

**DESCRIPCIÓN DE MARCADORES DE SENESCENCIA
ERITROCITARIA: REVISIÓN NARRATIVA**

Jorge Felipe Mena Acevedo

**Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Pregrado en Medicina
Bogotá
2020**

**DESCRIPCIÓN DE MARCADORES DE SENESCENCIA
ERITROCITARIA: REVISIÓN NARRATIVA**

Jorge Felipe Mena Acevedo

Director: Jorge Andrés Valencia Serna

Trabajo de Grado para Optar por el Título de Médico Cirujano

**Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Pregrado en Medicina
Bogotá
2020**



La Universidad EL BOSQUE no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.

Agradecimientos

Son Muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de esta meta personal y profesional. En primer lugar, quiero agradecer a mis padres Jorge Luis Mena Toro y Pilar Acevedo. Secundariamente a mi alma mater la Universidad El Bosque por el apoyo brindado a lo largo de esta trayectoria.

Adicionalmente agradecer a mi director de tesis el Dr. Jorge Andres Valencia Serna y a los anteriormente mencionados quienes creyeron en mí y en este proyecto, alentado me para que se finalizara esta investigación y proceso.

Dedicatoria

A mi familia y principalmente a mis padres por haberme forjado como la persona que he llegado a ser en la actualidad, gracias a que muchos de mis logros se los debo a ellos entre los que se incluye este. Me formaron de tal forma, reglas y libertades que me han permitido concluir cada uno de mis anhelos.

Tabla de contenido

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
TABLA 1. ABREVIATURAS	10
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	13
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	13
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	13
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	14
GRÁFICO 1. MÉTODO SELECCIÓN DE ARTÍCULOS	15
• DEFINICIÓN DE PALABRAS CLAVES INCLUIDAS EN EL TÍTULO Y ABSTRACT	16
MARCO TEÓRICO	18
<i>GENERALIDADES Y FACTORES QUE ALTERAN LA ESPERANZA DE VIDA ERITROCITARIA</i>	18
<i>NEOCITOLISIS</i>	22
<i>ERIPTOSIS</i>	23
MARCADORES	26
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	39
TABLA 2. RESUMEN MÉTODOS DE MARCAJE:	41
BIBLIOGRAFÍA	49

Resumen

Clásicamente se atribuye una esperanza de vida de 120 días al GR, sin embargo, existe evidencia que soporta la capacidad del GR para modificar su esperanza de vida según procesos fisiológico y/o patológicos. Por lo que se identificaron los métodos diseñados para estimar la senescencia eritrocitaria, al establecer las condiciones que modifican en ciclo de vida eritrocitaria y especificando ventajas y desventajas de los métodos. Para esta revisión narrativa se realizó una búsqueda de la literatura disponible en las bases de datos de Cochrane y Medline empleando las palabras claves y seleccionando 45 artículos.

Permitió identificar procesos como la eriptosis o neocitosis, al igual que marcadores y métodos de marcaje permiten evaluar senescencia eritrocitaria. Encontrando once marcadores (Cr51, Tc99, biotina, CDs, proteómica, entre otros) y el método con mayor evidencia la citometría de flujo cada uno con ventajas y desventajas. En la literatura actual no hay evidencia que soporte el uso de un método sobre otro, ni que compare el desempeño diagnóstico entre ellos, lo cual no permite considerar un GS en marcaje de senescencia eritrocitaria y se hace necesario promover la investigación para la estandarización de un método.

Palabras Claves

- Eritrocitos, células rojas sanguíneas.
- Envejecimiento, senescencia o esperanza de vida.
- Biomarcadores, marcadores.

Abstract

Classically, a life expectancy of 120 days is attributed to GR, however, there is evidence that supports GR's ability to modify its life expectancy according to physiological and / or pathological processes. Therefore, it is possible to identify the established methods to estimate red cell senescence, establish the conditions that modify the red cell life cycle and specify advantages and disadvantages of the methods. For this narrative review, a search of the available literature in the Cochrane and Medline databases was performed using the keywords and selecting 45 articles.

It allowed to identify processes such as eryptosis or neocytolysis, as well as markers and marking methods, to verify erythrocyte senescence. Once finding markers (Cr51, Tc99, biotin, CDs, proteomics, among others) and the method with the most evidence, flow cytometry each with advantages and disadvantages. In the current literature, there is no evidence to support the use of one method over another, nor to compare the diagnostic performance among them, which does not allow considering a GS in erythrocyte senescence marking and it is necessary to promote research for the standardization of a method.

Key Words

- Erythrocytes, red blood cells.
- Aging, senescence of life expectancy.
- Biomarkers, markers.

Introducción

Clásicamente se atribuye una esperanza de vida de 120 días a los glóbulos rojos (GR) (1) (2-6) sin embargo. Existe evidencia que soporta la capacidad del GR para modificar su esperanza de vida (EV) según procesos fisiológicos y/o patológicos (2-7). Además, hay poca evidencia científica robusta que aclare si la EV eritrocitaria se modifica con la edad, por tanto, es importante conocer los procesos de senescencia y señalización eritrocitaria, los cuales usualmente se hacen mediante la evaluación de expresión de proteínas en la membrana celular del GR.

Se han empleado múltiples técnicas de marcaje eritrocitario para evaluar senescencia como el Cr51, Tc99, biotina, CDs, técnicas de proteómica, entre otros cada uno con ventajas y desventajas. Sin embargo, desde 1919 gracias a la teoría propuesta por Ashby en aglutinación en la literatura actual no hay evidencia que soporte el uso de un método sobre otro, ni que compare el desempeño diagnóstico entre ellos, lo cual no permite considerar un GS en marcaje de senescencia eritrocitaria y se hace necesario promover la investigación en esta área para la estandarización de un método.

Se realizará una revisión de la literatura de marcadores de senescencia eritrocitaria para identificar y describir las características de cada uno de los marcadores. Buscando responder a la pregunta de ¿Cuáles son los métodos utilizados para determinar la senescencia eritrocitaria?; son múltiples los métodos de determinación de senescencia eritrocitaria existentes sin que se resuman las particularidades de cada uno y sin ser catalogado alguno de estos como un GS.

Tabla 1. Abreviaturas			
GR: glóbulo rojo	EV: esperanza de vida	LCR: Líquido cefalorraquídeo	DM Diabetes mellitus
GS: Gold Standard	Hb: Hemoglobina	EPO: Eritropoyetina	PS: fosfatidilserina
PAF: factor activador de plaquetas	AChE: Acetilcolinesterasa	Hcto: Hematocrito	HBA1c: Hemoglobina glicosilada
MO: médula ósea	GRM: glóbulos rojos marcados	B7: Biotina	AS: antígeno de senescencia

Justificación

Existe poca evidencia científica que soporte el uso de un método de marcaje de senescencia eritrocitaria como estándar de oro para evaluar la senescencia de los mismos, lo que hace necesario incluir revisiones de tema y opiniones de otros autores para esta revisión narrativa.

Hasta la fecha no se conoce un método estándar de oro en el marcaje de senescencia eritrocitaria, S. Franco et al. y otros autores han desarrollado e implementado métodos de marcaje eritrocitario in vivo e in vitro con la finalidad de explorar el desarrollo eritrocitario en múltiples patologías (6) y condiciones fisiológicas del cuerpo como eriptosis (2), neocitosis (7) y senescencia (8), sin embargo son pocos los estudios como estos.

La mayoría de métodos de evaluación de senescencia eritrocitaria en humanos, supone riesgos como exposición a radiación, infecciones particularmente en métodos que requieren reinfusión de sangre (8), entre otros (9), lo cual limita su aplicabilidad clínica.

Uno de los marcadores descritos en senescencia eritrocitaria es el CD47, el cual permite diferenciar a células del sistema hemofagocítico, los glóbulos rojos senescentes del resto de células sanguíneas. Así, permite estudiar trastornos eritrocitarios, hematológicos, cánceres, patologías autoinmunes y alteraciones óseas, lo cual le daría gran utilidad en la práctica clínica (10,11).

La senescencia eritrocitaria y el almacenamiento de glóbulos rojos para la práctica clínica es fundamental. Al año se realizan millones de transfusiones de hemoderivados (9), aspecto en donde se debe tener en cuenta las posibles alteraciones en la capacidad funcional del eritrocito almacenado según su edad, por ejemplo, la disminución en la capacidad de entrega

de oxígeno a los tejidos. El determinar de manera precisa la edad eritrocitaria por marcadores de senescencia podría tener un impacto en condiciones médicas/patológicas en las que se emplea la transfusión de glóbulos rojos, optimizando así la utilidad de una transfusión (10).

Por lo anteriormente mencionado y por la inexistencia de un GS en marcaje de senescencia eritrocitaria se hace necesario promover la estandarización de un método de marcaje de senescencia del GR.

Objetivos

Objetivo general

- Identificar los métodos diseñados para estimar la senescencia eritrocitaria

Objetivos específicos

- Establecer las condiciones fisiológicas y patológicas que modifican el ciclo de vida eritrocitaria
- Especificar las ventajas y desventajas de los métodos de estimación de senescencia eritrocitaria

Metodología de la investigación

Se realizará una revisión de la literatura disponible en las bases de datos de Cochrane y Medline en los que se incluirá ensayos clínicos y revisiones de tema en humanos y animales, con acceso libre o pagado en los idiomas español y/o inglés desde 1919 hasta 2018, empleando los siguientes términos (palabras claves):

- Eritrocitos, células rojas sanguíneas o sinónimos; (Erythrocytes or red blood cell or synonymous)
- Envejecimiento, senescencia o esperanza de vida; (Aging or senescence, or lifespan)
- Biomarcadores, marcadores; (Biomarkers or marker)

Bajo el siguiente algoritmo de búsqueda:

- (("erythrocytes"[MeSH Terms] OR "erythrocytes"[All Fields] OR "erythrocyte"[All Fields]) OR ("erythrocytes"[MeSH Terms] OR "erythrocytes"[All Fields] OR ("red"[All Fields] AND "blood"[All Fields] AND "cell"[All Fields]) OR "red blood cell"[All Fields])) AND (("aging"[MeSH Terms] OR "aging"[All Fields] OR "senescence"[All Fields]) OR lifespan[All Fields] OR ("aging"[MeSH Terms] OR "aging"[All Fields])) AND (("biomarkers"[MeSH Terms] OR "biomarkers"[All Fields] OR "marker"[All Fields]) OR ("biomarkers"[MeSH Terms] OR "biomarkers"[All Fields] OR "biomarker"[All Fields])).

La búsqueda en la base de datos de Medline arrojó 518 artículos y Cochrane 2 para un total de 520 artículos de los que se excluyeron 496 artículos al emplear los criterios de inclusión y exclusión. Adicionalmente se incluyeron 21 publicaciones de textos o revistas médicas que se consideraron pertinentes, al implementar los mismos criterios.

Los artículos finalmente seleccionados son 45 a los que se le realizará resumen, identificando método de marcaje de senescencia del GR junto con una tabla de resultados ventajas y desventajas

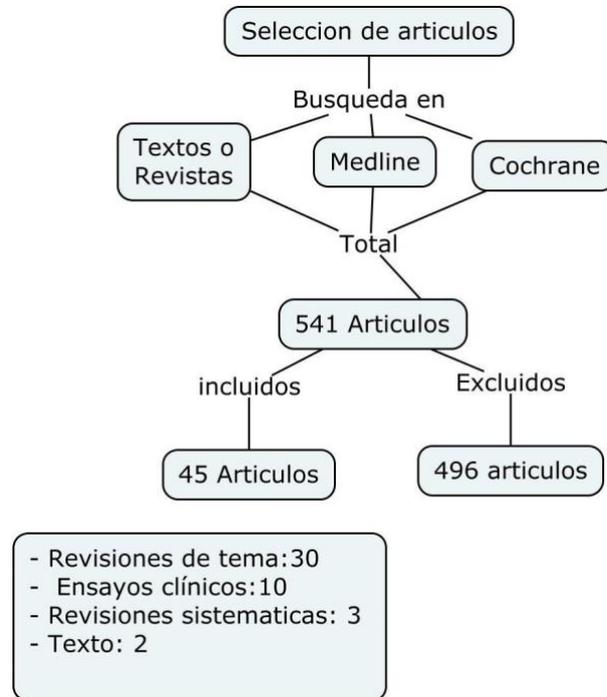


Gráfico 1. Método Selección de Artículos

Con los siguientes criterios de inclusión:

- Ensayos clínicos, revisiones de tema y estudios descriptivos realizados en humanos y animales desde 1919 a 2018.

- Definición de palabras claves incluidas en el título y abstract
 - Eritrocitos, células rojas sanguíneas o sinónimos; células bicóncavas maduras anucleadas que contienen hemoglobina y cuya función es el transporte de oxígeno.

 - Envejecimiento, cambios graduales e irreversibles en la estructura y función de un organismo que se producen como resultado del paso del tiempo.

 - Senescencia, proceso por el cual las células dejan de dividirse de manera irreversible y entran en un estado de detención permanente del crecimiento sin sufrir muerte celular y esta puede ser inducida por daños en ADN, estrés oxidativo.

 - Esperanza de vida, vida promedio de una célula u organismo.

 - Biomarcadores, marcadores; parámetros biológicos medibles y cuantificables que sirven como índices para evaluación relacionada con la salud y la fisiología, riesgo de enfermedad, trastornos psiquiátricos y diagnóstico de enfermedades.

- Resultados de la búsqueda que relacionan el marcaje eritrocitario con diversas condiciones físicas y/o patológicas que alteran la esperanza de vida eritrocitaria basadas en evidencia científica que lo soporte, motivo por lo que se deben incluir en el estudio para considerar variables a tener en cuenta en el marcaje de senescencia eritrocitario.

- Artículos en español e inglés, idiomas manejados por los autores de la presente revisión narrativa.

Con los siguientes criterios de exclusión:

- Marcaje celular no específico para eritrocito, marcaje celular diferente a línea roja.

Marco Teórico

Generalidades y factores que alteran la esperanza de vida eritrocitaria

La importancia de las revisiones narrativas se basa en que en algunos casos ni los estudios de investigación más rigurosos logran dar respuestas definitivas a diferentes problemáticas. Por otro lado, la gran cantidad de publicaciones que se encuentran disponibles que el clínico no es capaz de abarcar en su totalidad, motivo por el cual las revisiones narrativas permiten analizar y resumir la mejor evidencia disponible ya que pueden discrepar o concordar entre investigaciones (30,31).

La eritropoyesis o producción de GR inicia en la vida fetal en el saco vitelino pasando por una etapa hepática y finalmente hacia el segundo trimestre se instaura la etapa a nivel de médula ósea, uno de los órganos más grandes del cuerpo humano (entre 4 a 6% del peso corporal), con una concentración de 4.0 a 6.0×10^{12} GR en un adulto sano, su principal estímulo es la eritropoyetina (12); adicionalmente encontramos el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y las Interleucinas tres y cuatro (13).

El eritrocito (GR) es una célula con una longevidad de 120 días (2,13) con forma de disco bicóncavo, deformable, anucleado lo que no le permite reparación ni replicación y sin organelos típicos, son los principales elementos formes de la sangre (2). Encargado de transportar oxígeno por las concentraciones intracelulares de hemoglobina aproximadamente de 250 millones de moléculas por glóbulo rojo (12,13). Al integrarse al sistema cardiovascular es capaz de ejercer funciones como el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo, coagulación, quimiotaxis, interacción celular, transporte de nutrientes y desechos en el organismo (13).

Se conoce que la EV puede variar entre 70 a 140 días según los requerimientos fisiológicos del individuo (1,14) o son el resultado de múltiples procesos a nivel celular como la eritosis (ver tabla 2) o por estrés oxidativo y radicales libres los cuales han sido clasificados como los principales modelos de envejecimiento eritrocitario (14). Procesos o condiciones que impactan en la EV eritrocitaria (2,15) junto con la participación de los macrófagos, fagocitando en un adulto sano el 90% de los GR en la MO, bazo e hígado al concluir su ciclo de vida y el porcentaje restante desintegrándose en circulación.

La vida media eritrocitaria es principalmente afectada por alteraciones estructurales en la banda 3 generando pérdida de flexibilidad, biconcavidad (12,14) y aumentando la expresión de fosfatidilserina y microvesículas. A través de estudios de proteómica, ha sido posible obtener toda esta información, especificando el rol de la banda 3-anquirina, complejo fundamental en la remodelación de la membrana del eritrocito y formación de microvesículas, junto a la exposición de fosfatidilserina para la activación de complemento y fagocitosis eritrocitaria (16).

La aparición de microvesículas por proteólisis en la banda 3, por calpaínas activadas por el calcio y estimuladas por procesos como el shock osmótico, liberación de ácido araquidónico y prostaglandina E2 genera inestabilidad en la membrana por la alta concentración de calcio intracelular y se manifiesta con alteraciones estructurales como la expresión de antígenos (2,17,18,28) como la actina, espectrina y de la fosfatidilserina hacia la superficie (11,22). Al igual que la liberación de factores proapoptóticos que culmina en una respuesta coordinada entre los cambios relacionados con la edad de los GR y el sistema

inmune innato e interacción con complemento para la eliminación del GR más senescente o de aquel que exprese en membrana antígenos profagocitarios (10,19,21, 23).

Alteraciones o mutaciones en la banda 3 permiten conocer el mecanismo de envejecimiento eritrocitario, donde una mutación puede culminar en un envejecimiento normal o alterado, al hacer más susceptible a la banda 3 a la proteólisis, generando un envejecimiento más acelerado en el GR. Kay descubrió mutaciones que se encuentran en el sitio 538-554, y 812-830 de la banda 3 humana y demuestran importancia de la banda 3 en la senescencia eritrocitaria (17), ya que al verse comprometida se evidencia un envejecimiento alterado.

Interacciones entre la banda 3 y la expresión de receptores para IgG en membrana eritrocitaria para su fagocitosis requiere una concentración aproximada de 200 moléculas de IgG (2) o una concentración de aproximadamente 62,000 Mr glicoproteína (antígeno de senescencia, AS) (19,20), antígeno expresado por linfocitos, polimorfonucleares, eritrocitos, plaquetas, células embrionarias de riñón y células hepáticas (20).

Estudios evidencian vías similares para la eliminación del GR senescente donde se ha encontrado la acumulación de globinas e inmunoglobulinas (IgG) como lo expresó Kay. La externalización de la fosfatidilserina, cambios en la densidad, modulación de CD47, acumulación de C3 del complemento (14,17) y expresión de SIRT1 presente en estados inflamatorios por la producción de radicales libres y en el envejecimiento (21).

Otra alteración estructural de las proteínas es la glicosilación que se relaciona con las concentraciones de glicemia implicadas en resistencia a las enzimas de degradación,

alteración en los receptores, autoinmunidad (15), disminución de la supervivencia e incremento de adherencia a las células endoteliales, al comprometer componentes proteicos, lipídicos, alteración en la bomba de calcio y calmodulina. La disminución de las enzimas intracelulares posiblemente afectadas como la superóxido dismutasa (antioxidante) incrementa el daño por estrés oxidativo y radicales libres secundarios a la glicosilación (8,10,17) manifestándose con mayor compromiso estructural y modificando la EV eritrocitaria en el paciente diabético. Anteriormente se creía que la glicosilación de las proteínas no generaba alteración en su actividad, sin embargo actualmente se sabe que proteínas como la ribonucleasa A incubada con glucosa durante 24 horas pierde más del 50% de su actividad, la catepsina B y calpaína proteasas pierden el 70% de su función después de 2 semanas de glicosilación (15).

Las ceramidas tienen un papel fundamental en el “suicidio eritrocitario” al participar activamente en la crenación celular y senescencia eritrocitaria por medio de la activación de la fosfolipasa 2, factor activador de plaquetas (PAF), la esfingomielinasa, unión de los hemicromos a la banda 3, la sensibilidad por el calcio, formación de vesículas y expresión de fosfatidilserina para ser detectados y fagocitados por el sistema retículo endotelial (2). Al generar una agrupación de la banda 3 y acumulación de depósitos del complemento C3 e inmunoglobulinas anti banda 3, estímulo inicial para la fagocitosis eritrocitaria independientemente de la edad del GR (2,3) e influenciada por factores como en el síndrome metabólico y modificando la EV del GR (2-4).

La concentración de Acetilcolinesterasa (AChE) es estable durante la vida eritrocitaria, sin embargo llama la atención una disminución de la actividad enzimática, que no influye en las concentraciones de AChE. Esta es de carácter fundamental brindando información en

formación de vesículas en membrana, pero también como marcador de senescencia y lo encontramos directamente ubicado en los fosfolípidos de membrana como el glicosilfosfatidilinositol (23).

Por otra parte es importante determinar los cambios y el significado que tiene evidenciar la distribución de AChE en la membrana de los eritrocitos almacenados en bancos de sangre y la relación del tiempo de almacenamiento con lesiones tiempo dependientes como hemólisis, pérdida de potasio, acumulación de micropartículas relacionado con menor supervivencia y eficacia eritrocitaria postransfusional, mayor riesgo de reacciones adversas en GR almacenados bajo condiciones estándar, aspectos directamente relacionados con marcadores de senescencia eritrocitaria y morbimortalidad del paciente volviéndose de gran importancia en la práctica médica al implementar GR almacenados (24).

Neocitolisis

La neocitolisis es un proceso de hemólisis altamente selectivo para neocitos cuya vida plasmática es menor a diez días, por una reducción súbita en los niveles plasmáticos de EPO, disminuyendo en el conteo eritrocitario total (Hto) y de la hemoglobina (Hb) (5). Proceso visto en astronautas al regresar de la microgravedad, en individuos aclimatados a grandes altitudes que hacen un descenso rápido al nivel del mar y pacientes con insuficiencia renal crónica, lo que demuestra que fisiológicamente contamos con métodos selectivos para desarrollar hemólisis de GR que no llevan 120 días en circulación con variación en la EV (4,5,7), siendo esta una población celular en la que se podrían identificar marcadores de senescencia eritrocitaria.

Otro estudio relacionado con estímulos hipóxicos es el realizado por Riso A en el cual se emplearon a 4 alpinistas (dos mujeres y dos hombres, entre los 28 - 43 años) a los cuales a

los cuales se les extrajo muestras de sangre a nivel del mar antes y después de 53 días de aclimatación a una altura (4500 a 8160 m), sin administración ningún tipo de medicamento ni oxígeno durante el estudio. Posteriormente los GR se separaron por su densidad (baja, media, alta), criterios físicos y fenotípicos, caracterizándolos como jóvenes, de edad media y ancianos y calculando al mismo tiempo la expresión de CD en cada subconjunto de GR. El CD55 (CD55 anti humano IgG1 de ratón) y CD59 (CD59 anti humano IgG2a de ratón), fosfatidilserina y CD47 (CD47 anti humano IgG2b de ratón), siendo “los primeros se pierden parcialmente durante el envejecimiento de RBC”(5) y los últimos están implicados en la activación o inhibición de la fagocitosis de RBC por los macrófagos, los cuales fueron analizados mediante citometría de flujo utilizando FACScan (5), identificando así factores en membrana por subgrupo eritrocitario que pueden ser empleados como marcadores de senescencia.

Eriptosis

La eriptosis o muerte programada de los eritrocitos se caracteriza por la presencia de burbujas y expresión de fosfolípidos en la membrana celular como la fosfatidilserina, proceso que carece de señales fundamentales para la apoptosis como lo son despolarización mitocondrial y condensación nuclear ya que los GR carecen de núcleo y mitocondria, organelos que participan activamente en la apoptosis. Sin embargo, cuentan con la condensación de fosfatidilserina en la superficie celular, estímulo suficiente para ser degradados por los macrófagos del sistema retículo endotelial (2) entre los múltiples factores que deben ser considerados para el marcaje de senescencia eritrocitaria al influenciar en la EV eritrocitaria.

Tabla 2. Factores de la Eriptosis	
Factores Estimulantes de la Eriptosis	Factores Inhibidores de la Eriptosis
<ul style="list-style-type: none"> ● Modificaciones en las ceramidas ● Shock hipoosmótico (estimulado por prostaglandina E2 que activa los canales y la expresión de p38 kinasa) ● Estrés oxidativo por activación de canales de Cl y caspasas ● Protein quinasa C, activada por el deficit de energia ● Hipertermia ● Xenobióticos endogenos y exogenos ● Diabetes Mellitus ● Insuficiencia renal ● Síndrome hemolítico urémico ● Sepsis ● Infecciones por mycoplasma y malaria 	<ul style="list-style-type: none"> ● Adenosina ● Catecolaminas ● Amitriptilina ● Cafeína ● Catecolaminas como el isoproterenol ● Cloruro ● Endotelina 1 ● Eritropoyetina ● Ácido flufenámico ● NBQX / CNQX ● Ácido niflúmico ● NO (nitroprusiato) ● NPPB ● Resveratrol ● Sarafotoxina 6c ● staurosporine ● thymol ● Urea ● WHI-P131/JANEX-1 ● Xanthohumol

<ul style="list-style-type: none"> ● Anemia falciforme, ferropénica, por déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa ● B- talasemia ● Esferocitosis ● Hemoglobinuria paroxística nocturna ● Enfermedad de wilson ● Síndromes mielodisplásicos ● Disminución de fosfato. ● Deficiencia de hierro ● Neocitolisis ● Mutación en AE1 ● Mutación en GLUT1 ● Clorpromacina ● Ciclosporinas ● Placitaxel ● Plomo ● Mercurio ● Bismuto ● Sales de oro ● Aluminio <p>Tomado de: Musso Arturo. Eritrocitos y Eritrocitopatías. 2014 11/05/:151-155.</p>	<p>Tomado de: Musso Arturo. Eritrocitos y Eritrocitopatías. 2014 11/05/:151-155.</p> <p>Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Föller M. Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes. CPB 2010;26(1):21-28.</p>
--	---

Marcadores

Para la realización este tipo de procedimientos existen dos formas de realizarlo; la primera mediante la toma de sangre venosa para realizar la separación de los GR y ser mezclados con el material radioactivo para que este se una a la estructura del GR y ser inoculados en el paciente; el segundo se basa en la administración del método de marcaje directamente al paciente por vía intravenosa, lo que permite que el agente radioactivo se fije a los eritrocitos y posteriormente ser escaneado por gammagrafía para mirar el comportamiento de los GRM gracias a la cantidad de radiación que emiten, siendo muy útiles como método diagnóstico (27) al mirar el comportamiento de las células etiquetadas en circulación mediante agentes radiactivos o por la toma de pequeñas alícuotas para la identificación de diferentes marcadores que permitirán determinar la senescencia eritrocitaria de forma menos invasiva.

Al emplear técnicas de marcaje con agentes radioactivos hay riesgo de presentar síncope, hematomas, reacciones de anafilaxia e infecciones al tener que ser re inoculada. Riesgos que deben ser considerados según el paciente y su relación riesgo beneficio (27).

Ashby pionera en la medición de la EV en 1919 logró determinar la supervivencia postransfusional de glóbulos rojos mediante aglutinación, evidenció una supervivencia de 100 - 115 días para un individuo sano, aumentando la EV que se creía anteriormente. Marcaje fundamental durante casi 40 años para determinar la supervivencia del GR postransfusional (1), consistía en el paso de células tipo O a sujetos con células tipo A o B con la aglutinación por parte del suero anti-A, anti-B. Al no poderse emplear para determinar la supervivencia de GR autólogo pierde vigencia en respuesta a nuevas patologías que requerían ser diagnósticas más específicamente (1,6) y dando paso a nuevos métodos de marcaje eritrocitario.

Para 1950 aparece el Cromo 51, radioisótopo no covalente que permitió calcular el volumen de los GR a través del compuesto $\text{Na}^{251}\text{CrO}_4$ almacenado junto a las células sanguíneas como Cromato VI, a través canales aniónicos permitir el paso del marcador al interior de la célula y unirse de manera no covalente a la hemoglobina durante 30 días. Entre las ventajas son la poca cantidad de células necesarias para realizar el estudio, es marcador de GR de diferentes edades al igual que la capacidad de estudiar las células autólogas, sin embargo en sus restricciones se encuentra la incapacidad de ser utilizado en mujeres embarazadas y niños dado que deben ser sometidos a irradiación al implementar este marcador de senescencia eritrocitaria (1,6).

Por otro lado, isótopos de cromo no radiactivos presentan las mismas características del Cr^{51} con diferencia de que en este el paciente no tiene que ser sometido a radiación, al mismo tiempo es mucho más adecuado su uso en niños y mujeres embarazadas, pero a falta de disponibilidad y métodos analíticos del mismo, lo hacen muy complicado su uso (6) por lo que su implementación es limitada.

Otro marcador es el $\text{Tc}^{99\text{m}}$ empleado desde los años 60 en los GR para determinar su volumen glomerular (VG), definido como “el espacio de dilución de una población de glóbulos rojos marcados (GRM) en la circulación y se expresa en unidades de volumen”. Para el marcaje deben ser pre estañados con una solución de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dado que inicialmente se obtiene en el $\text{Tc}^{99\text{m}}$ como pertecnectato sódico ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) con un estado de valencia de +7 dificultando el marcaje eritrocitario, al agregar iones de estaño (Sn^{2+}) el pertecnectato adquiere una valencia intracelular reducida de +4, facilitando la unión del $\text{Tc}^{99\text{m}}$ a la cadena β de la hemoglobina y dificultando la salida del mismo con un rendimiento

del 95% en los eritrocitos pre estañados (25) y brindando una herramienta útil para el marcaje eritrocitario en la práctica clínica.

En la práctica clínica el Tc99m tiene múltiples usos como el VG eritrocitario en anemia, policitemia, visualización de ventrículos, plexos coroideos, hemorragias, gammagrafía ósea mediante la utilización de rayos gamma, con la ventaja que la radiación empleada vs el Cr51 es menor, impacto favorable sobre el paciente al recibir menos radiación durante los estudios y siendo este un método altamente selectivo (25).

Entre las propiedades del Tc99 encontramos un marcaje eritrocitario del 97% útil en imágenes diagnósticas a nivel cerebral o cardíaco y el tropismo por el tejido óseo con la reabsorción o acumulación de calcio (25). Se conocen interacciones medicamentosas con la cortisona o agentes citostáticos, el nifedipino, el dietilestilbestrol, las gonadotropinas, las fenotiacinas y la cimetidina a altas dosis, aspecto de importancia por la variedad pacientes que son manejados con alguno de los medicamentos anteriormente mencionados (26).

Otras de las dificultades para el uso del Tc99m es que se requiere de personal capacitado y autorizados en el uso de radioisótopos, radiación, la manipulación de forma aséptica de las alícuotas para la reinfusión dado que no permite ser administrado mediante catéter o vía plástica al comprometer su eficacia y las posibles reacciones adversas como fiebre, náuseas, flebitis, rash (erupciones, urticaria y eritematosas) y se desconocen su efectos en embarazo, lactancia o puerperio al igual que con Cr51 (26).

La Biotina (vitamina hidrosoluble) empleada como marcador de eritrocitos mediante el proceso de biotilación a través de una infusión intravenosa de B7 y una revisión periódica

por medio de tomas de alícuotas para determinar el número aproximado de GRM que permanecen en la circulación. Para ello se adiciona un reactivo fluorocromado (Avidina o Estreptavidina) para generar una reacción de fluorescencia al ser conjugado con la biotina en la pared de los eritrocitos. Procedimiento relativamente novedoso gracias a la unión covalente de la Biotina a las proteínas de membrana y citosólicas del eritrocito, se deben considerar cambios naturales como la pérdida de área de membrana que sufre el eritrocito a través del tiempo (1,6,28) y las alteraciones estructurales del mismo como posibles marcadores de senescencia eritrocitaria.

Se conoce que la acumulación de biotina en GRM de forma ex vivo y ser reinfundidos, está relacionada con la formación de IgG para la eliminación del GR, demostrando el papel fundamental de los IgG para la fagocitosis eritrocitaria. Por otro lado, en el marcaje invitro mediante el uso de biotina no son claros los posibles daños que sufre el GR durante el marcaje, antes o durante la reinfusión, acciones que pueden influenciar en el proceso de fagocitosis al presentar o no alteraciones estructurales o expresión de IgG o antígenos, que modifiquen estructuralmente su senescencia.

Entre los métodos de marcaje eritrocitario no invasivos a nivel comercial se encuentran diferentes tecnologías que permiten realizar estudios con variables únicas y específicas de cada grupo celular, en el caso de GR encontramos un medio de separación por gradientes, tamaño e isopícnica (separación por densidad) al emplear el coloide Percoll el cual posee la capacidad de separación por grupo etario específico, dependiendo la laguna en la que se encuentre, componente potencial en el estudio de la vida media del eritrocito al encontrar el eritrocito más longevo con mayor densidad (4,25).

Un estudio realizado anteriormente por Risso emplea gradientes de Percoll con el objetivo de separar los GR utilizando “una solución de sorbitol Percoll / 4% con RPMI-HEPES 8 mM al 90%, 80%, 70%, 60% y 40%, correspondiente a densidades de 1.117, 1.104, 1.091, 1.078, 1.052 g / ml” en donde la densidad disminuye de abajo hacia arriba obteniendo tres subgrupos de GR según su densidad baja, media y alta densidad (1.091, 1.104 y 1.117 g / ml) respectivamente (5), encontrando a los GR más longevos con mayor densidad. Por otro lado Goodman et al implemento gradientes de Percoll en reticulocitos y utilizar anticuerpos logrando obtener CDs específicos para reticulocitos, el CD36 y 71 (12) que se podrían implementar como marcadores en senescencia eritrocitaria.

Otro método de marcaje es el CD47, proteína de membrana asociada a integrina regulando procesos de adhesión e involucrada en el reconocimiento de eritrocitos longevos por macrófagos (5,10). Asociado a la disminución de colesterol y fosfolípidos celulares llevando a una disminución de área y volumen celular de aproximadamente 20% en el envejecimiento (2,14). Esta pérdida de componentes celulares se correlaciona con el proceso de formación de microvesículas (14) que participan en el proceso de envejecimiento eritrocitario al contener IgG en su superficie, exposición de fosfatidilserina (PS) (7) y productos de ruptura de banda 3 que desaparecen rápidamente de circulación al ser removidas por células de Kupffer (19) factores que influyen en la EV y eliminación del GR (16).

Se cree que existe una interacción entre el CD47, la banda 3 y el SIRP α de los macrófagos que determinaría la vida media y útil del GR (10,11). El receptor SIRP α también es expresado por granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (10) y se conoce que la interacción entre CD45 SIRP α regulador negativo para la fagocitosis, dependiente de la defosforilación de la miosina IIA y en el caso que favorecerle es por un cambio conformacional en el CD47 del GR aparentemente inducido por la oxidación (10).

Oldenborg encontró en ratones que el CD47 permite reconocimiento de células “normales” y de lo “propio” por parte de los macrófagos durante la senescencia eritrocitaria. Manifiesta que una fracción de eritrocitos de ratones de “30 días de edad” presentan una reducción del 20% (14) en la expresión de CD47 en comparación con una fracción de eritrocitos de ratones más jóvenes, encontrando así una posible ayuda diagnóstica mediante el empleo del CD47 en los trastornos eritrocitarios, hematológicos, cánceres, patologías autoinmunes y alteraciones óseas (10,11), entre uno de los marcadores no invasivos disponibles actualmente.

Otro de los marcadores no invasivo es la glicina como un marcador metabólico, precursor del grupo hemo y globina, puede ser administrado de forma oral para el marcaje de la Hb e indirectamente de eritrocitos. Permite medir la vida de los hematíes recién sintetizados, gracias a que la glicina se introduce en la hemoglobina mientras es sintetizada en los normoblastos, aumentado el número de eritrocitos marcados hacia el día 25 después de la ingesta de glicina en un grupo etario mediante la espectrometría de masas (1) y permite hacer un seguimiento de la senescencia de los GRM.

El monóxido de carbono en marcaje eritrocitario, está basado en la cuantificación del catabolismo del grupo hemo basado en que es “la única fuente endógena de CO”, ahorrando por cada molécula de CO una molécula de hemo, en el recambio del grupo hemo se conoce que la hemoglobina es en un 80 % del recambio lo cual puede diferir según las diversas patologías que presente el paciente (1). Para la cuantificación del CO se emplea un sistema de reinhalación o estimación de la medición de CO alveolar, muy útil como método de marcaje en periodos cortos. La cuantificación del hemo puede ser modificada por proteínas

que también poseen dicho grupo y la medición alveolar puede ser influenciada por factores ambientales (1).

La citometría de flujo es una técnica altamente avanzada, automatizada, objetiva que permite obtener y analizar información de diversos grupos celulares, entre 5.000 y 10.000 células por estudio, número representativo para la cantidad de muestra que pueden ser el aspirado de médula ósea (MO), LCR, líquido pleural y ascítico, concentrado de hematíes, plaquetas o plasma, sangre de cordón umbilical o periférica, particularmente para esta última se requiere de 1 ml de sangre que permitirá valorar hasta 10 antígenos por célula, brindando una amplia posibilidad de identificación de características por el alto rendimiento del procedimiento (38).

Su alta sensibilidad en la detección de características celulares le permite detectar una célula tumoral entre 10.000 células normales, utilizado para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas (38). Otra característica importante es el análisis de múltiples parámetros de la muestra al mismo tiempo, encontrando propiedades fisicoquímicas, expresión de proteínas celulares, al utilizar anticuerpos monoclonales (AcMc), antígenos de superficie, nucleares o citoplasmáticos con un rendimiento de 5000 partículas por segundo, cuantificados según la intensidad antigénica y del porcentaje de luz refractada por los fluorocromos de forma indirecta o directa a los AcMo (29).

Los resultados de la citometría de flujo son inversamente proporcional al tiempo transcurrido y grado de manipulación de la muestra desde la obtención hasta el procesamiento de la misma que debe realizarse en las primeras 24 h y mantenerse en preservación a temperatura ambiente o si se requiere de mayor tiempo entre 4 a 6°C más reactivo

estabilizador para conservar una viabilidad mayor al 90% junto con la utilización del anticoagulante EDTA para no generar alteraciones estructurales al igual que en la conformación de los antígenos a estudiar (29).

Pandey y Rizvi mediante citometría de flujo e inmunotransferencia han encontrado que las microvesículas expresan IgG, exponen la fosfatidilserina y fragmentos de degradación de la banda 3 (14), aspectos que al emplearse en conjunto podrían llegar a un posible marcador de senescencia eritrocitaria. Por otro lado Risso para determinar la expresión de fosfatidilserina en GR que son centrifugados y posteriormente se suspendieron en un “tampón de unión (10 mM HEPES- NaOH, pH 7,4; NaCl 150 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM) (5) para ser incubados con anexina V conjugada con FITC durante 10 minutos, para luego ser lavadas y analizadas inmediatamente con citometría de flujo” (5) se logra determinar la cantidad de GRs que expresan FS para ser fagocitados y posiblemente ser empleado como marcador de senescencia eritrocitaria.

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) encontró la presencia de microvesículas en la hemoglobina de los eritrocitos viejos (14) al implementar un biomarcador para investigar el daño por estrés oxidativo en los lípidos, mediante la medición de malonil acetaldehído MDA por el método de Esterbauer y Cheeseman que puede generar alteraciones estructurales e inducir una alteración en el sistema inmune, posiblemente comprometiendo la EV eritrocitaria. Adicionalmente se a encontrado una correlación entre el nivel de MDA eritrocitario y la edad humana, demostrando que el eritrocito puede actuar como modelo para el estudio del envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad (14) al igual que se podría implementar la HPLC para desarrollo de marcadores de senescencia eritrocitaria.

Discusión

Durante la revisión de la literatura se encontraron once marcadores de GR con resultados heterogéneos. El de mayor evidencia con siete artículos fue el CD47 seguido de la biotinylación y gradientes de percoll con tres y dos artículos correspondientemente. Por otro lado el mecanismo con mayor evidencia encontrado es la citometría de flujo con cuatro artículos seguido de la proteómica con 2 artículos, no se encontró un marcador común o estandarizado en marcaje de GR para determinar la senescencia del mismo.

Para Risso y Franco que consideran la aglutinación un método innovador desde su descubrimiento, coinciden en que su principal desventaja es su incapacidad para la determinación de la sobrevida de glóbulos rojos autólogos. Ningún otro autor hace uso de la aglutinación, razón por la cual consideramos no es un método adecuado para este fin ya que en la actualidad contamos con otros métodos que determinan la sobrevida del glóbulo rojo transfundido.

Franco en sus dos artículos considera que el Cr51 es útil para determinar el volumen del GR, estudio de células autólogas al lograr un marcaje de 30 días, sin embargo es necesario el uso de radiación con los potenciales efectos colaterales que implican. Debe considerarse el factor riesgo beneficio para el paciente al ser sometido al marcaje con Cr51 para estudiar una condición medico patología y tomando todas las medidas necesarias para mitigar los posibles riesgos o buscar algún otro marcador con las mismas capacidades en rendimiento y con menor riesgo.

Teresa et al. y el Centro de Isótopos consideran el Tecnecio 99 para el estudio de anemias o policitemias, visualización de plexos coroideos y cavidades cardiacas gracias a su alto

rendimiento de 98% de marcaje a los 15 minutos y del 97% a las 18 horas, pero es necesario el uso de radiación y con riesgo de presentar reacciones alérgicas, entre otras. Durante la revisión encontramos métodos de marcaje para GR que mediante el uso de radiación permiten determinar características del GRM o de estructuras en estudio, sin embargo el Tc99 es una de las que permite un marcaje rápido con un alto porcentaje, junto con la cantidad de estructuras que permite visualizar siendo este uno de los pocos marcadores encontrados con dicha capacidad.

A pesar de las posibles reacciones adversas los marcadores se continúan empleando dado su alto valor en la práctica médica por lo que siempre se está intentando mitigar a las mismas con las medidas necesarias. Pocos fueron los artículos encontrados en los que se utilizaron humanos. Esto debido a la dificultad en controles de bioseguridad, que disminuyan el riesgo que implica el marcaje en humanos.

Franco menciona que la biotina permite determinar el volumen celular eritrocitario, vida útil, monitoreo y diagnóstico de anemia, transfusiones y múltiples condiciones hematológicas con un mismo rendimiento del Cr51 sin uso de radioisótopos. Consideramos que es un marcador con un rendimiento y capacidades similares a otros en los que no se someten a radiación, es decir que tiene el mismo rendimiento con mayor seguridad sin embargo es necesario considerar la citotoxicidad, pérdida de los GRM y alteraciones estructurales que pueden alterar la esperanza de vida del GR y controlando estas variables podría ser posible su replicación en humanos de una manera segura. Mock et al. empleo la biotina para determinar la sobrevivencia de los GR post transfusional, coincidiendo con Franco en uso para vida útil, estudio de condiciones hematológicas. Actualmente es uno de los métodos más

utilizados por su alto rendimiento y fácil empleo, motivo por el que creemos tiene el mayor potencial para su uso en humanos sin embargo es necesario mayor evidencia científica.

Franco menciona el monóxido de carbono como un método adecuado para medición de periodos cortos que puede ser alterado por otras proteínas que posean grupo hemo e influenciado por factores ambientales. Su uso a la hora de práctica tiene un uso limitado pues son varios los factores que afectan esta medición lo cual limita su utilidad, no creemos que sea un marcador con las características necesarias para determinar de manera precisa la senescencia eritrocitaria.

La Glicina permite un marcaje de GR por cohortes al unirse a la hemoglobina y posteriormente ser analizada por espectrometrografía de masas la que permite estudiar características de cada cohorte de los que se pueden obtener información adicional al encontrar particularidades de cada subgrupo y relacionarlas con la senescencia eritrocitaria, con otros marcadores que clasifican los GR por edad en la circulación. Franco es el único autor que la menciona durante la búsqueda, pero posiblemente al implementarse con otros métodos logre optimizar el marcaje en senescencia eritrocitaria, brindando mayor conocimiento al igual que los otros marcadores que permiten clasificar los GR por edad desde su síntesis y en los que se han combinado métodos como citometría de flujo y CDs, identificando CDs específicos para reticulocitos. No se encontró estudios de senescencia eritrocitaria que combinen la identificación de dos o más marcadores y esto podría ayudar a incrementar la precisión de los resultados en cada experimento

Risso y Barasa et al. implementaron los gradientes de percoll para la separación por densidad y generar diferentes grupos etarios de GR. Ambos implementando y combinando

métodos de marcaje como identificación de CD, anticuerpos y complementar su medición con citometría de flujo o proteómica. Barasa empleó el CD36 junto a gradientes de percoll permitiéndole realizar el marcaje de reticulocitos. El combinar varios métodos de marcaje ha permitido abarcar más información en el tema, como los CDs expresados en los reticulocitos.

En los diferentes artículos mencionan cambios en el eritrocito como la expresión de los diferentes antígenos o receptores y microvesículas que se encuentran en el GR. Oldenburg menciona el receptor SIRP está involucrado en la interacción entre la banda 3, Cd 47 estructuras de importancia en la fagocitosis del GR con la limitación que el SIRP no es únicamente expresado en el GR. Herlax et al. (2), Risso et al. (5), Palomino et al. (7), Oldenburg (10), Murata et al. (11), Kanti et al (14). y Tissot et al (16). coinciden en que el CD47 está altamente relacionado con el reconocimiento de lo GR longevos, alteraciones estructurales e interacción de SIRP. CD implementado en estudios de trastornos hematológicos, entre otras. Con la limitación al igual que el SIRP de ser expresado en múltiples líneas celulares. Conocer las alteraciones estructurales que se generan en el GR para expresar moléculas o receptores para su fagocitosis permitirá identificar otros posibles marcadores aún no descritos y así ampliar la evidencia en marcaje de senescencia eritrocitaria.

Risso et al. (5), Kanti et al. (14), Suárez et al. (29) y Mock et al (28), coinciden en que la citometría de flujo permite el estudio de varios grupos celulares utilizando una pequeña muestra logrando una alta sensibilidad gracias al empleo de anticuerpos o antígenos en la superficie logrando así la medición de IgG, fosfatidilserina o fragmentos de la banda 3. La capacidad de la citometría de flujo para identificar múltiples objetivos o dianas en la célula

brinda opciones de identificar marcadores más específicos en senescencia eritrocitaria lo cual hace de la citometría de flujo un método de identificación prometedor en senescencia.

Barasa et al. y Tzounakas et al. utilizan la proteómica para la documentación de casi 2289 proteínas del GR para el desarrollo de biomarcadores o identificación de lesiones del GR almacenado en banco de sangre al recolectar proteínas de GR hemolizados y ser sometida a espectrometría de masas. Explorar el proteoma permitió conocer proteínas involucradas en respuesta a estrés oxidativo, plegamiento de proteínas, metabolismo, muerte celular y apoptosis. El conocer las diferentes proteínas involucradas en los múltiples procesos al cual el GR puede verse sometido al igual que las posibles alteraciones estructurales a las cuales se ve sometido por dichos procesos nos permite identificar potenciales marcadores de senescencia eritrocitaria e implementar en un futuro en la clínica.

Conclusiones

Esta revisión permitió identificar los diferentes marcadores y métodos de marcaje para senescencia eritrocitaria. Encontrando once marcadores de GR, el de mayor evidencia el CD47 con siete artículos seguido de la biotilación y gradientes de percoll con tres y dos artículos correspondientemente de los cuales se han resumido sus características previamente. Adicionalmente el mecanismo con mayor evidencia encontrado es la citometría de flujo con cuatro artículos seguido de la proteómica con 2 artículos. Al mismo tiempo, esta revisión permitió identificar los múltiples factores que alteran la EV del eritrocito al igual que los procesos fisiológicos y/o patológicos que intervienen en la EV como la eriptosis, neocitosis o alteraciones que puede presentar el GR a nivel estructural y molecular a lo largo de su proceso de senescencia y con ello identificar posibles marcadores, empleando estas modificaciones moleculares o estructurales.

Durante la senescencia eritrocitaria hay cambios estructurales y/o moleculares por factores que alteran la EV eritrocitaria, usados como marcadores. De los marcadores y métodos encontrados en la revisión de la literatura ninguno de los autores considera alguno como marcador GS de senescencia eritrocitaria, a pesar de tener resultados prometedores la evidencia científica es insuficiente para determinar el más preciso y seguro para determinar envejecimiento del GR. Al igual que los autores de los artículos revisados no podemos recomendar un marcador de senescencia eritrocitaria principalmente por el tipo de revisión realizada, además de los pocos experimentos encontrados. Contamos con marcadores eritrocitarios pero no específicamente de senescencia, por lo que posiblemente mediante la combinación de mecanismos y métodos se logre conocer exactamente la senescencia eritrocitaria.

Dentro de las posibles limitaciones para el desarrollo de un GS en senescencia eritrocitaria encontramos los múltiples factores que influyen en la esperanza de este, por lo que se deben conocer cada uno de estas, así como las alteraciones que generan en el GR. Adicionalmente la disponibilidad de ensayos clínicos en la literatura fue limitada y fue necesario incluir revisiones de tema las cuales son opiniones de expertos con las implicaciones que ello tiene.

Esta revisión expone la poca información y la falta de evidencia científica robusta en este tema. Resume las particularidades (ventajas y desventajas) así como los métodos comúnmente usados para dicha identificación. El conocimiento y uso de un GS en senescencia eritrocitaria permitiría una mayor calidad en la evaluación de los elementos formes destinados para la transfusión, atención y detección múltiples condiciones médicas/clínicas que dependen de un tratamiento pertinente y efectivo, motivos por los cuales se debe seguir investigando en este campo médico científico.

Tabla 2. Resumen Métodos de Marcaje:			
Método de marcaje	Ventajas	Desventajas	Bibliografía
Cr 51	<ul style="list-style-type: none"> - Manipulación mínima de células. - Capacidad de medir GR autólogas al unirse en un 90% a la Hb. - Distintos grupos etarios. - Permite medir volumen celular. - Se requiere de poca cantidad de muestra. - Permite medir características de supervivencia de GRM por 30 días 	<ul style="list-style-type: none"> - No está aprobado su uso en todos los países. - No se debe usar en niños ni embarazadas. - Radiación, radioisótopo. - Unión de forma no covalente. - Debe ser inoculada en el paciente. - Pueden ser considerados como desechos radiactivos 	(1,6)
Tecnecio 99 m	<ul style="list-style-type: none"> - Menos radiación vs Cr51. 	<ul style="list-style-type: none"> - Efectos indeseables: fiebre, rigor, náuseas, rash y flebitis. 	(25,26)

	<ul style="list-style-type: none"> - Tropismo por tejido oseoso con reabsorción o acumulación de calcio. - El 98% de la actividad sanguínea se localiza en los hematíes transcurridos 15 min. - El marcaje de los hematíes es superior al 97% después de 18 horas. - Imágenes del plexo coroides y de la cavidad cardíaca. - Permite medir volumen celular en estados de anemia o policitemia. - Rendimiento del 95% en GR pre estañados. - Útil en imágenes diagnósticas cerebrales o cardíacas 	<ul style="list-style-type: none"> - Personal capacitado y autorizados en radioisótopos. - Irradiación en el paciente. - Forma de administración. - No se conoce de su uso en el embarazo, lactancia o puerperio. - Anafilaxia. - Re-Inoculación de la alícuota. - Radiación. - Interacción con medicamentos. 	
<p>Biotinilación</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Marcaje poblacional del GR. - Vitamina hidrosoluble. 	<ul style="list-style-type: none"> - Administración por medio de infusión IV. 	<p>(1,6,28)</p>

<ul style="list-style-type: none"> - Unión covalente a la membrana eritrocitaria. - Permite determinar volumen, vida útil del GR, tomando muestras post infusión. - Determinar variables del GR dependientes de la longevidad - Análisis mediante citometría de flujo o cromatografía de alto rendimiento - Empleado en niños y adultos <ul style="list-style-type: none"> - Monitoreo y diagnóstico de diabetes, anemia, transfusiones o condiciones hematológicas. - No se emplean radioisótopos - Equivalente al marcaje con Cr51 	<ul style="list-style-type: none"> - Toma repetitiva de alícuotas con riesgo de infección - Marcaje ex vivo relacionado con la formación de IgG. - Desarrollo de anticuerpos contra GRM con biotina - Pérdida de 1/3 de los GRM - Citotoxicidad 	
---	--	--

<p>Monóxido de Carbono</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Útil para la medición en periodos cortos. (1) 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas que también poseen grupo hemo, pueden modificar la cuantificación del CO. - Influenciado por factores ambientales. - Modificado por la Inhalación de monóxido de carbono. 	<p>(1)</p>
<p>Glicina</p>	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere etiquetado ex vivo. - Marcaje de cohortes. - Administración de forma oral. - Marcaje de Hb 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere análisis por espectrometría de masas. 	<p>(1)</p>
<p>Aglutinación</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Permite determinar sobrevida del GR postransfusion. 	<ul style="list-style-type: none"> - No permite determinar la sobrevida en GR autólogos. 	<p>(1,6)</p>
<p>SIRPα</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Interacción entre banda 3, CD47 en la fagocitosis del GR 	<ul style="list-style-type: none"> - Expresado por granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas - Sufre de cambio conformacional inducido por la oxidación 	<p>(10)</p>

<p>Gradientes de Percoll</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Separación del GR por tamaño y densidad. - Distintos grupos etarios. - Permite identificar CD y anticuerpos al complementarlo con citometría de flujo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alterada por factores que modifican la densidad del GR 	<p>(5,12)</p>
<p>CD36</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Empleados en el marcaje de reticulocitos - Se puede emplear junto gradientes de Percoll 	<ul style="list-style-type: none"> - Podría ser expresado por otras líneas celulares 	<p>(12)</p>
<p>CD47</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína involucrada en el reconocimiento de GR longevos. - Relacionado con la formación de microvesículas, IgG, ruptura de banda 3 y exposición de fosfatidilserina. - Interacción con SIRPα - Se puede emplear en trastornos eritrocitarios, 	<ul style="list-style-type: none"> - Expresado por múltiples líneas celulares. 	<p>(2,5,7,10,11,14,16)</p>

	hematológicos, cánceres, patologías autoinmunes y alteraciones óseas.		
CD71	<ul style="list-style-type: none"> - Empleados en el marcaje de reticulocitos - Se puede emplear junto gradientes de Percoll 	<ul style="list-style-type: none"> - Podría ser expresado por otras líneas celulares 	(12)
Mecanismos			
Citometría de Flujo	<ul style="list-style-type: none"> - Permite el estudio de diversos grupos celulares. - Requiere de una alícuota pequeña y puede emplear varias muestras. - Alta sensibilidad. - Emplea anticuerpos monoclonales, antígenos de superficie o citoplasmáticos. - Relacionado con la medición de IgG, fosfatidilserina, fragmentos de la banda 3. 	<ul style="list-style-type: none"> - Resultados dependen del tiempo de manipulación de la muestra. - Requiere características de procesamiento específicas para viabilidad de la muestra. 	(5,14,29,38)

<p>Cromatografía de alto rendimiento o</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Permite identificar moléculas como el retinol, tocoferoles, betacaroteno y coenzimas. - Alícuota de 100 microlitros. 	<ul style="list-style-type: none"> - Puede ser alterada por el tamaño de las partículas en estudio o del poro. 	<p>(14)</p>
<p>Proteómica</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Utiliza electroforesis para separación de proteínas a estudiar. - Permite identificar casi 2289 proteínas del GR. - Permite identificar nuevas proteínas al recolectarlas del GR hemolizado durante en estudio al emplear espectrometría de masas - Permite explorar el proteoma del GR. - Identifica proteínas involucradas en respuesta al estrés oxidativo, plegamiento de proteínas, metabolismo, 	<ul style="list-style-type: none"> - La gran concentración de proteínas celulares puede alterar el resultado. - Emplea la electroforesis que se puede ser alterada por proteínas muy grandes o pequeñas dependiendo de la concentración. - Requiere de procedimientos para separar y purificar los GR, aspecto que podrían modificar al GR. - Puede ser alterado por la mutación de proteínas. - Requiere de más estudios biológicos para confirmar los resultados hasta ahora obtenidos en envejecimiento del GR, calidad del GR transfundidos y anemias 	<p>(12,24)</p>

	degradación, muerte celular y apoptosis.		
Espectrofotometría	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la medición de la glicina a los 25 días de ingesta. - Identificación de características de las diferentes cohortes marcadas con Glicina 	<ul style="list-style-type: none"> - Resultados dependen del tiempo de manipulación de la muestra. 	(1)

Bibliografía

(1) Franco RS. Measurement of Red Cell Lifespan and Aging. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2012 Oct;39(5):302-307.

(2) Herlax V, Vázquez R, Mate S, Bakás L. Eriptosis, la muerte suicida de eritrocitos: mecanismo y enfermedades asociadas. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 2011 06;45(2):287-296.

(3) Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Föller M. Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes. *CPB* 2010;26(1):21-28.

(4) Lang F, Lang E, Föller M. Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. *Transfus Med Hemother* 2012 -10;39(5):308-314.

(5) Risso A, Turello M, Biffoni F, Antonutto G. Red blood cell senescence and neocytolysis in humans after high altitude acclimatization. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2007 March 1;38(2):83-92.

(6) Franco RS. The measurement and importance of red cell survival. *Am J Hematol* 2009 February 1;84(2):109-114.

(7) Palomino F, García MA, Bautista L. Neocitolisis. *Revista Med de la Facultad de Medicina* 2009;17(1):130-136.

(8) Robert S. Franco, M. Estela Puchulu-Campanella., Latorya A, Mary B. Palascak Clinton H., Philip S. Low, Robert M. Cohen. Changes in the properties of normal human red blood cells during in vivo aging. *Hematol* 2013(88:44–51, 2013.).

(9) Delobel J, Rubin O, Prudent M, Crettaz D, Tissot J, Lion N. Biomarker Analysis of Stored Blood Products: Emphasis on Pre-Analytical Issues. *International journal of*

molecular sciences 2010 Nov 17;11(11):4601-4617.

(10) Oldenborg P. Role of CD47 in Erythroid Cells and in Autoimmunity. *Leukemia & Lymphoma* 2004 Jul;45(7):1319-1327.

(11) Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP α signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J Biochem* 2014 Jun;155(6):335-344.

(12) Barasa B, Slijper M. Challenges for red blood cell biomarker discovery through proteomics. *BBA - Proteins and Proteomics* 2014 May;1844(5):1003-1010.

(13) Ross MH, Pawlina W. *Histología*. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

(14) Kanti Bhooshan Pandey, Syed Ibrahim Rizvi. Markers of Oxidative Stress in Erythrocytes and Plasma During Aging in Humans. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2010;3(1):2-12.

(15) Yazdanpanah S, Rabiee M, Tahriri M, Abdolrahim M, Rajab A, Jazayeri HE, et al. Evaluation of glycated albumin (GA) and GA/HbA1c ratio for diagnosis of diabetes and glycemic control: A comprehensive review. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2017 Jun;54(4):219-232.

(16) Tissot J, Rubin O, Canellini G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Current Opinion in Hematology* 2010 Nov;17(6):571-577.

(17) Kay MM. Generation of senescent cell antigen on old cells initiates IgG binding to a neoantigen. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 1993 Mar;39(2):131.

(18) Jacob KD, Noren Hooten N, Trzeciak AR, Evans MK. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 2013 Mar;134(3-4):139-157.

(19) Beppu M, Ando K, Kikugawa K. Poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains of band 3 as determinants for anti-band 3 autoantibody binding to senescent and oxidized erythrocytes. *Cellular and Molecular Biology* 1996 Jan 1;42(7):1007-1024.

(20) Kay MM. Senescent cell antigen: a terminal differentiation antigen. Survey and synthesis of pathology research 1985;4(3):227.

(21) Balcerczyk A, Gajewska A, Macierzyńska-Piotrowska E, Pawelczyk T, Bartosz G, Szemraj J. Enhanced Antioxidant Capacity and Anti-Ageing Biomarkers after Diet Micronutrient Supplementation. *Molecules* (Basel, Switzerland) 2014 Sep 17;19(9):14794-14808.

(22) Jansen E, Beekhof P, Tamosiunas A, Luksiene D, Baceviciene M. Biomarkers of oxidative stress and redox status in a short-term low-dosed multivitamin and mineral supplementation study in two human age groups. *Biogerontology* 2015 Oct;16(5):645-653.

(23) Freitas JL, Adjobo-Hermans MJW, Brock R, Bosman G. Acetylcholinesterase provides new insights into red blood cell ageing in vivo and in vitro. *Blood Transfus* 2017 /05;15(3):232-238.

(24) Tzounakas VL, Kriebardis AG, Papassideri IS, Antonelou MH. Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges. *PROTEOMICS – Clinical Applications* 2016 Aug;10(8):791-804.

(25) Teresa A. Fundora Sarraff,1 Lic. Mario Figueredo Ruiz,1 Tec. Rafael Ferrer Semanat,1 Dra. Elena Putíntseva,1 Lic. Argelio Jiménez2 y Lic. David Sáez Núñez. Uso del Tc-99m en el marcaje in vitro de hematíes y y en la medición del volumen globular.

(26) CENTRO DE ISÓTOPOS. PIROFOSFATO -Sn para marcaje con 99MTc Liofilizado para inyección iv. -2010; Disponible en: <http://www.centis.cu/documentos/especificacion/car243.pdf>. Accessed Abr 30 -, 2017.

(27) Adam A, Allison DJ, Grainger RG. Grainger & Allison's diagnostic radiology. 6. ed. ed. Edinburgh [u.a.]: Churchill Livingstone Elsevier; 2015.

(28) Mock DM, Widness JA, Veng-Pedersen P, Strauss RG, Cancelas JA, Cohen RM, et al. Measurement of Post-Transfusion Red Cell Survival with the Biotin Label. *Transfus Med*

Rev 2014 -7;28(3):114-125.

(29) Suárez VM, Pérez, Lázaro O del Valle, Domínguez GD, Abraham CM. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas.

Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia 2015 /04/10;31(3).

(30) Revisiones sistemáticas de la literatura. Rev Col Gastroenterol [Internet]. 2005 Mar [citado 2018 Sep 23]; 20(1): 60-69. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572005000100009&lng=en.

(31) Velásquez, J. D. (2015). Una Guía Corta para Escribir Revisiones Sistemáticas de Literatura Parte 3. DYNA, 82(189), 9–12. doi:10.15446/dyna. v82n189.48931