





**UNRC**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

***Isotipos de tubulina en diferentes patologías humanas:  
distribución celular y efecto sobre la actividad Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa***

Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas

***NIGRA, Ayelén Denise***

*Río Cuarto, 2016*



Tesis doctoral

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Director de tesis:**

Dr. CASALE, César Horacio

**Co-Directora de tesis:**

Dra. SANTANDER, Verónica Silvina

**Comisión de tesis:**

Dr. NORES, Gustavo Alejandro

Dra. PASQUALINI, María Eugenia

Dra. RUMIE VITTAR, Natalia Belén



# ÍNDICE



● Abreviaturas	01
● Resumen	02
Abstract	03
● Introducción	04
Generalidades e hipótesis	04
Eritrocitos, Aspectos generales	06
Eritropoyesis	06
Membrana eritrocitaria	08
Citoesqueleto membranoso	09
Deformabilidad	11
Fragilidad osmótica o resistencia globular	11
Metabolismo	12
Citoesqueleto eritrocitario	13
Tubulina, Aspectos generales	16
Modificaciones post-traduccionales	17
Papel de la acetilación de tubulina en la regulación enzimática	22
Diabetes, Aspectos generales	25
Clasificación según la etiología	26
Base bioquímica de la diabetes mellitus	28
Diabetes e hipertensión	31
Morfología eritrocitaria en diabéticos	31
● Objetivos	34
● Metodología	35
Materiales, Anticuerpos, Pacientes, Animales	35
Inducción de diabetes, Inducción de hiperglucemia, Toma de muestras de sangre en ratas, Inmunofluorescencia	36
Obtención de homogenato y fracciones de tubulina de eritrocitos humanos, Preparación de tubulina de cerebro de rata	37
Preparación de tubulina o anticuerpo unidos a sefarosa, Inmunoprecipitación, Microscopia electrónica	38
Electroforesis e inmonoblot, Electroforesis en dos dimensiones	39
Determinación de proteínas, Determinación de deformabilidad eritrocitaria, Determinación de la resistencia globular o fragilidad osmótica	40
Determinación de la capacidad de acetilación/deacetilación de tubulina, Aislamiento de células progenitoras hematopoyéticas, Diferenciación de CPH a linaje eritroide	41
Tinción Wright, Análisis estadístico	42



- Resultados ..... 43
  - Efecto de la glucosa sobre la distribución de tubulina eritrocitaria ..... 43
  - Efecto *in vivo* de la glucosa sobre la distribución de tubulina eritrocitaria ..... 45
  - Distribución de tubulina en eritrocitos de individuos diabéticos ..... 46
  - Distribución de tubulina en eritrocitos de ratas diabéticas ..... 47
  - Isotipos de tubulina y su distribución en eritrocitos de individuos diabéticos o tratados con glucosa ..... 49
  - Capacidad de acetilación/deacetilación de tubulina en eritrocitos de diabéticos o tratados con glucosa ..... 51
  - Deformabilidad de eritrocitos tratados con glucosa o de individuos diabéticos ..... 52
  - Resistencia globular o fragilidad osmótica de eritrocitos de individuos diabéticos o tratados con glucosa ..... 54
  - Efecto de la glucosa sobre la estabilidad de la fracción sedimentable en eritrocitos ..... 58
  - Estructura de la fracción sedimentable de eritrocitos humanos ..... 60
  - Interacción entre tubulina y espectrina ..... 62
  - Diferenciación de células troncales hacia linaje eritroide ..... 65
  - Seguimiento cronológico de tubulina el linaje eritroide ..... 69
- Discusión y Conclusiones ..... 73
- Referencias bibliográficas ..... 79





Ac-tub	Tubulina Acetilada
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AGE	Productos de Glicosilación Avanzada
ATP	Adenosina Trifosfato
Baso-EB	Eritroblastos Basófilos
BFU-E	Unidad Formadora de Brote Eritroide
CFU-E	Unidad Formadora de Colonias Eritroides
CMP	Progenitores Mieloides Comunes
DAG	Diaciglicerol
DE	Diámetro eritrocitario
DM	Diabetes Mellitus
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EMI	Índice de Morfología Eritrocitaria
FPLC	Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas
EPO	Eritropoyetina
Glu-tub	Tubulina Detirosinada
GR	Glóbulos Rojos
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDAC6	Histona Deacetilasa Tipo 6
CPHs	Células Progenitoras Eritropoyéticas
HTA	Hipertensión Arterial
IF	Intensidad de fluorescencia
MAPs	Proteínas Asociadas a Microtúbulos
MPTs	Modificaciones Post-Traduccionales
MTs	Microtúbulos
NKA	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa
Orto-EB	Eritroblastos Ortocromáticos
PBS	Buffer Fosfato Salino
CPC	Carboxipeptidasas Citosólicas
PMCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de membrana plasmática
PMSF	Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro
Poli-EB	Eritroblasto Policromatófilo
Pro-EB	Eritroblasto Proeritroblasto
Retic	Reticulocitos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SIRT2	Sirtuina 2
SM	Síndrome Metabólico
STZ	Estreptozotocina
TBS	Buffer Tris Salino
TSA	Tricostatina A
TTL	Tubulina Tirosina Ligasa
Tyr	Tirosina
Tyr-tub	Tubulina Tirosinada





## **RESUMEN**

## RESUMEN

Nuestro grupo de investigación ha comprobado que si bien la tubulina no es una proteína mayoritaria dentro de los glóbulos rojos, cumple un importante papel estructural y regulador de determinadas enzimas (Amaiden y col., 2011; Monesterolo y col., 2012; Rivelli y col., 2012). En eritrocitos humanos esta proteína se distribuye en tres fracciones definibles operacionalmente, una fracción citosólica, una estructura capaz de sedimentar a 100 000 x g y una fracción asociada a la membrana plasmática.

En el presente trabajo se demuestra que el tratamiento *in vitro* de eritrocitos humanos con altas concentraciones de glucosa, como así también la inducción de hiperglucemia por administración intraperitoneal de glucosa en ratas Wistar, estimulan la traslocación de tubulina desde la fracción sedimentable hacia la membrana plasmática. El mismo efecto se observa en eritrocitos humanos de individuos diabéticos y de ratas Wistar con diabetes inducida por el tratamiento con estreptozotocina. Además, se demuestra que la exposición de los eritrocitos a altas concentraciones de glucosa produce hiperacetilación de tubulina, la cual podría ser consecuencia de la inhibición de la actividad de enzimas deacetilasas.

El incremento de tubulina en la fracción de membrana de los eritrocitos estaría implicado en la determinación de características reológicas de dichas células, ya que nuestros resultados confirman que el aumento en el contenido de tubulina asociada a la membrana, se correlaciona con la disminución de la deformabilidad y el aumento de la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos.

Los análisis de microscopía electrónica de la fracción sedimentable de eritrocitos humanos sugieren que esta fracción tendría una estructura similar a una red capaz de polimerizar y despolimerizar. Debido a que en este trabajo se demostró la interacción entre tubulina y espectrina, un componente del citoesqueleto de membrana de los eritrocitos, es probable que la fracción sedimentable de tubulina se encuentre subyacente a este y que exista una comunicación entre estas dos estructuras. Los análisis bioquímicos, revelaron además, que la tubulina es parte de una macroestructura con características similares a los microtúbulos, cuyo dinamismo es incrementado por glucosa.

Finalmente, a través del análisis de la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, se confirmó que la fracción sedimentable se origina de la reorganización de tubulina que pasa de conformar una abundante red microtubular, en las células precursoras, a una localización citosólica en los reticulocitos producidos luego de la enucleación.

## ABSTRACT

Our research group has found that although tubulin is not a major protein in red blood cells, it plays an important structural and regulatory role of certain enzymes (Amaiden et al., 2011; Monesterolo et al., 2012; Rivelli et al.; 2012). This protein in human erythrocytes is distributed in three fractions operationally definable, a cytosolic fraction, a structure capable of precipitating at 100 000 x g and a fraction associated with the plasma membrane.

The present work demonstrates that the *in vitro* treatment of human erythrocytes with high concentrations of glucose, as well as induction of hyperglycemia by intraperitoneal glucose administration in Wistar rats, stimulate the translocation of tubulin from sedimentable toward the plasma membrane fraction. The same effect is observed in human erythrocytes from diabetic individuals and in Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes. Furthermore, it is demonstrated that exposure of erythrocytes to high concentrations of glucose produces tubulin hyperacetylation, which could occur by inhibition of enzymes deacetylase activity.

Increasing tubulin in the membrane fraction of red cells would be involved in the determination of rheological characteristics of these cells, since that our results confirm that membrane tubulin increases correlates with decreased deformability and increased osmotic fragility of red blood cells.

The electron microscopy analysis of the sedimentable fraction of human erythrocytes suggest that this structure would be a net-like structure able to polymerize and depolymerize structure. Due to the interaction between tubulin and spectrin have been demonstrated, we hypothesize that the cytoskeleton of the red blood cell membrane and sedimentable fraction of tubulin are connected. Biochemical analyzes also revealed that tubulin is part of a macrostructure with similar characteristics to microtubules, whose dinamism is enhanced by glucose.

Finally, by analyzing the differentiation of hematopoietic progenitor cells, it was confirmed that the sedimentable fraction originates from the rearrangement of tubulin, which form an abundant microtubule network in the precursor cells but when reticulocytes are originates after enucleation it is located in cytosol.



# **INTRODUCCIÓN**

---

● **GENERALIDADES E HIPÓTESIS**

---

Durante muchos años se pensó que los eritrocitos humanos representaban restos de células inertes a los estímulos y que su composición proteica era simplemente un vestigio de sus células precursoras (Voet y col., 2007). Por este motivo, el conocimiento sobre los glóbulos rojos y su composición intracelular se mantuvo relegado por muchos años. Sin embargo en las últimas décadas numerosos estudios han demostrado que los eritrocitos son más complejos de lo que se pensaba y sumamente sensibles a su entorno (Foller y col., 2010; Ferru y col., 2011; Meibalan y col., 2015; Pagano y col. 2015).

En los estadios terminales del proceso de diferenciación de los precursores nucleados de los eritrocitos, los eritroblastos, el núcleo es extruído de la célula para producir reticulocitos que luego dan origen a los eritrocitos maduros anucleados. Debido a la carencia de núcleo todas las proteínas presentes en los eritrocitos provienen de su célula progenitora, sin embargo los microtúbulos (MTs) parecerían perderse con el núcleo durante el proceso de diferenciación (Koury y col., 1989). Los primeros estudios de microscopía electrónica en eritrocitos humanos demostraron la ausencia de MTs (Van Deurs y Behnke, 1973), con lo cual hasta la actualidad no se conoce sobre la existencia de un citoesqueleto de tubulina en eritrocitos. Sin embargo, los reportes proteómicos de Goodman y col. (2007, 2013) demuestran que estas células contienen los isotipos de tubulina  $\beta$ -1,  $\alpha$ -6 y  $\alpha$ -3. En concordancia, antecedentes previos de nuestro laboratorio demuestran mediante técnicas de inmunoblot e inmunofluorescencia la presencia de esta proteína y revelan que si bien la tubulina no es una proteína mayoritaria dentro de los glóbulos rojos, tendría un importante papel estructural y regulatorio ya que estaría involucrada en la regulación de la actividad de enzimas importantes como la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa (NKA) (Amaiden y col., 2011) y la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) (Monesterolo y col., 2012).

En eritrocitos humanos y de rata, la tubulina se distribuye en tres fracciones determinadas operacionalmente, una fracción citosólica (dímeros), una segunda fracción de tubulina asociada a la membrana plasmática y una fracción denominada “fracción sedimentable de tubulina” que corresponde a una estructura de tubulina capaz de sedimentar a  $100\ 000 \times g$  con características bioquímicas similares a la de microtúbulos de otros tipos celulares (Amaiden y col., 2011). La distribución de tubulina en estas fracciones no es

estática sino que se ha demostrado que puede verse afectada por diferentes estímulos (Monesterolo y col., 2015), además las proporciones de tubulina en cada fracción se encuentra alterada en diferentes patologías, como la hipertensión (Amaiden y col., 2012) y la diabetes (Rivelli y col., 2012).

En la actualidad la hipertensión y la diabetes se han incorporado dentro de los denominados síndromes metabólicos (SM). Se trata de un cuadro clínico especial en el que aumentan las probabilidades de un individuo de padecer una enfermedad cardiovascular. Esta situación involucra a cuatro enfermedades particulares que comparten determinadas características, la diabetes mellitus (DM), la hipertensión (HTA), la dislipemia y la obesidad centralizada. Conjuntamente, se han asociado a estas afecciones importantes alteraciones morfológicas de los eritrocitos que modifican las propiedades reológicas de la sangre de los pacientes que las padecen (Gyawali y col., 2012). La DM, por ejemplo, causa numerosas anomalías vasculares y hemorreológicas que determinan un alto riesgo de daños micro y macrovasculares (Berndt-Zipfel y col., 2013), se han encontrado además en eritrocitos de individuos con DM, alteraciones en propiedades fundamentales como la deformabilidad (Saito y col., 2012), el nivel de estrés oxidativo (Bandeira y col., 2012) o la resistencia al estrés osmótico (Suhail y col., 2010).

Sobre la base de estos antecedentes nosotros proponemos como hipótesis de trabajo que en pacientes diabéticos podría ocurrir una redistribución de tubulina en las distintas fracciones subcelulares, afectando características esenciales de los eritrocitos. En apoyo a esta hipótesis resultados previos de nuestro laboratorio confirman que el incremento en el contenido de tubulina asociada a la membrana se correlaciona con una disminución de la deformabilidad tanto en eritrocitos humanos como de ratas (Amaiden y col., 2012). En este sentido, el estudio acerca de la función de tubulina en cada fracción subcelular genera grandes perspectivas ya que podría utilizarse como blanco para el tratamiento de alteraciones vasculares como las observadas en enfermedades como la diabetes avanzada y la hipertensión arterial.

---

- **ERITROCITOS**

---

- **ASPECTOS GENERALES**

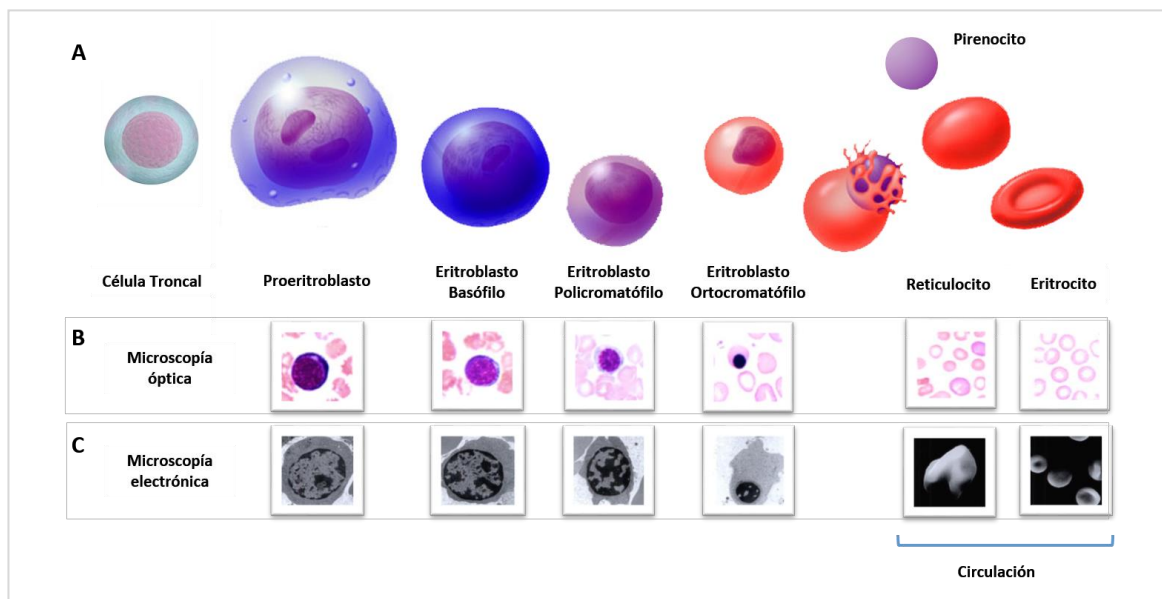
Los eritrocitos humanos son células con forma de disco bicóncavo de 2  $\mu\text{m}$  de espesor y aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  de diámetro, cuya función principal es el transporte de oxígeno. Esta función depende de numerosos factores que determinan la integridad de la membrana celular y la resistencia a la hemólisis. Los glóbulos rojos están compuestos aproximadamente por un 66 % de agua y un 33 % de hemoglobina, además de electrolitos en una concentración muy similar a la de las células musculares a excepción de su elevado contenido de cloruro. Estas células mantienen su composición iónica por mecanismos de transporte dependientes de ATP, siendo su principal fuente de energía la glucosa, que ingresa a las células por un mecanismo de transporte facilitado no dependiente de insulina (Fuentes y col., 1998).

Los eritrocitos maduros de mamífero carecen de núcleo y otras organelas, por lo cual son incapaces de sintetizar proteínas. Aunque no se conoce mucho sobre el envejecimiento de estas células, un factor asociado a este fenómeno es la pérdida de flexibilidad de la membrana, lo que gradualmente les impide circular por los capilares y sobre todo atravesar las paredes de los sinusoides esplénicos. Los eritrocitos circulantes tienen una vida media de unos 120 días pero su actividad metabólica comienza a disminuir a partir de los 100 días. Los eritrocitos envejecidos o alterados son degradados por los macrófagos del bazo y al fallar este órgano, esta función es llevada a cabo por las células de von Kupffer presentes en el hígado (Welsch y Sobotta, 2008).

- **ERITROPOYESIS**

Los eritrocitos se forman a partir de una célula madre pluripotencial que se va diferenciando hasta perder el núcleo y la capacidad de síntesis. El feto humano comienza a producir hemoproteínas y eritrocitos a partir de la sexta semana de gestación y por el resto de la vida, la médula ósea es el principal órgano de síntesis.

La eritropoyesis es un proceso complejo que determina la producción de eritrocitos, este proceso se encuentra regulado por la hormona eritropoyetina (EPO) que a su vez está gobernada por la cantidad de oxígeno que llega a los tejidos. La EPO es una hormona glicoproteica sintetizada en los riñones como respuesta a la hipoxia, actúa sobre las células madres pluripotenciales de la médula ósea uniéndose a un receptor específico para estimular la producción de eritrocitos, hemoglobina y numerosas proteínas de la membrana eritroide. Ciertas hormonas como los andrógenos, tiroxina o el cortisol también pueden provocar la síntesis de eritropoyetina (Fuentes y col., 1998).



**Figura 1: Proceso de eritropoyesis.** Tipos celulares involucrados en las etapas de maduración de la serie eritrocitaria. **A.** Esquema, **B.** Microfotografías ópticas y **C.** Microfotografías electrónicas (modificación de Carr y Rodak, 2010).

El proceso de eritropoyesis (Figura 1), comienza en la médula ósea por proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas (CPHs) o células troncales hematopoyéticas dando lugar a los progenitores mieloides comunes (CMP) y posteriormente a la unidad formadora de brotes eritroides (BFU-E). La diferenciación de BFU-E da origen a la unidad formadora de colonias eritroides (CFU-E), la cual es capaz de desarrollarse por incubación en cultivo originando proeritroblasto (Pro-EB) y posteriormente eritroblastos basófilos (Baso-EB). Una nueva etapa de diferenciación origina los eritroblastos policromatófilos (Poli-EB) que se caracterizan por una alta producción de hemoglobina y una disminución progresiva del tamaño celular. Las tasas relativas de la división celular y la síntesis de proteínas durante estas dos últimas etapas

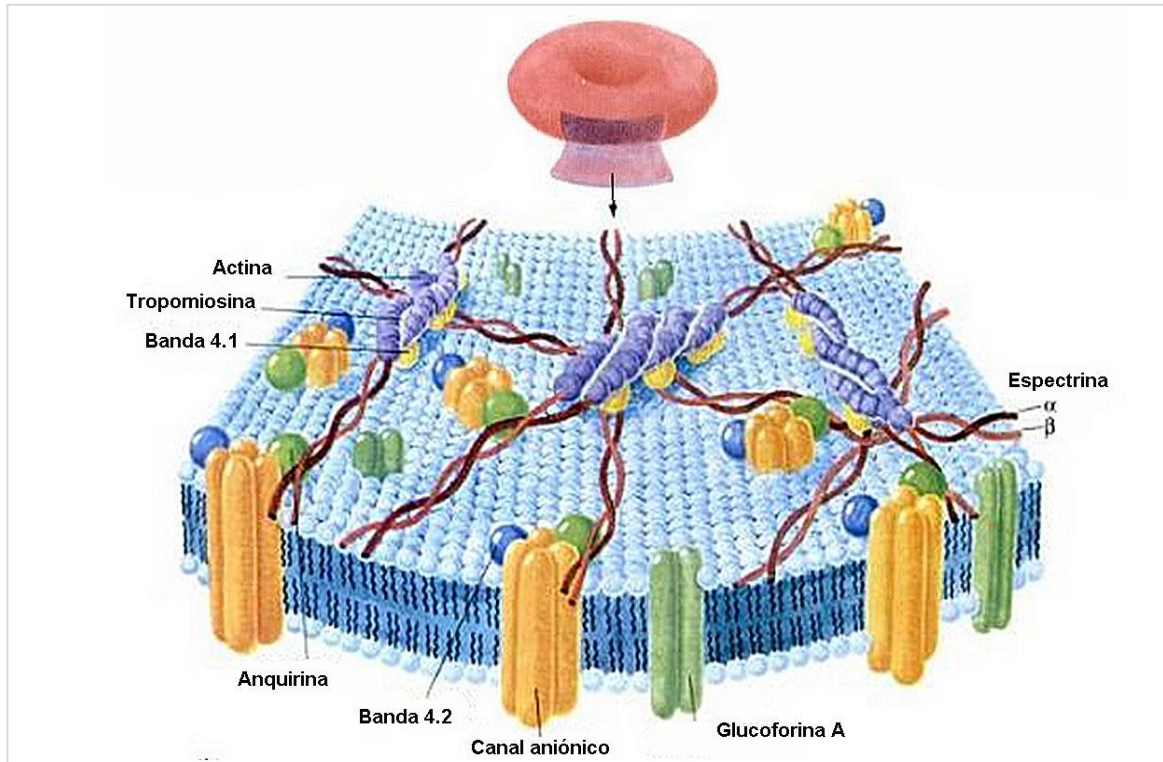


determinan el tamaño de los eritrocitos que se producirán. La siguiente etapa da origen a los eritroblastos ortocromáticos (Ortho-EB), los cuales se reconocen por su aspecto morfológico en tinciones de frotis de medula ósea. Finalmente, se produce la enucleación, proceso por el cual el núcleo es extruído y fagocitado rápidamente en la medula ósea. La enucleación da lugar a los reticulocitos (Retic) que ingresan al torrente sanguíneo a través de sinusoides venosos. Los reticulocitos circulantes maduran en uno o dos días al degradar y descargar sus orgánulos internos y por último adoptan la forma discoidal bicóncava característica de los glóbulos rojos (GR) (Koury y col., 2012). Junto al núcleo, los eritrocitos pierden sus organelas y la mayor parte del citoesqueleto presente en los precursores, en consecuencia todas las proteínas presentes en los eritrocitos provienen de sus progenitores (Koury y col., 1989).

#### ● MEMBRANA ERITROCITARIA

La integridad de los eritrocitos es preservada por las características de su membrana que, además de conferirle flexibilidad, también participa en el metabolismo de la glucosa y el hierro, en el recambio del bicarbonato y en el mantenimiento de la homeostasis celular.

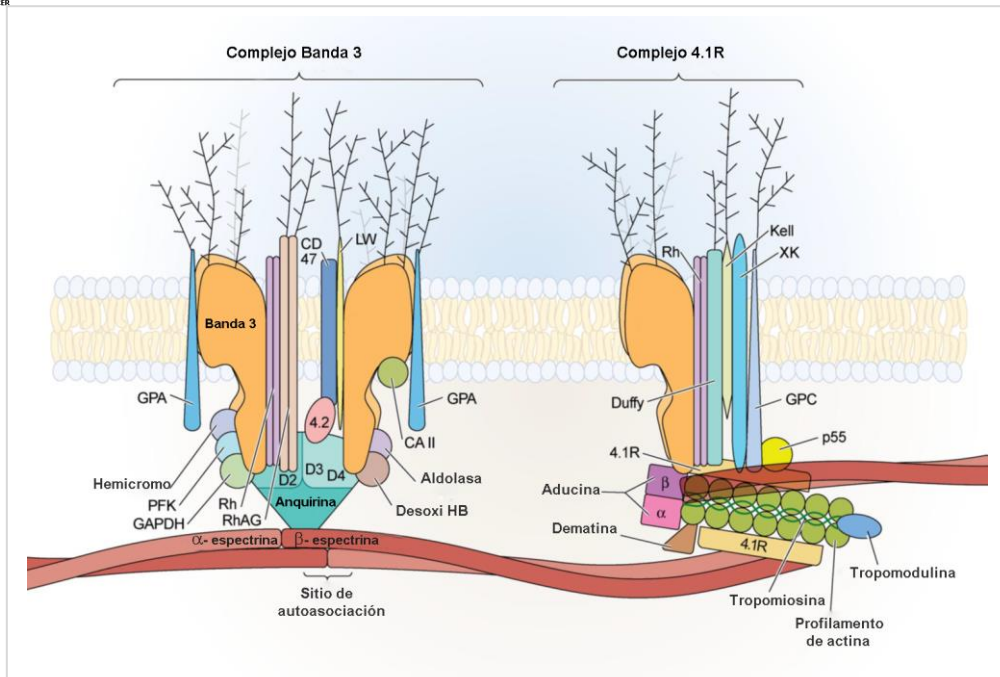
La membrana de los eritrocitos está formada por tres elementos esenciales que son desde el interior al exterior, un esqueleto proteico interno o citoesqueleto membranoso, una capa intermedia de proteínas y una doble capa externa de fosfolípidos y colesterol. Como se muestra en la figura 2, el esqueleto interno está formado por proteínas como espectrina, anquirina, proteína 4.1, 4.2, P55 y aducina. Los defectos en estas proteínas originan anemias hemolíticas. La capa intermedia de proteínas está incluida en la capa de lípidos, los cual representan el 60 % de la membrana y en condiciones fisiológicas se encuentran en estado líquido, los mismos se van perdiendo con el envejecimiento de la célula. Por último, la bicapa lipídica está compuesta por iguales cantidades de colesterol y fosfolípidos (Walensky y col., 2003). Mientras que el colesterol está distribuido en forma homogénea en las dos capas de la membrana, los fosfolípidos se disponen en forma asimétrica, fosfatidilcolina y esfingomiélin se localizan predominantemente en la monocapa externa mientras que fosfatidilietanolamina y fosfatidilserina junto con los fosfoinosítidos están ubicados del lado interno de la membrana (Verkleij y col., 1973; Zwaal y Schroit 1997).



**Figura 2: Membrana de los eritrocitos.** Esquema del esqueleto interno de la membrana de eritrocitos humanos (Voet y col., 2007).

● **CITOESQUELETO MEMBRANOSO**

La preservación de la integridad y flexibilidad de los glóbulos rojos se confiere a un conjunto intracelular complejo de proteínas conocidas como el citoesqueleto interno de la membrana. Éste, se encuentra constituido por interacciones específicas entre proteínas integrales de membrana, proteínas adaptadoras y espectrina (Ipsaro y col., 2010).



**Figura 3: Complejos multiproteicos que conforman el citoesqueleto interno de membrana de eritrocitos.** Modelo esquemático de los dos complejos proteicos principales de la membrana de glóbulos rojos. El panel izquierdo representa el complejo Banda 3 y el derecho el 4.1R (Salomao y col., 2008).

Como se puede observar en la figura 3, el esqueleto interno de membrana está acoplado a la bicapa lipídica a través de dos grandes complejos proteicos.

El primero, nucleado en la interacción entre espectrina, actina y 4.1R, está modulado por proteínas accesorias tales como las proteínas dematina, aducina, tropomiosina y tropomodulina (cuya función es estabilizar el complejo proteico), proteínas transmembrana tales como glicoforina C, intercambiador de aniones AE1 y proteínas adaptadoras como la proteína p55 y la proteína 4.2 (Machnicka y col., 2012).

El segundo complejo, se encuentra establecido por el nexo entre espectrina, anquirina y banda 3. A su vez, la banda 3 contiene un sitio de unión para anhidrasa II en su dominio citoplásmico C-terminal y de unión para enzimas glicolíticas, hemoglobina y proteína 4.2 en su dominio citoplásmico N-terminal (Salomao y col., 2008).

El complejo de Rh/RhAG-anquirina puede ser también un vínculo entre la membrana del glóbulo rojo y el esqueleto de espectrina. Por otro lado, la espectrina también interactúa directamente con fosfolípidos, tales como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. (Machnicka y col., 2012).

Como se mencionó anteriormente, la composición proteica de la membrana y de su citoesqueleto son factores determinantes de diferentes propiedades hemorreológicas tales como la deformabilidad y la fragilidad osmótica.

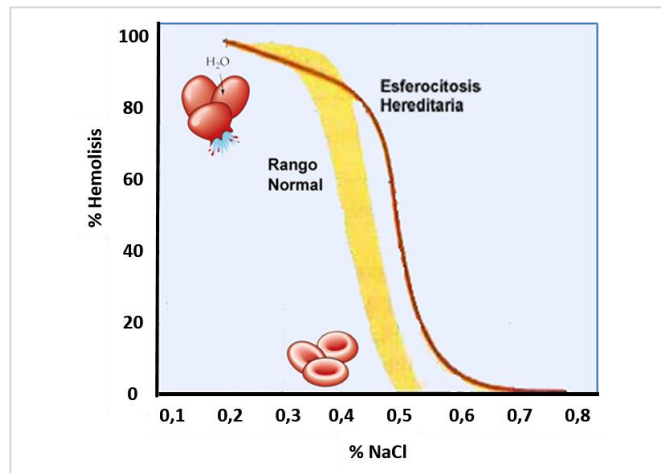
- **DEFORMABILIDAD**

Una característica única de los eritrocitos es su alta elasticidad que les permite responder rápidamente a las presiones aplicadas durante la circulación, por lo que la deformabilidad de la membrana de los eritrocitos resulta fundamental para su ordenamiento de acuerdo con las fuerzas tangenciales de deformación. Las células sin capacidad de deformabilidad presentan una mayor viscoelasticidad (propiedad dilatante) por lo que aumenta su resistencia al flujo (Best y Taylor, 2010). Los principales determinantes de la deformabilidad de estas células son su geometría (relación superficie/volumen), su viscosidad interna (función de la hemoglobina) y las propiedades viscoelásticas de su membrana celular afectadas por la concentración de ATP, hierro, calcio, composición lipídica y proteica (Cabrales, 2007; Wan y col., 2008; Brandão y col., 2009; Spengler y col., 2014).

- **FRAGILIDAD OSMÓTICA O RESISTENCIA GLOBULAR**

En ciertos estados patológicos los eritrocitos se lisan continua y aceleradamente. La esferocitosis hereditaria, dada por una deficiencia de  $\alpha$  espectrina, así como la mayoría de las anemias hemolíticas hereditarias (que implican mutaciones de las proteínas estructurales de la membrana), se asocian con un aumento de la fragilidad osmótica (Bogardus y col., 2014).

Para conocer la capacidad de resistencia de los GR al estrés osmótico se realiza la prueba de fragilidad osmótica que consiste en exponer a las células a diferentes soluciones salinas hipotónicas y determinar la liberación de hemoglobina espectrofotométricamente a temperatura ambiente. El fundamento del ensayo radica en que el eritrocito normal es capaz de resistir la afluencia de agua en una determinada medida. Como se observa en la figura 4, cuando las propiedades de la membrana de eritrocitos se ven afectadas por diversos factores, esta capacidad de resistir el estrés osmótico disminuye considerablemente, dado que la hemólisis es inversamente proporcional a la concentración de cloruro de sodio (Greer, 2009).



**Figura 4: Curva de resistencia globular.** Gráfico típico del aumento de fragilidad osmótica eritrocitaria de individuos con esferocitosis hereditaria en comparación a sanos (Imagen modificada de Greer, 2009).

● **METABOLISMO**

El metabolismo de los eritrocitos, en comparación a otras células, es limitado debido a la ausencia de núcleo, mitocondrias y otras organelas subcelulares. Aunque la unión, el transporte y la liberación de oxígeno y dióxido de carbono son procesos pasivos que no requieren energía, existe una variedad de procesos metabólicos dependientes de ella que son esenciales para la viabilidad de la célula. Entre estos últimos se destaca el mantenimiento de concentraciones altas de potasio y bajas de sodio en el interior del GR, concentraciones de calcio intracelular muy bajas (a través de la bomba de cationes), hemoglobina en forma oxidada, elevados niveles de glutatión reducido y la integridad de la membrana.

Las vías metabólicas más importantes para el eritrocito maduro necesitan glucosa como sustrato. De esta manera se llevan a cabo la glucólisis (o vía de Embden-Meyerhof), la vía de las pentosas fosfatos, la vía de la hemoglobina reductasa y el ciclo de Rapoport-Luebering (Rodak y col., 2005).

Mediante la *vía anaeróbica de Embden-Meyerhof (Glucolisis)* la glucosa se cataboliza a piruvato y lactato, mientras que el ADP es fosforilado a ATP. Esta vía proporciona ATP para la regulación de la concentración intracelular de cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) a través de bombas de cationes. Aproximadamente del 90 al 95 % del consumo celular de glucosa es metabolizado hacia esta vía (Best y Taylor, 2010).

El *ciclo de las pentosas* proporciona nicotinamida adenina dinucleótido fosfato y glutatión reducido para reducir oxidantes celulares. Aproximadamente el 5 % de la glucosa

celular ingresa a la vía oxidativa de las pentosas, un sistema auxiliar para producir coenzimas reducidas. El glutatión reducido protege a la célula contra muchas lesiones producidas por agentes oxidantes permanentes, ya que éstos oxidan los grupos sulfhidrilo de la hemoglobina, por lo cual es necesario el glutatión reducido para lograr que los oxidantes sean neutralizados. Esta función es crucial para la integridad del eritrocito (Rodak y col., 2005).

La *vía de la hemoglobina reductasa* protege a la hemoglobina de la oxidación a través del NADH y la metahemoglobina reductasa. Se trata de una vía alterna a la vía Embden-Meyerhof, esencial para mantener el hierro del grupo hemo en el estado ferroso. Debido a que la metahemoglobina (hemoglobina con el hierro en estado férrico) no logra combinarse con el oxígeno, es fundamental su unión con el NADH producido por la vía Embden-Meyerhof, para proteger al hierro de la oxidación. Sin este sistema, los niveles de metahemoglobina diaria pasarían del 2 % a un 20-40 %, con lo que se limitaría gravemente la capacidad transportadora de oxígeno en la sangre.

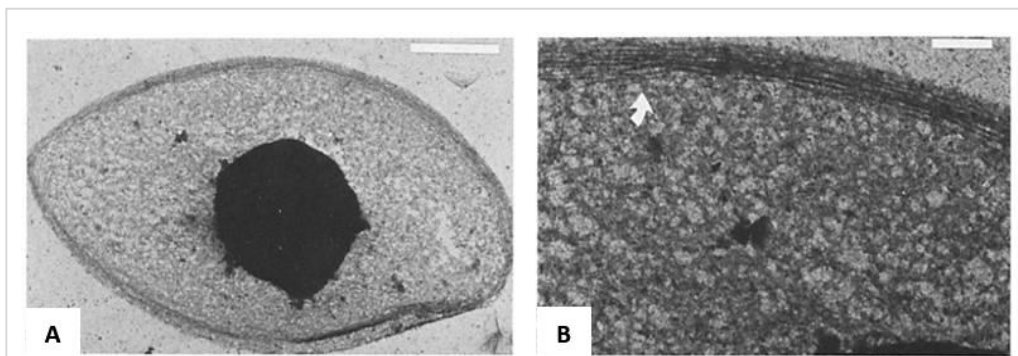
El *Ciclo de Rapoport-Luebering* es parte de la vía Embden-Meyerhof, y tiene por finalidad desviar la formación de 3-fosfoglicerato y ATP hacia la de 2,3-bifosfoglicerato (BPG), un regulador de la afinidad del oxígeno por la hemoglobina. El BPG está presente en el eritrocito en una concentración de un mol BPG/mol de hemoglobina, y se une con fuerza a la desoxihemoglobina, con lo que la hemoglobina se mantiene en estado desoxigenado y se facilita la liberación de oxígeno. El incremento en la concentración de BPG facilita la liberación de oxígeno a los tejidos mediante la disminución en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. De esta manera, el eritrocito cuenta con un mecanismo interno para la regulación del aporte de oxígeno a los tejidos (Rodak y col., 2005).

- **CITOESQUELETO ERITROIDE**

La capacidad de las células eucariotas de adoptar una diversidad de formas, organizar sus componentes intracelulares e interactuar mecánicamente con el ambiente depende de su citoesqueleto, una red proteica de filamentos formada por: filamentos intermedios, filamentos de actina y microtúbulos (MTs) (Bruce y col., 2008). El patrón de distribución de los microtúbulos en una célula es un aspecto fundamental para el mantenimiento de la

polaridad y la morfología celular. Aunque la mayoría de los MTs tienen esencialmente la misma ultraestructura, compuesta por  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina altamente conservadas, sus patrones celulares son diversos, la forma, número y ubicación de los MTs varían dramáticamente entre las células e incluso dentro de una misma célula a lo largo de su ciclo celular (Song y Brady, 2014).

Se ha reportado que en las especies avícolas, el citoesqueleto de los eritrocitos maduros está compuesto principalmente por una estructura de MTs altamente especializada que difiere en gran medida de la red microtubular intracelular presente en células como los fibroblastos (Linhartova y col., 2002), ya que este citoesqueleto está compuesto por un anillo de MTs denominado "Banda marginal" (Figura 5). Esta estructura consiste en un haz de MTs estables que abarcan la circunferencia intracelular de la célula, situado directamente debajo de la membrana plasmática, en el plano ecuatorial. Durante la eritropoyesis, la formación de la banda marginal y su interacción con el esqueleto de la membrana provocan el cambio morfológico que le confiere al eritrocito maduro su forma aplanada característica (Infante y col., 2007).

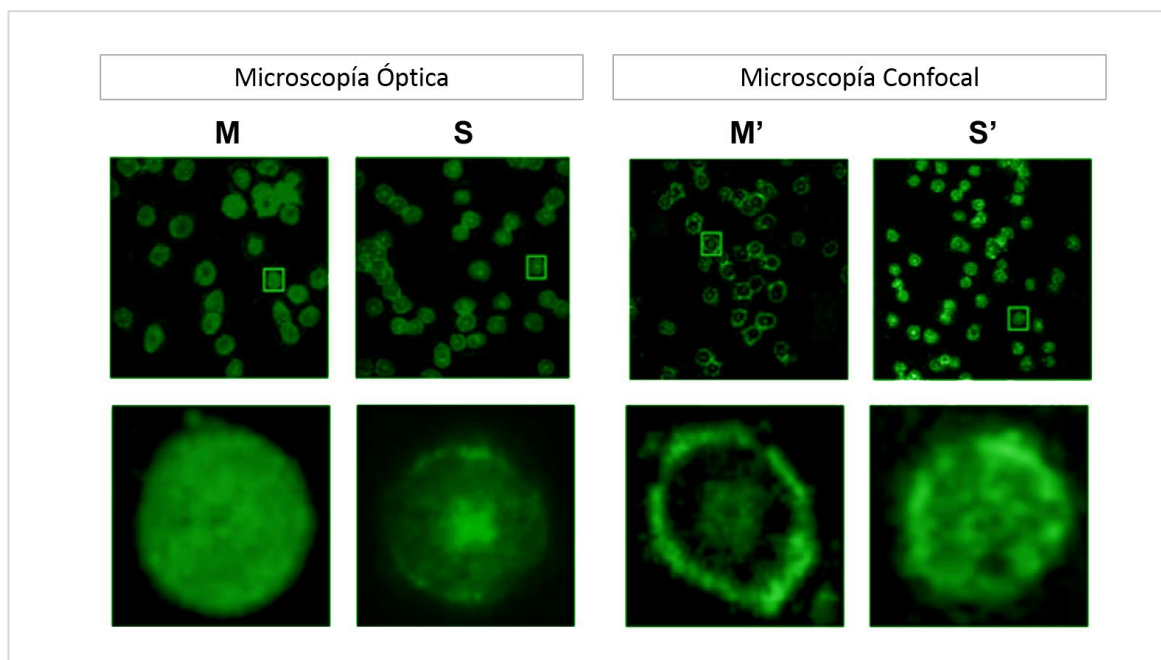


**Figura 5: Citoesqueleto de eritrocitos de ave.** Microscopía electrónica de eritrocitos de ave. **A.** Fotografía 7000x de eritrocito completo. **B.** Microfotografía ampliada 2,9 veces de la banda marginal constituida por un haz de microtúbulos (Flecha blanca) (Swan y Solomon, 1984).

En las últimas etapas de la eritropoyesis de los eritrocitos de mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en anfibios, reptiles y aves, los eritroblastos pierden su núcleo para producir reticulocitos que luego dan origen a los eritrocitos maduros anucleados. Los MTs parecerían perderse con el núcleo durante el proceso de diferenciación (Koury y col., 1989). Debido a esto, como se mencionó anteriormente durante mucho tiempo se ha negado la existencia de tubulina y MTs en eritrocitos de mamíferos (Van Deurs y Behnke, 1973; Bennett, 1985; Liao y col., 2000; Liu y col., 2010 y 2011), sin embargo los estudios de Goodman y col. (2007; 2013) y de nuestro laboratorio ponen en evidencia la presencia, distribución y posible

papel de la tubulina en estas células. Amaiden y col. (2011) describieron la existencia de las tres fracciones operacionalmente distinguibles, mencionadas anteriormente:

1. Una población de tubulina asociada a la membrana plasmática que se observa utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta, como una fluorescencia uniformemente distribuida en la superficie del GR (Figura 6M), mientras que por microscopía confocal la fluorescencia correspondiente a esta fracción se observa como un anillo en la periferia de la célula y un botón central (Figura 6M').
2. Una población polimerizada que conforma una macroestructura subcelular capaz de sedimentar a 100 000 x g, cuyo patrón típico de fluorescencia por inmunofluorescencia indirecta corresponde a un anillo bien marcado en la periferia celular, similar a la banda marginal, y un fondo esfumado (Figura 6S), mientras que por microscopía confocal se observa el anillo alrededor de la membrana pero también puntos bien marcados sobre un fondo más tenue (Figura 6S').
3. Una población de dímeros citosólicos no observable por microscopia de fluorescencia.



**Figura 6: Distribución de tubulina en eritrocitos humanos.** El panel izquierdo muestra microfotografías obtenidas por microscopía óptica mientras que el derecho por microscopía confocal: **M** y **M'**. Fracción de tubulina asociada a la membrana. **S** y **S'**. Fracción de tubulina sedimentable (Adaptado de Amaiden y col., 2011).



En la figura 6 se muestra el patrón típico de fluorescencia de tubulina en la fracción sedimentable y en la fracción de membrana de eritrocitos humanos, observadas por inmunofluorescencia indirecta. Adicionalmente, en nuestro laboratorio se han desarrollado los protocolos específicos para el aislamiento de cada una de las poblaciones nombradas y su análisis por inmunoblot.

---

- **TUBULINA**

---

- **ASPECTOS GENERALES**

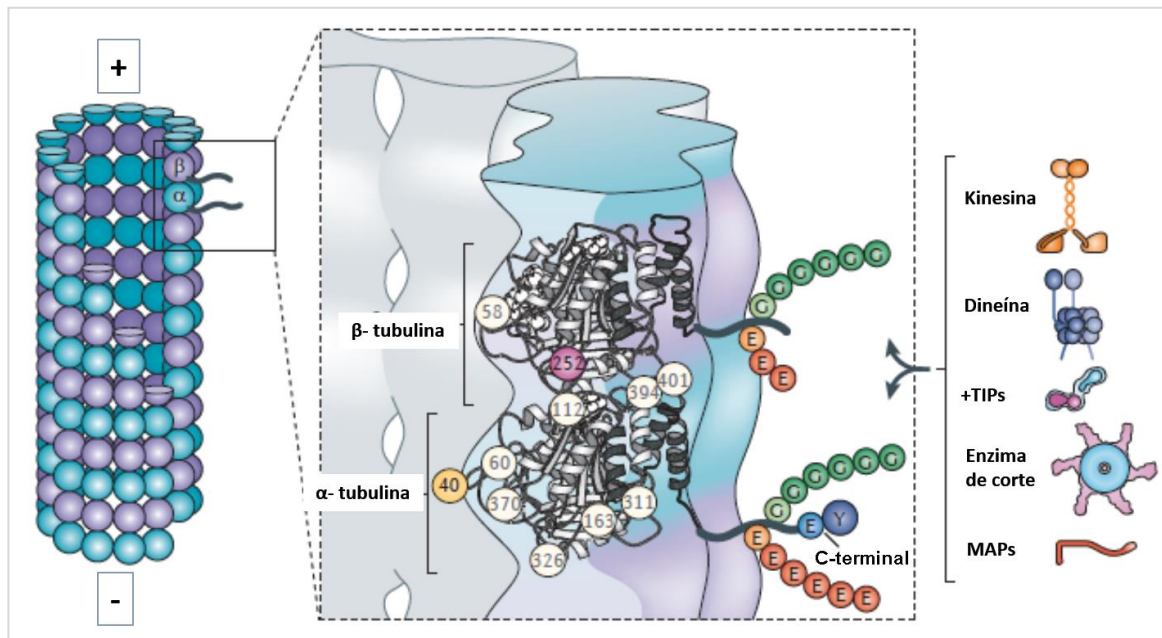
La tubulina es el componente principal de los MTs, se trata de una proteína de 55 kDa, cuya secuencia se encuentra altamente conservada en todos los organismos eucariotas. El dímero de tubulina está compuesto por un monómero alfa ( $\alpha$ ) y uno beta ( $\beta$ ), cada uno de ellos contiene alrededor de 450 aminoácidos y un nucleótido de guanina. Ambos monómeros comparten aproximadamente el 40 % de identidad en sus secuencias y sus estructuras tridimensionales son muy similares. La estructura de cada uno se puede dividir en tres dominios, el N-terminal, el intermedio y el dominio C-terminal, éste último dominio parece estar implicado en la unión de proteínas asociadas a MTs (MAPs) y proteínas motoras (Janke y Bulinski, 2011).

Como se puede observar en la figura 7, los dímeros de tubulina interaccionan de una manera “cabeza” con “cola” para formar protofilamentos rectos que se asocian entre sí de forma paralela, para formar la pared cilíndrica de los MTs (Müller y col., 2008). Estos polímeros proteicos cilíndricos de 25 nm de diámetro y longitud variable, presentan una polaridad determinada por las diferencias de sus extremos. En cada MT existe un “extremo más o plus” (compuesto por  $\beta$  tubulina) y un “extremo menos o minus” (compuesto por  $\alpha$  tubulina), esta direccionalidad es un factor decisivo que define la dirección del transporte intracelular en los MTs. Estos polímeros son estructuras dinámicas que pueden crecer en ambos extremos, sin embargo el extremo “más” lo hace cuatro veces más rápido que el extremo “menos” debido a su microambiente que presenta una conformación favorable para la polimerización. Del mismo modo se diferencian las velocidades de despolimerización.

El motor del dinamismo de los MTs es la molécula de guanosina trifosfato (GTP), dado que para que se produzca la polimerización es necesario que ambos monómeros de tubulina

se unan a una molécula de GTP cada uno, sin embargo la  $\beta$ -tubulina hidroliza el GTP unido a GDP y Pi ya que tiene actividad GTPasa, con lo cual se produce un cambio de conformación que disminuye la afinidad por GDP- $\beta$ -tubulina para las moléculas vecinas. Puesto que en el extremo “más”, la instalación de GTP-tubulina es más rápida que la hidrólisis de GTP, se origina un “capuchon” de GTP-tubulina que actúa como protección impidiendo su disociación (Müller y col., 2008).

Los MTs cumplen dentro de las células múltiples funciones determinando la organización interna, la forma, la movilidad y el ciclo de las células eucariotas. Por otro lado, en la mayoría de las células, la red microtubular está involucrada en el transporte intracelular, el posicionamiento y movilidad de las organelas y la formación del huso mitótico, esencial durante el proceso de división celular (Janke y Bulinski, 2011).



**Figura 7: Esquema de la estructura de un microtúbulo.** En el esquema se muestran los componentes principales de un microtúbulo, dímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y protofilamentos. Se señalan además los extremos más (+) y menos (-), modificaciones postraduccionales del extremo C-terminal y las principales proteínas de unión a microtúbulos: kinesina, dineína, +TIPs (proteínas marcadoras de extremo positivo), enzimas de corte y MAPs (proteínas asociadas a MTs) (Janke y Bulinski, 2011).

● **MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES**

Muchas, si no todas, las funciones de los MTs están mediadas por un conjunto muy complejo y diverso de proteínas tales como las MAPs y las proteínas motoras de MTs que interactúan con ellos (Wilson y Borisy, 1997). Esta interacción ocurre principalmente con

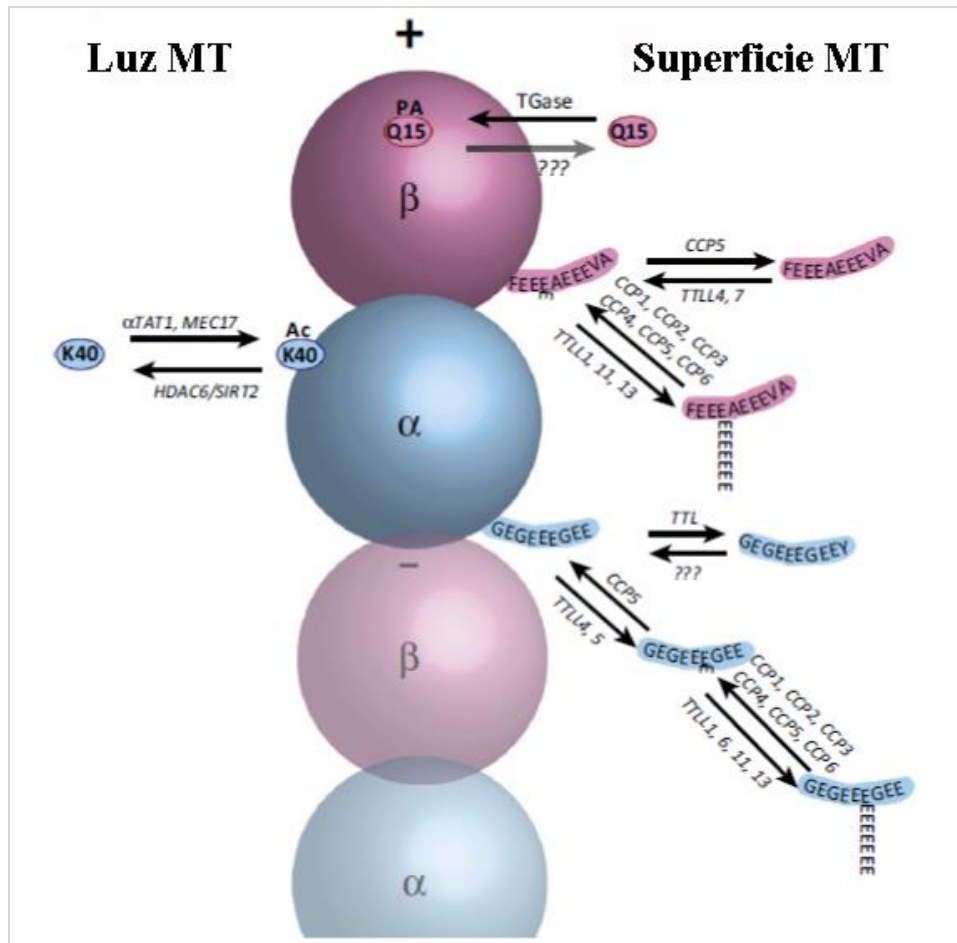
el extremo C-terminal de la tubulina, en este sitio además se llevan a cabo ciertas modificaciones pos-traduccionales (MPTs) tales como: tirosinación/detirosinación, modificación  $\Delta 2$ , poliglutamilación y poliglicilación. De esta manera, la secuencia variable de la región C-terminal puede dar lugar a diferentes isoformas específicas. Existen además otras MPTs tales como acetilación, fosforilación y palmitoilación que ocurren en otros sitios de tubulina diferentes al extremo C-terminal (Hammond y col., 2008).

Estas modificaciones emergen como controladores de propiedades y funciones cruciales de los MTs y se sugiere que podrían generar las diferencias químicas necesarias para conferir funciones específica a los MTs (Westermann y Weber, 2003; Verhey y Gaertig, 2007; Janke y Kneussel, 2010).

La diversidad de los isotipos de tubulina puede permitir la optimización de las funciones de los MTs. El rol e implicancia de las MPTs es de hecho intrigante, especialmente debido a la gran variabilidad de modificaciones y sitios donde pueden presentarse. En la figura 8 se muestran algunas de las MPTs de tubulina que han sido reportadas: tirosinación, detirosinación, generación de  $\Delta 2$ -tubulina, poliglutamilación, poliglicilación y acetilación (Janke y Bulinski, 2011).

Las MPTs intervienen en la determinación de funciones y propiedades de los microtúbulos. De hecho, muchas de ellas se encuentran al mismo tiempo sobre un mismo MT, dando lugar a una considerable diversidad de MTs, que a su vez varía con el desarrollo, la diferenciación, compartimento celular y el ciclo celular. Actualmente se sabe las MPTs de tubulina afectan, no sólo la dinámica de los MTs, sino también su organización y su interacción con otros componentes celulares (Song y Brady, 2014).

Se detallan a continuación la acetilación, detirosinación y tirosinación, debido a que estas MPTs fueron sujeto de estudio en el presente trabajo:



**Figura 8:** Modificaciones post-traduccionales de tubulina y enzimas involucradas. La **acetilación** (Ac) se encuentra principalmente en K (lisina) 40 de  $\alpha$ -tubulina, que se expone en el lumen del MTs.  $\alpha$ TAT1 y Mec17 son las principales enzimas responsables de esta MPT, mientras que HDAC6 y SIRT2 son las implicadas en la desacetilación. El extremo C-terminal de  $\alpha$ -tubulina es un punto caliente para las MPTs, entre ellas la **tirosinación** es producida por la tubulina tirosina ligasa (TTL), pero la enzima que cataliza la detirosinación no se ha identificado. Por el contrario, múltiples enzimas son capaces de eliminar el residuo glutamato y dar lugar a  $\Delta 2$ -tubulina, incluyendo seis carboxipeptidasas citoplasmáticas (CCP1-6), estas mismas enzimas también pueden recortar la longitud de la cadena poliglutamilada, sin embargo sólo una enzima ha sido reconocida para eliminar el iso-péptido final ligado al glutamato (PCC5). La **detirosinación** se limita a  $\alpha$ -tubulina, pero la **glutamilación** y la **poliglutamilación** también pueden ocurrir en diversos glutamatos del dominio C-terminal de  $\beta$ -tubulina. Múltiples enzimas son capaces de añadir el iso-péptido para iniciar la poliglutamilación (TLL4, 5, 7). Por último, la **poliaminación** (PA) está mediada por transglutaminasas, particularmente transglutaminasa 2 (TG2). Un sitio putativo para esta MPT es Q15 (Glutamina) conservada en  $\beta$ -tubulina, sin embargo varios sitios puede ser sujetos de esta modificación (Song y Brady, 2014).

**Tirosinación/detirosinación de  $\alpha$ -tubulina:** En 1975 se observó por primera vez la adición enzimática de tirosina (Tyr) en  $\alpha$ -tubulina (Arce y col., 1975), poco después, se demostró la reversibilidad del proceso (Hallak y col., 1977). El ciclo de tirosinación/detirosinación es iniciado por la eliminación del aminoácido Tyr del extremo

C-terminal de tubulina (detirosinación), dicha reacción es catalizada por la acción de una Tubulina Tirosina Carboxi-Peptidasa (TTCP) cuya naturaleza aún se desconoce, sin embargo se estima que esta proteína es parte de una familia de carboxipeptidasas citosólicas (CPC) (Rodríguez de la Vega, 2007). La acción de TTCP genera tubulina detirosinada o Glu-tubulina, debido a que luego de la detirosinación, queda expuesto en el extremo C-terminal un residuo de ácido glutámico (Glu). Una segunda modificación postraduccional, catalizada por la enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL) permite la reincorporación de Tyr (tirosinación) permitiendo que la tubulina vuelva a su estado original.

Las enzimas que participan en la detirosinación actúan sobre MTs polimerizados, mientras que la TTL afecta casi exclusivamente a los dímeros de tubulina solubles. De esta manera, en la célula, los MTs más recientemente polimerizados poseen un alto contenido de tubulina tirosinada. Por otro lado, la Glu-tubulina incrementa en los MTs de larga vida en muchos tipos de células, con lo cual, esta modificación se suele asociar a MTs estables. Sin embargo, la tubulina detirosinada no provoca mayor estabilidad per se, sino que KIF2C y KIF2A despolimerizan preferentemente MTs altamente tirosinados, por lo cual aquellos con alto grado de tubulina detirosinada permanecen polimerizados (Janke y Bulinski, 2011).

Para analizar directamente la función del ciclo de tirosinación, los genes que codifican para la TTL han sido suprimidos en ratones. Los ratones carentes de TTL nacen sin malformaciones aparentes, pero mueren dentro del primer día de nacimiento, demostrando que la enzima es necesaria en cierta etapa del desarrollo de algunos tipos de células neurales (Erck y col., 2005). Por otra parte, estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran que la tubulina detirosinada se encuentra aumentada en la membrana de eritrocitos de individuos hipertensos y que este factor incrementa el efecto inhibitorio sobre la actividad de NKA. Adicionalmente demostramos un menor contenido y actividad de la enzima tubulina tirosina ligasa en los eritrocitos de sujetos hipertensos, alteraciones que están relacionadas con la reducción de la deformabilidad eritrocitaria. Nuestros hallazgos indican que el ciclo de detirosinación/tirosinación de tubulina es importante en la regulación de la actividad NKA, y que las anomalías en este ciclo participan en el desarrollo de la hipertensión. (Amaldoss y col., 2015).

La TTCP no solo actúa sobre tubulina tirosinada sino que también la tubulina detirosinada es sustrato de esta enzima, generando un nuevo isotipo de tubulina, la  $\Delta 2$ -tubulina, la cual constituye una fracción considerable de tubulina de cerebro. La  $\Delta 2$ -tubulina no es sustrato para la TTL con lo cual escapa del ciclo de tirosinación (Rudiger y col., 1994). En cultivo de células de mamíferos, la aparición de  $\Delta 2$ -tubulina puede ser usada para

detectar líneas celulares que tienen baja actividad TTL. Aunque estas células tienen un citoesqueleto microtubular normal, cuando son inyectadas en ratones desnudos producen un aumento de tumores, poniendo en evidencia que durante la tumorigénesis la actividad TTL se pierde. De hecho, en la mayoría de las células de cáncer de mama que han sido investigadas, la actividad TTL está disminuida y como consecuencia el nivel de detirosinación en estas células es elevado (Mialhe y col., 2001).

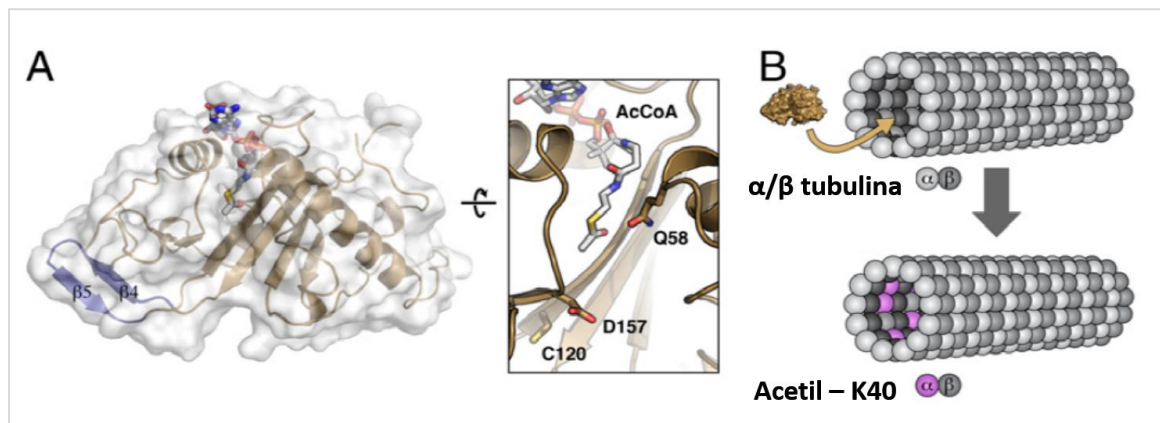
**Acetilación/deacetilación de  $\alpha$ -tubulina:** La acetilación del residuo Lisina 40 (Lys40), cercano al extremo N-terminal de  $\alpha$ -tubulina, tienen lugar en los MTs polimerizados, similar a lo observado para la detirosinación. Recientemente, se informó que el residuo Lisina 252 de  $\beta$ -tubulina también es sustrato de acetilación, pero en este caso la modificación tendría lugar preferentemente sobre tubulina no polimerizada (Chu y col., 2011). El contenido de tubulina acetilada (Ac-tub) en la célula depende del equilibrio entre dos tipos de enzimas, la tubulina deacetilasa y la tubulina acetiltransferasa.

Aunque varias enzimas pueden acetilar tubulina, incluyendo ELP3, ARD1-NAT1 y GCN5 (Perdiz y col., 2011), las principales acetilasas de tubulina son  $\alpha$ TAT1 (Figura 9) y Mec17 (Akella y col., 2010), dado que la supresión de la actividad de estas enzimas, elimina efectivamente los MTs acetilados en varios modelos. La regulación y la especificidad de sustrato de  $\alpha$ TAT1 es poco conocido (Song y Brady, 2014).

Por otro lado, se han descrito dos enzimas deacetilasas: histona deacetilasa 6 (HDAC6) y sirtuina 2 (SIRT2). La HDAC6 es un miembro citoplasmático de la familia histona deacetilasa y co-localiza con MTs. Esta enzima puede deacetilar tubulina y MTs *in vitro* y la supresión de la función de HDAC6 por inhibidores farmacológicos o pequeños ARN de interferencia (siARN) *in vivo* conduce a un marcado aumento en la acetilación de la tubulina. La segunda histona deacetilasa, SIRT 2, co-inmunoprecipita con la HDAC6 en extractos celulares, lo cual indica la posibilidad de que estas enzimas cooperen para deacetilar tubulina *in vivo* (Westermann y Weber, 2003; Hammond y col., 2008).

A pesar de que la acetilación es una de las principales MPTs de la tubulina, hay poco consenso sobre las funciones de la tubulina acetilada. En general, se la ha asociado a la estabilidad microtubular, ya que se da mayormente en MTs longevos, mientras que los dímeros de tubulina solubles son deacetilados rápidamente y MTs recién formados son deficientes en este isotipo. Aunque esta idea persiste, no se cuenta con pruebas directas que demuestren el efecto de la acetilación en la dinámica de MT. Sin embargo, se ha reportado en ratones sin expresión de  $\alpha$ TAT1 o en MTs acetilados, una mayor resistencia al nocodazol,

lo que sugiere una mayor estabilidad microtubular independiente del estado de acetilación (Kalebic y col., 2013). Por su parte Zilberman y col. (2009), informaron que la presencia de la proteína HDAC6 *per se* inhibe el crecimiento de los MTs, mientras que Sudo y Baas (2010) demostraron tanto en fibroblastos como en neuronas, que la acetilación induce la ruptura enzimática de los MTs mediada por Katanina, por lo cual se propone al estado de acetilación como una posible señal para la despolimerización. En contraste, Tran y col. (2007) informaron que la inhibición inducida por fármacos o el silenciado genético de HDAC6 disminuyeron significativamente la mayoría de los parámetros del dinamismo microtubular. En conclusión, existe mucha controversia con respecto a la función de la acetilación como estabilizadora de los MTs.



**Figura 9: Acetilación de tubulina y enzimas involucradas.** **A.** Descripción general de la estructura de  $\alpha$ TAT humana. Ampliación del sitio activo de la enzima, incluyendo el cofactor AcCoA y algunos residuos catalíticos propuestos Q58 (glutamina), C120 (cisteína) y D157 (ácido aspártico) en la interacción. **B.** Ubicación de  $\alpha$ TAT (marrón) y K40 (lisina)  $\alpha$ -tubulina en el lumen del MT (Al-Bassam y Corbett, 2014).

● **PAPEL DE LA ACETILACIÓN DE TUBULINA EN LA REGULACIÓN ENZIMÁTICA**

En nuestro grupo de trabajo se demostró una importante función para la acetilación de tubulina como regulador de las actividades P-ATPasas, la acetilación de tubulina es esencial para que se forme el complejo tubulina/NKA que resulta en la inhibición de la actividad de la enzima (Casale y col., 2001; 2003; Santander y col., 2006). Esta interacción de la tubulina no es exclusiva con NKA sino que además se ha demostrado que la proteína interactúa con otros miembros de la familia de las P-ATPasas como lo son la PMCA y la H<sup>+</sup>-ATPasa (Campetelli y col., 2005; Monestrollo y col., 2008).

**Interacción con NKA.** Tanto en líneas celulares de origen neuronal como no neuronal, se encontró que la Ac-tub forma un complejo con la membrana plasmática a través de su asociación con la NKA, lo que resulta en la inhibición de dicha enzima (Casale y col., 2001; 2003; 2005). En células CAD, una línea celular de origen neuronal que se caracteriza por la ausencia de cantidades medibles de Ac-tub, no se observa la presencia de un complejo entre tubulina y NKA. Sin embargo, el tratamiento con inhibidores de HDAC6 tales como tricostatina A o tubacina, causa la aparición de la Ac-tub en las células, formación del complejo tubulina/NKA y la reducción de la actividad ATPasa de membrana, estos resultados indican que dicho isotipo es esencial para que la interacción ocurra (Santander y col., 2006). Zampar y col. (2009) demostraron que la interacción entre ambas proteínas es directa y se produce a través del dominio citoplasmático CD5 de la NKA, que la enzima es capaz de interactuar con MTs y posiblemente podría actuar como un sitio de anclaje de los MTs a la membrana plasmática.

La regulación de la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+$  es muy importante debido a que muchos procesos fisiológicos incluyendo la transmisión del impulso nervioso, respuesta nutritiva y bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$ , dependen del gradiente electroquímico que resulta de la actividad de la enzima (Arce y col., 2008). Recientemente en nuestro laboratorio se ha demostrado que el mecanismo de regulación de la NKA por tubulina también está presente en eritrocitos humanos y de rata y que alteraciones de dicho mecanismo tendrían implicancia en enfermedades tales como la diabetes y la hipertensión (Rivelli y col., 2012; Amaiden y col., 2011; 2012).

**Interacción con PMCA.** Nuestro grupo de trabajo, ha demostrado también que la PMCA interactúa con Ac-tub y que, en forma semejante a lo observado para la NKA, la formación del complejo inhibe la actividad enzimática (Monesterolo y col., 2008). Para este caso, se demostró además que los lípidos que rodean al complejo influyen sobre el efecto que causa la tubulina sobre la actividad de PMCA. Cuando la enzima purificada es reconstituida en lípidos ácidos la formación del complejo estimula la actividad enzimática, mientras que si la reconstitución se realiza en lípidos neutros el efecto que provoca tubulina es dependiente de su concentración (Monesterolo y col., 2012).

**Interacción con  $\text{H}^+$ -ATPasa.** Finalmente trabajos de nuestro laboratorio demuestran que la Ac-tub interactúa con un tercer miembro de la familia de las P-ATPasas, la  $\text{H}^+$ -ATPasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En forma semejante a lo observado para



NKA y PMCA, la asociación de la tubulina inhibe la actividad de la enzima. La incubación de las levaduras con glucosa provoca disminución del nivel de Ac-tub en la membrana plasmática, disociación del complejo y activación de la enzima (Campetelli y col., 2005). Trabajos recientes demuestran que la disociación del complejo tubulina/H<sup>+</sup>-ATPasa inducido por glucosa en *S. cerevisiae* ocurre por degradación de la tubulina a través de la activación de una serina proteasa, Lpx1, que es activada por disminución del pH citosólico cuando las células son estimuladas por glucosa (Campetelli y col., 2013).

***Interacción con Aldosa reductasa (AR):*** Además de su interacción con los miembros de la familia de las P-ATPasas, se ha informado que la tubulina también es capaz de interaccionar y regular la actividad de enzimas citosólicas en diferentes células. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la exposición de eritrocitos humanos y otros tipos celulares a altas concentraciones de glucosa induce la polimerización de tubulina, formación del complejo Ac-tub/NKA y consecuente inhibición de la actividad enzimática. El incremento del contenido de MTs se debería al incremento en los niveles de sorbitol mediados por activación de la enzima AR. Esta enzima forma un complejo citosólico con tubulina que, a diferencia de lo observado para las P-ATPasas resulta en el incremento de la actividad enzimática. Resultados de nuestro grupo sugieren que la actividad AR es regulada por interacción directa con tubulina y que la actividad enzimática está involucrada en la regulación de la actividad NKA y el contenido de MTs cuando las células están expuestas a altas concentraciones de glucosa (Rivelli y col., 2012).

***Interacción con otras enzimas:*** Otros autores han reportado interacción de la tubulina con diversas enzimas tales como la 3-fosfodiesterasa de nucleótidos 2'3'-cíclicos (Bifulco y col., 2002), el canal aniónico dependiente de voltaje (Carré y col., 2002), la fosfolipasa D (Chae y col., 2005), el supercomplejo mitocondrial ANT-CKmt-VDAC, formado por la ATP-ADP translocasa (ANT) y la creatina quinasa (CKmt) (Kuznetsov y col., 2013). Este panorama sitúa a la tubulina como una proteína que participa en la regulación de numerosos procesos enzimáticos vitales para las células. De acuerdo a lo expuesto anteriormente variaciones como las modificaciones post-traduccionales o el grado de polimerización de dicha proteínas afectarían críticamente a una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos.

---

- **DIABETES**

---

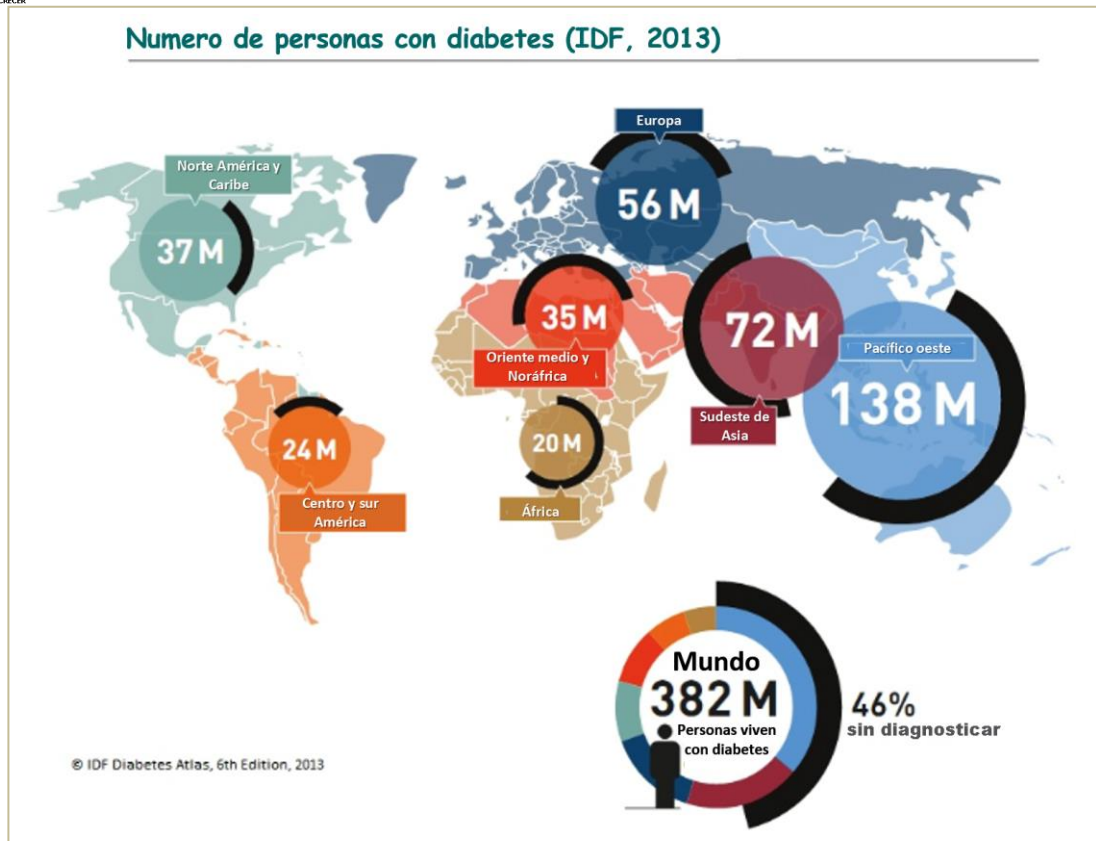
- **ASPECTOS GENERALES**

La diabetes mellitus (DM) es un problema de salud pública en constante ascenso en la mayor parte del mundo. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, en 2013 alrededor de 382 millones de personas padecían diabetes (Figura 10), de las cuales el 80 % vivían en países de ingresos medios y bajos. Para ese mismo año, la región de América Central y Sur América concentró 24,1 millones de diabéticos y se estima que para 2035 esta cifra ascienda en un 59,8 %. La prevalencia nacional de diabetes en América Latina varía notoriamente entre países, siendo Perú el que registra la cifra más baja (4,3 %) y Puerto Rico la más alta (15,4 %). En el caso de Argentina, el porcentaje es del 6,0 % (López-Jaramillo y col., 2014; Agudelo-Boteroa y Dávila-Cervantes, 2015).

El comportamiento de la morbilidad y la mortalidad por DM es el resultado de la compleja interacción de factores de riesgo individuales y estructurales, entre los que se encuentran la genética, los estilos de vida, el medio ambiente y los determinantes sociales. Algunos de estos aspectos son altamente modificables, principalmente aquellos que tienen que ver con los patrones de alimentación, la actividad física y el tabaquismo. Las evidencias indican que la DM suele ser más común en las mujeres, en personas adultas mayores y en áreas urbanas. Para la región de las Américas, la DM ocupa el tercer lugar como causa de muerte, sólo precedida por las enfermedades isquémicas del corazón y las enfermedades cerebrovasculares (Agudelo-Boteroa y Dávila-Cervantes, 2015).

El tipo de DM más frecuente en la población mundial es la de tipo 2. En general, la frecuencia correspondiente a la tipo 1 es del 5 al 10 %, la de tipo 2 varía entre 80 y 90 % y otro 5-10 % se produce por diversos desórdenes genéticos.

Existe numerosa evidencia de que la DM puede afectar a todo el cuerpo incluyendo el sistemas inmunológico, el hígado, músculo-esquelético, la función renal y el sistema cardiovascular para dar lugar a una disfunción de las células endoteliales y aterosclerosis. Estos trastornos pueden afectar fácilmente a otras regiones del cuerpo, tales como el sistema nervioso y conducir a la pérdida cognitiva, deterioro visual y de los nervios periféricos y la enfermedad isquémica del cerebro (Maiese, 2015).



**Figura 10: Prevalencia de diabetes en el mundo.** Esquema del número de personas con diabetes en el mundo durante el año 2013 (Federación Internacional de Diabetes, 2013).

- **CLASIFICACIÓN SEGÚN LA ETIOLOGÍA**

Desde 1997 la DM se ha dividido en 4 entidades, considerando como base la etiología de la afección (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003):

**Diabetes tipo I.** Aparece en los primeros años de vida, y se origina por una destrucción autoinmune selectiva de las células  $\beta$ -pancreáticas productoras de insulina, en el proceso participa la respuesta humoral y la celular.

A medida que la enfermedad progresa, los niveles de insulina decrecen produciendo un aumento en la concentración de glucosa en la sangre y la disminución de la entrada de glucosa al músculo y al tejido adiposo. Por otro lado, la disminución de insulina en el hígado, así como el relativo exceso de glucagón, producen un aumento en la degradación del glucógeno y de la glucogénesis, lo que ocasiona un incremento adicional de la glucosa sanguínea. La hiperglucemia afecta la capacidad de reabsorción en el riñón y como consecuencia se elimina glucosa por orina arrastrando consigo agua y sales. La escasez de glucosa como fuente de energía provoca la utilización de las grasas y degradación de proteínas, principalmente musculares, para la obtención de aminoácidos. La degradación

proteica aumenta la producción de urea e induce un balance negativo de nitrógeno, la lipólisis también se favorece por la falta de glucosa en el adipocito, además, el aumento relativo de glucagón produce la salida de ácidos grasos, parte de los cuales se utilizan como combustible y/o se transforman a cuerpos cetónicos en el hígado. Al avanzar, el catabolismo del glucógeno, proteínas y en especial de lípidos, sobrepasa las necesidades nutricionales del paciente y ocasiona un exceso de cuerpos cetónicos, provocando cetoacidosis y coma diabético.

***Diabetes tipo II.*** Predomina la incapacidad para incorporar glucosa a las células musculares y al tejido adiposo por el desarrollo de resistencia a la insulina o una deficiencia de su acción. Las causas que desencadenan la DM tipo 2 se desconocen en el 70-85 % de los pacientes, al parecer influye la herencia poligénica (en la que participa un número indeterminado de genes) junto con factores nutricionales y ambientales.

***Diabetes gestacional.*** El aumento de estrógenos y progesterona produce hiperplasia de las células  $\beta$  del páncreas, y por consiguiente se afecta el metabolismo de los carbohidratos, aumentando la secreción de insulina. Durante la segunda mitad del embarazo (24-28 semanas), el metabolismo de los carbohidratos se afecta al aumentar la producción de somatostatina coriónica humana placentaria, prolactina, cortisol y glucagón, lo que contribuye a producir menor tolerancia a la glucosa y mayor resistencia a la insulina.

***Tipos específicos de diabetes.*** Este grupo conjuga distintos orígenes, a) defectos genéticos de las células  $\beta$  del páncreas que se presenta a edad temprana y se manifiesta por un deterioro en la secreción de insulina, con un mínimo o ningún defecto en su acción, b) defectos genéticos en la acción de la insulina, generalmente asociada a mutaciones en el receptor de insulina, c) enfermedades del páncreas, d) endocrinopatías, en la que varias hormonas antagonizan la acción de la insulina o inhiben su secreción, e) farmacológica por drogas que afectan la acción o secreción de la insulina, f) infecciones que destruyen las células  $\beta$  del páncreas, g) inmunidad, en la que se presentan anticuerpos anti-receptor de insulina y resistencia a la insulina, y h) síndromes genéticos relacionados con deficiencia a la insulina (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003).

## ● BASES BIOQUÍMICAS DE LA DIABETES MELLITUS

El estudio del Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) mostró que, en gran parte, la fisiopatología de las tres complicaciones crónicas de la DM, la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía tienen un punto en común para su origen: la hiperglucemia. Es la sumatoria de las elevaciones de la glucemia la que, a través de los años, va desencadenando procesos bioquímicos y físico-químicos en los tejidos, los que finalmente se manifiestan como los síntomas y signos clásicos de las complicaciones. Se demostró también que, mientras más cercana a lo normal se mantiene la glucemia y la hemoglobina glicosilada, mayor es el beneficio en la reducción de complicaciones (Palma-Gámiz, 2007).

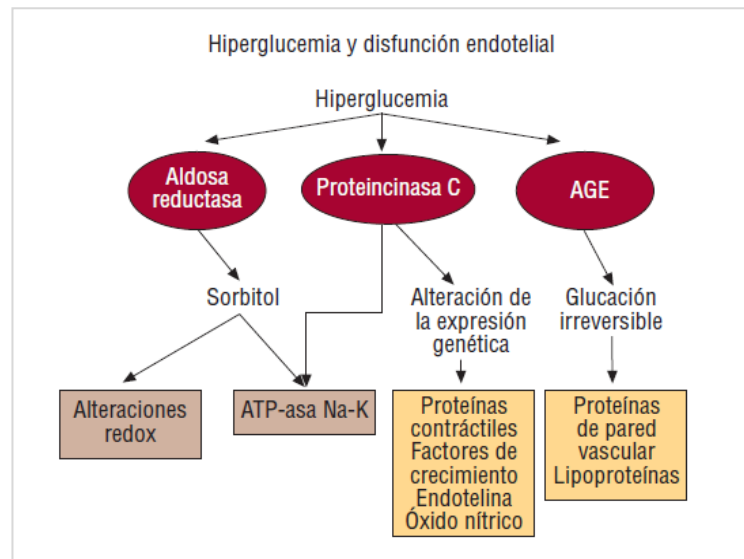
En general, hay tres vías metabólicas por medio de las cuales la hiperglucemia lleva, a través de los años, a las complicaciones microvasculares crónicas de la DM:

***Aumento de la actividad de Aldosa Reductasa (AR).*** La AR es una enzima que cataliza la reducción de hexosas, como la glucosa, a sorbitol. Se encuentra presente en ojos (epitelio corneal, cristalino y pericitos retinales), riñones (podocitos, células mesangiales, epitelio tubular), eritrocitos y nervios periféricos (axones y células de Schwann). Cuando hay hiperglucemia, la AR transforma la glucosa en sorbitol y este es metabolizado a fructosa a través de la Sorbitol-Deshidrogenasa. En este proceso se genera sorbitol, fructosa y NADH y disminuyen los niveles de NADPH.

El sorbitol por se aumenta la presión osmótica intracelular dañando los tejidos por edema celular. En las fibras nerviosas se bloquea el contratransportador  $\text{Na}^+$ /mioinositol, disminuyendo así el mioinositol y los fosfoinositidos intracelulares, lo que causa un incremento del diacilglicerol (DAG), inhibición de la NKA y edema axonal. Como se mencionó anteriormente en nuestro grupo de trabajo se demostró que el sorbitol induce la polimerización de MTs, los cuales junto a la AR regularían los niveles de tubulina en la membrana y la actividad NKA (Rivelli y col., 2012).

Por otro lado, el aumento de la fructosa causa fructosilación de las proteínas, un fenómeno muy similar a la glicosilación. El consumo de NADPH favorece el estrés oxidativo al disminuir el cociente glutatión reducido/oxidado, lo cual acelera la glicosilación. El aumento de la actividad de la ciclooxigenasa, también favorece la producción de prostaglandina ( $\text{PG}^{\text{E}2}$ ), sumándose a uno de los efectos de la activación de la Proteína quinasa C  $\beta 2$ , ésta última enzima es también activada por la disminución del NADPH y el aumento del DAG mediado por incremento en los niveles de NADH.

En resumen, la activación de la AR no sólo produce daño celular por sí misma, sino que aumenta el daño producido por los otros dos mecanismos, la activación de la Proteína quinasa C  $\beta 2$  y la glicosilación proteica (Figura 11).



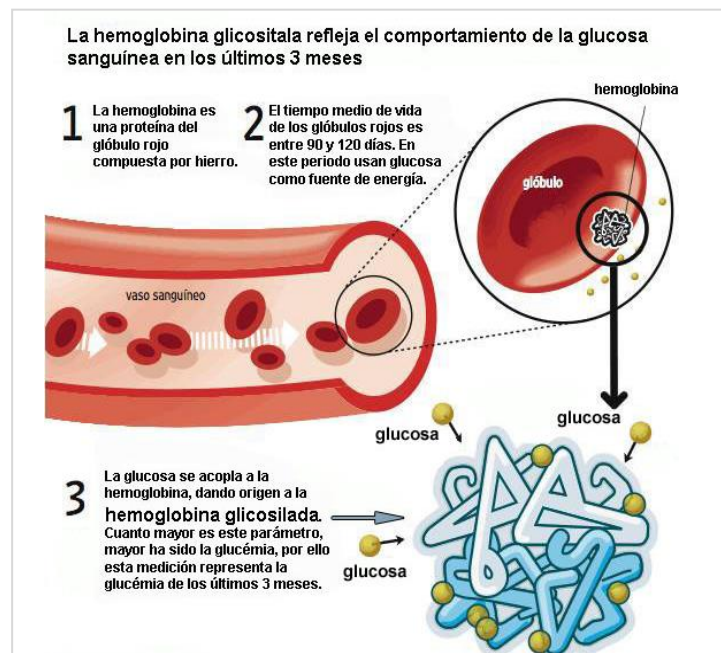
**Figura 11: Consecuencias de la hiperglucemia.** Esquema de los tres mecanismos bioquímicos básicos que se desencadenan como consecuencia de la hiperglucemia presente en pacientes diabéticos (Palma-Gámiz, 2007).

**Aumento del DAG y de la actividad de la proteína quinasa C  $\beta 2$ .** Este mecanismo ocurre en la retinopatía y la nefropatía. La proteína quinasa C es una enzima capaz de fosforilar las proteínas responsables de la transducción de señales intracelulares. La isoforma  $\beta 2$  de la proteína quinasa C aumenta su actividad en las células endoteliales de retina y riñón ante hiperglucemia, ya que al aumentar la glucosa, también lo hace la síntesis de DAG, que estimula a dicha enzima. Esto ocurre por la activación en la vía de las pentosas y una mayor oferta de dihidroxiacetonafosfato (DHAP).

La proteína quinasa C  $\beta 2$  a su vez, activa a la fosfolipasa A2, aumentando así la producción de prostaglandina E2 y de Tromboxano A2. Estos últimos mediadores modifican drásticamente la permeabilidad endotelial y la respuesta vasoconstrictora a la Angiotensina II en el músculo liso vascular.

**Glicosilación no enzimática de proteínas:** La glucosa en exceso se combina con los residuos amino de las proteínas formando inicialmente una base de “Schiff”, la cual posteriormente se reordena, formando el denominado producto Amadori, este demora horas o días en producirse y la reacción inversa es muy lenta. La “Hemoglobina Glicosilada”, un

índice de calidad de control glucémico, es un producto Amadori de glucosa y hemoglobina (Figura 12). En proteínas de larga vida y en el curso de meses y años, estos productos se reordenan para formar compuestos cetoaldehídos que son mucho más estables e irreversibles. Se forman así los productos de glicosilación avanzada (AGE), que son proteínas que sufren la formación de puentes anormales entre péptidos, alteración de su estructura secundaria y terciaria y en consecuencia, alteraciones funcionales. Entre ellas se destaca el cambio en la permeabilidad de las membranas basales (Larkins y Dunlop, 1992).



**Figura 12: Glicosilación proteica.** Esquema de la formación del producto Amadori hemoglobina glicosilada que se da entre la glucosa y la hemoglobina (Palma-Gámiz, 2007).

La glicosilación del colágeno hace que ligamentos, cápsulas y aponeurosis pierdan elasticidad. En este punto, cabe recordar que, especialmente en condiciones de hiperglucemia, la glucosa puede sufrir también un proceso de ‘autooxidación’ generando radicales libres y cetoaldehído, el cual actúa como propagador en la transformación del producto Amadori en AGE. De este modo, la autooxidación de la glucosa acelera aún más la glicosilación no enzimática de proteínas.

En resumen, la hiperglucemia estimula la combinación de la glucosa con las proteínas en un proceso que puede producir cambios irreversibles en la estructura y función de estas moléculas. También la autooxidación de la glucosa, que no sólo genera radicales libres oxidantes, sino que también se transforma en un cetoaldehído capaz de acelerar aún más el proceso de glicosilación avanzada.

## ● **DIABETES E HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Su prevalencia ha aumentado debido a la mayor expectativa de vida y al mayor grado de obesidad en la población. En Argentina, la prevalencia de la HTA en la población general es del 33,5 %, siendo mayor en hombres (41,7 %) que en mujeres (25,7 %) y aumenta con la edad en ambos sexos, del 11,1 % en < 35 años al 68,5 % en ≥ 65 años (Marini y col., 2012).

La HTA en la DM es aproximadamente el doble que en la población normoglucémica, del mismo modo, podría decirse que las alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono son más frecuentes en los individuos hipertensos que en los normotensos. Cabría pensar, por lo tanto, que hay un mecanismo de retroalimentación por el cual ambos procesos se interrelacionan entre sí y se potencian (Palma-Gámiz, 2007).

En ocasiones es difícil establecer si la HTA que aparece en el curso de la DM es debida a la respuesta hiperadrenal por hiperinsulinemia, como propuso Reaven (1988), o es una consecuencia directa de la disfunción renal cuando previamente ha aparecido proteinuria. Para la mayoría de los autores, no obstante, el mecanismo sería de origen multifactorial.

## ● **MORFOLOGÍA ERITROCITARIA DE DIABÉTICOS**

Se ha descrito en la DM anormalidades anatómicas en las cuales los vasos arteriales grandes y pequeños se ven involucrados en un proceso aterotrombótico que conduce a la enfermedad vascular generalizada (infarto de miocardio, ictus, pie diabético, neuropatía diabética, ceguera e insuficiencia renal crónica progresiva e irreversible) (Palma-Gámiz, 2007). A estas complicaciones crónicas características de la DM se le debe adicionar el hecho de que los eritrocitos de pacientes diabéticos desarrollan una morfología particular. La oxidación de la glucosa y la glicosilación de proteínas causadas por la hiperglucemia, inducen una serie de alteraciones metabólicas y modificaciones en las propiedades mecánicas y reológicas de los eritrocitos (Gyawali y col., 2012).

En individuos sanos, se ha encontrado que un 55 % de los eritrocitos presentan forma de "cuenco" (células de morfología normal consideradas como las más deformables) mientras que un 44 % son discocitos, levemente más rígido que lo eritrocitos "en forma de cuenco". El 1 % restante corresponde a eritrocitos con morfología alterada, como las que se



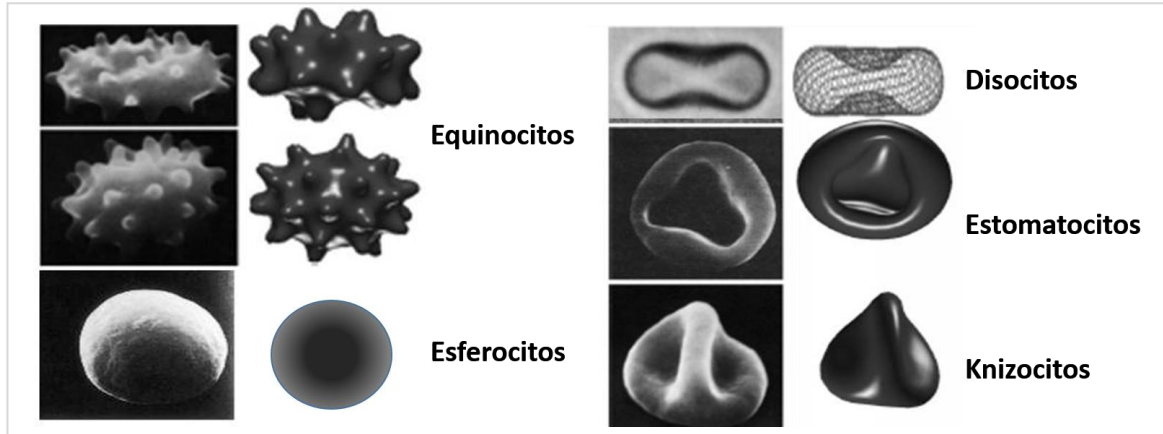
observan en la figura 13, tales como equinocitos (con 10-30 espículas) y knizocitos (con un diámetro ligeramente más pequeño y concavidades en la membrana causadas por alteraciones en sus componentes lipídicos). Se ha reportado que en individuos diabéticos sin complicaciones vasculares no se observan diferencias significativas en la morfología de los eritrocitos con respecto a individuos sanos. Sin embargo, pacientes diabéticos con vasculopatías, presentan un 60 % de discocitos y una disminución en las células con forma de cuenco, al igual que un leve aumento de las alteraciones eritrocitarias que llegan al 3 % (Turchetti y col., 1997). Se ha informado incluso la presencia de esferocitos (células con pérdida total de concavidad) en diabéticos tipo 1, mientras que en diabéticos tipo II fueron reportados tanto esferocitos como equinocitos. Varios autores estiman que la esferocitosis, observada en ambos tipos de DM, parece encontrarse asociada a la hiperglucemia, mientras que la equinocitosis observada en pacientes diabéticos de tipo II es posiblemente relacionable con el perfil lipídico anormal del plasma sanguíneo y el aumento de nivel de peróxidos lipídicos (Gyawali y col., 2012).

El índice de morfología de eritrocitos (EMI), una medida de la rigidez eritrocitaria representada por la relación de células en forma de cuenco/discocitos, es superior a 1 en individuos sanos, mientras que en pacientes diabéticos se encuentra por debajo de este valor, lo cual se asocia con una disminución del número de las células más deformables.

Aunque desde hace décadas, las complicaciones vasculares de la DM son ampliamente reconocidas, en la actualidad se han propuesto a las morfologías anormales de eritrocitos en la etiología de las complicaciones vasculares de la DM. Por otro lado, se ha relacionado a las anormalidades morfológicas con un aumento de la adhesión de los eritrocitos al endotelio en pacientes diabéticos. Este proceso estimula la activación endotelial y posteriormente conduce a numerosas complicaciones vasculares (Wautier y Wautier, 2013).

Se ha demostrado un aumento de agregación eritrocitaria y una reducida deformabilidad de los eritrocitos en individuos con DM, conjuntamente a la detección de marcadores inflamatorio tales como la proteína C reactiva, fibrinógeno y neutrófilos. El aumento de la vía de los polioles, la activación de la proteína quinasa C y la formación de AGE en la DM conducen a un exceso del ión superóxido en la mitocondria, y por lo tanto un estado de estrés oxidativo. En consecuencia, muchos marcadores de estrés oxidativo se acumulan en la sangre y los tejidos, mientras que los niveles de antioxidantes son significativamente bajos. El daño oxidativo en eritrocitos afecta su membrana y morfología; incluyendo la disminución de la deformabilidad (Gyawali y col., 2012; 2015).

En base a lo expuesto anteriormente es posible destacar la importancia clínica de los cambios morfológicos de eritrocitos como consecuencia de las numerosas alteraciones bioquímicas desencadenadas en los cuadros de pacientes diabéticos.



**Figura 13: Alteraciones morfológicas eritrocitarias.** Microscopía electrónica de barrido y diagrama de las principales alteraciones eritrocitarias (modificación de Lim y col., 2002)



## **OBJETIVOS**

- **OBJETIVO GENERAL:**

Esta investigación tuvo como objetivo general el estudio de tubulina y sus isotipos en eritrocitos de individuos diabéticos, especialmente el mecanismo de señal desencadenado por tubulina acetilada y su consecuente migración a la membrana celular, su efecto sobre las propiedades reológicas y la implicancia de este mecanismo sobre la diabetes.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

**A** - Determinar el contenido y distribución de tubulina total y sus diferentes isoformas en eritrocitos humanos de una población de pacientes diabéticos y su relación con otros parámetros indicativos de diabetes.

**B** - Establecer si el mayor grado de acetilación de tubulina previamente demostrada en pacientes hipertensos, y eventualmente en individuos diabéticos, se debe a un aumento en la acetilación o a una relocalización específica en la membrana.

**C** - Establecer la implicancia de altas concentraciones de glucosa (en relación a la diabetes mellitus) en alteraciones reológicas tales como la deformabilidad eritrocitaria y la resistencia al estrés osmótico. Analizar su relación con los niveles de tubulina acetilada intracelular.

**D** - Analizar la estructura, dinamismo, organización y composición de la fracción de tubulina sedimentable en eritrocitos humanos.

**E** - Realizar el seguimiento cronológico de tubulina durante el proceso de eritropoyesis a partir de células madre humanas.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

- **MATERIALES**

Membranas de nitrocelulosa, fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), nocodazol, paclitaxel (taxol), tritón X-100 y dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. El kit de detección Lumigen<sup>TM</sup> y film de quimioluminiscencia de alta eficiencia fueron obtenidos en GE Healthcare Life Sciences.

- **ANTICUERPOS**

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos provenientes de Sigma Chemical Co: 6-11B-1 monoclonal desarrollado en ratón anti Ac-tub, 1A2 monoclonal desarrollado en ratón anti Tyr-tub, DM1A monoclonal desarrollado en ratón para  $\alpha$ -tubulina, anti  $\alpha$  y  $\beta$  espectrina, monoclonal, producido en conejo, IgG de ratón o conejo conjugado con peroxidasa, IgG de ratón conjugado con rodamina, IgG de conejo o ratón conjugado con fluoresceína. Además se utilizaron los anticuerpos anti tubulina policlonal producido en conejo para  $\beta$ -tubulina y anti Glu-tub policlonal producido en conejo (Gundersen y col., 1984), ambos desarrollados en el laboratorio del Dr. Arce.

- **PACIENTES**

Muestras de sangre fueron tomadas de pacientes de ambos sexos del Hospital Regional de Río Cuarto (Córdoba, Argentina). Se tomaron 2 ml de sangre de pacientes con DM y de individuos sanos. Se consideró a un individuo diabético cuando su hemoglobina glicosilada sanguínea (HbA1c) fue mayor al 6 % (indicativo de glucemia de 120 mg/dl-150 mg/dl). Las muestras sanguíneas fueron recolectadas en tubos conteniendo EDTA como anticoagulante y almacenadas a 4 °C por un máximo de 24 h.

- **ANIMALES**

Se utilizaron ratas Wistar de más de 28 días de edad que fueron mantenidas en jaulas con libre acceso al agua y alimento a 25 °C, 55 % de humedad ambiente y ciclos de 12 h de luz/oscuridad.

- **INDUCCIÓN DE DIABETES EN RATAS WISTAR POR ESTREPTOZOTOCINA**

La DM en ratas fue inducida empleando estreptozotocina (STZ), como describen Rivelli y col. (2012). Ratas Wistar de 7 semanas de edad con libre acceso al alimento y al agua se inyectaron por vía intraperitoneal con una dosis de STZ (70 mg/kg en buffer citrato 0,1 mM, pH 4,5). En los casos exitosos, entre los 7-8 días después de la inyección la concentración de glucosa en sangre se encontró entre 300-400 mg/dl. Los animales controles fueron inyectados con un volumen igual de buffer citrato. Todos los animales fueron sacrificados 1 mes después de la inyección.

- **INDUCCIÓN DE HIPERGLUCEMIA EN RATAS WISTAR**

Ratas Wistar machos en ayuno de 12 h, fueron inyectadas subcutáneamente con una solución de glucosa 1 M en PBS para alcanzar una concentración final de 30 mM. Los animales controles fueron inyectados con un volumen igual de PBS. Durante las 2 h posteriores a la inyección, se tomaron muestras de sangre para medir la glucemia (Rivelli y col., 2012).

- **TOMA DE MUESTRA DE SANGRE EN RATAS**

Las muestras de sangre de rata fueron tomadas de la cola del animal realizando un pinchazo y recolectando una gota de sangre en portaobjetos, para ello las ratas fueron inmovilizadas sin anestesia. Dichas muestras fueron extendidas y sujetas a inmunofluorescencia. Cuando se necesitaron volúmenes de sangre mayores, las muestras fueron obtenidas por decapitación del animal y la sangre se recolectó en un recipiente conteniendo como anticoagulante EDTA al 0,3 % (Amaiden y col., 2011; 2012).

- **INMUNOFLUORESCENCIA**

Los extendidos de sangre fueron fijados sobre un portaobjetos con metanol a -20 °C durante 6 min. Las muestras fueron hidratadas con PBS, incubadas con 2 % (p/v) albúmina sérica bovina en PBS durante 30 min y teñidas para inmunofluorescencia indirecta como describen Amaiden y col. (2011). Los portaobjetos fueron montados con FluorSave y observados por microscopía de fluorescencia óptica o confocal.

- **OBTENCIÓN DE HOMOGENATO Y FRACCIONES DE TUBULINA DE ERITROCITOS HUMANOS**

Sangre humana (2 ml) fue centrifugada durante 5 minutos a 100 x g, los eritrocitos contenidos en el precipitado fueron resuspendidos en 6 ml de buffer de lisis (7.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 7.5) e incubados durante 15 minutos en hielo para su lisis. Esta muestra constituyó el homogenato de eritrocitos y a partir de ella se aislaron las distintas fracciones eritrocitarias según describen Amaiden y col. (2011):

- **MEMBRANA**

El homogenato se centrifugó durante 15 min a 20 000 x g a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó tres veces con 4 ml de buffer de lisis. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 200 µl de buffer de lisis y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

- **SEDIMENTABLE**

En este caso, el precipitado de eritrocitos fue resuspendido en 3 ml de buffer de lisis conteniendo 0.01 mM taxol y 0.5 % Tritón X-100, incubado durante 3 min a temperatura ambiente y luego centrifugado a 20 000 x g durante 10 min a 37 °C. El sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 100 000 x g durante 30 min a 37 °C. El precipitado fue resuspendido en 200 µl TBS.

- **CITOSÓLICA**

El homogenato fue centrifugado a 100 000 x g durante 1 h. El sobrenadante constituyó la fracción citosólica eritrocitaria.

- **PREPARACIÓN DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA**

Cerebros de ratas de 30-60 días fueron homogeneizados a 4 °C en 1 volumen de buffer MEM conteniendo 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, el homogenato fue centrifugado a 100 000 x g durante 45 min a 4 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante fue incubado con 40 % de glicerol durante 30 minutos a 37 °C, posteriormente fue centrifugado a 70 000 x g durante 30 min a 37 °C. El precipitado, fuente de tubulina, fue resuspendido en 300 µl/cerebro de buffer MEM y finalmente fue sometido a cromatografía de intercambio iónico empleando fosfocelulosa para retener las MAPs asociadas a microtúbulos (Amaiden y col., 2011).



- **PREPARACIÓN DE ANTICUERPO O TUBULINA PURIFICADA UNIDA A SEFAROSA**

Tubulina purificada o el anticuerpo anti-espectrina fueron unidos covalentemente a sefarosa 4B activada con CNBr como describen Hubbert y col. (2002) con leves modificaciones. Las perlas de sefarosa fueron lavadas con 100 volúmenes de HCl 1 mM a temperatura ambiente. Las perlas empaquetadas (1 ml) fueron mezcladas con anticuerpo (2.5 mg de proteína) en 1 ml buffer de acoplamiento (0.2 M NaHCO<sub>3</sub> conteniendo 0.5 M NaCl, pH 8.2). La mezcla fue agitada sobre una plataforma durante toda la noche a 4 °C y cargada dentro de una columna cromatográfica. El anticuerpo o proteína no unida fueron removidos lavando con 5 ml de buffer de acoplamiento. Luego, las perlas fueron transferidas a un eppendorff con 1 ml de buffer de acoplamiento saturado con albúmina bovina para bloquear los sitios de sefarosa no reactivos. La mezcla fue agitada durante 2 h a temperatura ambiente y la albúmina no unida fue removida lavando con 10 ml de buffer de acoplamiento. Las perlas unidas al anticuerpo o proteína fueron lavadas con 1.5 ml de TBS-Tritón y utilizadas para los experimentos de inmunoprecipitación.

- **INMUNOPRECIPITACIÓN**

Homogenato de eritrocitos fue incubado con las perlas de sefarosa, unidas al anticuerpo o tubulina, en agitación durante toda la noche a 4 °C. Luego las muestras fueron centrifugadas y el material precipitado fue lavado 5 veces con TBS-Tritón. Fracciones de 50 µl de perlas empaquetadas fueron resuspendidas en 50 µl de sample buffer, calentadas a 50 °C durante 15 min y centrifugadas 1 min a 100 x g. Alícuotas de 20 µl de la fracción soluble fueron sometidas a SDS-PAGE (Amalden y col., 2011).

- **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

La fracción sedimentable de eritrocitos obtenida a partir de 10 ml de sangre de individuos sanos, se fijó en 2 % glutaraldehído/4 % formaldehído. Las muestras fijadas fueron deshidratadas por una serie de soluciones de etanol de 50, 70 y 90 % e incluidas primero en resina etanol-LRWhite (1:1; 2 h) y posteriormente en resina pura a 4 °C. Finalmente se colocaron en cápsulas incubadas a 50 °C por 48 h. Luego los cortes fueron bloqueados con 5 % albúmina sérica bovina, lavados con agua milliQ durante 2 minutos, incubados con el anticuerpo primario DM1A (1:200 dilución PBS-1 % BSA) y lavados nuevamente con PBS. Luego fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-raton IgG conjugado con oro coloidal 5 nm (1:30 dilución en PBS -1 % BSA) durante 45 min a 37 °C.

Finalmente se lavaron y tiñeron con acetato de uranilo acuoso durante 1 min para ser observados por microscopía electrónica (Schwartzbach, 2010).

- **ELECTROFORESIS E INMUNOBLOT**

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE sobre un gel de poliacrilamida al 15 % para visualizar tubulina o espectrina, siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario mAb 6-11B-1, DM1A, 1A2 (dilución 1:1000), anti-Glu (dilución 1:200) o anti-espectrina, durante 2 h a temperatura ambiente o 12 h a -4 °C. La membrana fue lavada tres veces con TBS-Tritón X-100 y posteriormente se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (IgG de ratón o IgG de conejo, dilución 1:500). La membrana fue lavada tres veces con TBS-Tritón y la reacción antígeno-anticuerpo se detectó usando el método del 4-cloro-1-naftol o por quimioluminiscencia mediante el kit de quimioluminiscencia. La intensidad de las bandas fue cuantificada usando el software Scion Image.

- **ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES**

Se tomaron 50 µl de muestra (50 µg) y se concentraron usando el kit comercial 2D CleanUp (GE Healthcare). Luego se resuspendió en 125 µl de solución de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2 %, IPG Buffer 3-11 NL 0,5 %, azul de bromofenol 0.002 %) con 17 mM DTT. Para la primera dimensión (IEF) se cargaron 50 µg de proteínas en tiras de isoelectroenfoque DryStrip 4-7; 7 cm (GE Healthcare) por rehidratación pasiva durante toda la noche a temperatura ambiente. El programa de IEF fue: 1) 300 V constante 30 min, 2) 1000 V en gradiente 30 min, 3) 5000 V en gradiente 90 min y 4) 5000 V constante hasta 1,2 kV/h. Los parámetros empleados fueron: 5000 V 33 uA 2 h 39 min y 5723 V/h. Se equilibró con buffer equilibrador (6 M urea, 75 mM Tris pH 8,8, 29,3 % glicerol, 2 % SDS, 0,002 % azul de bromofenol) con DTT (10 mg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación y luego con buffer equilibrador con Iodoacetamida (25 mg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación.

La segunda dimensión fue realizada por SDS-PAGE al 12 %, 10 x 10 x 0,1 cm en las siguientes condiciones: 10 mA/gel, durante 30 min, 20 mA/gel, hasta que el frente de corrida alcanzó el borde del gel. Se empleó el marcador de peso molecular Amersham Low Molecular Weight Calibration. Luego el gel fue teñido con azul de Coomassie.

- **DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS**

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina (1-10 µg) como control y proteína calibradora de la curva patrón.

- **DETERMINACIÓN DE LA DEFORMABILIDAD DE ERITROCITOS**

La deformabilidad de los eritrocitos se midió siguiendo la metodología descrita por Cabrales (2007). Se midió la presión que debe aplicarse a una solución de eritrocitos para que atraviesen una membrana poros de 5 µm. Dado que los eritrocitos poseen un tamaño “helicoidal” de aproximadamente 10 µm, para atravesar la membrana deben deformarse, cuanto menor sea la presión aplicada sobre el sistema mayor es la deformabilidad eritrocitaria. De esta manera, se calculó el parámetro β (Skalak y col., 1983), como la resistencia al flujo de los eritrocitos al atravesar la membrana, para lo cual se utilizó la ecuación:

$$\beta = (P_i / P_0 - 1) v/h+1$$

Donde  $P_i$  es la presión inicial necesaria para que la suspensión de eritrocitos en solución fisiológica atravesase la membrana a un flujo determinado,  $P_0$  es la presión de la solución fisiológica,  $v$  es la relación entre el volumen celular y el volumen del poro de la membrana y  $h$  es el volumen de empaquetamiento de los eritrocitos.

La determinación de la  $P_i$  fue realizada en una solución de eritrocitos provenientes de 1 ml de sangre. Para ello, la sangre fue sometida a los diferentes tratamientos indicados en cada figura y posteriormente los eritrocitos se lavaron dos veces, se resuspendieron en 6 ml de solución fisiológica y la suspensión fue perfundida. A cada flujo se determinó la  $P_i$  y se calculó β. Dado que hay una relación lineal entre β y el flujo de perfusión podemos definir a ψ como la pendiente de la curva β en función del flujo de perfusión (Amaiden y col., 2012). Un aumento de ψ indica menor deformabilidad y viceversa una disminución de ψ mayor deformabilidad.

- **DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA GLOBULAR O FRAGILIDAD OSMÓTICA**

Se colocaron 10 µl de eritrocitos de individuos sanos o diabéticos en 1 ml de las distintas soluciones de cloruro de sodio con las siguientes concentraciones: 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80 y 0.90 % (solución fisiológica). Luego se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos, se agitaron y centrifugaron los tubos a 100 x g

durante 1 min y cada sobrenadante fue medido por espectrofotometría a 540 nm para cuantificar la hemoglobina libre. Se tomó como blanco el sobrenadante del tubo correspondiente a la solución fisiológica y como 100 % de hemólisis al correspondiente a la solución de NaCl 0,30 %. El porcentaje de hemólisis para cada solución fue calculado como:

$$\% \text{ Hemólisis} = (\text{D.O. tubo problema} \times 100) / \text{D.O. tubo } 0,9 \% \text{ NaCl}$$

Finalmente, se calculó la fragilidad corpuscular media (FCM) como la concentración de solución de cloruro de sodio que produce el 50 % de lisis (Harmening, 2002).

- **DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ACETILACIÓN**

La fracción citosólica de eritrocitos (100  $\mu$ l) y tubulina purificada de cerebro de rata (200  $\mu$ g) fueron incubadas a 37 °C en un volumen final de 0.45 ml de la mezcla de reacción (0.8 mM EGTA, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT). A los tiempos 0, 30, 60 y 90 min, se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l y posteriormente se analizó el contenido de Ac-tub y  $\alpha$ -tubulina por inmunoblot.

- **AISLAMIENTO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS**

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) fueron obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical de embarazos normales, según las directrices institucionales del Hospital Oncológico Siglo XXI, Instituto Mexicano de Seguro Social de Distrito Federal, México. La sangre fue fraccionada en sus componentes celulares empleando ficoll para generar un gradiente de densidad que permitió recuperar las células mononucleadas. Posteriormente, mediante selección negativa utilizando el kit human progenitor cell enrichment, Easy Sep, el cultivo fue enriquecido en ~98 % de CPH, CD34<sup>+</sup> y linaje<sup>-</sup> (según Stem Cell Technologies) y mantenido en medio de expansión (Stem Spam) (Ubukawa y col., 2012).

- **DIFERENCIACIÓN DE CPH A LINAJE ERITROIDE**

Luego del aislamiento de las CPH, se llevaron a cabo dos protocolos de diferenciación en placas de cultivo de 24 multipocillos.

- El primero consistió en el mantenimiento de las CPH en medio de expansión para células madre (Stem spam) durante 22 días. El medio fue suplementado con 20 % SFB (suero fetal bovino), 1 UI/ml eritropoyetina (EPO), 50 ng/ml trombopoyetina (TPO),

interleucina 3 y 6 (IL3 e IL6), factor de células madre (SCF) y factor de transcripción FLT3t. Este cultivo fue iniciado con 15.000 cel/ml y repicado sin tripsina a los 6 días, las células se contaron mediante solución de Turck, se evaluó la viabilidad por azul tripán y se resembraron 25.000 cel/ml. A partir de este momento, este paso se repitió cada 2 días hasta los 22 días. A partir del día 11 se resembraron 50.000 cel/ml.

- El segundo protocolo consistió en el mantenimiento de las CPH en medio LTCM suplementado con 20 % SFB, 50 ng/ml IL-3, 50 ng/ml SCF y 2 UI/ml EPO durante 7 días. Luego las células se cultivaron en medio de expansión de células madre (Stem spam) suplementado únicamente con 20 % SFB y 2 UI/ml EPO hasta los 12 días (modificación de Ubukawa y col., 2012). Este cultivo fue iniciado con 30.000 cel/ml y repicado sin tripsina a los 7 días, las células se contaron mediante solución de Turck, se evaluó la viabilidad por azul tripán y se resembraron 100.000 cel/ml. Los cultivos fueron realizados empleando equipamiento del Hospital Oncológico perteneciente al Instituto del Seguro Social Mexicano (ISSM).

#### ● TINCIÓN WRIGHT

En cada repique de los cultivos celulares se tomaron muestras que fueron citocentrifugadas (Centrífugas Citológicas Wescor, modelo Aerospray 7720) en portaobjetos y luego se tiñeron con colorante Wright para evaluar la morfología celular e identificar la etapa de maduración (Weisenthal, 2011).

#### ● ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  S.D. En los casos necesarios, los test ANOVA y Student-Newman-Keuls fueron utilizados. Las diferencias en los resultados se consideró estadísticamente significativa para  $p < 0,05$ .

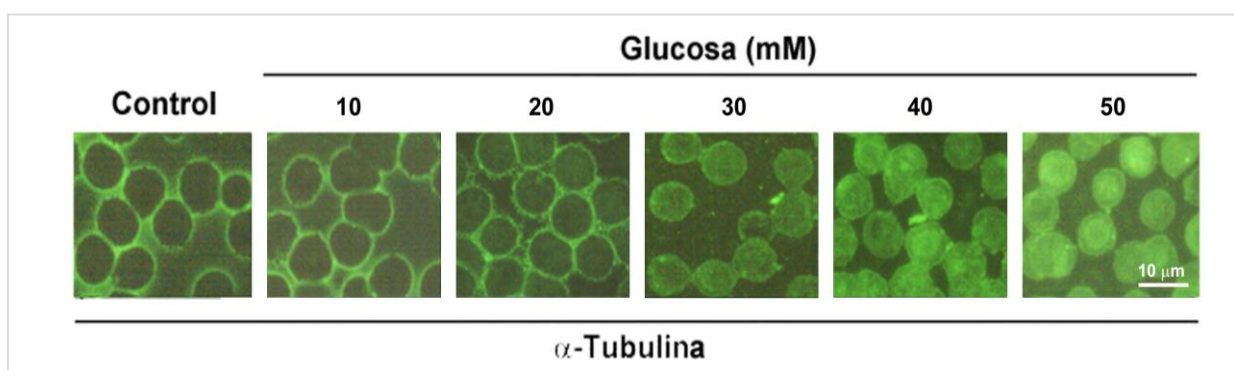


## **RESULTADOS**

● **EFEECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE TUBULINA EN ERITROCITOS HUMANOS**

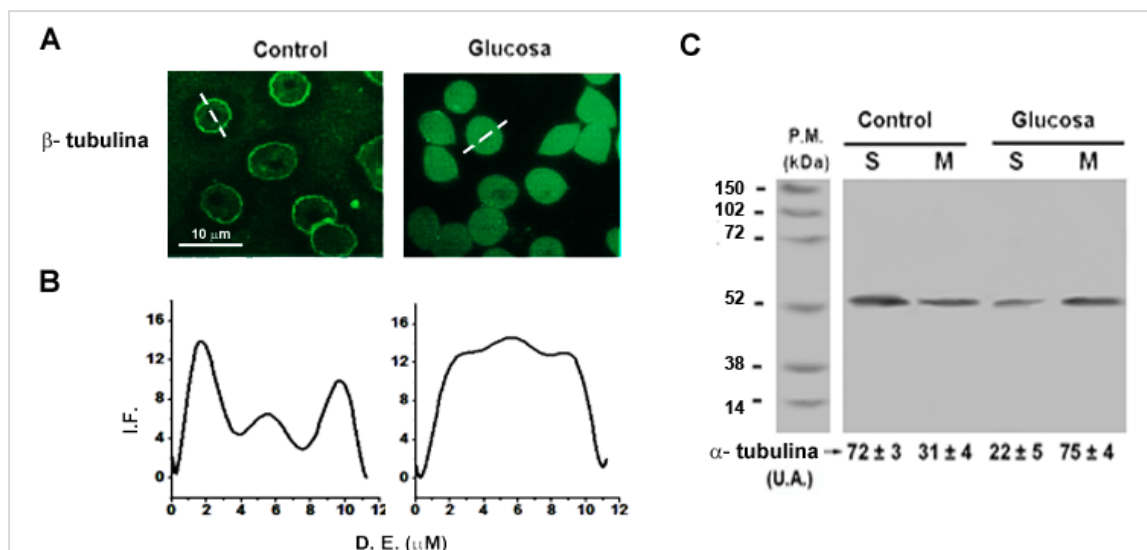
Antecedentes previos de nuestro grupo de trabajo demuestran que en distintas líneas celulares la exposición de las células a altas concentraciones de glucosa (30 mM) induce un aumento en el contenido de MTs (Rivelli y col., 2012), por lo cual se analizó el efecto de la glucosa sobre el contenido de  $\alpha$ -tubulina en eritrocitos humanos. Para ello se extrajo sangre de individuos sanos y se trató durante 2 h con concentraciones de glucosa desde 5 a 50 mM (equivalente a 90 - 900 mg/dl). El análisis de las muestras mediante inmunofluorescencia empleando el anticuerpo monoclonal DM1A (anti  $\alpha$ -tubulina), muestra que la distribución intracelular de tubulina total es modificada por el tratamiento de los eritrocitos con concentraciones de glucosa mayores a 20 mM (Figura 14). Los eritrocitos del grupo control presentan una distribución de fluorescencia típica de tubulina localizada en la denominada fracción sedimentable, es decir un anillo de fluorescencia periférica con el interior vacío (Amaiden y col., 2011). Sin embargo al incrementar la concentración de glucosa involucrada en el tratamiento, el contenido de tubulina disminuye en esta fracción para aumentar en la membrana, ya que la fluorescencia se observa (a partir de glucosa 30 mM) en la superficie celular. Estos resultados demuestran que la distribución de tubulina en eritrocitos humanos es modificada por la presencia de glucosa de manera dependiente de la dosis.

En base a que glucosa 30 mM (equivalente a una glucemia de 540 mg/dl) fue la concentración mínima que indujo cambios significativos en la distribución de tubulina, esta fue empleada en los siguientes experimentos para analizar diferentes aspectos involucrados en esta traslocación.



**Figura 14: Efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la distribución de tubulina en eritrocitos humanos.** Eritrocitos humanos fueron incubados con 5 (Control), 10, 20, 30, 40 o 50 mM glucosa durante 2 h a 37 °C. Los glóbulos rojos se fijaron en un portaobjetos y se analizó la distribución de  $\alpha$ -tubulina por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo DM1A. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Para descartar que el efecto observado fuera un artefacto de la técnica por enmascaramiento de epitopes en la tubulina, se analizó el efecto de la glucosa sobre la distribución de tubulina por inmunofluorescencia utilizando un segundo anticuerpo, un anticuerpo policlonal anti  $\beta$ -tubulina. La figura 15A muestra nuevamente que en presencia de 30 mM glucosa la tubulina se distribuye en la membrana de los eritrocitos, mientras que en los controles se encuentra en la región sedimentable. Los perfiles de intensidad de fluorescencia interna de los eritrocitos confirman esta distribución, ya que en los glóbulos rojos sin tratamiento se observan picos de fluorescencia en la zona periférica de la célula, lo que corresponde a una localización de la tubulina en la estructura sedimentable, mientras que en eritrocitos tratados con glucosa, la fluorescencia se observa en toda la superficie de las células indicando la localización de tubulina en la membrana (Figura 15B).



**Figura 15: Efecto de la glucosa sobre la distribución de tubulina en eritrocitos humanos.** Sangre de individuos saludables fue separada en dos alícuotas, incubadas con 5 (Control) o 30 mM glucosa (Glucosa) durante 2 h a 37 °C. **A.** Los glóbulos rojos fueron fijados en portaobjetos y analizados por inmunofluorescencia usando el anticuerpo policlonal anti  $\beta$ -tubulina. **B.** La intensidad de fluorescencia (I.F.) interna de los eritrocitos fue medida y graficada en función del diámetro del eritrocito (D.E.) utilizando el programa Scion Image. **C.** Se obtuvieron las fracciones sedimentable y de membrana de los eritrocitos y se emplearon para cuantificar  $\alpha$ -tubulina por inmunoblot manteniendo la misma cantidad de proteínas totales en todos los pocillos sembrados. Las bandas mostradas corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. Las bandas de tubulina fueron cuantificadas usando el programa Scion Image y sus valores, expresados en unidades arbitrarias (U.A.), se muestran como el promedio  $\pm$  S.D.

Para cuantificar el contenido de tubulina en cada fracción subcelular, luego de los tratamientos, los eritrocitos fueron sometidos a un esquema de centrifugación diferencial mediante el cual se obtuvieron las fracciones de membrana y sedimentable, y se analizó en ellas el contenido

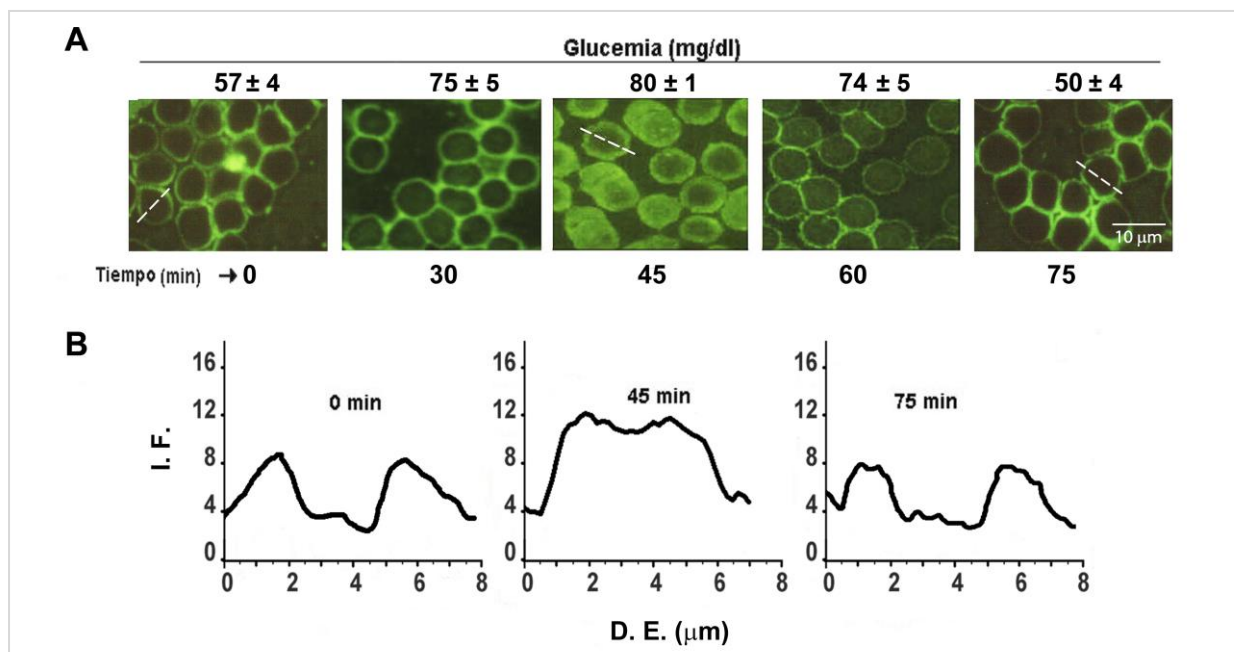


de tubulina. La cuantificación de las bandas de tubulina en las diferentes fracciones muestra que luego del tratamiento de los eritrocitos con glucosa, se produce una disminución de tubulina del 30 % en la fracción sedimentable y un aumento de la misma del 140 % en la fracción de membrana (Figura 15C). En conjunto, estos resultados sugieren que *in vitro* la glucosa induce una redistribución de la tubulina en eritrocitos humanos, estimulando su migración desde la fracción sedimentable hacia la membrana plasmática.

#### ● EFECTO *IN VIVO* DE GLUCOSA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE TUBULINA EN ERITROCITOS DE RATA

Sobre la base de los resultados descritos, se propuso determinar el efecto *in vivo* de las altas concentraciones de glucosa sobre los eritrocitos. Para ello ratas Wistar hembras en ayuno fueron inyectadas subcutáneamente con 30 mM glucosa para generar una hiperglucemia. Se extrajeron muestras de sangre a los tiempos 0 (antes de la inyección), 30, 45, 60 y 75 min post-inyección y se analizó en los animales la glucemia y la distribución de tubulina en los eritrocitos por inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo DM1A. Como se observa en la figura 16A, en ratas sin tratamiento la tubulina se localizó claramente en una zona marginal del eritrocito correspondiente a la fracción sedimentable, la glucemia de las ratas medidas bajo estas condiciones fue de  $57 \pm 4$  mg/dl. Luego de los 45 minutos post-inyección se observó el pico de glucosa en sangre correspondiente a una glucemia de  $80 \pm 1$  mg/dl, valor que corresponde a un 50 % de aumento. Bajo estas condiciones la fluorescencia se observó más tenue en la fracción sedimentable e incrementada en la superficie celular uniformemente, lo cual indican la presencia de tubulina en la membrana de los eritrocitos. En concordancia, cuando la glucemia retornó a los valores basales (75 minutos post-inyección), la distribución de tubulina se localizó en forma similar a su patrón original. El análisis de los perfiles de la localización de la fluorescencia interna de las células confirman esta distribución de tubulina (Figura 16B).

Los resultados mostrados indican que tanto *in vivo* como *in vitro*, la glucosa induce la translocación de la tubulina desde la fracción sedimentable a la membrana. Es por ello que existiría una correlación positiva entre el aumento de la glucemia y el incremento de la tubulina asociada a la membrana de los eritrocitos. Asimismo, es importante destacar que bajo las condiciones empleadas, éste es un fenómeno reversible, es decir que cuando los niveles de glucosa en sangre descienden, los eritrocitos retornan a su estado inicial.

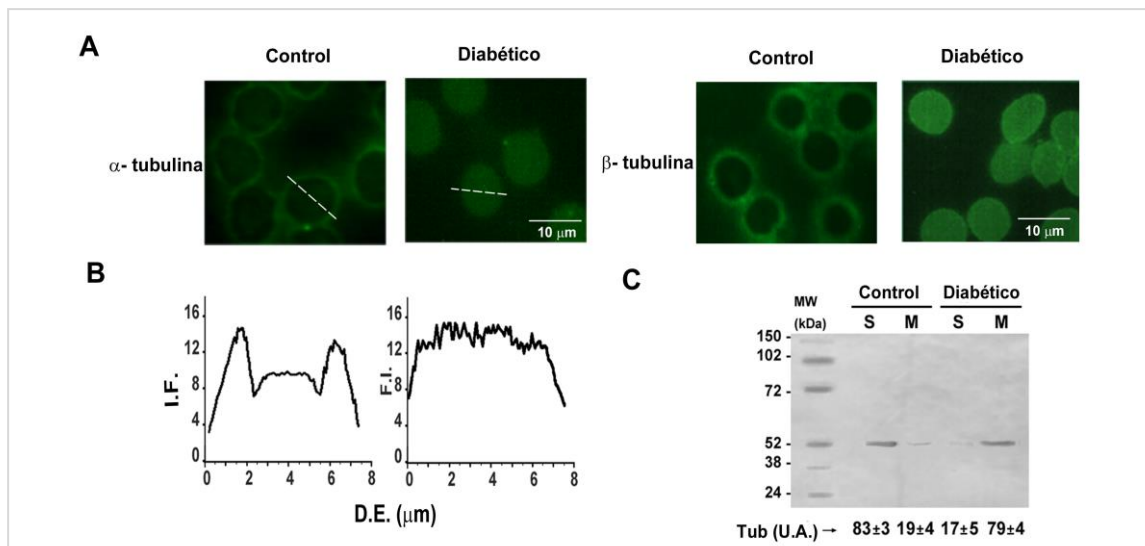


**Figura 16: Efecto de la administración de glucosa *in vivo* sobre la distribución de tubulina en eritrocitos.** Ratas Wistar fueron inyectadas con 30 mM glucosa. Alícuotas de sangre fueron extraídas a los tiempos indicados en la figura. **A.** Los eritrocitos fueron fijados en portaobjetos y analizados por inmunofluorescencia usando el anticuerpo DM1A anti  $\alpha$ -tubulina. **B.** La intensidad de fluorescencia (I.F.) interna fue medida y graficada en función al diámetro del eritrocito (D.E.) utilizando el programa Scion Image. Los datos corresponden a un experimento representativo de tres realizados independientemente.

● **DISTRIBUCIÓN DE TUBULINA EN ERITROCITOS DE INDIVIDUOS DIABÉTICOS**

Como se comprobó anteriormente que la exposición de GR a altas concentraciones de glucosa produce cambios significativos en la distribución de tubulina dentro de la célula, se propuso analizar si en eritrocitos de individuos con DM tipo 2 se observan alteraciones similares. El análisis de la distribución de tubulina en eritrocitos de individuos sanos y con DM mediante inmunofluorescencia empleando los anticuerpos policlonal anti  $\beta$ -tubulina y monoclonal anti  $\alpha$ -tubulina (DM1A), pone en evidencia una alteración en la distribución de tubulina en eritrocitos de individuos diabéticos (Figura 17A y B). En concordancia, se observa una correlación entre los resultados observados luego del tratamiento con glucosa y en eritrocitos de individuos diabéticos, la cual nos permite deducir que la alta glucosa extracelular produce una translocación de tubulina desde la fracción sedimentable hacia la membrana plasmática. El mismo resultado se observó con los dos anticuerpos empleados, es decir tanto para  $\alpha$ - como para  $\beta$ -tubulina. El análisis de los perfiles de la localización de la fluorescencia en el interior de los eritrocitos confirman esta distribución de tubulina (Figura 17B).

La cuantificación del contenido de tubulina en la fracción sedimentable y de membrana de los eritrocitos por inmunoblot, confirma que en individuos diabéticos se observa una disminución en el contenido de tubulina de la fracción sedimentable cercana al 80 % y un aumento de 300 % en la membrana de los glóbulos rojos (Figura 17C).

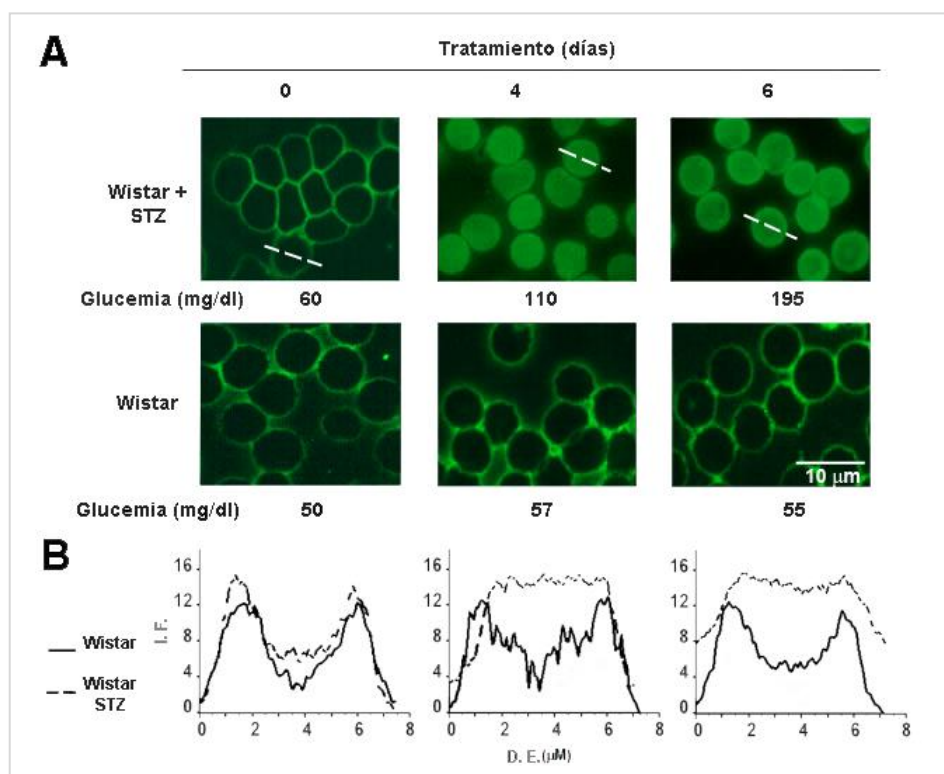


**Figura 17: Distribución de tubulina en eritrocitos humanos de individuos diabéticos.** **A.** Eritrocitos de individuos diabéticos y sanos (Control) fueron fijados en un portaobjetos y analizados por inmunofluorescencia usando DM1A o el anticuerpo policlonal anti  $\beta$ -tubulina. **B.** La intensidad de fluorescencia interna de los eritrocitos (I.F.) fue medida y graficada en función del diámetro del eritrocito (D.E.) utilizando el programa Scion Image. **C.** Las fracciones sedimentable y de membrana de eritrocitos de individuos diabéticos y sanos fueron obtenidas y empleadas para cuantificar  $\alpha$ -tubulina por inmunoblot utilizando el anticuerpo DM1A y manteniendo la misma cantidad de proteínas totales en todos los pocillos sembrados. Las bandas mostradas corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. Las bandas de tubulina fueron cuantificadas usando el programa Scion Image y sus valores, expresados en unidades arbitrarias (U.A.), se muestran debajo de cada banda como el promedio  $\pm$  S.D.

● **DISTRIBUCIÓN DE TUBULINA EN ERITROCITOS DE RATAS DIABÉTICAS**

Los resultados anteriores evidenciaron que los pacientes diabéticos poseen un mayor contenido de tubulina asociada a la membrana y menor en la fracción sedimentable de los eritrocitos, con lo cual este mismo fenómeno debería observarse en ratas con diabetes inducida por STZ. Para llevar a cabo el análisis de esta hipótesis, ratas Wistar de 7 semanas de edad con acceso libre al agua y al alimento, se inyectaron por vía intraperitoneal con una dosis de STZ. Como grupo control se utilizaron ratas del mismo sexo y edad inyectadas con buffer de citrato. Antes del tratamiento (tiempo 0) y a los 4 y 6 días pos-tratamiento se extrajeron muestras de sangre para

determinar la glucemia de los animales y posterior análisis de la distribución de  $\alpha$ -tubulina por inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo DM1A.



**Figura 18: Distribución de tubulina en eritrocitos de ratas con diabetes inducida por STZ.** Ratas Wistar fueron inyectadas con STZ o buffer citrato (control). Alícuotas de sangre fueron extraídas a los días 0, 4 y 6 post-inyección. **A.** Los eritrocitos fueron fijados en portaobjetos y se analizó la distribución de tubulina por inmunofluorescencia empleando el anticuerpo DM1A. **B.** La intensidad de fluorescencia interna de los eritrocitos (I. F.) fue medida y graficada en función del diámetro del eritrocito (D. E.) utilizando el programa Scion Image.

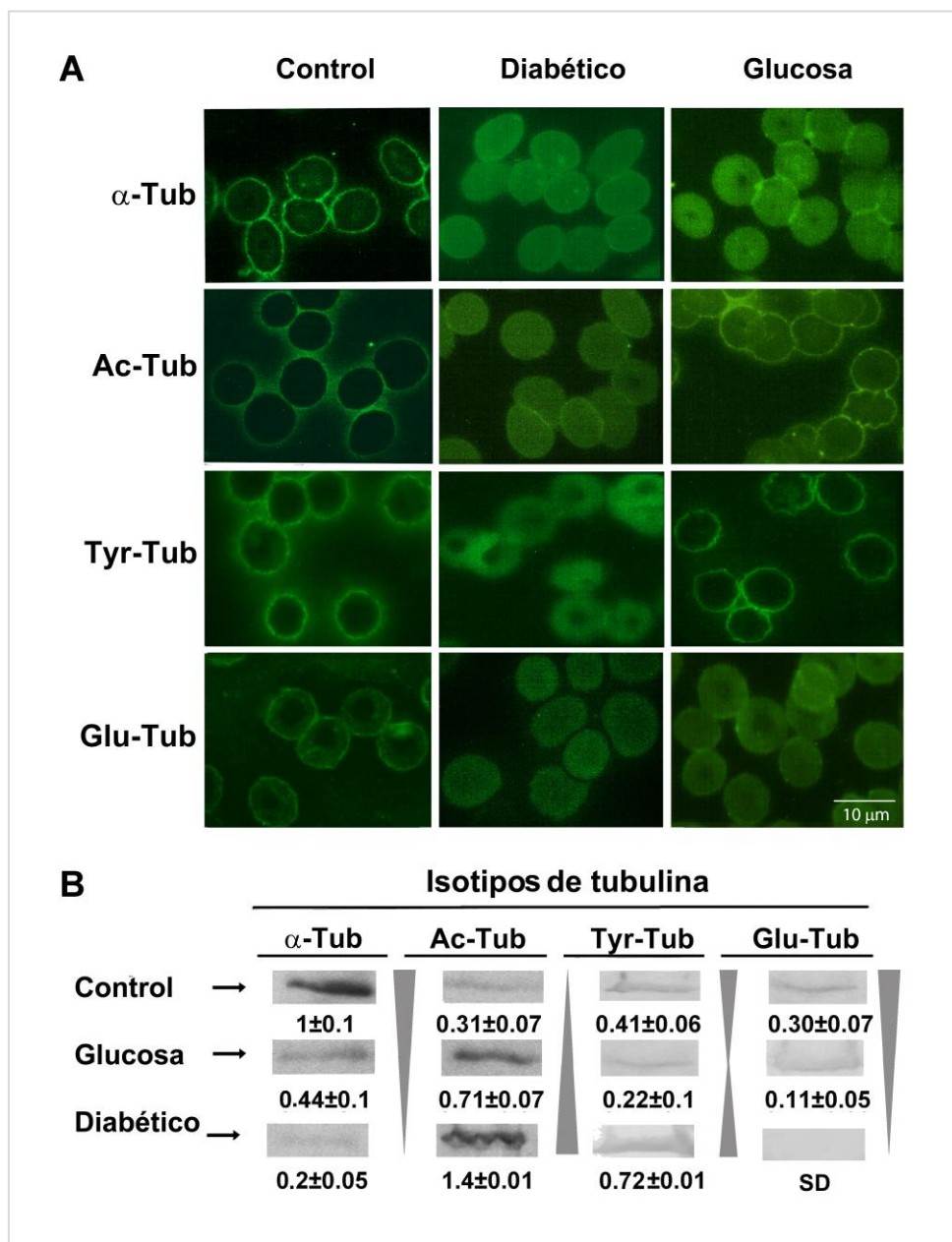
En la figura 18A se puede apreciar claramente que al día 0 los eritrocitos mostraron un delgado anillo fluorescente periférico correspondiente a la presencia de tubulina en la estructura sedimentable. Este patrón de distribución de la fluorescencia se repitió característicamente en todos los extendidos de sangre correspondientes a los animales del grupo control. Sin embargo, en el grupo tratado, a partir de los 4 días posteriores al tratamiento con STZ, la fluorescencia se distribuyó uniformemente sobre las células sugiriendo que la inducción de diabetes produce la relocalización de la tubulina en la membrana del eritrocito. Como se puede observar en el panel B de la figura 18, tanto el contenido como la distribución de tubulina al día 0 son prácticamente idénticos entre los dos grupos. Sin embargo, esta situación cambia a partir del cuarto día, ya que se observa una localización de tubulina típica de membrana. Es destacable que tanto en eritrocitos de humanos diabéticos como en aquellos provenientes de ratas con DM inducida se produce la traslocación de tubulina hacia la membrana plasmática.

● **ISOTIPOS DE TUBULINA Y SU DISTRIBUCIÓN EN ERITROCITOS HUMANOS DIABÉTICOS Y TRATADOS CON GLUCOSA**

Se ha demostrado que los eritrocitos presentan diferentes isotipos de tubulina, los cuales se distribuyen en forma diferencial en las distintas fracciones subcelulares. Adicionalmente, se conoce que esta distribución varía en diferentes patologías, tubulina acetilada (Ac-tub), tirosinada (Tyr-tub) y detirosinada (Glu-tub) aumentan en la membrana de eritrocitos de pacientes hipertensos (Amáiden y col., 2011; 2015), mientras que Ac-tub se ve incrementada en la membrana de glóbulos rojos de individuos diabéticos (Rivelli y col., 2012). Por este motivo, se propuso caracterizar por inmunoblot la localización de Ac-tub, Tyr-tub y Glu-tub en eritrocitos de individuos diabéticos y tratados con glucosa. Como control se analizó el contenido de estas mismas isoformas de tubulina en eritrocitos de individuos sanos (5 mM glucosa).

La cuantificación por inmunoblot del contenido de los diferentes isotipos de tubulina en la fracción sedimentable de los eritrocitos se muestra en la figura 19B, se observa una importante disminución de  $\alpha$ -tubulina en eritrocitos tratados con glucosa y diabéticos (coincidentemente con las figuras 15 y 17). En glóbulos rojos expuestos a glucosa,  $\alpha$ -tubulina disminuye un 56 %, sin embargo, a pesar del bajo contenido de tubulina, Ac-tub aumenta aproximadamente 2 veces, mientras que Tyr-tub y Glu-tub disminuyen aproximadamente 50 % y 63 % respectivamente. Por otra parte en eritrocitos de pacientes diabéticos,  $\alpha$ -tubulina disminuye un 80 %, mientras que se observa un incremento de casi 5 veces en Ac-tub y 2 en Tyr-tub, junto a un descenso de hasta niveles indetectables para Glu-tub. Es importante destacar el enriquecimiento de Ac-tub en la fracción sedimentable bajo estas dos situaciones lo que implicaría un estado de hiperacetilación de tubulina en estos eritrocitos.

La visualización de la inmunofluorescencia brinda mayor información sobre la composición integral de las células para cada isotipo de tubulina (Figura 19A). De esta forma es posible visualizar claramente el aumento de tubulina total en la membrana de glóbulos rojos en ambos casos y la participación de Ac-tub y Glu-tub en este enriquecimiento.



**Figura 19: Distribución de isotipos de tubulina en eritrocitos humanos tratados con glucosa o de individuos con diabetes.** **A.** Eritrocitos de individuos sanos tratados con 30 mM glucosa o de individuos diabéticos fueron fijados en portaobjetos y se analizó por inmunofluorescencia la distribución de los diferentes isotipos de tubulina mencionados en la figura utilizando anticuerpos específicos. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de tres realizados independientemente. **B.** La fracción sedimentable de tubulina fue obtenida a partir de eritrocitos humanos de individuos sanos (control) o incubados con glucosa y de individuos diabéticos. Una alícuota fue empleada para cuantificar por inmunoblot  $\alpha$ -tubulina, y cada isotipo, manteniendo la misma cantidad de proteínas totales en todos los pocillos sembrados. Las bandas de tubulina fueron cuantificadas usando el programa Scion Image. Los valores  $\alpha$ -tubulina fueron referidos al del control, mientras que los valores de los isotipos se muestran como la relación entre el valor obtenido para cada isotipo sobre el obtenido para la tubulina total en cada caso.

- **CAPACIDAD DE ACETILACIÓN/DEACETILACIÓN DE TUBULINA EN ERITROCITOS TRATADOS CON GLUCOSA O DE INDIVIDUOS DIABÉTICOS**

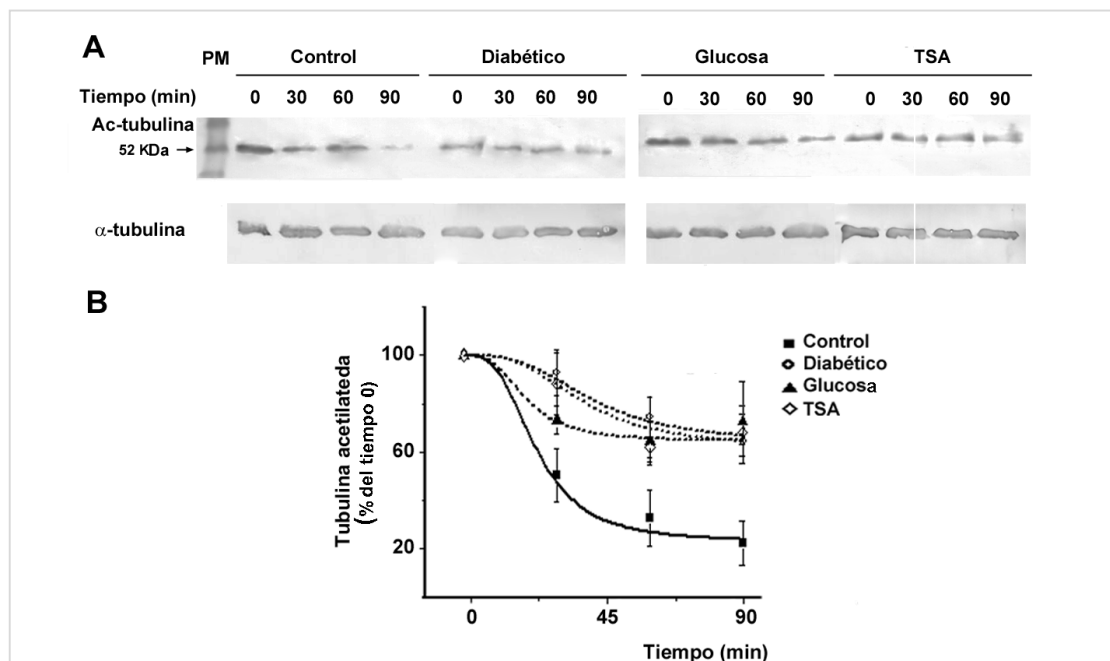
La hiperacetilación de tubulina es un estado dado por un marcado incremento en la expresión de la tubulina acetilada (Bonet-Ponce y col., 2015). Este fenómeno se ha reportado mediante inactivación genética de HDAC6, por tratamiento con inhibidores de HDAC (Geeraert y col., 2010), tratamiento con taxol, ante autofagia (Bonet-Ponce y col., 2015), estrés oxidativo (Mackeh y col., 2014) y apoptosis (Catley y col., 2006). Sobre la base de los resultados expuestos en la figura 19, es importante destacar la hiperacetilación observada tanto en la fracción sedimentable como en la membrana de eritrocitos humanos de individuos diabéticos y sanos tratados con glucosa.

El aumento en los niveles de Ac-tub en eritrocitos sometidos a alta concentración de glucosa sugirió una alteración en el equilibrio del mecanismo responsable de la acetilación/deacetilación de la tubulina. Con el objetivo de analizar este fenómeno de hiperacetilación, se evaluó la capacidad de acetilación/deacetilación de las enzimas presentes en el citosol de eritrocitos de individuos sanos sin tratamiento (control), tratados con glucosa y de individuos diabéticos. Para ello, la fracción citosólica de los eritrocitos fue incubada a 37 °C con tubulina purificada de cerebro de rata y a los tiempos indicados en la figura 20 se analizó el contenido de Ac-tub y  $\alpha$ -tubulina por inmunoblot.

En los eritrocitos controles, el contenido de Ac-tub disminuyó en función al tiempo de incubación, en relación con el valor del tiempo inicial (0 min), la acetilación se redujo aproximadamente un 50 % a los 30 min y alcanzó su valor mínimo cercano al 20 %, luego de 90 min de incubación (Figura 20). En los glóbulos rojos de individuos diabéticos o tratados con glucosa, el contenido de Ac-tub también disminuyó pero en menor medida en comparación a los controles. Para estos dos grupos, los valores mínimos fueron de 60 % y 70 % respectivamente en comparación al valor basal. Estos hallazgos demuestran que la capacidad de acetilación de los eritrocitos controles es menor a la de los tratados o que tienen una mayor capacidad de deacetilación, sugiriendo que la actividad de las enzimas que participan en esta modificación postraduccional (acetilasas y/o desacetilasa) son afectadas por la glucosa.

Con el objetivo de determinar si la glucosa induce inhibición de la actividad de deacetilasas, el experimento anterior se repitió con eritrocitos tratados con tricostatina A (TSA), un inhibidor de la histona deacetilasa 6 (HDAC6), la enzima responsable de la desacetilación de tubulina. Bajo estas condiciones la disminución de la Ac-tub fue similar a la observada para eritrocitos de individuos diabéticos o tratados con glucosa, lo cual sugiere que los tratamientos evaluados

inhiben la actividad de las enzimas deacetilasas dando lugar a la hiperacetilación observada en la figura 19. Estos resultados no nos permiten descartar que la glucosa afecte también la actividad de enzimas acetilasas o modifique de alguna manera la disponibilidad de sus sustratos.



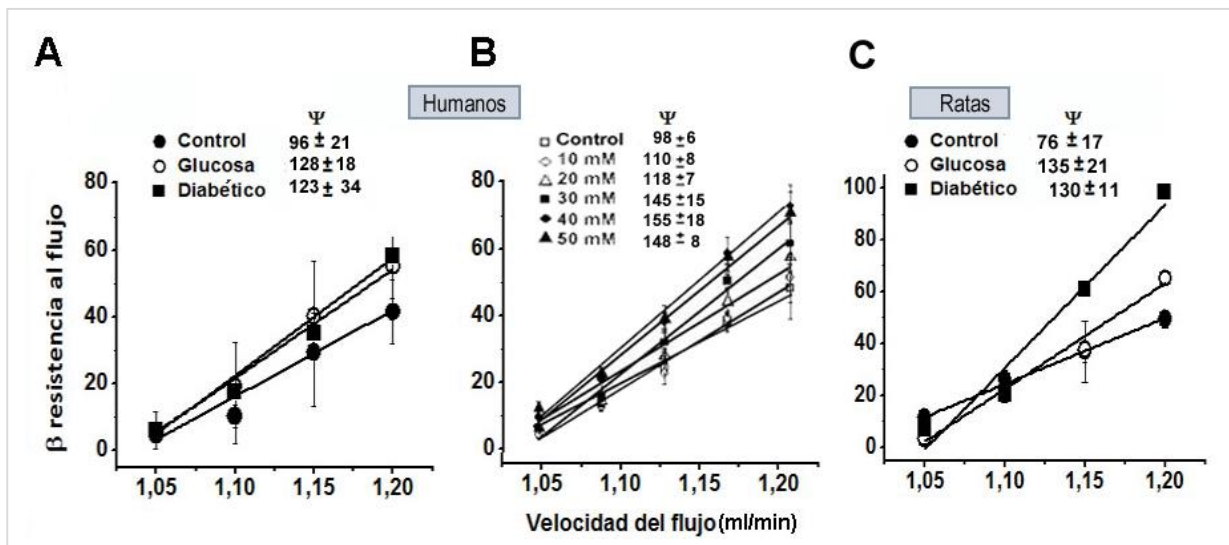
**Figura 20: Capacidad de acetilación/deacetilación de los eritrocitos.** Las fracciones citosólicas de eritrocitos controles, tratados con glucosa 30 mM durante 3 h, con TSA 5  $\mu$ M durante 3 h (control positivo de inhibición de deacetilación) y de individuos diabéticos, fueron incubadas con tubulina purificada de cerebro de ratas. **A.** Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para analizar por inmunoblot el contenido de Ac-Tub y  $\alpha$ -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes. **B.** Las bandas fueron cuantificadas con el programa Scion Image y los valores (expresados como porcentaje con respecto al tiempo 0 min) fueron graficados en función del tiempo de incubación. Los valores mostrados (media  $\pm$  S.D.) corresponden a tres experimentos independientes.

● **DEFORMABILIDAD DE ERITROCITOS TRATADOS CON GLUCOSA O DE INDIVIDUOS DIABÉTICOS**

La deformabilidad de los eritrocitos es una propiedad esencial para desempeñar su función y asegurar la supervivencia de los mismos en la microcirculación (Pretorius y Kell, 2014). Se ha demostrado que esta característica se ve seriamente alterada en enfermedades como la hipertensión arterial. Resultados recientes de nuestro laboratorio ponen en evidencia la existencia de una correlación negativa entre el aumento del contenido de tubulina en la membrana de eritrocitos y su deformabilidad, es decir que el incremento de tubulina asociada a membrana contribuye a la reducción de la deformabilidad eritrocitaria (Amaiden y col., 2012).



Debido a que los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un cambio en el contenido de tubulina en la membrana de los glóbulos rojos expuestos a altas concentraciones de glucosa y provenientes de individuos con diabetes, se analizó la deformabilidad eritrocitaria bajo estas condiciones tanto en humanos como en ratas. Como control se determinó este parámetro en eritrocitos de individuos sanos sin tratamiento previo. La deformabilidad se midió por el método de filtración a través de filtros de policarbonato con poros de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Mediante esta técnica se obtuvieron los valores  $\beta$  correspondientes a la resistencia a distintos flujos, los cuales describen una recta cuya pendiente se denominó  $\Psi$ .



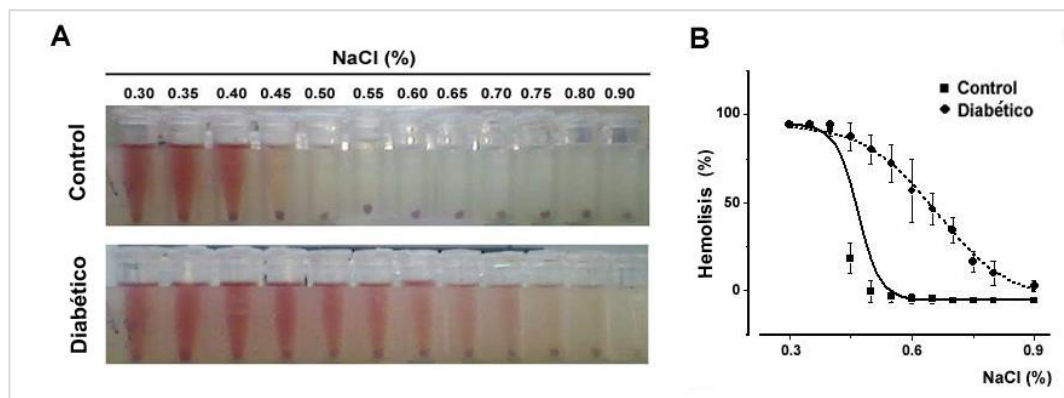
**Figura 21: Deformabilidad de los eritrocitos.** 1 ml de sangre fue lavado y resuspendido en solución fisiológica para luego determinar la resistencia al flujo ( $\beta$ ) y la deformabilidad ( $\Psi$ ) como se describe en Materiales y Métodos. Los valores mostrados son la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se evaluó la deformabilidad de **A.** Eritrocitos humanos de individuos sanos sin tratamiento (control), incubados durante 2 h con 30 mM glucosa (Glucosa) y de individuos diabéticos (Diabético), **B.** Eritrocitos de humanos saludables fueron incubados 2 h con distintas concentraciones de glucosa entre 5 mM (control) y 50 mM. **C.** Eritrocitos de ratas Wistar sin tratamiento (Control), con hiperglucemia inducida por administración intraperitoneal de 30 mM glucosa (Glucosa) y con diabetes inducidas por SZT (Diabético).

Como se puede observar en la figura 21A, la deformabilidad tanto de los glóbulos rojos de individuos diabéticos como los expuestos a glucosa disminuyó 26 % y 35 % respectivamente con respecto al control. Estos datos concuerdan con la hipótesis de que el incremento de tubulina en la membrana afecta sus propiedades intrínsecas y se correlaciona con la disminución de la deformabilidad de dichas células. Además, se demostró que la disminución de la deformabilidad de eritrocitos inducida por glucosa es dependiente de la concentración de glucosa utilizada (Figura 21B). La disminución en este parámetro fue estadísticamente significativa con concentraciones de glucosa igual o mayor a 20 mM y la máxima disminución se observó con 30 mM glucosa.

Para brindar más evidencia que apoye esta conclusión, se midió la deformabilidad de eritrocitos en ratas Wistar bajo las tres condiciones analizadas anteriormente, sin tratamiento (control), con hiperglucemia inducida por la administración intraperitoneal de 30 mM glucosa (glucosa) o con DM inducida por SZT. Coincidentemente con lo observado en humanos, la deformabilidad de los eritrocitos de ratas diabéticas e hiperglucémicas fue significativamente menor, se obtuvieron valores de  $\Psi$  hasta un 80 % mayores a los encontrados para el control (Figura 21C). En conjunto estos resultados indican que la deformabilidad disminuye significativamente en los casos en los cuales aumenta el contenido de tubulina asociada a la membrana eritrocitaria, tal como fue reportado por Amaiden y col. (2012).

- **RESISTENCIA GLOBULAR O FRAGILIDAD OSMÓTICA DE ERITROCITOS TRATADOS CON GLUCOSA O DE INDIVIDUOS DIABÉTICOS**

En ciertos estados patológicos que involucran alteraciones en las proteínas asociadas a membrana, los eritrocitos sufren hemólisis anormal y acelerada, ya que al perder las propiedades características de la membrana, las células presentan mayor fragilidad osmótica (Bogardus y col., 2014). Nuestros antecedentes confirman que la exposición a glucosa y el desarrollo de diabetes afectan numerosas características de la membrana en eritrocitos como la deformabilidad (Figura 21), el contenido de tubulina (Figuras 14-19) y la actividad de distintas enzimas (Rivelli y col., 2012), por lo tanto nos propusimos estudiar la resistencia de los glóbulos rojos al estrés osmótico bajo estas condiciones. Para ello, alícuotas de sangre de individuos sanos y diabéticos fueron incubadas en soluciones hipotónicas de NaCl en un rango de concentración de 0.30-0.90 %. Luego de 15 min de incubación se calculó en cada caso el porcentaje hemólisis y a partir de estos datos la fragilidad corpuscular media (FCM), la cual es la concentración de solución de NaCl que produce el 50 % de hemólisis (Harmening, 2002).

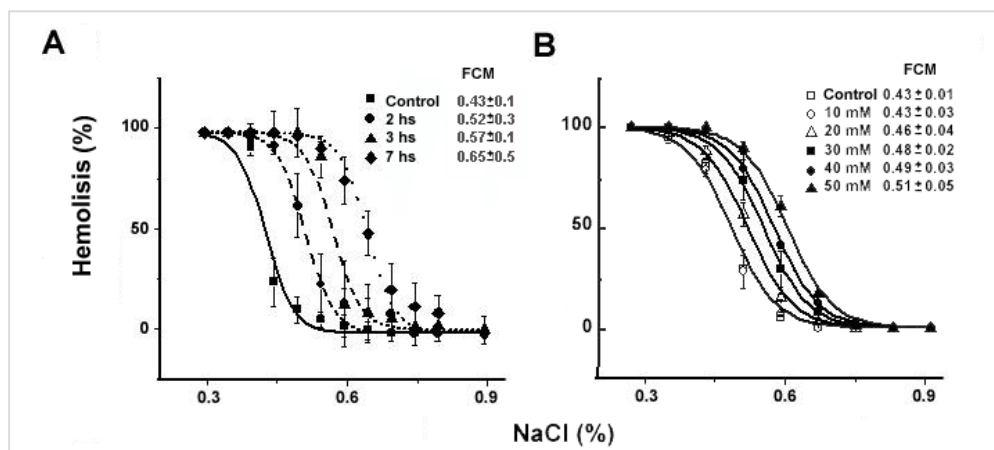


**Figura 22: Fragilidad osmótica de eritrocitos de individuos diabéticos.** Se midió mediante espectrofotometría el porcentaje de hemólisis en individuos diabéticos (n=6) y sanos (n=6) incubados en soluciones hipotónicas de diferentes concentraciones de NaCl. **A.** Imagen representativa de la secuencia de concentraciones de NaCl correspondiente a un experimento representativo de seis independientes **B.** Los porcentajes de hemólisis de cada punto fueron calculados y el promedio  $\pm$  S.D. de los seis experimentos fue graficado en función del % P/V de NaCl.

La figura 22A muestra la serie de soluciones hipotónicas empleadas para evaluar la resistencia globular de los eritrocitos. Es posible distinguir a simple vista el marcado aumento de la fragilidad osmótica eritrocitaria de los individuos diabéticos, ya que en muchos casos presentan hemólisis incluso al incubarlos en solución fisiológica (isotónica), mientras que para los eritrocitos de individuos controles la hemólisis fue evidente con concentraciones menores a 0,6 %. En efecto, la cuantificación del porcentaje de hemólisis muestra que en solución 0,9 % NaCl (isotónica) los eritrocitos de individuos diabéticos presentan una hemólisis cercana al 5 %, alcanzando una FCM de  $0,61 \pm 0,03$  % NaCl en comparación al control cuyo valor es de  $0,43 \pm 0,01$  % (Figura 22B). Estos datos indican que la membrana plasmática de eritrocitos de individuos sanos tiene mayor resistencia al estrés osmótico adaptándose al aumento de agua intracelular, lo cual se correlaciona con su mayor capacidad de deformabilidad reportada anteriormente (Figura 21).

Como se mencionó anteriormente la hiperglucemia es el principal signo de la diabetes, por lo tanto para determinar si las altas concentraciones de glucosa están involucradas en la disminución de la resistencia globular se realizó este mismo ensayo incubando eritrocitos de individuos sanos con glucosa 30 mM durante distintos tiempos. Los resultados muestran que el tratamiento aumenta la fragilidad de los glóbulos rojos al estrés osmótico en forma semejante a lo observado para eritrocitos de individuos diabéticos. Por otro lado, este efecto fue dependiente del tiempo de incubación, ya que la resistencia globular disminuyó progresivamente con el tiempo de exposición a glucosa, los valores de FCM obtenidos para cada tiempo fueron 0,52 %, 0,57 % y 0,65 % a las 2, 3 y 7 h de incubación, respectivamente (Figura 23A). Este último valor fue similar al reportado para eritrocitos de individuos diabéticos. En resumen, al incrementar el tiempo de exposición a glucosa, los eritrocitos alcanzan el 50 % de hemólisis en soluciones cada vez menos hipotónicas,

aumentando su fragilidad osmótica. Se evaluó también la dependencia de esta propiedad a la concentración de glucosa utilizada. La figura 23B muestra que no hay diferencias significativas con el control cuando la dosis de glucosa utilizada fue de 20 mM, por encima de esta concentración el valor de FCM aumenta progresivamente hasta llegar a 0,51 % de NaCl con la incubación con 50 mM glucosa durante 2 h.



**Figura 23: Efecto de glucosa sobre la fragilidad osmótica eritrocitaria.** Se midió mediante espectrofotometría el porcentaje de hemólisis para determinar la resistencia globular de eritrocitos de individuos sanos incubados con **A.** glucosa 30 mM durante los tiempos indicados en la figura. **B.** distintas concentraciones de glucosa durante 2 h. Los valores mostrados corresponden al promedio  $\pm$  S.D. de al menos tres experimentos.

Estos resultados indican que el efecto de glucosa sobre la fragilidad eritrocitaria se encuentra más fuertemente determinado por el tiempo en comparación a la concentración, efecto que es coincidente con la situación patológica de pacientes con DM, ya que generalmente ellos no presentan una hiperglucemia tan alta como las evaluadas en el presente trabajo pero, ante la falta de insulina, la hiperglucemia es prolongada en el tiempo.

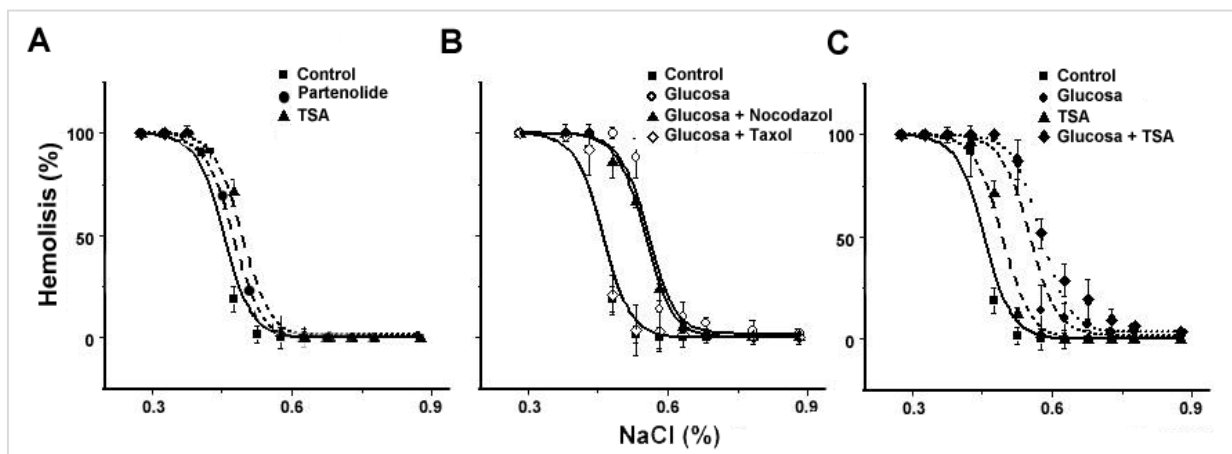
Dado que se produce un incremento de Ac-tub y Glu-tub asociado a la membrana en eritrocitos luego del tratamiento con altas concentraciones de glucosa o el desarrollo de diabetes, se propuso analizar si estos isotipos de tubulina están relacionados a la disminución de la resistencia globular. Para ello, previamente a la medición de la fragilidad osmótica, se modificaron *in vitro* los niveles de Ac-tub y Glu-tub de eritrocitos de individuos sanos. El contenido de Ac-tub fue modificado por el tratamiento con TSA 5  $\mu$ M durante 16 h, un inhibidor de las histonas deacetilasas tipo 6 (HDAC6), enzima responsable de la deacetilación de tubulina, por lo tanto el tratamiento de los glóbulos rojos con TSA produce un aumento en los niveles de Ac-tub (Liu y col., 2015). Por otro lado, se indujo una disminución del contenido de Glu-tub por incubación de los eritrocitos durante 16 h con 20  $\mu$ M partenolide, el cual es un eficiente inhibidor de la enzima

Tubulina Tirosina Carboxipeptidasa (TTCP) (Amaiden y col., 2015). En la figura 24 se puede observar que partenolide no alteró significativamente la resistencia globular, indicando que el aumento de Glu-tub no es suficiente para modificar dicho parámetro. Sin embargo, el tratamiento con TSA produjo un aumento en la fragilidad osmótica, el valor de FCM fue 0,51 % sugiriendo que Ac-tub tiene implicancia sobre la fragilidad osmótica.

Debido a que el efecto de TSA sobre la fragilidad osmótica fue menor que el de glucosa, es posible que además de la modificación en el contenido de un determinado isotipo de tubulina se requiera de otro estímulo dado por la glucosa. Por este motivo se evaluó si el efecto de glucosa sobre la resistencia globular es modificado por el pretratamiento con TSA. La figura 24C muestra que los eritrocitos pre-tratados con TSA e incubados posteriormente durante 3 h con glucosa, presentan un patrón de hemólisis mayor con respecto a aquellos que sólo fueron tratados con glucosa o con TSA, el valor de FCM para este tratamiento fue de  $0,60 \pm 0.005$  %. Este valor y el patrón de hemólisis fueron similares a los observados para glóbulos rojos expuestos durante 7 h a glucosa, sugiriendo que el aumento en la acetilación de tubulina es capaz de incrementar la fragilidad eritrocitaria, pero si hay un estímulo que induzca su translocación a la membrana plasmática, en este caso el aumento del dinamismo polimerización/despolimerización, inducido por la glucosa el efecto es mayor. El pre-tratamiento de los eritrocitos con partenolide, no modificó el efecto de glucosa, lo que confirma que la Glu-tub no estaría involucrada en la disminución de la resistencia globular.

Estos resultados nos indicarían que los el aumento en los niveles de Ac-tub, pero no de Glu-tub, en los glóbulos rojos están directamente involucrados en la alteración de las propiedades de la membrana, afectando la capacidad de la eritrocitos para responder el estrés osmótico.

Finalmente se evaluó el efecto de agentes capaces de afectar el dinamismo de los microtúbulos, para ello los eritrocitos se pre-trataron con taxol o nocodazol y posteriormente se incubaron con glucosa 30 mM. En los eritrocitos pretratados con 10 mM taxol durante 4 h, el tratamiento de la glucosa no redujo la fragilidad, presentando valores similares a los controles (Figura 24B), lo que sugiere que el efecto de la glucosa es dependiente de la presencia de estructuras dinámicas de tubulina o de dímeros. Por otro lado, en las células pretratadas con 50 mM nocodazol durante 4 h para inducir la despolimerización de tubulina, el efecto de la glucosa no se vio alterado (siendo similar en eritrocitos con y sin pretratamiento con nocodazol). Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que el efecto de la glucosa podría estar mediado por dímeros en lugar de estructuras de tubulina polimerizadas o altamente estables.



**Figura 24: Efecto de TSA, partenolide, taxol y nocodazol sobre la fragilidad osmótica eritrocitaria.** Se midió la resistencia globular de eritrocitos de individuos sanos incubados con **A.** TSA 5 $\mu$ M o partenolide 20  $\mu$ M durante 16 h. **B.** Nocodazol 5  $\mu$ M o taxol 10  $\mu$ M + glucosa 3 h. **C.** TSA 5 $\mu$ M, glucosa 30 mM o TSA + glucosa 3 h. Se determinó por espectrofotometría el porcentaje de hemólisis de cada caso y se calcularon los promedios  $\pm$  S.D. de al menos tres experimentos independientes.

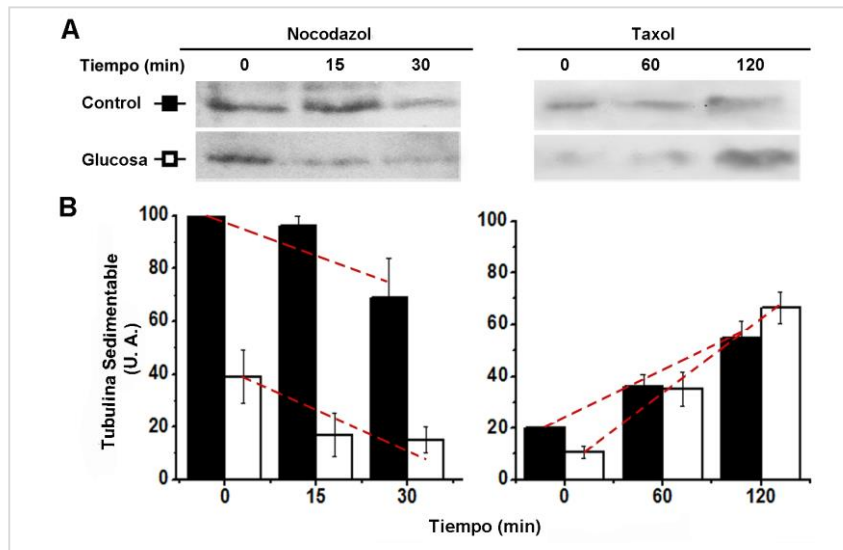
● **EFFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA FRACCIÓN SEDIMENTABLE EN ERITROCITOS HUMANOS.**

Diversos estudios han permitido ampliar el conocimiento de la función de tubulina asociada a la membrana tanto en eritrocitos como en otros tipos de células, en efecto, se ha comprobado que esta proteína interactúa con importantes enzimas integrales de membrana (Bifulco y col., 2002; Carre y col., 2002; Campetelli y col., 2005; Chae y col., 2005; Amaiden y col., 2011; Monesterolo y col., 2012). Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre el papel que desempeña la tubulina en la fracción sedimentable de glóbulos rojos. Debido a las posibles interacciones de esta fracción de tubulina con otros compartimentos celulares, en el presente trabajo se inició el estudio del comportamiento y composición de dicha estructura, con el propósito de comprender su función en los eritrocitos.

Teniendo en cuenta que en esta fracción la tubulina se encuentra en forma polimerizada, se investigó en eritrocitos expuestos previamente a altas concentraciones de glucosa, el efecto de distintos agentes capaces de afectar el dinamismo de los MTs. Para ello, glóbulos rojos de individuos sanos fueron incubados durante 2 h con 5 mM (Control) o 30 mM glucosa (Glucosa) y posteriormente tratados durante distintos tiempos con 5 mM nocodazol (como agente despolimerizante) o 10 mM taxol (como agente estabilizador de MTs). Luego de los tratamientos se extrajo la fracción de tubulina sedimentable de las distintas muestras y se analizó el contenido de  $\alpha$ -tubulina por inmunoblot.

Como se puede observar en la figura 25, en eritrocitos sin tratamiento con glucosa, la fracción sedimentable presentó un comportamiento similar al de los MTs, debido a que el contenido de  $\alpha$ -tubulina disminuyó en función al tiempo de incubación con nocodazol y aumentó proporcionalmente con el tiempo de tratamiento con taxol. El mismo efecto se observó en los eritrocitos tratados previamente con glucosa, sin embargo, en este caso la respuesta de los glóbulos rojos fue más marcada. La disminución del contenido de tubulina en la fracción sedimentable inducida por nocodazol en las células tratadas con glucosa fue del 50 % de tubulina a los 15 min del tratamiento y se mantuvo en el tiempo, mientras que para el grupo control la disminución fue solo del 25 % a los 30 min y no se observaron diferencias significativas en periodos de tiempos más cortos (Figura 25, panel izquierdo). Por otro lado, con el tratamiento con taxol, el aumento en el contenido de tubulina de la fracción sedimentable fue un 20 % mayor en los eritrocitos tratados con glucosa respecto a los eritrocitos del grupo control (Figura 25, panel derecho).

Estos resultados indican que la exposición de eritrocitos a glucosa no sólo promueve la traslocación de la tubulina desde la fracción sedimentable a la membrana, sino que además induce en la fracción sedimentable cambios importantes que conllevan a un mayor dinamismo de esta estructura estimulando tanto la polimerización como su despolimerización.



**Figura 25: Estabilidad de la fracción de tubulina sedimentable en eritrocitos humanos tratados con glucosa.** Sangre humana (6 ml) fue incubada durante 2 h con 5 mM (Control) o 30 mM glucosa (Glucosa) y posteriormente tratados durante distintos tiempos con 5  $\mu$ M nocodazol (panel izquierdo) o 10  $\mu$ M taxol (panel derecho). Luego del tratamiento se extrajo la fracción de tubulina sedimentable como se describe en Materiales y Métodos. **A.** Cada muestra fue empleada para determinar la cantidad de  $\alpha$ -tubulina por inmunoblot utilizando el anticuerpo DM1A. Las bandas corresponden a un experimento representativo de al menos tres repeticiones independientes. **B.** Las bandas de tubulina fueron cuantificadas usando el programa Scion Image y sus valores expresados como unidades arbitrarias (media  $\pm$  S.D.) y graficadas en función del tiempo de incubación con el efector correspondiente.

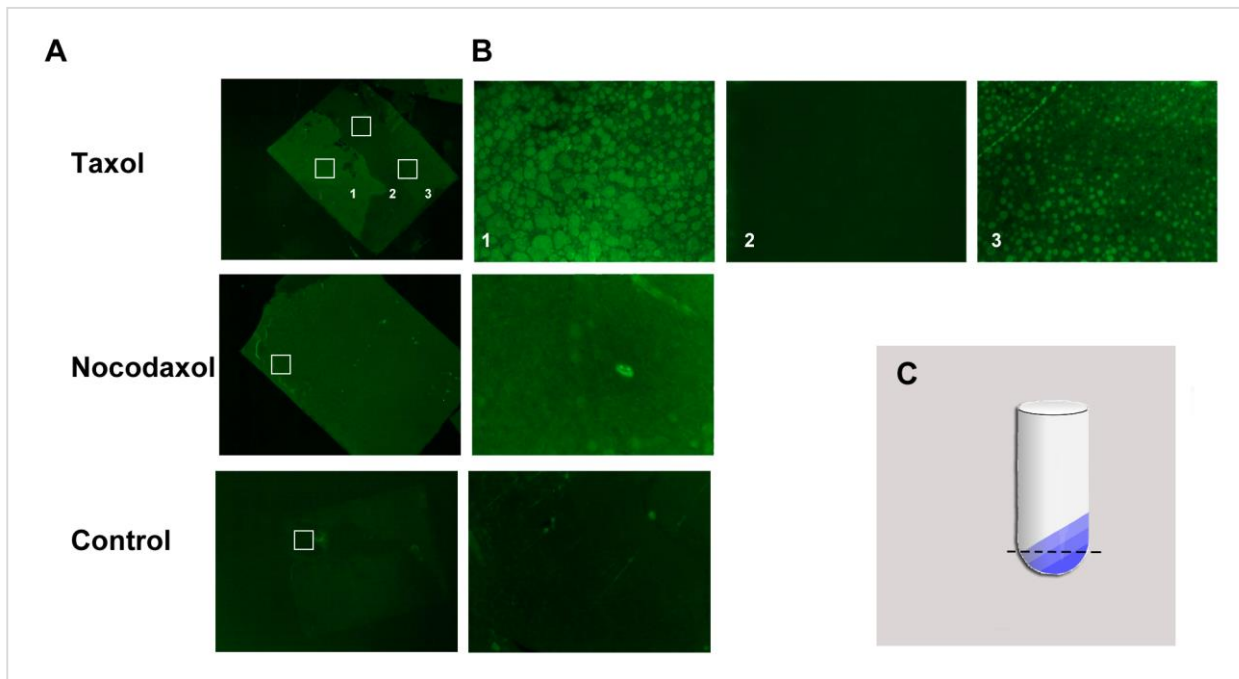
## ● ESTRUCTURA DE FRACCIÓN SEDIMENTABLE DE ERITROCITOS HUMANOS

Sobre la base de los resultados mostrados, surgió la necesidad de tener un mayor conocimiento sobre la estructura, organización y composición de la fracción de tubulina sedimentable de eritrocitos humanos. Para ello, se analizó esta fracción por microscopía electrónica. No fue posible la observación de tubulina en eritrocitos intactos utilizando esta técnica por la alta densidad de hemoglobina citosólica, por lo tanto se aisló la fracción sedimentable para una mejor visualización. Para ello se partió de 16 ml de sangre humana de individuos sanos, de los cuales 8 ml fueron tratados con nocodazol 5 mM durante 1 h y el volumen restante se trató con taxol 10 mM por 1 h para estabilizar las estructuras de tubulina polimerizada. Ambas muestras fueron fijadas e incluidas en una matriz de resina LR-White a partir de la cual se realizaron los cortes. Estos preparados se observaron mediante microscopía de fluorescencia y electrónica.

En primer lugar se analizaron las características generales del preparado para lo cual se observó la distribución y presencia de tubulina por microscopía de fluorescencia empleando el anticuerpo DM1A. El precipitado correspondiente a la fracción sedimentable de eritrocitos tratados con taxol, presentó tres zonas claramente distinguibles bajo el objetivo 10x mientras que el correspondiente al tratamiento con nocodazol es completamente homogéneo, lo cual confirma que esta estructura responde en forma semejante los MTs a las drogas taxol y nocodazol, tal como se mencionó anteriormente. Por lo tanto al mantener condiciones estabilizantes de MTs, las estructuras de tubulina polimerizada del eritrocito se mantienen intactas y sedimentan a 100 000 xg, en concordancia, en condiciones despolimerizantes no se observó ninguna estructura en el precipitado obtenido al aislar la fracción sedimentable (Figura 26A). Como control se incubó uno de los cortes del precipitado de eritrocitos tratados con taxol únicamente con el anticuerpo secundario (es decir en ausencia del anticuerpo primario), de esta manera, se corroboró que la resina en la cual se encuentran inmersos los precipitados no presenta fluorescencia por unión inespecífica al anticuerpo ni autofluorescencia.

Al observar los cortes con mayor aumento (100x), fue posible distinguir en el preparado de eritrocitos taxolados numerosas estructuras organizadas compuestas por un alto contenido de tubulina. Estas estructuras desaparecen al tratar los eritrocitos con nocodazol, sugiriendo que la integridad de las mismas depende de la estructuración de la tubulina (Figura 26B). La figura 26C muestra una representación esquemática del corte del precipitado de tubulina sedimentable, en el cual se puede observar el posible origen de las distintas zonas observadas por una diferencia en la velocidad de sedimentación de cada estructura.



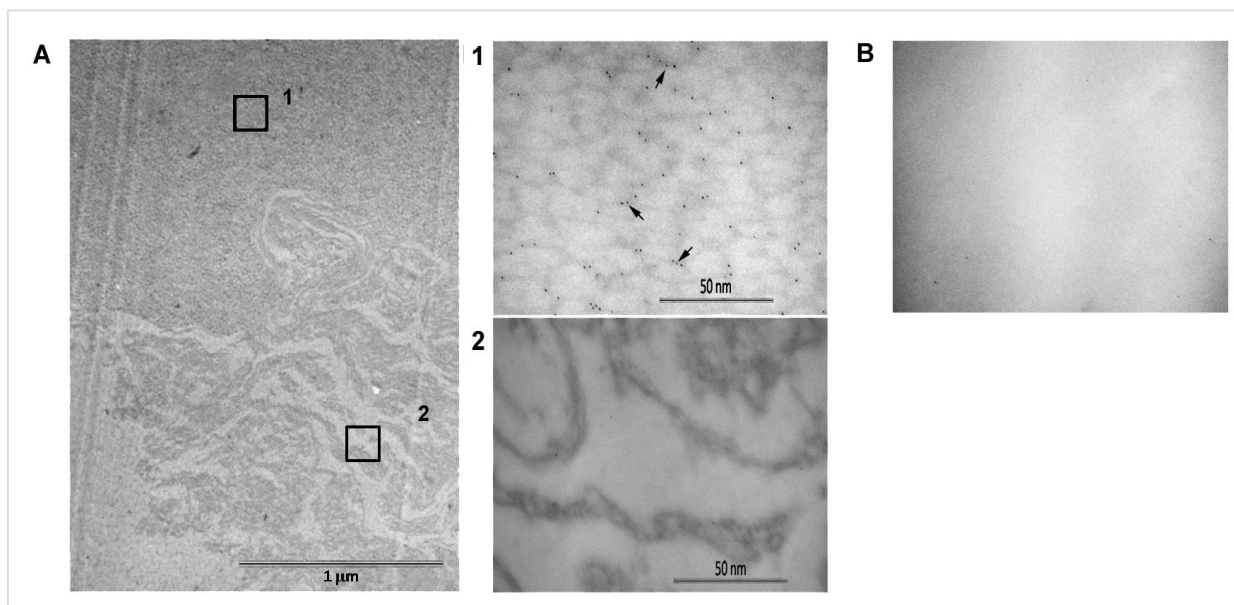


**Figura 26: Microscopía de fluorescencia de la fracción de tubulina sedimentable de eritrocitos humanos.** Se aisló la fracción sedimentable a partir de sangre humana de individuos sanos, una alícuota fue tratada con nocodazol 5 mM durante 1h y otra con taxol 10 mM durante 1h. Ambas alícuotas fueron fijadas e incluidas en una matriz de resina LR-White que fue cortada. Estos preparados fueron analizados por microscopía de fluorescencia empleando el anticuerpo DM1A. Un corte del tratamiento con taxol fue incubado únicamente con el anticuerpo secundario (Control). **A.** Aumento 10X, **B.** Aumento 100X, **C.** Representación esquemática del corte realizado en el precipitado correspondiente a la fracción sedimentable de tubulina.

Estos mismos cortes fueron utilizados para el análisis por inmunohistoquímica usando DM1A como anticuerpo primario e IgG anti-mouse conjugado con oro coloidal de 5 nm como anticuerpo secundario. Estos preparados se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión, la cual fue realizada en el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba.

Mediante este estudio se observó nuevamente la presencia de diferentes zonas bien definidas a lo largo del corte del precipitado formado al aislar la fracción sedimentable de los eritrocitos taxolados (Figura 27A). En la ampliación de la zona 1 de la figura 27A se puede observar una estructura similar a una red con intensa marcación para tubulina (flechas negras). La integridad de esta estructura fue dependiente de tubulina, ya que desapareció cuando los eritrocitos fueron tratados con nocodazol (Figura 27B). Esta sería la fracción que nosotros previamente identificamos por primera vez como fracción sedimentable de tubulina. Por otro lado, en la ampliación de la zona 2 de la figura 27A, se pueden observar estructuras similares a cadenas de espectrina de un diámetro menor al de un MT (25 nm) (Lodish y col., 2005). La marcación de tubulina fue negativa en esta zona.

A pesar de que la fracción sedimentable de tubulina en los eritrocitos no había sido descrita anteriormente, nosotros proponemos que esta red formada por tubulina tendría un papel clave como intermediaria entre el contenido de la tubulina citosólica y el de tubulina unida a las enzimas ATPasas integrales de membrana y sería además muy importante en la regulación de la morfología de los eritrocitos, ya que podría interactuar con otras proteínas integrales de la membrana o del esqueleto de membrana de los eritrocitos, como por ejemplo la espectrina.

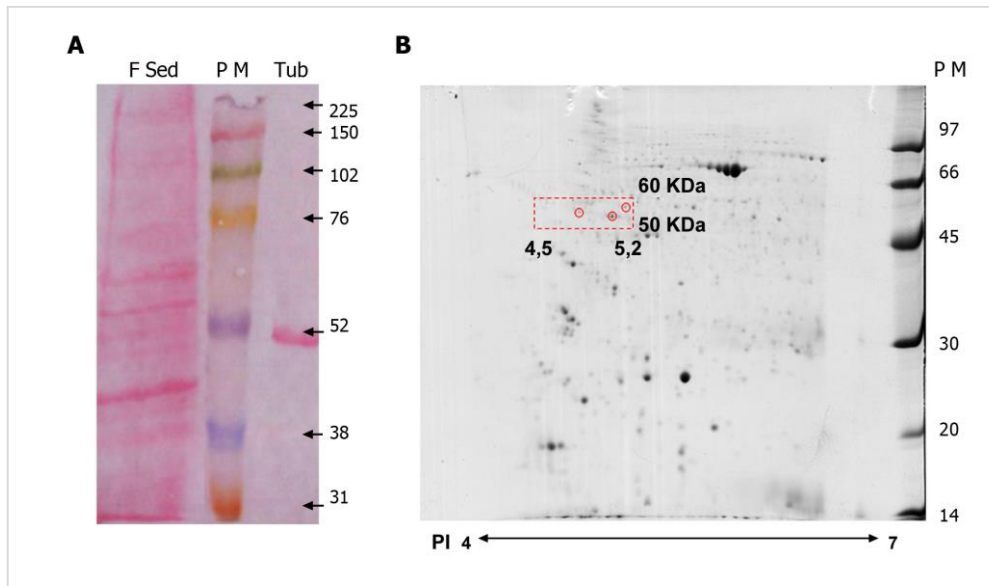


**Figura 27: Microscopía electrónica de transmisión de la fracción de tubulina sedimentable de eritrocitos humanos.** Se aisló la fracción sedimentable a partir de eritrocitos de individuos sanos, la cual fue fijada e incluida en una matriz de resina LR-White para realizar los diferentes cortes. Estos preparados fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión empleando los anticuerpos DM1A e IgG conjugado con oro coloidal de 5 nm. **A.** Los preparados de eritrocitos tratados con taxol 10 mM durante 1h fueron observados bajo el objetivo 4.600x. **1 y 2.** Amplificaciones de 36.000x de las zonas marcadas en A con cuadros negros. Las flechas indican la marca positiva para tubulina. **B.** Amplificación de 36.000x de una zona de marcación negativa correspondiente a eritrocitos tratados con nocodazol 5 mM durante 1h.

### ● INTERACCIÓN ENTRE TUBULINA Y ESPECTRINA

La presencia de diferentes estructuras con distinta marcación para tubulina en la fracción sedimentable de eritrocitos humanos, mostrada anteriormente, sugiere que esta fracción se encuentra constituida por numerosas proteínas. En efecto la tinción con Ponceau de dicha fracción separada por electroforesis revela múltiples proteínas formando parte de esta estructura (Figura 28A). Con el objetivo de realizar un estudio más detallado la Dra. Marina Rafaela Amaiden (integrante de nuestro grupo de investigación), aisló la fracción sedimentable de eritrocitos

humanos para analizarla por electroforesis bidimensional, esta técnica fue llevada a cabo por la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable de la Facultad de Ciencias del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.



**Figura 28: Composición proteica de la fracción sedimentable de eritrocitos humanos.** La fracción sedimentable fue aislada de eritrocitos humanos de un individuo sano y preparada para electroforesis. **A.** Corrida monodimensional, seguida por electrotransferencia y tinción por Ponceau. F Sed: fracción sedimentable, PM: patrón de peso molecular, Tub: Tubulina purificada. **B.** Corrida bidimensional, seguida por tinción de Coomassie y secuenciación por MALDI-TOF de las proteínas marcadas en los spot. Se indica punto isoeléctrico como PI. (Experimento realizado por la Dra. Marina Rafaela Amaiden).

La figura 28B muestra la corrida en dos dimensiones de la fracción sedimentable de eritrocitos y confirma la presencia de múltiples proteínas formando parte de la misma, las proteínas encontradas presentan un amplio rango de peso molecular que va desde 20 a más de 100 kDa y un rango de punto isoeléctrico entre 4 y 7. Debido a que la tubulina tiene un peso molecular de 55 kDa, se secuenciaron las proteínas situadas en los puntos marcados en la figura 28B con el objetivo de identificarlas por mapeo peptídico mediante MALDI-TOF. Ninguna de las bandas analizadas corresponde a tubulina. Este resultado sugiere que la tubulina se encontraría en muy baja proporción en esta fracción subcelular. Sin embargo, este análisis reveló que dos de las bandas analizadas corresponden a “alpha-I spectrin” de *Homo sapiens*, lo cual nos permite especular que podría llegar a establecerse una interacción entre tubulina y espectrina, la cual es una proteína importante del citoesqueleto de los eritrocitos.

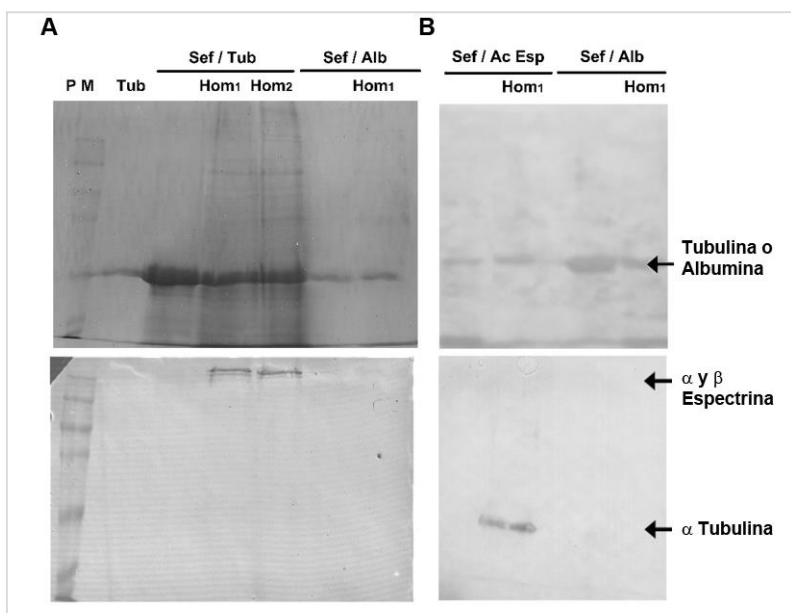
Debido a que la red formada por tubulina en la fracción sedimentable (Figura 27) tendría un papel clave como intermediaria entre el contenido de tubulina citosólica y la membrana (Figuras

15 y 16); y sobre la base de la presencia de espectrina como componente de esta fracción (Figura 28), nos propusimos analizar si la tubulina interactúa con espectrina, como una proteína constituyente del esqueleto interno de la membrana plasmática de eritrocitos.

Para ello, se obtuvieron perlas de sefarosa unidas covalentemente a tubulina purificada de cerebro de rata y se incubaron con homogenato de eritrocitos humanos. Luego, las perlas se lavaron y las muestras fueron preparadas para electroforesis. Como control negativo se utilizaron perlas de sefarosa unidas con albúmina. La figura 29A (panel inferior) muestra que en el homogenato de eritrocitos existe interacción entre tubulina y  $\alpha$  y  $\beta$  espectrina, ya que se observó marca positiva para el anticuerpo anti-espectrina únicamente en aquellas calles que tenían tubulina. En el panel superior, la tinción por Coomassie muestra que la interacción entre las proteínas sería específica, ya que al realizarse el bloqueo de las perlas, con albúmina, no se observó ninguna banda en el gel (calles 6 y 7).

Para confirmar estos resultados, se repitió el experimento, realizando la inmunoprecipitación con perlas de sefarosa unidas covalentemente al anticuerpo anti-espectrina y la posterior incubación con homogenato de eritrocitos. La figura 29B confirma la interacción entre tubulina y espectrina, el panel inferior muestra el inmunoblot revelado con DM1A, corroborando el resultado anterior ya que sólo se detecta tubulina en aquellas calles en las cuales las perlas de sefarosa se encontraban unidas al anticuerpo anti-espectrina. El control de perlas de sefarosa bloqueadas con albúmina fue negativo para tubulina. En el panel superior de la figura 29B, se puede observar la tinción por ponceau, donde nuevamente se destaca la especificidad de la interacción.

Estos resultados indican que tubulina y espectrina interaccionan en eritrocitos humanos ya sea de forma directa o indirecta. Esta interacción podría estar involucrada en la alteración de las propiedades reológicas encontradas en eritrocitos humanos sometidos a altas concentraciones de glucosa o provenientes de individuos con diabetes.



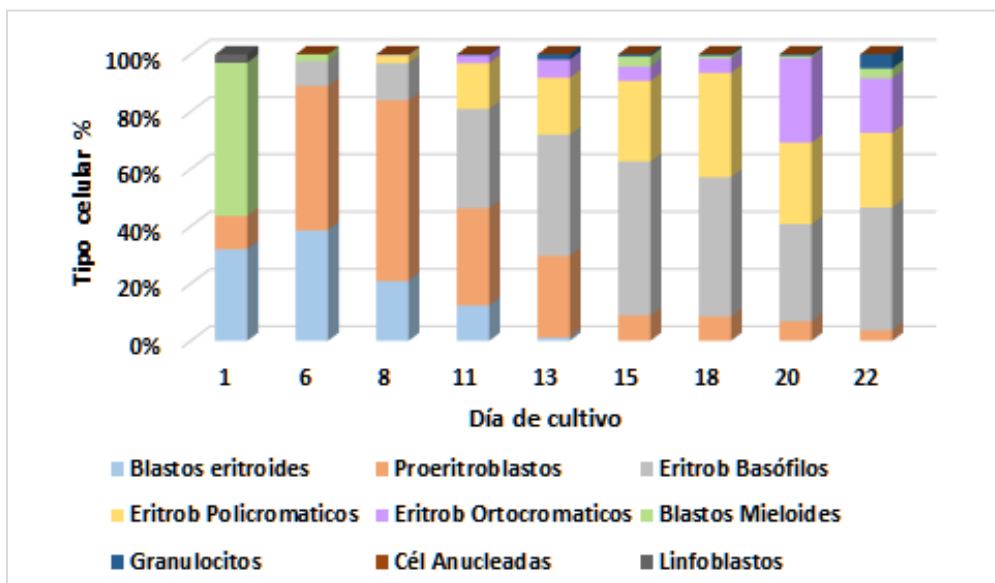
**Figura 29: Interacción entre tubulina y espectrina en eritrocitos humanos.** La inmunoprecipitación fue llevada a cabo utilizando **A.** Perlas de sefarosa unidas covalentemente a tubulina purificada de cerebro de rata e incubadas durante toda la noche con homogenato de eritrocitos humanos de dos individuos (Hom 1 y 2). El panel superior muestra la tinción con Coomassie y el panel inferior el inmunoblot revelado con anticuerpo anti-espectrina. **B.** Perlas de sefarosas unidas covalentemente al anticuerpo anti-espectrina humana se incubaron durante toda la noche con homogenato de eritrocitos humanos (Hom 1). El panel superior muestra la tinción con Ponceau y el panel inferior el inmunoblot revelado con DM1A. PM: patrón de peso molecular, Tub: tubulina purificada, Sef/Tub: perlas de sefarosa unidas a tubulina purificada, Sef/Alb: perlas de sefarosa bloqueadas con albúmina, Sef/Ac Esp: perlas de sefarosa unidas al anticuerpo anti-espectrina.

● **DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES HACIA LINAJE ERITROIDE**

Los resultados mostrados sugieren que la red formada por tubulina en la fracción sedimentable de eritrocitos podría tener un papel clave como intermediaria entre el contenido de la tubulina citosólica y el de tubulina unida a la membrana. Sin embargo, la investigación en eritrocitos humanos impone grandes límites metodológicos: 1- la observación por microscopía es muy limitada debido al gran contenido de hemoglobina en el interior de las células, 2- al tratarse de células carentes de núcleo no es posible inducir ningún tipo de modificaciones en la expresión génica. Por este motivo, se planteó la incorporación de técnicas que nos permitan trabajar con los precursores hematopoyéticos. En este marco se realizó una pasantía en el Laboratorio de células troncales hematopoyéticas del Hospital Oncológico perteneciente al Instituto del Seguro Social Mexicano en México (D.F.) a cargo del Dr. Héctor Mayani Viveros y su equipo de trabajo.

Durante esta pasantía se estudiaron las condiciones necesarias para llevar a cabo el proceso de diferenciación hematopoyética *in vitro* a partir de células madre progenitoras hematopoyéticas

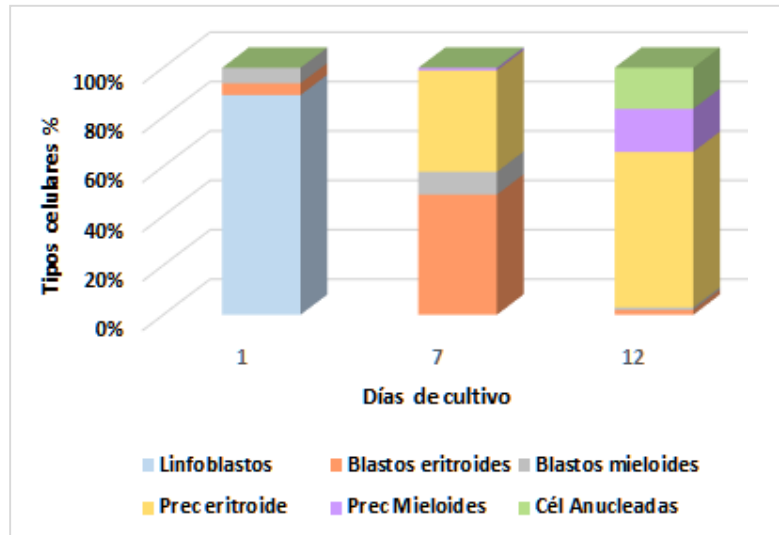
(CPH), que fueron aisladas de sangre de cordón umbilical de embarazos saludables y mantenidas en medio de expansión para células madre (Stem span) durante 22 días. Para inducir la diferenciación hacia el linaje eritroide, el medio fue suplementado con eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), interleucina 3 y 6 (IL3 y IL6), factor de células madre (SCF) y el factor de transcripción FLT3t. Regularmente se cuantificaron los distintos tipos celulares por observación morfológica tras tinción Wright, para identificar el nivel de maduración (Weisenthal, 2011). Como se puede observar en la figura 30, al iniciar el cultivo, la población celular se caracteriza por abundancia de progenitores inmaduros (blastos), principalmente blastos mieloides que se pierden en etapas tempranas del cultivo, mientras los blastos eritroides comienzan a diferenciarse y luego de 15 días se identifican precursores avanzados en la diferenciación (tales como proeritroblastos, eritroblastos basófilos, ortocromatófilos y policromatófilos). Si bien transcurridos 22 días de cultivo se obtiene un alto porcentaje de células diferenciadas, bajo estas condiciones no se produjo enucleación celular. En este momento el cultivo comienza a agotarse por el alto nivel de diferenciación y por ende, la baja autorrenovación.



**Figura 30: Diferenciación de CPH por inducción con EPO, TPO, IL3, IL6, SCF y FLT3t.** Células progenitoras hematopoyéticas CD 34<sup>+</sup>, Linaje<sup>-</sup>, fueron aisladas a partir de sangre de cordón umbilical humano. Posteriormente se las mantuvo en medio de expansión por 22 días, suplementado con EPO, TPO, IL3, IL6, SCF y FLT3t. A los días indicados en la figura, se cuantificaron los distintos tipos celulares por observación de al menos 300 células teñidas con colorante Wright.

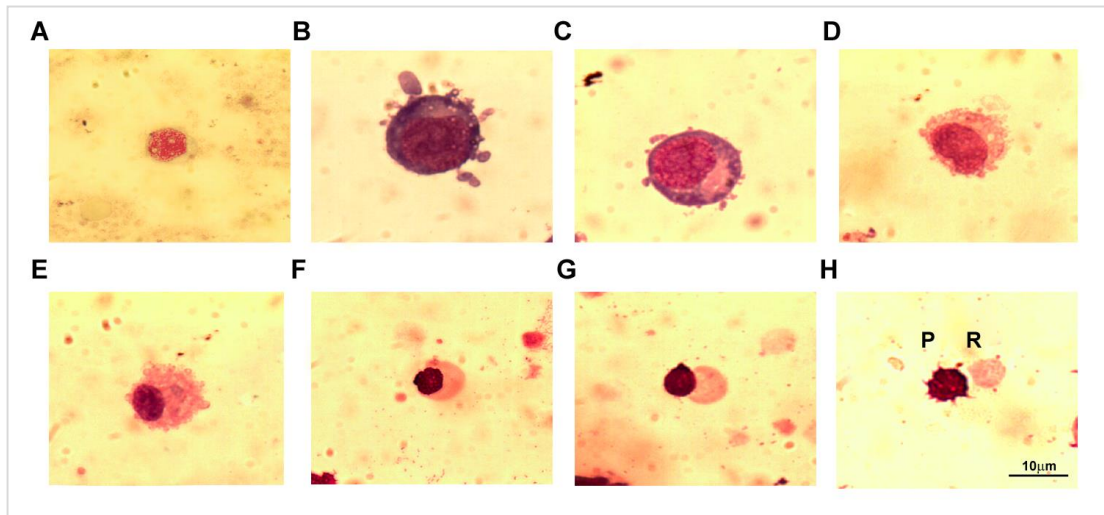
Para inducir la enucleación de los eritroblastos, se propuso llevar a cabo una adaptación del protocolo publicado por Ubukawa y col. (2012). De este modo, luego de ser aisladas las CPH fueron mantenidas en medio LTCM suplementado con EPO, SCF y IL3 durante 7 días y luego en

medio de expansión de células madre suplementado únicamente con EPO hasta los 12 días. Regularmente se cuantificaron los distintos tipos celulares por observación morfológica tras tinción Wright, para identificar el nivel de maduración (Weisenthal, 2011).



**Figura 31: Diferenciación de CPH por inducción con EPO, TPO, IL3 durante 7 días y EPO hasta el día 12.** Células progenitoras hematopoyéticas CD 34<sup>+</sup>, Linaje<sup>-</sup>, fueron aisladas a partir de sangre de cordón umbilical humano. Posteriormente se las mantuvo en medio LTCM durante 7 días, suplementado con EPO, TPO, IL3 y luego en medio de expansión suplementado con EPO hasta el día 12. A los días indicados en la figura se cuantificaron los distintos tipos celulares por observación de al menos 300 células teñidas con colorante Wright.

La figura 31 muestra que la modificación del protocolo fue exitosa debido a que el proceso de diferenciación hacia linaje eritroide avanza en función al tiempo de incubación, obteniéndose a los 12 días un porcentaje de células enucleadas cercano al 20 %. En este momento el cultivo se trasladó a una cámara-cubreobjetos (LabTek recubierta con poli-D-lisina) durante 24 h para estimular la adhesión celular, con lo cual el porcentaje de células en proceso de enucleación ascendió a ~88 % (datos no mostrados en el gráfico). Es de destacar que al día 12 se encuentran numerosos eritoblastos ortocromatófilos e incluso reticulocitos y núcleos excluidos de su célula (Figura 1 y 32).



**Figura 32: Morfología de la serie eritroide.** Células progenitoras hematopoyéticas CD 34<sup>+</sup>, Linaje<sup>-</sup>, fueron aisladas a partir de sangre de cordón umbilical humana y mantenidas en medio LTCM por 7 días, suplementado con EPO, TPO, IL3, luego en medio de expansión suplementado con EPO hasta el día 12. Las microfotografías de los distintos tipos celulares fueron tomadas tras tinción Wright sobre muestras obtenidas a lo largo de los 12 días de cultivo. Se observan **A.** célula madre (CPH), **B.** pro-eritroblasto **C.** eritroblasto basófilo, **D.** eritroblasto policromatófilo, **E.** eritroblasto ortocromatófilo temprano, **F.** y **G.** eritroblasto ortocromatófilo tardío y **H.** pirenocito (P) y reticulocito (R) resultantes del proceso de enucleación.

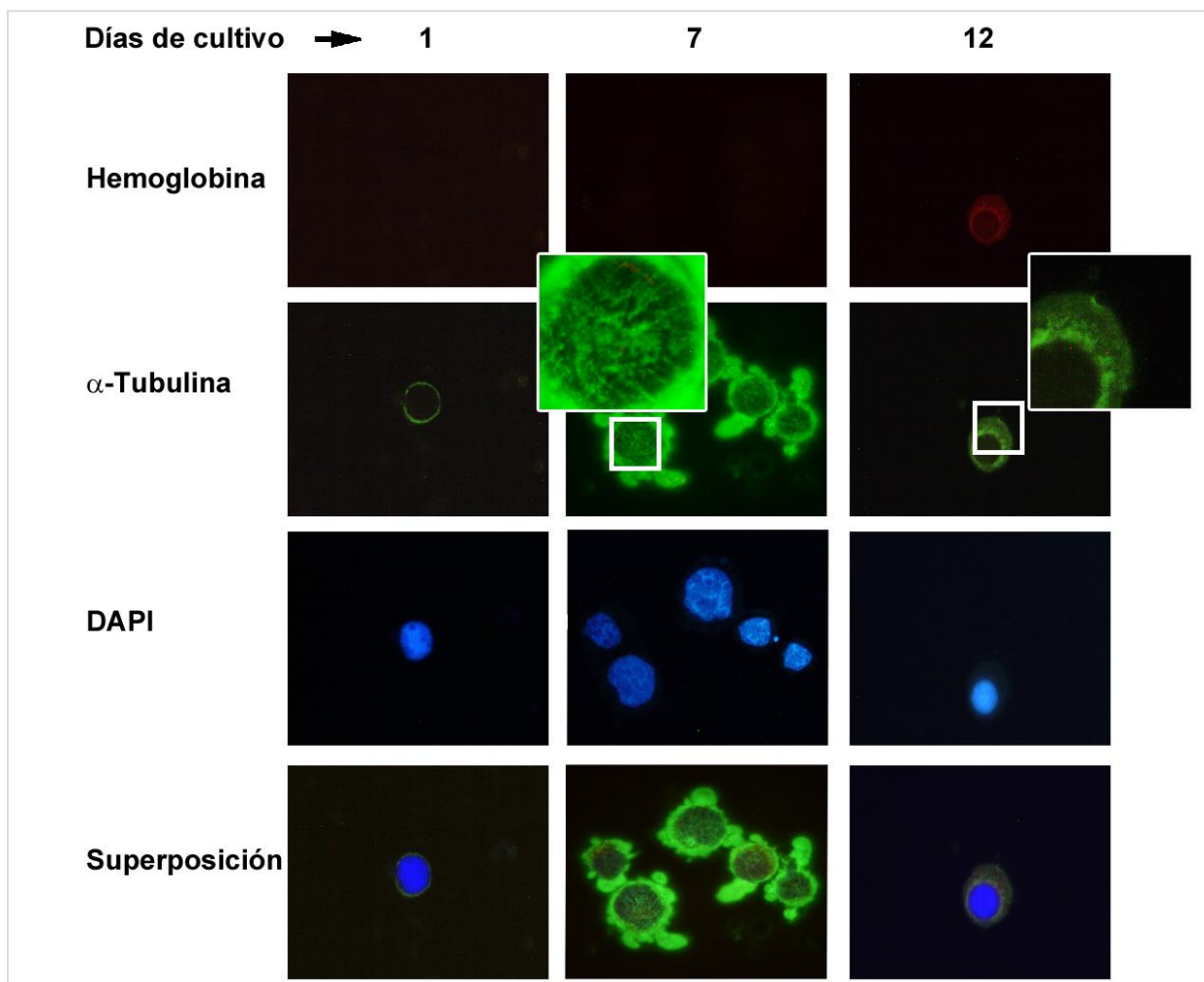
En cada etapa de la diferenciación eritroide se tomaron microfotografías de la morfología observada las cuales son presentadas en la figura 32. Las CPH se identificaron por ser pequeñas y basófilas ya que casi la totalidad de la célula se encuentra ocupada por el núcleo. Luego de transcurridos 7 días de incubación se observan las primeras células eritroides morfológicamente reconocibles, los pro-eritroblastos (Migliaccio, 2010), caracterizados por ser células de gran tamaño (20-30 µm), con núcleo centrado de cromatina laxa y uno o dos nucléolos, el citoplasma es fuertemente basófilo (azul oscuro) por el alto contenido de poliribosomas, una zona perinuclear clara correspondiente al retículo endoplásmico y protuberancias citoplasmáticas (Figura 32B). Los eritroblastos ortocromatófilos que predominan al día 12 de cultivo (Figura 32E-G) poseen un tamaño pequeño (7-10 µm) y presentan núcleos extruídos, excéntricos, intensamente pignóticos, de cromatina homogénea y condensada y citoplasma acidófilo rosado por el aumento de la síntesis de hemoglobina (Manasscero, 2003). En este momento también se identifican los reticulocitos y pirenocitos resultantes de la enucleación (Figura 32H).



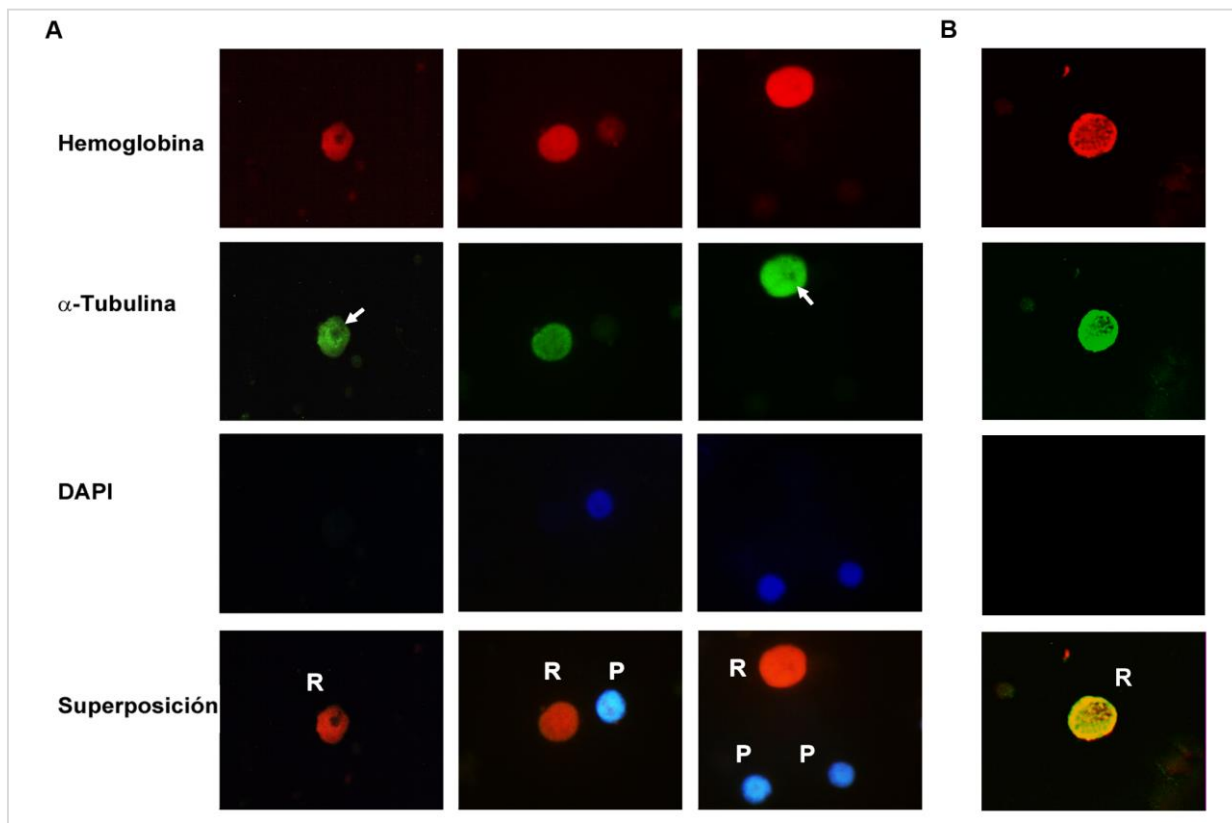
## ● SEGUIMIENTO CRONOLÓGICO DE LA FRACCIÓN DE TUBULINA SEDIMENTABLE

Como se expuso anteriormente, un objetivo importante de esta investigación fue avanzar en el conocimiento de las estructuras subcelulares formadas por tubulina dentro del eritrocito humano. Si bien hemos descrito parcialmente la composición y estructura de la fracción de tubulina sedimentable, no se conoce aún el proceso de reestructuración que la origina luego de la enucleación. Con el objetivo de realizar el seguimiento cronológico de la tubulina a lo largo de la diferenciación hematopoyética y en especial la observación de la modificación a nivel microtubular que se da tras la enucleación, luego de encontrar las condiciones necesarias para inducir la diferenciación de CPH hacia linaje eritroide *in vitro*, se tomaron muestras de distintas etapas de maduración para seguir cronológicamente el desarrollo de la fracción sedimentable.

Para cumplir con este objetivo, células progenitoras hematopoyéticas CD 34<sup>+</sup>, Linaje<sup>-</sup>, fueron aisladas a partir de sangre de cordón umbilical humano y mantenidas en medio LTCM durante 7 días, suplementado con EPO, TPO, IL3 y luego en medio de expansión suplementado con EPO hasta el día 12. Se tomaron muestras a los 1, 7 y 12 días de cultivo que fueron analizadas por microscopía de inmunofluorescencia indirecta. La figura 33 muestra el contenido de hemoglobina (por autofluorescencia en espectro rojo),  $\alpha$ -tubulina (DM1A y Fit-c -verde-), ADN (DAPI -azul-) y la superposición de las tres marcas. En coincidencia con los resultados de la figura 32, mediante este análisis, se puede observar al día 1 un predominio de CPH, en estas células la tubulina forma un delgado anillo periférico al núcleo, ya que estas células son pequeñas, con muy baja actividad y poseen poco citoplasma. Luego de transcurridos 7 días, las células predominantes fueron proeritroblastos muy activos que presentan una red bien definida de microtúbulos (flecha blanca). Al avanzar el proceso de diferenciación, el tamaño celular y nuclear disminuye y los MTs se reestructuran desdibujándose. De este modo, al doceavo día de cultivo, en los proeritroblastos ortocromatófilos tardíos, la tubulina parece localizarse principalmente alrededor del núcleo y se observa un importante incremento en la síntesis de hemoglobina (Figura 33, día 12).



**Figura 33: Seguimiento de la tubulina durante la diferenciación eritroide.** Células progenitoras hematopoyéticas CD 34<sup>+</sup>, Linaje<sup>-</sup>, fueron aisladas a partir de sangre de cordón umbilical humano. Posteriormente se las mantuvo en medio LTCM durante 7 días, suplementado con EPO, TPO, IL3 y luego en medio de expansión suplementado con EPO hasta el día 12. Se tomaron muestras a los días 1, 7 y 12 de cultivo que fueron analizadas por microscopía de inmunofluorescencia indirecta para observar  $\alpha$ -tubulina (verde: DM1A y Fit-c), ADN (azul: DAPI), hemoglobina (rojo: por autofluorescencia) y la superposición de las tres marcas. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.



**Figura 34: Reticulocitos y pironocitos.** Células progenitoras hematopoyéticas CD 34<sup>+</sup>, Linaje<sup>-</sup>, fueron aisladas a partir de sangre de cordón umbilical humano y se mantuvieron en medio LTCM durante 7 días, suplementado con EPO, TPO, IL3 y luego en medio de expansión suplementado con EPO hasta el día 12. Se tomaron muestras al día 12 de cultivo para observar R: reticulocitos y P: pironocitos que fueron analizadas por **A.** Microscopía de fluorescencia, **B.** Microscopia confocal. La inmunofluorescencia indirecta fue realizada para observar  $\alpha$ -tubulina (DM1A y Fit-c), ADN (DAPI), hemoglobina (por autofluorescencia) y la superposición de las tres marcas. Las imágenes son representativas de uno de tres experimentos independientes. Las flechas blancas indican una incipiente concavidad.

La figura 34 muestra la inmunofluorescencia correspondiente a reticulocitos (R) y pironocitos (P) obtenidos el día 12 y 13 (por la incubación en LabTek). Es importante destacar que a diferencia de lo reportado anteriormente por muchos autores, luego de la enucleación la mayor parte de la tubulina, al igual que la hemoglobina, permanece en el reticulocito resultante, localizándose uniformemente en la célula. Por otro lado, el pironocito, núcleo excluido rodeado por parte de la membrana plasmática, no presenta contenido de tubulina ni hemoglobina. Este análisis evidencia un proceso de alto dinamismo en el cual el citoesqueleto sufre una gran reorganización. En algunas de estas microfotografías (indicadas con flecha blanca), se puede visualizar lo que podría ser una incipiente concavidad. Sin embargo, no llega a observarse la estructura sedimentable típica de eritrocitos maduros descrita anteriormente por nuestro grupo (Figura 6), ni la morfología de disco bicóncavo, lo cual sugiere la falta de maduración del reticulocito a eritrocito.

Por otro lado, es importante destacar que hasta el momento numerosos autores han investigado sobre la organización microtubular particular que se desarrolla al momento de la enucleación (Konstantinidis y col., 2012; Palis, 2012; Kalfa y Zheng, 2014), sin embargo no se ha estudiado la distribución de tubulina una vez culminado este proceso. Finalmente, como se puede observar en la figura 34B, mediante microscopía confocal, se comprobó que: 1- el reticulocito resultante de la enucleación mantiene presente la tubulina intracelular, 2- los MTs presentes en la última etapa se desorganizan y desaparecen y 3- la tubulina presente en la célula resultante se distribuye citosólicamente. Esta tubulina sería la que luego se distribuye en las tres fracciones observadas en eritrocitos maduros.



## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

Nuestros estudios anteriores mostraron que la tubulina en eritrocitos humanos se distribuye en tres fracciones operacionalmente distinguibles: membrana, citosólica, y la fracción sedimentable (Amaiden y col., 2011). Los resultados del presente estudio indican que esta redistribución se encuentra alterada en los eritrocitos de individuos diabéticos y que dicha alteración se debe a la concentración de glucosa elevada, que induce la translocación de la tubulina de la fracción sedimentable hacia la membrana plasmática. Esta conclusión se basa en dos observaciones: **1.** La tubulina se localiza principalmente en la membrana de eritrocitos de individuos diabéticos, y en la fracción sedimentable en eritrocitos controles (Figura 17). La inducción de la diabetes por STZ indujo la translocación de la tubulina de la fracción sedimentable a la fracción de membrana (Figura 18). **2.** La redistribución de la tubulina descrita también se observó en eritrocitos humanos tratados con alta concentración de glucosa (Figuras 14 y 15) y en ratas hiperglucémicas (Figura 16). Estos hallazgos sugieren que la glucosa activa un mecanismo que conduce a la migración de tubulina hacia la membrana, similar a nuestras observaciones anteriores en células COS y CAD (Rivelli y col., 2012).

Aunque el mecanismo de migración de tubulina sigue siendo poco claro, esta proteína debe encontrarse acetilada para asociarse a la membrana (Santander y col., 2006; Zampar y col., 2009). En el presente estudio, se demuestra que la glucosa no sólo induce la translocación de tubulina, sino que afecta también el equilibrio entre los tres isotipos estudiados, en particular en lo que respecta a la acetilación, la cual es promovida mediante la inhibición de la deacetilación de tubulina *in vitro*, de manera similar a lo ocurrido en eritrocitos tratados con TSA (Figura 20). En los glóbulos rojos de individuos diabéticos y controles tratados con glucosa, aumenta el contenido total de tubulina en la membrana debido principalmente a los isotipos Ac-tub y Glu-tub. Bajo estas condiciones, la tubulina localizada en ambas fracciones se encuentra hiperacetilada (Figura 19).

La acetilación de proteínas es una importante modificación postraducciona involucrada en la regulación de numerosos eventos celulares (Kouzarides, 2000; Polevoda y Sherman, 2002; Xiong y Guan, 2012), incluyendo la respuesta celular a la alta concentración de glucosa (Kosanam y col., 2014; Lin y col., 2014; Liu y col., 2014). Zhao y col. (2010) informaron que la acetilación de lisina es una modificación que ocurre con frecuencia en enzimas que catalizan el metabolismo intermedio y modula las vías metabólicas que implican esas enzimas. La acetilación de proteínas mediada por glucosa se debe a la inhibición de histonas, como las histonas deacetilasas (Lin y col., 2014) y las sirtuinas (Chalkiadaki y Guarente, 2012). En el presente estudio, las altas concentraciones de glucosa alteran el equilibrio acetilación/deacetilación en células con baja actividad deacetilasa, lo que sugiere que la glucosa inhibe la actividad desacetilasa y por

consiguiente promueve la acetilación de la tubulina (Figura 19). Este proceso parece funcionar como señal que promueve la migración de la tubulina a la membrana de los eritrocitos.

En este sentido, Skoge y col. (2014), demostraron que los niveles de NAD celular están implicados en el estado de acetilación de tubulina, dado que el agotamiento de la coenzima induce la hiperacetilación de  $\alpha$ -tubulina, proceso reversible al aumentar el nivel de NAD disponible en la célula. Es importante mencionar que con una alta concentración de glucosa se ponen en marcha en los eritrocitos numerosas vías que indirectamente consumen NAD, entre ellas la vía de Embden-Meyerhof, de la hemoglobina reductasa y diferentes reacciones redox.

La migración de Ac-tub a la membrana desencadena varios eventos fisiológicos que afectan tanto actividades enzimáticas como las propiedades reológicas de las células. Una serie de estudios anteriores de nuestro laboratorio demostraron que Ac-tub forma complejos con  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa,  $\text{H}^+$ -ATPasa y  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, dando lugar a la inhibición de la actividad de dichas ATPasas tanto *in vivo* como *in vitro* (Casale y col., 2001; 2003; 2005; Santander y col., 2006; Monesterolo y col., 2008; Zampar y col., 2009; Campetelli y col., 2013). Hemos demostrado recientemente que el ciclo de detirosinación/tirosinación de tubulina participa en la regulación de la actividad NKA y que Glu-tub en la membrana ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de dicha enzima (Amaiden y col., 2015). Los presentes resultados indican que el nivel de Glu-tub en la membrana es mayor en los eritrocitos de individuos diabéticos y controles expuestos a glucosa. Este aumento también podría estar involucrado en la regulación de la actividad de NKA.

Los niveles elevados de Ac-tub en la membrana eritrocitaria alteran la deformabilidad y fragilidad osmótica de las células. En concordancia, el aumento de tubulina asociada a la membrana en los eritrocitos de humanos y ratas se correlaciona con una deformabilidad reducida (Amaiden y col., 2011; 2012). En el presente estudio, se observaron asociaciones entre el alto nivel de glucosa, el contenido de tubulina asociada a la membrana, la fragilidad osmótica y la deformabilidad eritrocitaria. Si bien no es posible concluir que la acumulación de tubulina en la membrana es la causa molecular de la reducción de la deformabilidad, es de destacar que los valores del parámetro  $\Psi$  al medir la deformabilidad en los eritrocitos humanos y de rata son alterados por cambios en el contenido de tubulina de membrana inducidos por el tratamiento de alta glucosa o diabetes. Mayor contenido de tubulina en esta fracción, se asoció con un mayor valor  $\Psi$  y en consecuencia inferior deformabilidad (Figura 21). El mismo fenómeno se observó en sujetos hipertensos (Amaiden y col., 2012). La disminución de la deformabilidad en los eritrocitos diabéticos ha sido reportada por otros grupos (Schwartz y col., 1991; Shin y col., 2007; Manno y col., 2010; Richards y Nwose, 2010; Berndt-Zipfel y col., 2013). Se cree generalmente que la deformabilidad eritrocitaria es determinada principalmente por factores geométricos tales como

el volumen corpuscular, la forma y la viscosidad interna (como se refleja por el contenido de hemoglobina) y por propiedades de la membrana (Ariyoshi y col., 2010). Ballas y col. (1984) concluyeron que la deformabilidad reducida es el resultado de alteraciones en la composición lipídica de membrana, la actividad enzimática NKA y captación de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Por otro lado, Gyawali y col. (2012; 2015) propusieron que las proteínas de membrana (por ejemplo, espectrina, ankyrina, proteínas 4,2) son más fuertemente glicosiladas en los eritrocitos de pacientes diabéticos.

Los presentes resultados indican que la reducción en la deformabilidad de los eritrocitos se correlaciona al mayor contenido de tubulina en la fracción de membrana, sin embargo, la participación de otros factores como el aumento de ATP, modificaciones lipídicas o glicosilación de otras proteínas no se pueden descartar. Es posible que este aumento se asocie con cambios en la deformabilidad en otros estados patológicos, de hecho, nuestros estudios recientes muestran que esta relación se observa también en sujetos hipertensos (Amaiden y col., 2015). La reducción de la deformabilidad eritrocitaria también se ha informado en pacientes con dislipidemia, la cual es una patología donde se observan alteraciones del metabolismo de lípidos que provoca concentraciones anormales de lípidos y lipoproteínas en la sangre (Uydy y col., 2012, Karbiner y col., 2013). Por otro lado, se observó recientemente que el tratamiento de eritrocitos humanos con diacilglicerol incrementa el contenido de tubulina en la membrana (Monesterolo y col., 2015). Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que el contenido lipídico alterado en pacientes con dislipidemia puede no ser la causa directa de la reducción de la deformabilidad eritrocitaria, pero ambos procesos pueden estar relacionados.

Los niveles de Ac-tub de la membrana están claramente relacionados con la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos. En el presente estudio, la curva de fragilidad fue sigmoideal (en forma de S) para eritrocitos de individuos sanos, pero casi lineal para eritrocitos de diabéticos (Figura 22). Hamidi y col. (2001) informaron resultados similares para los eritrocitos cargados con fármacos. La población de glóbulos rojos de diabéticos es evidentemente más heterogénea que la población de eritrocitos control en términos de resistencia de la membrana a los cambios en la presión osmótica externa. El aumento en la fragilidad osmótica eritrocitaria se ha observado en varios estudios de síndrome metabólico (que incluyen la hipertensión y la diabetes), y dicho incremento se asocia con el cambio en la forma de la curva de hemólisis. Además del aumento de la fragilidad osmótica, los síndromes metabólicos a menudo implican la transformación morfológica, la consiguiente reducción de la deformabilidad de los eritrocitos y la fluidez de la membrana (Gyawali y Richards, 2014; 2015). En el presente estudio, se observó una correlación entre el grado de resistencia al estrés osmótico, la duración de la exposición y la concentración de glucosa (Figura 23). La fragilidad osmótica fue promovida por la acetilación de la tubulina y el

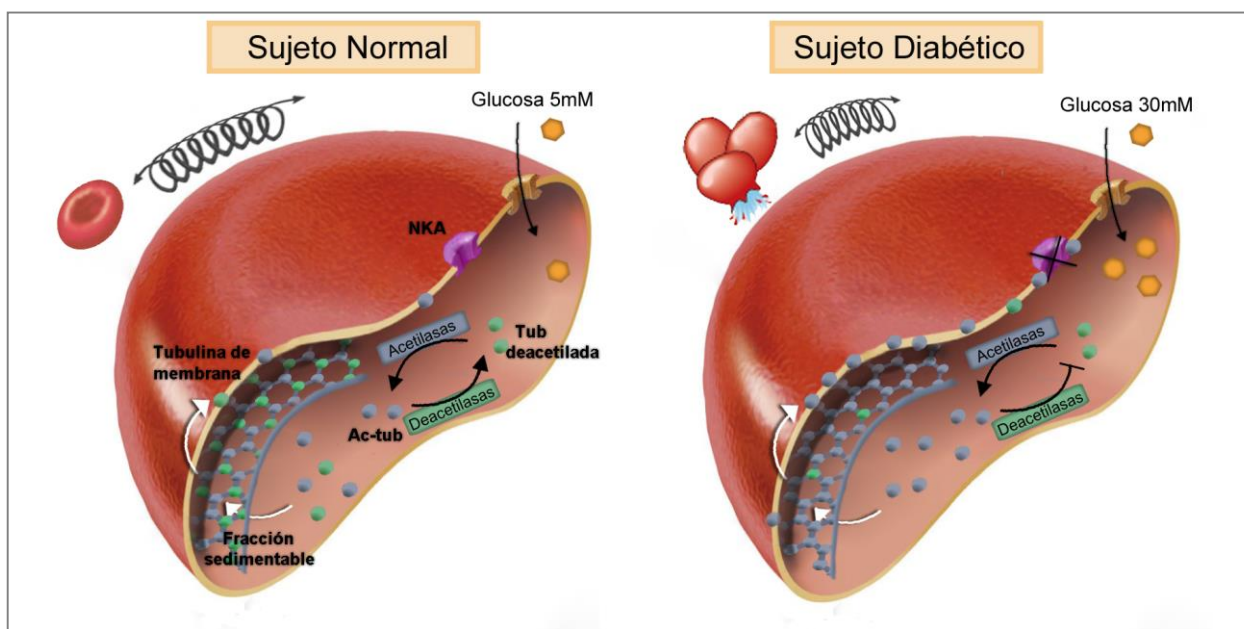


aumento en la capacidad de despolimerización de las fracciones de tubulina; es decir, el tratamiento de los eritrocitos con tricostatina A (inhibidor de deacetilasas) aumentó la fragilidad corpuscular media, mientras que el tratamiento con taxol abolió el efecto de la glucosa sobre la fragilidad (Figura 24). No podemos descartar la posibilidad de que la resistencia al estrés osmótico también involucre factores que intervienen en las modificaciones postraduccionales de proteínas como la fosforilación.

En los eritrocitos existe, evidentemente, un equilibrio entre las fracciones de tubulina sedimentable y de membrana, el cual puede ser modificado en función de las necesidades de la célula, provocando de esta manera tanto cambios mecánicos (deformabilidad, fragilidad osmótica) como fisiológicos (transporte de iones, actividades enzimáticas). A pesar de que se sabe que la tubulina de la fracción sedimentable se encuentra polimerizada, no se conoce la estructura ni composición exacta de este polímero. El análisis bioquímico de esta estructura utilizando fármacos que modifican la estabilidad de los microtúbulos (nocodazol y taxol), realizado en el presente trabajo, mostró que en la fracción sedimentable de los eritrocitos, la tubulina es parte de una macroestructura con características similares a las de los microtúbulos. Los resultados indican que la exposición de los glóbulos rojos a glucosa induce un alto dinamismo de la estructura de tubulina en la fracción sedimentable, estimulando tanto, la polimerización como la despolimerización de esta estructura (Figura 25). Por otro lado, los análisis de microscopía electrónica nos permitieron describir a esta fracción subcelular como una estructura similar a una red y confirmar su capacidad de polimerizar y despolimerizar (Figura 26 y 27). Esta estructura singular nunca ha sido descrita en los eritrocitos humanos, sin embargo puede ser muy importante para comprender la regulación de la morfología celular. Por otra parte, proponemos que esta estructura se encuentra subyacentemente al citoesqueleto de membrana. De hecho, comprobamos que existe una fuerte unión entre componentes de ambas capas, ya que tubulina y espectrina interaccionan directa o indirectamente, con lo cual demostramos una posible comunicación entre estas dos estructuras (Figura 29). Terasawa y col. (2006) mostraron por inmunohistoquímica y microscopía electrónica aplicada a eritrocitos especialmente tratados para aumentar la permeabilidad de la membrana, la existencia de un endoesqueleto citoplasmático diferente al citoesqueleto membranoso clásico, compuesto por dos capas de proteína actina y neurofilamentos conectadas al citoesqueleto de membrana. La malla de tubulina, que se describe en este trabajo, podría ser parte del endoesqueleto de eritrocitos asociado con el citoesqueleto membranoso; y podría por lo tanto, participar en la regulación de la forma bicóncava, deformable, flexible y recuperable contra circunstancias externas de estas células (Figura 35).

Finalmente, en el presente trabajo, se establecieron las concentraciones y los tiempos de exposición a las distintas citocinas específicas para el desarrollo *in vitro* de células eritroides maduras a partir de células madres humanas de sangre de cordón umbilical (Figuras 30 y 31). Los resultados no coinciden con los obtenidos por Ubukawa y col. (2012), debido a que el porcentaje de células en proceso de enucleación fue significativamente menor. Sin embargo, este pudo ser incrementado modificando el microambiente celular al brindar un sustrato de mayor afinidad y semejanza al ambiente medular.

Sobre la base de los resultados expuestos hasta el momento, proponemos el modelo esquematizado en la figura 35, para explicar los efectos de la glucosa sobre la distribución de la tubulina en eritrocitos humanos. Se puede observar la fracción sedimentable como una red subyacente a la membrana plasmática. El aumento en las concentraciones de glucosa alteraría el equilibrio acetilación/deacetilación en eritrocitos con inhibición de actividad deacetilasa, y consecuentemente inducción del aumento en los niveles de tubulina acetilada de dichas células. Este proceso sería una señal de la glucosa que promueve la translocación de la tubulina desde la fracción sedimentable hacia la membrana. La migración de la tubulina a membrana, dispara eventos fisiológicos que afectan la actividad de diferentes enzimas y las propiedades reológicas del eritrocito, como la disminución de la deformabilidad y la resistencia al estrés osmótico.



**Figura 35: Esquema representativo del efecto de glucosa o diabetes.** Una alta concentración de glucosa inhibe la actividad deacetilasa induciendo un aumento de tubulina acetilada, su traslocación de la fracción sedimentable hacia la membrana plasmática, inhibiendo la actividad de diferentes enzimas y disminuyendo tanto la deformabilidad como la resistencia gluobular eritrocitaria.

Durante las últimas etapas de la maduración eritrocitaria los pro-eritroblastos sufren alteraciones citoplasmáticas y nucleares que incluyen pérdida de mitocondrias, reducción de ribosomas, reestructuración de los microfilamentos (Migliaccio, 2010) y, como demostramos en este trabajo, la reorganización de tubulina que pasa de conformar una abundante red microtubular, en las células precursoras, a una distribución uniforme en la célula eritroide madura (Figura 32 y 33). Konstantinidis y col. (2012) establecieron, por medio de un análisis de flujo de imágenes de alta velocidad, que la enucleación es un proceso de múltiples pasos, en el cual es esencial la polaridad celular de los microtúbulos, seguida por la formación de un anillo contráctil de actina y miosina. Sin embargo, ningún autor ha descrito la estructura de tubulina resultante luego de la exclusión nuclear ya que los microtúbulos dejan de ser visibles. Por otro lado, Liu y col. (2010; 2011) han publicado que proteínas como tubulina y actina se pierden junto al núcleo durante la maduración del reticulocito. En contraposición, nuestros resultados muestran que la mayor parte de la tubulina no permanece unida al núcleo sino que se mantiene en el reticulocito resultante, presentando una distribución citoplasmática uniforme (Figura 34). Estos resultados preliminares son el punto inicial para luego analizar (en investigaciones posteriores) las diferencias entre el proceso de eritropoyesis de embarazos saludables y con diabetes mielitus gestacional con vista al desarrollo de diferentes terapias contra esta enfermedad en continuo aumento.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Agudelo-Botero M. y Dávila-Cervantes C.A. (2015). Carga de la mortalidad por diabetes mellitus en América Latina 2000-2011: los casos de Argentina, Chile, Colombia y México. *Gac Sanit.* 29(3):172-7.
- Akella J.S., Wloga D., Kim J. y col. (2010). MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature.* 467:218-22.
- Al-Bassam J. y Corbett K.D. (2012).  $\alpha$ -Tubulin acetylation from the inside out. *PNAS.* 109(48):19515-6.
- Amaiden M.R., Santander V.S., Monesterolo N.E. y col. (2011). Tubulin pools in human erythrocytes: altered distribution in hypertensive patients affects  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:1755-68.
- Amaiden M.R., Monesterolo N.E., Santander V.S. y col. (2012). Involvement of membrane tubulin in erythrocyte deformability and blood pressure. *J. Hypertens.* 30:1414-22.
- Amaiden M.R., Santander V.S., Monesterolo N.E. y col. (2015). Effects of detyrosinated tubulin on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity and erythrocyte function in hypertensive subjects. *FEBS Lett.* 589(3):364-73.
- Arce C.A., Casale C.H. y Barra H.S. (2008). Submembrane microtubule cytoskeleton: regulation of ATPases by interaction with acetylated tubulin. *FEBS J.* 275:46-74.
- Arce C.A., Rodríguez J.A., Barra H.S. y Caputo R. (1975). Incorporation of 1-tyrosine, 1-phenylalanine and 1-3, 4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur. J. Biochem.* 59:145-9.
- Bandeira S.M., Guedes G.S., Fonseca L.S. y col. (2012). Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 819310:2-13.
- Berndt-Zipfel C., Michelson G., Dworak M. y col. (2013). Vildagliptin in addition to metformin improves retinal blood flow and erythrocyte deformability in patients with type 2 diabetes mellitus-results from an exploratory study. *Card. Diabetology.* 12:59-66.
- Best C. y Taylor S. (2010). Physiological basis of medical practice. *Ed. Medica Panamericana.* 18:378-80.
- Bifulco M., Laezza C., Stingo S. y Wolff J. (2002). 2, 3-Cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:1807-12.
- Bogardus H., Schulz V.P., Maksimova Y. y col. (2014). Severe nondominant hereditary spherocytosis due to uniparental isodisomy at the SPTA1 locus. *Haematologica.* 99:168-170.
- Bonet-Ponce L., Saez-Atienzar S., da Casa C. y col. (2015). Rotenone Induces the Formation of 4-Hydroxynonenal Aggregates. Role of ROS-Mediated Tubulin Hyperacetylation and Autophagic Flux Disruption. *Mol. Neurobiol.* [Epub ahead of print].
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of dye-protein binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Brandão M.M., Castro M.L., Fontes A. y col. (2009). Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 43(3):217-21.
- Bruce A., Hopkin J., Lewis R. y Roberts W. (2008). Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana. 17:571.

- Cabrales P. (2007). Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293:1206-15.
- Compentelli A.N., Previtali G., Arce C.A. y col. (2005). Activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of the H<sup>+</sup>-ATPase-acetylated tubulin complex. *FEBS J.* 272:5742-52.
- Compentelli A.N., Monesterolo N.E. Previtali G. y col. (2013). Activation of H<sup>+</sup>-ATPase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae* involves a membrane serine protease. *Biochem. Biophys. Acta.* 1830:3593-603.
- Carr J.H. y Rodak B.F. (2010). Atlas de hematología clínica. Ed. Médica Panamericana. 19-32.
- Carré M., André N., Carles G. y col. (2002). Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J. Biol. Chem.* 277:33664-9.
- Casale C.H., Alonso A.C. y Barra, H.S. (2001). Brain plasma membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase is inhibited by acetylated tubulin. *Mol. Cell. Biochem.* 216:85-92.
- Casale C.H., Previtali G. y Barra, H.S. (2003). Involvement of acetylated tubulin in the regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* 534:115-8.
- Casale C.H., Previtali G., Serafino J.J. y col. (2005). Regulation of acetylated tubulin/Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase interaction by L-glutamate in non-neural cells: involvement of microtubules. *Biochim. Biophys. Acta.* 1721:185-92.
- Catley L., Weisberg E., Kiziltepe T. y col. (2006). Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood.* 108(10):3441-9.
- Chae Y.C., Lee S., Lee H.Y. y col. (2005). Inhibition of muscarinic receptor-linked phospholipase D activation by association with tubulin. *J. Biol. Chem.* 280:3723-30.
- Chu C.W., Hou F., Zhang J. y col. (2011). A novel acetylation of  $\beta$ -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down regulating tubulin incorporation. *Mol. Biol. Cell.* 22:448-56.
- Erck C., Peris L., Andrieux A. y col. (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:7853-8.
- International Diabetes Federation. (2013). <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>.
- Ferru E., Giger K., Pantaleo A. y col. (2011). Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood.* 117:5998-6006.
- Ferru E., Pantaleo A. y Turrini F. (2012). A new method for the capture of surface proteins in *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocyte. *J. Infect. Dev. Ctries.* 6(6):536-41.
- Foller M., Mahmud H. y Qadri S.M. (2010). Endothelin B receptor stimulation inhibits suicidal erythrocyte death. *FASEB J.* 24:3351-9.

- Fuentes X., Castiñeiras M.J. y Queraltó J.M. (1998). Bioquímica clínica y patología molecular. Ed. Reverté. 2:1006-7.
- Geeraert C., Ratier A., Pfisterer S.G. y col. (2010). Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J. Biol. Chem.* 285(31):24184-94.
- Goodman S.R., Kurdia A., Ammann L. y col. (2007). The human red blood cell proteome and interactome. *Exp. Biol. Med.* 232:1391-408.
- Goodman S.R., Daescu O., Kakhniashvili D.G. y Zivanic M. (2013). The proteomics and interactomics of human erythrocytes. *Exp. Biol. Med.* 238(5):509-18.
- Greer J.P. (2009). Wintrobe's Clinical Hematology. *Lippincott Williams & Wilkins.* 1:805.
- Gundersen G.G., Kalnoski M.H. y Bulinski J.C. (1984). Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently *in vivo*. *Cell.* 38:779-89.
- Guzmán-Juárez N. y Madrigal-Bujaidar E. (2003). Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 28:14-23.
- Gyawali P., Richards R.S. y Uba Nwose E. (2012). Erythrocyte morphology in metabolic syndrome. *Expert. Rev. Hematol.* 5:523-31.
- Gyawali P., Richards R.S., Bwititi P.T. y col. (2015). Association of abnormal erythrocyte morphology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome. *Blood. Cells. Mol. Dis.* 54(4):360-3.
- Hallak M.E., Rodriguez J.A., Barra H.S. y Caputto R. (1977). Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* 73:147-50.
- Hammond J.W., Cai D. y Verhey K.J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:71-6.
- Harmening M. (2002). Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. *FA: Davis Company.* 615-6.
- Hubbert C., Guardiola A., Shao R. y col. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 417:455-8.
- Infante A.A., Infante D., Chan M., y col. (2007). Ferritin associates with marginal band microtubules. *Exp. Cell Res.* 313:1602-14.
- Ipsaro J.J., Harper S.L., Messick T.L. y col. (2010). Crystal structure and functional interpretation of the erythrocyte spectrin tetramerization domain complex. *Blood.* 115:4843-52.
- Janke C. y Bulinski J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:773-86.
- Janke C. y Kneussel M. (2010). Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci.* 33:362-72.

- Kaestner L., Tabellion W., Lipp P. y Bernhardt I. (2004). Prostaglandin E2 activates channel-mediated calcium entry in human erythrocytes: an indication for a blood clot formation supporting process. *Thromb. Haemost.* 92(6):1269-72.
- Kalebic N., Sorrentino S., Perlas E. y col. (2013) alphaTAT1 is the major alpha-tubulin acetyltransferase in mice. *Nat. Commun.* 4:1962.
- Kalfa T.A. y Zheng Y. (2014). Rho GTPases in erythroid maturation. *Curr. Opin. Hematol.* 21(3):165-71.
- Konstantinidis D.G., Pushkaran S., Johnson J.F. y col. (2012). Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood.* 119(25):6118-27.
- Koury M.J. y Rhodes M. (2012). How to approach chronic anemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol.* 2012:183-90.
- Koury S., Koury M.J. y Bondurant M. (1989). Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J. Cell Biol.* 109:3005-13.
- Kuznetsov A.V., Javadov S., Guzun R. y col. (2013). Cytoskeleton and regulation of mitochondrial function: the role of beta-tubulin II. *Frontiers Physiol.* 4:1-7.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Larkins R.J. y Dunlop M.E. (1992). The link between hyperglycemia and diabetic nephropathy. *Diabetology.* 35:499-504.
- Liao E.C., Paw B.H., Peters L.L., y col. (2000). Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid  $\beta$ -spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. *Development.* 127:5123-32.
- Lim H.W., Wortis M. y Mukhopadhyay R. (2002). Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:16766-9.
- Lin Y., Berg A.H., Iyengar P. y col. (2005). The hyperglycemia induced inflammatory response in adipocytes the role of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 280:4617-26.
- Linhartova I., Novotna B., Sulimenko V. y col. (2002). Gamma-tubulin in chicken erythrocytes: changes in localization during celldifferentiation and characterization of cytoplasmic complexes. *Developmental dynamics.* 223:229-240.
- Liu J., Mohandas N. y An X. (2011). Membrane assembly during erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 18(3):133-8.
- Liu J., Guo X., Mohandas N. y col. (2010). Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood.* 115:2021-7.
- Liu N., Xiong Y., Li S. y col. (2015). New HDAC6-mediated deacetylation sites of tubulin in the mouse brain identified by quantitative mass spectrometry. *Sci. Rep.* 5: 16.869.



- Lodish H., Sterin N., Vidal N. y col. (2005). Biología celular y molecular. *Ed. Médica Panamericana*. 5:819.
- López-Jaramillo P., Sánchez R.A., Diaz M. y col. (2014). Consenso latino-americano de hipertensão em pacientes com diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 58(3):205-25.
- Machnicka B., Grochowalska R., Bogusławska D.M. y col. (2012). Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:191-201.
- Maiese K. (2015). Erythropoietin and diabetes mellitus. *World. J. Diabetes.* 6(14):1259-73.
- Mackeh R., Lorin S., Ratier A. y col. (2014). Reactive oxygen species, AMP-activated protein kinase, and the transcription cofactor p300 regulate  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase-1 ( $\alpha$ TAT-1/MEC-17)-dependent microtubule hyperacetylation during cell stress. *J. Biol. Chem.* 289(17):11816-28.
- Manassero A.R. (2003). Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. *Ed. CEJA*. 18-23.
- Manno S., Mohandas N. y Takakuwa Y. (2010). ATP-dependent mechanism protects spectrin against glycation in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 285(44):33923-9.
- Marini M.J., Fábreguesmtsac G., Rodríguez P.D. y col. (2012). Registro Nacional de Hipertensión Arterial. Conocimiento, tratamiento y control de la hipertensión arterial. *Rev. Arg. Cardiología.* 80(2):121-9.
- Meibalan E., Comunale M.A., Lopez A.M. y col. (2015). Host erythrocyte environment influences the localization of exported protein 2, an essential component of the Plasmodium translocon. *Eukaryot. Cell.* 14(4):371-84.
- Mialhe A., Lafanechère L., Treilleux I. y col. (2001). Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer. Res.* 61:5024-7.
- Migliaccio A.R. (2010). Erythroblast enucleation. *Haematologica.* 95(12):1985-8.
- Miller J.A., Gravalles E. y Bunn H.F. (1980). Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. Relevance to diabetes. *J. Clin. Invest.* 65:896-901.
- Monesterolo N.E., Santander V.S., Campetelli A.N. y col. (2008). Activation of PMCA by calmodulin or ethanol in plasma membrane vesicles from rat brain involves dissociation of the acetylated tubulin/PMCA complex. *FEBS J.* 275:3567-79.
- Monesterolo N.E., Amaiden M.R., Campetelli A.N. y col. (2011). Regulation of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity by acetylated tubulin: Influence of the lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta.* 1818:601-8.
- Müller-Esterl W., Brandt U. y Serra J.J. (2008). Bioquímica: Fundamentos de medicina y ciencias de la vida. *Ed. Reverté.* 31:431-3.
- Olearczyk J.J., Ellsworth M.L., Stephenson A.H. y col. (2004). Nitric oxide inhibits ATP release from erythrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309(3):1079-84.
- Pagano M. y Faggio C. (2015). The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell. Biochem. Funct.* doi: 10.1002/cbf.3135.
- Palis J. (2012). Losing a "nucleus" to gain a cytoplasm. *Blood.* 119(25):5948-9.

- Palma-Gámiz J.L. (2007). La diabetes mellitus entendida como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.* 7:12-9.
- Perdiz D., Mackeha R. y Poüs C. y col. (2011). The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell. Signal.* 23:763-71.
- Pretorius E. y Kell D.B. (2014). Diagnostic morphology: biophysical indicators for iron-driven inflammatory diseases. *Integr. Biol. Camb.* 5:486-510.
- Reaven G.M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37:1595-607.
- Rivelli J.F., Amaiden M.R., Monesterolo N.E. y col. (2012). High glucose levels induce inhibition of Na, K-ATPase via stimulation of aldose reductase, formation of microtubules and formation of an acetylated tubulin/ Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase complex. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:1203-13.
- Rodak R., Kubota H., Ishihara H. y col. (2005). Induction of reactive oxygen intermediates-dependent programmed cell death in human malignant *ex vivo* glioma cells and inhibition of the vascular endothelial growth factor production by taurolidine. *J. Neurosurg.* 102:1055-68.
- Rodriguez de la Vega M., Sevilla R.G., Hermoso A. y col. (2007). Nna1-like proteins are active metallopeptidases of a new and diverse M14 subfamily. *FASEB J.* 21:8-65.
- Rüdiger M., Wehland J. y Weber K. (1994). The carboxy-terminal peptide of detyrosinated alpha tubulin provides a minimal system to study the substrate specificity of tubulin-tyrosine ligase. *Eur. J. Biochem.* 220:309-20.
- Saito K., Odashiro K., Maruyama T. y col. (2012). Improvement of diabetic or obese patients' erythrocyte deformability by the program of the brain-oriented obesity control system (BOOCS). *J. Physiol. Sci.* 62:445-51.
- Salomao M., Zhang X., Yang Y. y col. (2008). Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *PNAS.* 105:8026-31.
- Santander V.S., Bisig C.G., Purro S.A. y col. (2006). Tubulin must be acetylated in order to form a complex with membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and to inhibit its enzyme activity. *Mol. Cell. Biochem.* 291:167-74.
- Schwartzbach S.D. (2010). Microscopía Inmunoeléctronica: métodos y protocolos. *Ed: Humana Press.* 145-183.
- Skalak R., Hanss M. y Chien S. (1983). Indices of filterability of red blood cell suspensions. *Biorheology.* 20:311-6.
- Skoge R.H., Dölle C. y Ziegler M. (2014). Regulation of SIRT2-dependent  $\alpha$ -tubulin deacetylation by cellular NAD levels. *DNA Repair (Amst).* 23:33-8.
- Song Y. y Brady S.T. (2014). Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *TICB.* 25 (3):125-36.
- Spengler M.I., Svetaz M.J., Leroux M.B. y col. (2014). Lipid peroxidation affects red blood cells membrane properties in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 58(4):489-95.
- Sudo H. y Baas P.W. (2010). Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J. Neurosci.* 30:7215-26.

- Suhail M., Patil S., Khan S. y Siddiqui S. (2010). Antioxidant vitamins and lipoperoxidation in non-pregnant, pregnant and gestational diabetic women: erythrocytes osmotic fragility profile. *J. Clin. Med. Red.* 2:266-73.
- Swan J.A. y Solomon F. (1984). Reformation of the marginal band of avian erythrocytes *in vitro* using calf-brain tubulin: determinants of microtubule form. *J. Cell. Biol.* 99:2108-13.
- Symeonidis A., Athanassiou G., Psiroyannis A. y col. (2001). Impairment of erythrocyte viscoelasticity is correlated with levels of glycosylated haemoglobin in diabetic patients. *Clin. Lab. Haematol.* 23:103-9.
- Terasawa K. (2006). Human erythrocytes possess a cytoplasmatic endoskeleton containing  $\beta$ -actin and neurofilamentprotein. *Arch. Histol. Cytol.* 69:329-40.
- Tran A.D., Tran A.A., Marmo T.P. y col. (2007). HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J. Cell. Sci.* 120:1469-79.
- Turchetti V., Matteis C., Leoncini F. y col. (1997). Variations of erythrocyte morphology in different pathologies. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 17:209-15.
- Ubukawa K., Guo Y.M., Takahashi M. y col. (2012). Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood.* 19:1036-44.
- Umudum F., Yücel O., Sahin Y. y Bakan E. (2002). Erythrocyte membrane glycation and  $Na^+K^+$  levels in NIDDM. *J. Diabetes Comp.* 16:359-62.
- Van Deurs B. y Behnke O. (1973). The microtubule marginal band of mammalian red blood cells. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 143:43-7.
- Verkleij A.J., Zwaal R.F., Roelofsen B. y col. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 323:178-93.
- Verhey K.J. y Gaertig J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle.* 6:2152-60.
- Voet D., Voet J.G. y Pratt C.W. (2007). Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. *Ed. Médica Panamericana.* 261-18.
- Walensky L.D., Mohandas N., Lux S.E. y col. (2003). Blood, principles and practice of hematology. *Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.* 2:1726-44.
- Wan J., Ristenpart W.D. y Stone H.A. (2008). Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA.* 105(43):16432-7.
- Wautier J.L. y Wautier M.P. (2013). Molecular basis of erythrocyte adhesion to endothelial cells in diseases. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 53(1-2):11-21.
- Weisenthal L.M. (2011). Differential staining cytotoxicity assay: a review. *Methods Mol. Biol.* 731:259-83.
- Welsch U. y Sobotta J. (2008). Histología. *Ed. Médica Panamericana.* 207-8.



Westermann S. y Weber K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:938-47.

Wilson P.G. y Borisy G.G. (1997). Evolution of the multitubulin hypothesis. *Bioessays.* 19:451-4.

Zampar G.G., Chesta M.E., Carbajal A. y col. (2009). Acetylated tubulin associates with the fifth cytoplasmic domain of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: possible anchorage site of microtubules to the plasma membrane. *Biochem. J.* 422:129-37.

Zilberman Y., Ballestrem C., Carramusa L. y col. (2009). Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J. Cell. Sci.* 122:35-41.

Zwaal R.F. y Schroit A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 89:1121-32.