquete globular y, aunque ciertos elementos que representan un riesgo directo para la salud pueden ser detectados (como es el caso de los virus, los anticuerpos y los grupos sanguíneos), no todas las sustancias contenidas en un paquete globular pueden ser detectadas y neutralizadas.

Lo anterior es principalmente importante para los metabolitos originados por el deterioro normal de los eritrocitos o como consecuencia directa del metabolismo normal que esta célula lleva a cabo bajo condiciones de almacenamiento.

De esta forma, ha sido reportado que existe a lo largo del tiempo de almacenamiento, una acumulación de sustancias potencialmente tóxicas para el organismo, tales como fragmentos de he-

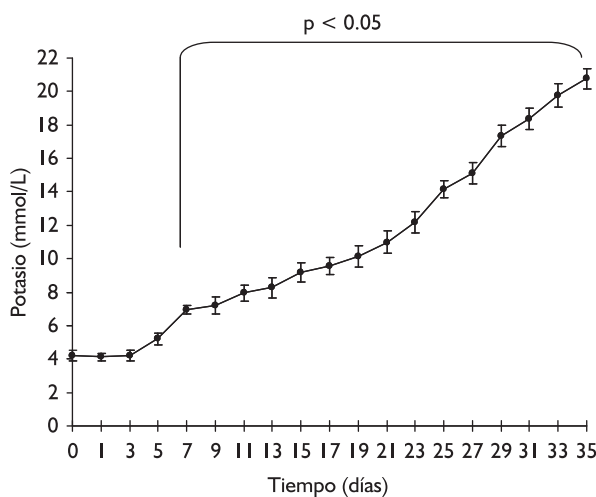


Figura 5. Concentración de potasio en eritrocitos provenientes de paquetes globulares preservados hasta por 35 días. Los resultados están expresados como promedios \pm el error estándar de 34 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. El paréntesis entre los datos indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre cada uno de los puntos *versus* el tiempo cero.

molglobina; fragmentos de membranas de eritrocitos; acumulación de iones de calcio, sodio, potasio; acumulación de disminución del pH del paquete globular; acumulación de ácido láctico; entre otras más.^{7,8,10-14,37-39}

El hecho de que el eritrocito que se encuentra en un paquete globular para transfusión conserve su principal función, que es la de transportar oxígeno, implica que su metabolismo intermedio debe estar preservado lo mejor posible. Es por eso que se han ideado una serie de mezclas que sirvan para preservar a lo largo del tiempo, tanto la función como la estructura de los eritrocitos. Sin embargo, ningún medio de preservación de eritrocitos que existe en la actualidad puede contrarrestar los efectos adversos que el metabolismo normal del eritrocito tiene durante el periodo de almacenamiento en una bolsa para transfusión; de hecho, uno de los éxitos de las mezclas actuales es precisamente que pueden mantener por largo tiempo de almacenaje, el funcionamiento del metabolismo del eritrocito en índices razonablemente aceptables para que conserve su función como transportador de oxígeno.^{1,40-43}

Tal como se mencionó en líneas anteriores, la conservación del metabolismo intermedio del eritrocito es fundamental para que pueda servir como transportador de oxígeno, el cual reacciona espontáneamente con el grupo hemo de la hemoglobina para formar oxihemoglobina (oxi-Hb) y de esta forma llevar el oxígeno a las células. Una vez en ellas, la oxi-Hb libera al oxígeno y se transforma en metahemoglobina (meta-Hb), la cual está lista nuevamente para recibir al oxígeno y transformarse en oxi-Hb.¹⁵⁻²⁷ En condiciones *in vivo*, la transformación de oxi-Hb a meta-Hb y viceversa genera radicales libres derivados del oxígeno (RLox) los cuales, si no son neutralizados por los sistemas antioxidantes del eritrocito (principalmente las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), pueden reaccionar con lípidos y proteínas del eritrocito, forman-

do compuestos nitrogenados y MDA, los cuales deben ser eliminados para no causar mayores alteraciones al organismo.^{25,42,43}

Se ha descrito que en condiciones normales, la concentración de MDA presente en los eritrocitos humanos es de 3.5 a 4.5 nmol/mL y la actividad de las enzimas antioxidantes es de 1.2 a 1.4 mU/mg Hb para la SOD y de 32 a 36U/g Hb para la glutatión peroxidasa, y dichas cifras pueden encontrarse en un paquete globular fresco obtenido de un adulto sano.^{12,18,20,21,33-38} De igual forma, se ha reportado que la actividad basal de enzima LDH en los paquetes globulares es de 350 a 460 U/L y la concentración de potasio está en el rango de 3.5 a 4.5 mmol/L.^{1,11,26,30,38}

Los anteriores valores de actividad de enzimas, así como la concentración de MDA y potasio, están presentes en los paquetes globulares frescos, tal como lo muestran nuestros resultados (tiempo cero en todas las figuras). Por otro lado, conforme pasa el tiempo de almacenamiento, tanto la actividad de las enzimas como de los metabolitos se modifican gradualmente, lo que se observa a partir de los siete días de almacenamiento en el caso de las enzimas antioxidantes, así como en el MDA y el potasio. En el caso de la enzima LDH, los cambios empiezan a los cinco días de almacenamiento para hacerse máximos a los 35 días posteriores a la obtención de los eritrocitos.

La acumulación gradual de MDA en la membrana de los eritrocitos contenidos en los paquetes globulares denota un daño a la membrana de los eritrocitos producido por la generación de radicales libres derivados del oxígeno (RLox), ya que dichos compuestos son capaces de reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas y producir lipoperoxidación de los mismos con la consiguiente producción del MDA como metabolito final.¹⁵⁻¹⁹ En condiciones *in vivo*, la generación de RLox se presenta en el eritrocito durante el intercambio de oxígeno, cuando la oxihemoglobina reacciona en forma espontánea para liberar al oxígeno y se convierte en metahemoglo-

bina y viceversa. En dicha reacción espontánea, el grupo hemo de la hemoglobina (que tiene un centro de hierro) cataliza una reacción tipo Fenton o Haber-Weis, lo que origina de forma espontánea a los RLox.¹⁵⁻¹⁹ Por otro lado, se ha descrito que existe la generación espontánea de RLox en condiciones *in vitro*, en donde el grupo hemo de la hemoglobina interviene, formando dichas especies reactivas y, por tanto, puede generar daño a las estructuras adyacentes.¹⁵⁻¹⁹

En nuestro caso, podemos considerar al paquete globular como un sistema *in vitro*, en donde, por las características de la solución de preservación usada en ellos, se mantiene el metabolismo oxidativo del eritrocito, así como la generación espontánea de RLox por parte de los grupos hemo de la hemoglobina, ya que se ha demostrado que la de conversión de oxihemoglobina (principal componente del eritrocito) a metahemoglobina, se lleva a cabo de manera espontánea, la cual, como se mencionó en líneas anteriores, es un sistema generador de RLox. Por otro lado, para contener el daño que puedan provocar los RLox, el eritrocito posee diversas enzimas antioxidantes que tienen la función de eliminar a los RLox. Entre las más importantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD) y a la glutatión peroxidasa; esta última conectada metabólicamente con el ciclo de las pentosas en el eritrocito.^{15-21,25,33,34} Bajo condiciones normales *in vivo*, el recambio de oxihemoglobina a metahemoglobina que genera RLox, estos últimos son eliminados a través de las enzimas antioxidantes SOD y glutatión peroxidasa, las cuales se renuevan constantemente a través del metabolismo normal del eritrocito. Sin embargo, podemos suponer que, en un sistema *in vitro* como sería el paquete globular, el eritrocito carece de las condiciones normales para su funcionamiento, por lo que la oxihemoglobina que contiene el paquete globular espontáneamente libera al oxígeno y se convierte en metahemoglobina con la consiguiente producción de RLox. Dichos RLox son conte-

nidos por las enzimas antioxidantes al menos por los primeros siete días de almacenamiento, ya que en ese tiempo, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y glutatión peroxidasa empieza a decaer y se incrementa al mismo tiempo la concentración de MDA (*figuras 1 a 3*).

Por otro lado, el daño a la membrana del eritrocito se manifiesta por la presencia en el medio de la enzima LDH, así como el incremento gradual en la concentración de potasio (*figuras 4 y 5*). Tanto la actividad de la enzima LDH, así como la concentración de potasio en el paquete globular se consideran como marcadores de daño a la membrana eritrocitaria que se interpreta como hemólisis de los mismos.^{11,25,30} De acuerdo con nuestros resultados, la hemólisis de los eritrocitos se iniciaría de manera más acentuada a los 5-7 días de almacenamiento y sería máxima a los 35 días (*figuras 4 y 5*). Con base en todo lo anterior, podemos afirmar que durante el tiempo de almacenamiento de los paquetes globulares, aun bajo condiciones óptimas, se presenta un daño importante al eritrocito generado por los RLox, que se manifiesta por aumento en la cantidad de MDA, probablemente debido a la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y glutatión peroxidasa.

Una buena parte del éxito de una transfusión sanguínea reside en que los eritrocitos que son obtenidos de donantes sanos permanezcan sin cambios aparentes durante el tiempo que pasan en almacenamiento, bajo condiciones óptimas, de acuerdo a normas y procedimientos seguidos por los bancos de sangre de instituciones hospitalarias públicas y privadas. Sin embargo, una vez que los eritrocitos salen del donante, éstos tienden a presentar diversos cambios a nivel metabólico y estructural aun cuando hayan sido almacenados bajo condiciones óptimas, por lo que el prolongado almacenamiento de paquetes globulares puede representar un riesgo para la salud del sujeto que lo recibe. Es por eso que los paquetes globulares destinados a la transfusión en humanos de-

ben ser dispuestos lo más frescos posibles, para de esa forma evitar la entrada de sustancias dañinas al organismo, tal como puede ser el potasio y el MDA que pueden comprometer el estado de salud del paciente que lo recibe, además de que, al transfundir eritrocitos dañados, éstos pierden su función de acarreadores de oxígeno, lo que hace que pierdan su potencial terapéutico y puedan ser dañinos o tóxicos para el organismo.

Referencias

- Bunn HF, May MH, Kocholaty WF, Shields CE. Hemoglobin function in stored blood. *J Clin Invest* 1969; 48: 311-321.
- García Escamilla RM, Méndez López TIA. Reacciones adversas por transfusión sanguínea en pacientes cardiopatas. *Rev Mex Patol Clin* 2006; 53 (3): 139-145.
- Serrano VX. Hemotransfusión como factor de riesgo en cirugía cardíaca. *Arch Cardiol Mex* 2006; 76 (supl 2): 86-91.
- Rodríguez MH. TRALI: daño pulmonar agudo por transfusión. *Rev Med IMSS* 2004; 42 (6): 501-506.
- Barba EJR. Transfusión de sangre y sus componentes: riesgos, beneficios e indicaciones. *Rev Mex Patol Clin* 2004; 51 (2): 97-118.
- Nishiyama T, Hanaoka K. Free hemoglobin concentration in patients receiving massive blood transfusion during emergency surgery for trauma. *Can J Anesth* 2000; 47: 881-885.
- Estep TN, Pedersen RA, Miller TJ, Stupar KR. Characterization of erythrocyte quality during the refrigerated storage of whole blood containing di- (2-ethylhexyl) phthalate. *Blood* 1984; 64: 1270-1276.
- Cint C, Johansen JS, Swko F, Price PA, Nielsen HJ. Accumulation of the neutrophil-derived protein YKL-40 during storage of various blood components. *Inflamm Res* 2001; 50: 107-111.
- Nielsen HJ. Detrimental effects of perioperative blood transfusion. *Br J Surg* 1995; 82: 582-587.
- Nielsen HJ, Werther K, Mynster T, Brünner N. Soluble vascular endothelial growth factor in various blood transfusion components. *Transfusion* 1999; 39: 1078-1083.
- Szpisjak D, Edgell DS, Bissonnette B. Potassium as a surrogate marker of debris in cell-salvaged blood. *Anesth Analg* 2000; 91: 40-43.
- Korgum DK, Bilmen S, Yesilkaya A. Alterations in the erythrocyte antioxidant system of blood stored in blood bags. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 109: 357-363.
- Deepa DKV, Manoj KV, Arun P, Santhosh A. Increase lipid peroxidation of erythrocytes in blood stored in polyvinyl chloride blood storage bags plasticized with di- (2-ethyl hexyl) phthalate and effect of antioxidants. *Vox Sang* 1998; 75 (3): 198-204.
- Hill HR, Oliver KC, Lippert LE, Greenwalt TJ, Hess JR. The effects of polyvinyl chloride and polyolefin blood bags on red blood cells stored in a new additive solution. *Vox Sang* 2001; 81 (3): 161-166.
- Gutiérrez-Salinas J. ¿Qué sabe usted acerca de radicales libres? *Rev Mex Cien Farm* 2006; 37: 69-73.
- Gutiérrez-Salinas J. Función de los complementos antioxidantes durante el ejercicio. *Med Int Mex* 2007; 23: 217-222.
- Gutiérrez-Salinas J. Daño al hígado por radicales libres derivados del oxígeno. En: Morales GJA (ed). *Alcohol, alcoholismo y cirrosis: Un enfoque multidisciplinario*. Pachuca, Hgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2007. p. 97-109.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-514.
- Maeda H, Akaike T. Oxygen free radicals as pathogenic molecules in viral diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 721-727.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52: 601-623.
- Beck MA, Levander OA, Handy J. Oxidative stress mediated by trace elements: Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr* 2003; 133: 1463S-1467S.
- Gibson JS, Cossins AR, Ellory JC. Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells. *J Exp Biol* 2000; 203: 1395-1407.
- Smolen JE, Shohet SB. Permeability changes induced by peroxidation in liposomes prepared from human erythrocyte lipids. *J Lipid Res* 1974; 15: 273-280.
- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43: 1209-1214.
- Raun HA, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997; 43: 562-568.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuepin). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
- Guermouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37: 1932-1937.
- Van der Zee J, Van Steveninck J, Koster JF, Dubbelman TMAR. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals. *Biochim Biophys Acta* 1989; 980: 175-180.
- Dodge JT, Mitchell C. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963; 100: 119-130.
- Ramírez-Farías C, Madrigal-Santillán E, Gutiérrez-Salinas J, Rodríguez-Sánchez N, Martínez-Cruz M, Valle-Jones I et al. Protective effect of some vitamins against the toxic action of ethanol on liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 899-907.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- Bannister JV, Bannister WH. Isolation and characterization of superoxide dismutase. En: Packer L (ed). *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1984; vol 105. p. 88-93.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
- CellTiter 96. Non-radioactive cell proliferation assay. Technical Bulletin, #TB112, Promega Corporation.
- Knight JA, Voorhees RP, Martín L. The effect of metal chelators on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann Clin Lab Sci* 1991; 22: 207-213.
- Kohn MC, Melnick RL, Ye F, Portier CJ. Pharmacokinetic of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 676-683.

37. Bratosin D, Leszczynski S, Sartiaux C, Fontaine O. Improved storage of erythrocytes by prior leukodepletion: flow cytometric evaluation of stored erythrocytes. *Cytometry* 2001; 46 (6): 351-356.
38. Sezdi M, Bayik Y, Ulgen Y. Storage effects on the cole-cole parameters of erythrocyte suspensions. *Physiol Meas* 2006; 27: 623-635.
39. Waltemath C. The effect of pH and blood gas correction on DPG and plasma potassium content of stored blood. *Canad Anaesth Soc J* 1975; 22: 164-170.
40. Gutiérrez-Salinas J, Cruz-Tovar L, García-Ménez S. Incremento en la concentración de óxido nítrico y metahemoglobina en eritrocitos contenidos en bolsas para transfusión sanguínea. *Rev Mex Patol Clin* 2008; 55 (1): 21-28.
41. Meyerstein N, Mazor D, Dvilansky. Erythrocyte agglomeration and survival studies in citrate-phosphate-dextrose (CPD) units. *J Ann Hematol* 1979; 39 (3): 211-216.
42. Hardy JF, Belisle S. Erythrocyte transfusion: Friend or foe? *Can J Anesth* 2001; 48 (6): 1-7.
43. Borghi B, Van Oven H. Reducing the risk of allogeneic blood transfusion. *JAMC* 2002; 166 (3): 332-334.