

Alteraciones bioquímicas de los eritrocitos almacenados en condiciones estándar de banco de sangre

Oscar Andrés Peñuela B., Adriana Urbina B. Internos Especiales en Investigación Fisiología del Eritrocito Humano, Unidad de Fisiología. Luis Fernando Palomino Q, Profesor Asistente Unidad de Fisiología. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

SUMMARY

Liquid preservation is the most common method of erythrocytes blood bank storage. Deleterious changes are produced during storage, which decrease the viability and function into receptor and conduce to side effects. We carried out a revision about the biochemical changes and its mechanisms.

Key Words: *Erythrocytes, storage, blood bank.*

RESUMEN

La forma más habitual de almacenamiento de eritrocitos es en fase líquida. Durante el almacenamiento se producen cambios deletéreos que disminuyen la viabilidad y funcionalidad en el receptor y conllevan a efectos colaterales. Se revisaron los mecanismos que generan los cambios bioquímicos de los eritrocitos.

Palabras Claves : *Eritrocitos, almacenamiento, banco de sangre.*

INTRODUCCIÓN

Se realizó una búsqueda computadorizada de artículos sin límite de idioma ni fecha de publicación en las bases de datos PubMedQuery, PubMedCentral e Infotrieve de MEDLINE, además en las bases de datos en CD Medical-Journals y Medical-Library, con límites de fechas 1994 a 1999 y 1986 a 1999 respectivamente. Las palabras clave fueron: "red blood cells", "preservation", "aging", "blood bank", "transfusion", excluyendo las palabras "leukocyte" y "platelets". Se obtuvieron 388 resultados. El proceso de selección de los artículos fue según la pertinencia del título de cada registro para resolver el objetivo general de la revisión. Luego de los artículos seleccionados, se procedió a obtener

algunas de las referencias citadas en dichos artículos y que también resultaban pertinentes. Para la evaluación de la validez se tuvo en cuenta que todos los trabajos experimentales fueran llevados a cabo en sangre humana y que su metodología fuera adecuada para alcanzar el objetivo que plantean y permitiera llegar a las conclusiones propuestas.

La forma más común de almacenamiento de sangre es la preservación en fase líquida, que supone unas condiciones estándar como: temperatura de almacenamiento de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$, recolección en bolsas plásticas de cloruro de polivinilo (PVC) y solución anticoagulante. En algunos casos también se emplean soluciones aditivas.

El primero de los anticoagulantes efectivos fue el ácido cítrico-citrato-dextrosa (ACD), descrito en 1943 (1). Posteriormente surgió el citrato-fosfato-dextrosa (CPD), que es el ACD con el agregado bifosfato de sodio (16). El CPDA-1 (adenina, dextrosa, fosfato, citrato), el anticoagulante conservador estándar en este momento, permite almacenar los concentrados de glóbulos durante 35 días (2).

Las soluciones aditivas se idearon con el fin de atenuar los cambios deletéreos que ocurren en los eritrocitos durante el almacenamiento. Las más utilizadas actualmente son AS-1, AS-3 y AS-5, que permiten el adecuado almacenamiento de los eritrocitos durante 42 días (3). La composición de cada una de estas sustancias se ilustra en la tabla 1. También se han diseñado soluciones para restaurar los niveles depletados de ATP y 2,3-DPG de células que han sido almacenadas por varias semanas. Estas soluciones rejuvenecedoras no son ampliamente usadas por su costo alto (4, 5).

Tabla 1. Composición de soluciones aditivas (mM).

	AS-1 (Adsol ®)	AS-3 (Nutricell ®)	AS-5 (Optisol ®)
Dextrosa	111.00	55.50	45.40
Adenina	2.00	2.22	2.22
Fosfato de Sodio monobásico	-	23.00	-
Manitol	41.20	-	45.40
Cloruro de Sodio	154.00	70.00	150.00

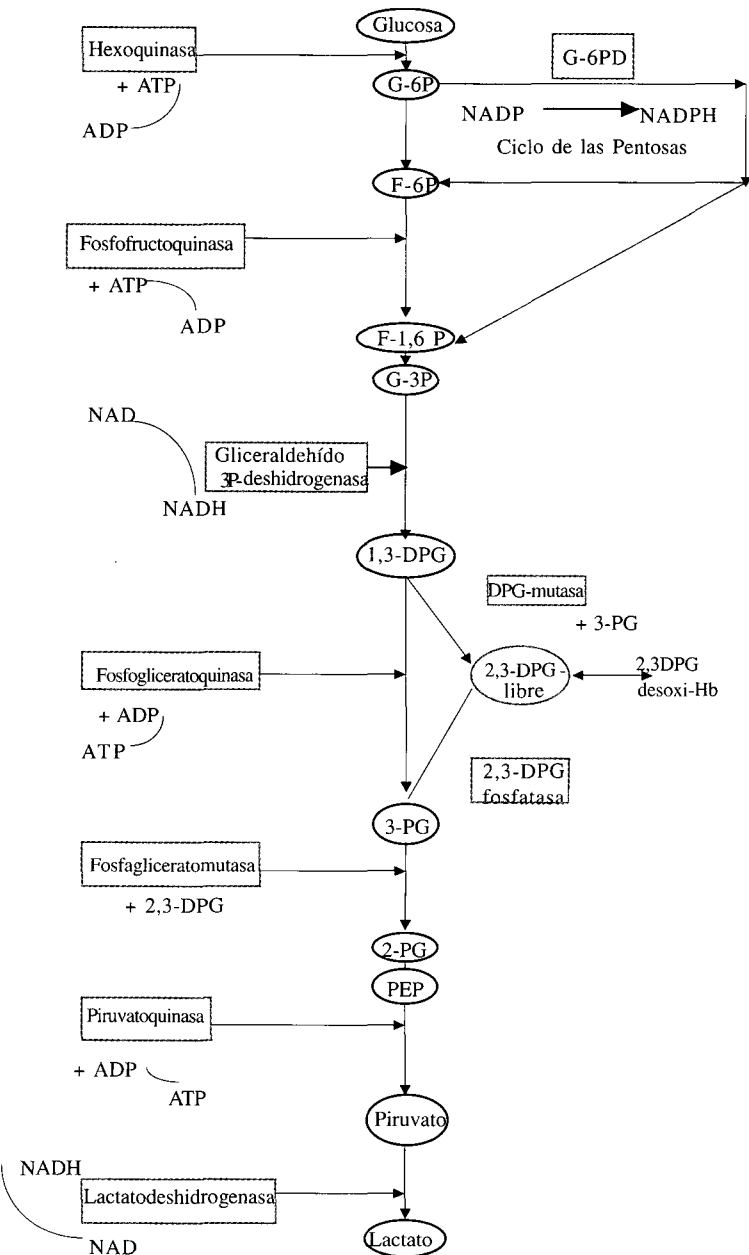
Durante el almacenamiento estándar descrito anteriormente ocurren ciertas modificaciones físicas y bioquímicas. Aunque algunos de estos cambios son retardados o acelerados por las diferentes composiciones del medio de almacenamiento, no son completamente prevenidos. Es importante señalar que las alteraciones que ocurren durante el almacenamiento de los eritrocitos son diferentes a las que ocurren cuando las células envejecen en la circulación (6, 7).

CAMBIOS BIOQUÍMICOS A NIVEL DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO

Glicólisis y nivel de ATP

Al no disponer de reservas, los eritrocitos deben tener acceso constante a la glucosa para preservar el metabolismo energético. La glucosa penetra a la membrana eritrocitaria por difusión simple (8). En circunstancias normales, casi el 90% de la glucosa que llega a los glóbulos rojos se metaboliza por la vía glicolítica anaeróbica y el 10% restante por la vía de las pentosas (Vea figura 1) El pH de la sangre ejerce un efecto directamente proporcional sobre el metabolismo de la glucosa. La tensión de oxígeno por el contrario, ejerce un efecto inversamente proporcional (9).

Las funciones generales conocidas de la vía de la pentosa fosfato en el eritrocito son (10), la reducción de NADP a NADPH, que funciona como coenzima tanto para la reducción de glutatión oxidado (GSSG) y para la NADPH metahemoglobina reductasa (diaforasa II); la generación de glutatión reducido (GSH) que juega un papel fundamental en la protección de los grupos sulfhidrilo de varias proteínas contra el daño oxidativo y en la detoxificación celular de H₂O₂; y la regeneración de fosforribosil pirofosfato (PRPP) usado por la célula para la síntesis de nucleótidos de adenina y de NAD. De otro lado, en la vía glicolítica se forman tres sustancias fundamentales (11): ATP, el principal fosfato de alta energía; NADH, cofactor de la metahemoglobina reductasa; y 2,3-DPG (ciclo Rapoport-Luebering), efector alostérico de la unión del oxígeno con la hemoglobina.



ATP, adenosintrifosfato; ADP, adenosindifosfato; G6PD, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa; G6P, glucosa 6 fosfato; F6P, fructosa 6 fosfato; F1,6P, fructosa 1,6 fosfato; G3P, gliceraldehído 3 fosfato; 1,3 DPG, 1,3 difosfoglicerato; NAD-NADH, nicotinamida adenina dinucleótido, NADP-NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; 3PG, 3 fosfoglicerato; 2,3 DPG, 2,3 difosfoglicerato; 2PG, 2 fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato.

Figura 1. Glicólisis anaerobia del hematíe y formación del 2,3-DPG en la zona del shunt del Rapoport-Luebering.

De las 11 enzimas de la glicólisis (12), tres de ellas parecen ser las más relevantes (11): la Fosfofructoquinasa (PFK), que juega un papel importante en la regulación glicolítica del eritrocito a través de su respuesta mediada por el pH; la hexoquinasa (HK), que es la menos activa de las enzimas (13) y por tanto, es la que más limita la tasa; y finalmente la piruvatoquinasa (PK), inhibida por el ATP y por tanto vinculada con la velocidad de utilización del ATP en el metabolismo celular.

La energía metabólica derivada de los mecanismos glicolíticos es utilizada para mantener el equilibrio electrolítico, la integridad funcional y estructural de la membrana, así como la prevención de los fenómenos oxidativos a todo nivel.

Es sabido que el eritrocito consume glucosa durante el almacenamiento. El ácido láctico y el ácido pirúvico, que son productos de la glicólisis se acumulan, y el pH de las células almacenadas gradualmente disminuye. Como la glicólisis disminuye, el nivel de ATP de los eritrocitos cae, alterando pues los diferentes mecanismos que controlan el equilibrio electrolítico de la célula, así como la integridad de la membrana y produciendo un aumento en la susceptibilidad al deterioro oxidativo. Sin embargo, la actividad de muchas enzimas es bien mantenida durante el almacenamiento prolongado (14); la excepción incluye la fosfofructoquinasa, difosfogliceromutasa, gliceraldehído tres-fosfato deshidrogenasa y triosafosfato isomerasa (6, 15-17).

Sodio y potasio

Los eritrocitos pierden potasio (K⁺) y ganan sodio (Na⁺) durante las dos o tres primeras semanas de almacenamiento (6). Esta pérdida no está relacionada con el nivel de ATP intracelular sino con la inhibición reversible de la Na⁺/K⁺ ATPasa por efecto de la baja temperatura de almacenamiento (18). Por consiguiente, con el almacenamiento se produce a nivel extracelular, un aumento del K⁺ y un decremento en el Na⁺.

Calcio

La senectud de los eritrocitos se adjudica en parte a modificaciones en el balance del calcio que conducen a un incremento intracelular del mismo. Se postula además, que una de las principales consecuencias de la depleción del ATP es la menor actividad de la ATPasa de Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ vinculada con la membrana y con la respectiva acumulación de calcio (13). La elevación del calcio intracelular se acompaña de pérdida de potasio, deshidratación, incremento de la densidad y de la viscosidad, y restricción de la deformabilidad (19). Al parecer, la transglutaminasa eritrocitaria es la enzi-

ma encargada de catalizar la formación de agregados polipeptídicos de membrana relacionados con la pérdida de deformabilidad mediada por Ca⁺⁺. Dichos agregados están constituidos por espectrina asociada a otras proteínas de membrana (20).

Difosfoglicerato (2,3-DPG)

El 2,3-DPG fue descrito por primera vez en porcinos, bovinos y humanos en 1925 (21). Sin embargo el efecto de los ésteres de fosfato sobre la curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina y el papel fundamental del 2,3-DPG en el transporte de oxígeno no fue establecido sino hasta 1967 (22). Previamente se había establecido (23) que la sangre almacenada en ACD desplazaba su curva de disociación a la izquierda, y que la pérdida de 2,3-DPG se producía rápidamente durante las dos primeras semanas de almacenamiento (24).

La concentración de 2,3-DPG en el eritrocito está regulada por una enzima que a niveles de pH por encima de 7.2 actúa como mutasa, moviendo el fosfato de la posición 1 del 1,3-DPG a la posición 2. De otro lado, a niveles de pH por debajo de 7.2 la enzima funciona como fosfatasa, removiendo el fosfato del 2,3-DPG y formando 3-PG. Por lo tanto, los niveles eritrocitarios de 2,3-DPG aumentan cuando el pH se incrementa (25) y disminuyen cuando la temperatura se incrementa (26).

Durante el almacenamiento, la pérdida de 2,3-DPG y su efecto sobre el receptor es aún debatido (26-28). La concentración de 2,3-DPG predice el valor de la P50 tanto de los eritrocitos frescos como almacenados (29).

Oxidación de la hemoglobina

El papel del eritrocito como transportador de oxígeno lo expone al riesgo de lesión oxidativa. La oxihemoglobina en solución se autooxida y transforma en metahemoglobina. La tasa de oxidación aumenta por ascenso de la temperatura, descenso del pH, presencia de fosfato inorgánico, iones metálicos, fármacos o toxinas y oxigenación parcial de la hemoglobina (13). Los productos finales del proceso oxidativo son los hemicromos y la globina sin hem, que se precipitan. En los eritrocitos intactos los precipitados constituyen inclusiones cocoides denominadas cuerpos de Heinz, que representan la fase final en la degradación oxidativa de la hemoglobina (30), y que se adhieren a la membrana eritrocitaria a través de puentes disulfuro (31), aunque se ha sugerido que la unión se realiza posiblemente a través de uniones hidrofóbicas (32). Estos procesos de oxidación son más notorios en los glóbulos rojos HbAA de alta densidad y en los HbSS (33-35).

Es de esperar por tanto, que durante el almacenamiento haya un incremento en la concentración de metahemoglobina, en virtud de la disminución de la actividad de la metahemoglobina reductasa I y II, causado por disminución en las vías metabólicas eritrocitarias, a pesar del mantenimiento de los niveles de GSH, lo que refleja una relación directamente proporcional entre la susceptibilidad de los eritrocitos a la lesión oxidativa y el tiempo del almacenamiento.

CAMBIOS BIOQUÍMICOS A NIVEL DE LA MEMBRANA CELULAR

Oxidación de lípidos

Durante el almacenamiento la membrana, rica en ácidos grasos polinsaturados, se oxida alterando sus propiedades físicas y químicas (36). La oxidación de los componentes de la membrana ocurre por un mecanismo de cadena de radicales libres, por el cual una sola reacción oxidativa puede inducir la oxidación de muchas otras moléculas amplificando el daño oxidativo (37). El proceso puede ser iniciado por la propia hemoglobina (38), ya que cuando la oxihemoglobina (Fe^{++}) se autooxida a metahemoglobina (Fe^{+++}), se libera superóxido (39, 40).

El malonildialdehído es un compuesto derivado de la peroxidación de los lípidos, y es usado como un indicador de su ocurrencia. Durante el almacenamiento ocurre una acumulación progresiva de malonildialdehído (41), la cual puede ser prevenida parcialmente por la adición de quelantes de hierro a la sangre en el momento de la recolección (42) o por la suplementación de los donantes con vitamina C, vitamina E, β -caroteno y selenio durante diez días antes de la recolección de la sangre (36).

La distribución de los fosfolípidos en la membrana eritrocitaria es asimétrica: la esfingomielina y la fosfatidilcolina se encuentran predominantemente en la parte externa de la bicapa, mientras que la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina (fosfolípidos polares) se encuentran en la parte interna de la bicapa (43), ya que pueden activar la cascada de la coagulación (44).

El malonildialdehído causa disminución de la espectrina (45) y con ello (46) el movimiento de los fosfolípidos polares hacia la parte externa de la bicapa (47), iniciando la cascada de la coagulación y aumentando la adherencia de los eritrocitos al endotelio (48). La exposición de fosfatidilserina también permite la unión de macrófagos; sin embargo, la fagocitosis de los eritrocitos requiere de la participación de otros receptores de membrana (49). El malonildialdehído también produce reducción de la flexibilidad de la membrana eritrocitaria con la con-

siguiente disminución de la deformabilidad, así como pérdida de potasio y deshidratación celular. La pérdida de la deformabilidad se correlaciona con la reducción de la sobrevida in vivo (50).

La vitamina E protege la membrana del daño oxidativo por radicales libres porque bloquea la cadena de propagación (37). Debido a su estructura lipofílica se acumula en las membranas celulares donde reacciona muy fácilmente con el oxígeno molecular y los radicales libres (51). La vitamina E es un constituyente de la membrana celular eritrocitaria y su deficiencia produce un incremento de la hemólisis por peróxidos (52). Es capaz de inhibir la alteración de la asimetría de los lípidos de la membrana, por detención de la peroxidación de los ácidos grasos y de la formación de malonildialdehído (46). Durante el almacenamiento, la disminución en la concentración de vitamina E se relaciona con el incremento del malonildialdehído (53).

Oxidación de proteínas

La membrana eritrocitaria está conformada principalmente por un esqueleto de espectrina-actina, conectado a espacios regulares con las proteínas integrales de la membrana, banda tres y glicoforina C, por medio de las proteínas de unión, anquirina y banda 4.1.

Como se ha mencionado, durante el almacenamiento la hemoglobina se desnaturaliza formando hemicromos y se oxida formando metahemoglobina. Estos compuestos a su vez oxidan los grupos sulfhidrilo de la espectrina, produciendo una disminución en la formación de complejos espectrina-actina-banda 4.1 (54). El resultado del anterior proceso es la desestabilización del citoesqueleto y de su unión a la membrana plasmática que conlleva a la formación de equinocitos y la disminución de la deformabilidad (55,56). Se ha establecido que la formación de complejos entre la hemoglobina y la espectrina también ocurre in vivo asociada a deshidratación celular en eritrocitos senescentes (57), así como en eritrocitos con β talasemia y con enfermedad de células falciformes (58).

Los hemicromos oxidan la banda tres formando cuerpos de Heinz y favorecen la unión de inmunoglobulina G anti-banda tres (59), lo cual facilita la remoción de los eritrocitos de la circulación por el sistema mononuclear fagocítico. Por tanto, los anticuerpos anti-banda tres y el complemento median juntos la fagocitosis de los eritrocitos expuestos a estrés oxidativo (60).

Glicosilación de proteínas

El almacenamiento de sangre en estado líquido bajo condi-

ciones convencionales de banco de sangre resulta en un nivel significativamente elevado de componentes glicosilados. Se observa un incremento de la glicosilación no enzimática de las proteínas de membrana, del plasma y de la hemoglobina. Sin embargo, no se ha establecido aún la significancia de este proceso (61).

Cambios en los carbohidratos

El almacenamiento de sangre está relacionado con una reducción del contenido de ácido siálico de los eritrocitos y subsecuentemente un cambio en su carga de superficie (62). La disminución en la carga negativa de la superficie hace que se reduzca la repulsión por las proteínas plasmáticas, especialmente fibrinógeno u otras moléculas agregantes y hace posible que los eritrocitos interactúen fuertemente entre sí y formen agregados (63, 64). El tamaño de los agregados aumenta progresivamente durante el almacenamiento y que al ser transfundidos causan daño microcirculatorio (65).

Otro cambio que ocurre en los carbohidratos de la membrana, es la expresión gradual de residuos galactosil, la cual permite la unión de anticuerpos irregulares (66). Esto sugiere que tal vez existen antígenos crípticos que se encuentran enmascarados en las células frescas, pero que pueden ser reconocidos por anticuerpos irregulares luego del almacenamiento de los eritrocitos.

Acumulación de fósforo en la membrana

Durante el almacenamiento, la disminución del pH conlleva a un aumento de la concentración de fosfato en la membrana plasmática. De la misma forma, declina el transporte de fósforo inorgánico a través de la membrana (67). Los dos fenómenos contribuyen a la fosforilación de la espectrina que se relaciona con una estabilidad de membrana reducida (68).

Fisiológicamente el contenido de ATP eritrocitario preserva la deformabilidad de la membrana a través de un sistema de fosfatasa-fosfoproteínquinasa (69, 70) que regula la cantidad de espectrina en estado fosforilado y así mantiene a la membrana deformable y en su forma bicóncava.

PÉRDIDA DE LA REGULACIÓN METABÓLICA

La banda tres es una proteína integral de la membrana eritrocitaria, cuyo dominio citoplasmático posee una alta afinidad con las enzimas glicolíticas lactato deshidrogenasa, aldolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosfofructoquinasa, así como para la desoxihemoglobina (71).

La hemoglobina oxigenada induce la unión del dominio citoplasmático de la banda tres a estas enzimas, causando su inhibición y la consiguiente reducción del flujo de glucosa a través de la glicólisis. Como consecuencia, más glucosa es metabolizada por la vía de las pentosas fosfato, asegurando así niveles adecuados de NADPH necesarios para proteger al eritrocito del estrés oxidativo producido por la liberación del oxígeno. De otra parte, a una baja saturación de oxígeno, el desplazamiento de las enzimas glicolíticas desde la banda tres, incrementa el flujo de la glucosa a través de la vía glicolítica (72).

Cuando la sangre es almacenada, ocurre la pérdida progresiva de la proteína de banda tres, y con ella el eritrocito pierde la capacidad para su propia regulación metabólica (72). El efecto es la formación de agregados de dímeros y polímeros de banda tres, (eliminados tanto por vesiculación como por degradación por proteasas) y la paulatina distorsión de la arquitectura de la membrana celular.

Los fenómenos oxidativos también contribuyen a la pérdida de banda tres a través de la formación de los hemicromos (59), así como por la fosforilación excesiva de los residuos tirosina del segmento N-terminal de las proteínas (73). De hecho, se ha informado que la unión de las enzimas glicolíticas a la banda tres disminuye por la fosforilación (74, 75). Así, al perder los mecanismos de regulación metabólica, los eritrocitos almacenados consumen menos glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato y están menos protegidos contra el daño oxidativo.

Aunque cada vez se conoce más acerca de las diferentes rutas metabólicas del eritrocito y los mecanismos de producción de las diferentes alteraciones bioquímicas, no se ha logrado establecer un medio de almacenamiento totalmente capaz de evitarlas y de asegurar la preservación adecuada de sangre en condiciones de banco de sangre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Loutit JF, Mollison PL.** Advantages of a disodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative. *BMJ* 1943;2:744.
2. **Moore GL, Peck CC, Sohmer PR, Zuck TF.** Some properties of blood stored in anticoagulant CPDA-1 solution. A brief summary. *Transfusion* 1981;21:135.
3. **Hess J, Hill H, Oliver C, et al.** The effects of phosphate, pH, and AS volume on RBCs stored in saline-adenine-glucose-mannitol solutions. *Transfusion* 2000;40:1000.
4. **Valeri CR, Zaroulis CG.** Rejuvenation and freezing of outdated stored human red cells. *N Engl J Med* 1972;287:1307.
5. **Brecher ME, Zylstra-Halling VW, Pineda AA.** Rejuvenation of erythrocytes preserved with AS-1 and AS-3. *Am J Clin Pathol* 1991;96:767.
6. **Beutler E.** Liquid Preservation of Red Cells. En: Rossi E, Simon T,

- Moss G, Gould S. Principles of Transfusion Medicine. 2a ed. Baltimore. Williams and Wilkins. 1996: 51.
7. **Clark M.** Senescence of red blood cells: progres and problems. *Physiol Rev* 1988;68:503.
 8. **Murphy JR.** Erythrocyte metabolism. The equilibration of glucose-C14 between serum and erythrocytes. *J Lab Clin Med* 1960;55:281.
 9. **Murphy JR.** Erythrocyte metabolism. Glucose metabolism and pathways. *J Lab Clin Med* 1960;55:286.
 10. **Eaton JW, Brewer GJ.** Pentose phosphate metabolism. En Surgenor DM. The red blood cells. 2a ed. New York. Academic Press. 1974:438.
 11. **Brewer GJ.** General red cell metabolism. En Surgenor DM. The red blood cells. 2a ed. New York. Academic Press. 1974:397.
 12. **Friedemann H, Rapoport SM.** Enzymes of the red cell; a critical catalogue. En Yoshikawa H, Rapoport SM. Cellular and molecular biology of erythrocytes. Japan. University of Tokyo Press. 1974:181.
 13. **Lee R, Bithell T, Foerster J.** Wintrobe. Hematología Clínica. 9a ed. Buenos Aires Editorial Intermédica. 1994: 168.
 14. **Nakao M, Nakayama T.** Decrease phosphofuctokinase activity during blood preservation and the effect of intracellular ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;95:1294.
 15. **Marks PA, Johnson AB.** Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. *J Clin Invest* 1958;37:1542.
 16. **Bernstein RE.** Alterations in metabolic energetics and cation transport during aging of red cells. *J clin invest* 1959;38:1572.
 17. **Brewer GJ.** General red cell metabolism. En Surgenor DM. The red blood cells. 2a ed. New York. Academic Press. 1974:392.
 18. **Wallas CH.** Sodium and potassium changes in blood bank stored human erythrocytes. *Transfusion* 1979;19:210.
 19. **Shiga T, Sekiya M, Maeda N, Kon K, Okazaki M.** Cell age dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985;814:289.
 20. **Anderson DR, Davis JL, Carraway K.** Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1977;252:6617.
 21. **Greenwalt I.** A new type of phosphoric acid compound isolated from blood, with some remarks on the effect of substitution on the rotation of L-glyceric acid. *J Biol Chem* 1925;63:339.
 22. **Chanutin A, Curnish RR.** Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1967;121:96.
 23. **Valtis DJ, Kennedy AC.** Defective gas-transport function of stored red blood cells. *Lancet* 1954; 20:119.
 24. **Bartlett GR, Shafer AW.** Phosphorylation carbohydrate intermediates of the human erythrocyte during storage in acid citrate dextrose. Effect of the addition of inosine late in storage. *J Clin Invest* 1961; 20:1185.
 25. **Bellingham Aj, Grimes AJ.** Red cell 2,3-Diphosphoglycerate. *Br J Haematol*, 1973;25:555.
 26. **Hogman CF, Knutson F, Loof H.** Storage of whole blood before separation: the effect of temperature on red cell 2,3 DPG and the accumulation of lactate. *Transfusion* 1999;39:492.
 27. **Malberg PO, Hlastala MP, Woodson RD.** Effect of increased oxygen affinity on oxygen transport in hemorrhagic shock. *J Appl Physiol* 1979;47:889.
 28. **Fitzgerald RD, Martin CM, Dietz GE.** Transfusing red blood cells stored in CPDA-1 for 28 days fails to improve tissue oxygenation in rats. *Crit Care Med* 1997;25:726.
 29. **Moore GL.** Correlation of red cell 2,3-diphosphoglycerate to P50 values in stored blood. *Transfusion* 1987;27:293.
 30. **Grimes AJ.** Oxidation of haemoglobin. En Grimes AJ. Human red cell metabolism. 1a ed. London. Blackwell scientific publications. 1980.
 31. **Jacob HS, Brain MC, Dacie JV, Carrel RW, Lehmann H.** Abnormal Haem binding and globin SH group blockade in unstable haemoglobins. *Nature* 1968;218:1214.
 32. **Winterbourn CC, Carrel RW.** The attachment of Heinz bodies to the red cell membrane. *Br J Haematol* 1973;25:585.
 33. **Sears DA, Friedman JM, White DR.** Binding of intracellular protein to the erythrocyte membrane during incubation: the production of Heinz bodies. *J Lab Clin Med* 1975;86:722.
 34. **Capwala HQ, Desforges JF.** Membrane-bound hemicrome in density-separated cohorts of normal (AA) and sickled (SS) cells. *J Lab Clin Med* 1982;99:25.
 35. **Sheng K, Shariff M, Hebbel R.** Comparative oxidation of hemoglobins A and S. *Blood* 1998;91:3467.
 36. **Racek J, Herynkova R, Holecek V, et al.** Influence of antioxidants on the quality of stored blood. *Vox Sang* 1997; 72: 16-19.
 37. **Niki E, Yamamoto y, Komuro E, Sato K.** Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 201 S-205 S.
 38. **Carrel RW, Winterbourn CC, Rachmilewitz EA.** Activated oxygen and haemolysis. *Br J Haematol* 1975; 30: 259-264.
 39. **Weiss JJ.** Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin. *Nature* 1964; 202: 83-84.
 40. **Misra HP, Fridovich I.** The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972; 247: 6960-6962.
 41. **Liu T, Chiu D, Stern A.** Diethylenetriaminopentaacetic acid is unsuitable for long-term preservation of RBCs. *Transfusion* 2001; 41: 556-559.
 42. **Knight JA, Voorhees RP, Martin L, Anstall H.** Lipid peoxidation in stored red cells. *Transfusion* 1992; 32: 354-357.
 43. **Bretscher MS, Raff MC.** Mammalian plasma membranes. *Nature* 1975; 258: 43-49.
 44. **Zwaal RF, Comfurius P, Deenen LL.** Membrane asymetry and blood coagulation. *Nature (Lond)* 1977; 268: 358-360.
 45. **Jain SK.** Polymerization of membrane components in aging red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 92: 247-254.
 46. **Haest CW, Plasa G, Kamp D, Deuticke B.** Spectrin as a stabilizer of the phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1978; 509: 21-32.
 47. **Jain SK.** The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J Biol Chem* 1984; 259: 3391-3394.
 48. **Yamaja Setty BN, Kulkarni S, Koneti Rao A, Stuart MJ.** Fetal hemoglobin in sickle cell disease: Relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation. *Blood* 2000; 96: 1119-1124.
 49. **Sambrano GR, Terpstra V, Steinberg D.** Independent mechanisms for macrophage binding and macrophage phagocytosis of damaged erythrocytes, Evidence of receptor cooperativity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3442-3448.
 50. **Jain SK, Mohandas N, Clark M, Shohet S.** The effect of malonyldoaldehyde, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and 51Cr-survival of erythrocytes. *Br J Haematol* 1983; 53: 247-255.
 51. **Burton, G.W, Joyce A, Ingold K.U.** Is vitamin E the only lipid-soluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membrane?. *Arch Biochem Biophys* 1983;221:281-90.
 52. **Draper H, Saari A.** A simplified hemolysis test for vitamin e deficiency. *J Nutrition* 1969;98: 390-394.
 53. **Deepa K, Manoj V, Arun P, et al.** Increases lipid peroxidation of erythrocytes in blood stored in polyvinyl chloride blood storage bags plasticized with di-[2-ethyl hexyl] phtalate and effect of

- antioxidants. *Vox Sang* 1998; 75: 198-204.
54. **Wolfe LC, Byrne AM, Lux SE.** Molecular defect in the membrane skeleton of blood bank-stored cell: Abnormal spectrin-protein 4.1-actin complex formation. *J Clin Invest* 1986; 78: 1681-1686.
55. **Snyder LM, Fortier NL, Trainor J, et al.** Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J Clin Invest* 1985; 76: 1971-1977.
56. **Lux S, John K, Ukena T.** Diminished spectrin extraction from ATP-depleted human erythrocytes. *J Clin Invest* 1978; 61: 815-827.
57. **Snyder LM, Leb L, Piotrowski J, et al.** Irreversible spectrin-haemoglobin cross linking in vivo: a marker for red cell senescence. *Br J haematol* 1983; 53: 379-384.
58. **Fortier N, Snyder LM, Garver F, et al.** The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood* 1988; 71: 1427-1431.
59. **Low PS, Zinke K, Drenckhahn D.** The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 1985; 227: 531-533.
60. **Lutz HU, Bussolino F, Flepp R, et al.** Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7368-7372.
61. **Szelényi JG, Foldi J, Hollán SR.** Enhanced nonenzymatic glycosylation of blood proteins in stored blood. *Transfusion* 1983; 23: 11-14.
62. **Godin C, Caprani A.** Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity. *Eur Biophys J* 1997; 26: 175-182.
63. **Izumida Y, Seiyama A, Maeda N.** Erythrocyte aggregation: bridging by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1067: 221-226.
64. **Hadengue AL, Del-Pino M, Simon A, Levenson J.** Erythrocyte disaggregation shear stress, sialic acid, and cell aging in humans. *Hypertension* 1998; 32: 324-330.
65. **Hovav T, Yedgar S, Manny N, Barshtein G.** Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage. *Transfusion* 1999; 39: 277-281.
66. **Krugluger W, Koller M, Hopmeier P.** Development of a carbohydrate antigen during storage of red cells. *Transfusion* 1994; 34: 496-500.
67. **McCue JP, Vincent JM.** Changes in the red blood cell membrane phosphate concentration during blood bank storage. *Transfusion* 1981; 21: 107-112.
68. **Manno S, Takakuwa Y, Nagao K, Mohandas N.** Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by α -spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 1995; 270: 5659-5665.
69. **Ghailani N, Guillemin C, Vigneron C.** Chronology of the formation of vesicles and membrane protein aggregates during erythrocyte aging. *Nouv Rev Fr Hematol* 1995; 37: 313-319.
70. **Shapiro D, Marchesi V.** Phosphorylation in membranes of intact human erythrocytes. *J Biol Chem* 1977; 252: 508-517.
71. **Zhang D, Kiyatkin A, Bolin J, Low P.** Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood* 2000; 96: 2925-2933.
72. **Messana L, Ferroni L, Misiti F, et al.** Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation. *Transfusion* 2000; 40: 353-360.
73. **Brunatti AM, Bordin L, Clari G, et al.** Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes: identification of primary of secondary phosphorylation sites. *Blood* 2000; 96: 1550-1557.
74. **Low PS, Allen DP, Zioncheck TF, et al.** Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding. *J Biol Chem* 1987; 262: 4592-4596.
75. **Harrison ML, Rathinavelu P, Arese P, et al.** Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of the erythrocyte glycolysis. *J Biol Chem* 1991; 266: 4106-4111.