



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Modificaciones de la membrana de eritrocitos humanos expuestos a *Plasmodium falciparum* relacionadas con la adhesión a la célula endotelial y la capacidad de formar agregados

Autora Renata Blanco

Directora Cora Lilia Alvarez

Lugar de trabajo: IQUIFIB (INSTITUTO DE QUÍMICA Y FISICOQUÍMICA BIOLÓGICAS), Facultad de Farmacia y Bioquímica

Fecha: 7/2023

Renata Blanco

Cora Lilia Alvarez (Directora)

Agradecimientos

Agradezco de corazón a todas las personas que contribuyeron de alguna manera en la realización de esta tesis de licenciatura. Sus valiosos aportes, apoyo y motivación fueron fundamentales para alcanzar este logro.

Principalmente a mi directora Cora Alvarez, por su orientación y paciencia durante todo el proceso de investigación. Sus conocimientos y consejos me guiaron en cada etapa de este proyecto y me permitieron crecer tanto profesional como personalmente. También a todo el grupo del laboratorio por los espacios y el tiempo compartido.

Y finalmente un agradecimiento especial a mi familia y amigos que, con o sin distancia de por medio, siempre están acompañando.

Resumen

La malaria tiene graves consecuencias a nivel circulatorio, pudiendo resultar en la obstrucción de capilares de pequeño diámetro. Es crucial investigar los mecanismos bioquímicos que subyacen a esta enfermedad. En la infección por malaria, los parásitos crecen dentro de los glóbulos rojos (GR). Los GR infectados por los parásitos (GRi) suelen representar una minoría de los GR en los pacientes con malaria, siendo la mayoría GR no infectados (GRni). A pesar de no tener el parásito dentro, los GRni sufren alteraciones que podrían contribuir en gran medida a la patología en la malaria. Por esta razón, se planteó evaluar la agregación de GR y su influencia en la adhesión al endotelio vascular, centrándose en los glóbulos rojos no infectados (GRni), células que estuvieron en contacto con el parásito pero que no han sido infectadas por *Plasmodium falciparum*, bajo la hipótesis de que los GRi liberan al medio factores que modifican la membrana plasmática de los GRni favoreciendo la agregación y la adhesión al endotelio de estas células. Los resultados revelaron notables diferencias en los agregados formados por GRni en comparación con los formados por glóbulos rojos de control (GRc). Los agregados de GRni mostraron una disposición más desorganizada y voluminosa que los GRc. Asimismo, se observó un mayor número de GRni adheridos a las células endoteliales EAhy 926 en comparación con los GRc. Estos hallazgos indican que no sólo los glóbulos rojos infectados (GRi) desempeñan un papel en la patología, sino que también se ven afectados los GRni. Además, se pudo apreciar un efecto diferencial de nucleótidos en la agregación y adhesión de GRni y GRc. Si bien estos últimos resultados no son aún concluyentes y se requiere llevar a cabo más ensayos, sería posible que la agregación y adhesión de GRni esté influida por la presencia de nucleótidos extracelulares.

Abstract

Malaria has severe consequences at the circulatory level, potentially resulting in the obstruction of small-diameter capillaries. It is crucial to investigate the biochemical mechanisms underlying this disease. In malaria infection, parasites grow inside red blood cells (RBCs). Infected RBCs (iRBCs) typically represent a minority of RBCs in malaria patients, with the majority being uninfected RBCs (uRBCs). Despite not harboring the parasite, uRBCs undergo alterations that could significantly contribute to pathology in malaria. Therefore, the evaluation of RBC aggregation and its influence on vascular endothelial adhesion was proposed, focusing on uninfected red blood cells (uRBCs), which are cells that have been in contact with the parasite but have not been infected by *Plasmodium falciparum*. The hypothesis was that iRBCs release factors into the environment that modify the uRBC plasma membrane, promoting aggregation and adhesion of these cells to the endothelium. The results revealed notable differences in the aggregates formed by uRBCs compared to those formed by control red blood cells (cRBCs). The uRBC aggregates exhibited a more disorganized and voluminous arrangement than cRBC aggregates. Additionally, a higher number of

uRBCs adhered to EAhy 926 endothelial cells compared to cRBCs. These findings indicate that not only infected red blood cells (iRBCs) play a role in pathology, but also uRBCs are affected. Furthermore, a differential effect of nucleotides on the aggregation and adhesion of uRBCs and cRBCs was observed. Although these recent results are not yet conclusive, and further assays are required, it is possible that the aggregation and adhesion of uRBCs are influenced by the presence of extracellular nucleotides.

Agradecimientos	1
Resumen	2
Abstract	2
Abreviaturas	5
1. Introducción	6
1.1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	6
1.2. Síntomas y tratamiento de la enfermedad.....	8
1.3. Modificaciones en membrana.....	8
1.4. Agregación.....	9
1.5. Citoadherencia.....	10
1.6. ATP como molécula de señalización.....	10
1.7. Glóbulos rojos no infectados.....	11
2. Hipótesis	12
3. Objetivos	12
4. Materiales y métodos	12
4.1. Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	12
4.2. Separación de GR infectados y no infectados por columna magnética....	13
4.3. Cultivo de células endoteliales (EAhy 926).....	13
4.4. Cuantificación de la agregación por transmitancia.....	14
4.5. Cuantificación de la agregación por microscopía.....	14
4.6. Cuantificación de la adhesión a células EAhy 926.....	14
4.7. Análisis estadístico.....	15

5. Resultados	16
5.1. Análisis de la agregación de GRni.....	16
5.2. Análisis del perfil de adhesión de GRni a células endoteliales.....	21
6. Discusión	28
7. Conclusión	31
8. Anexo	32
8.1 Protocolo para descongelar parásitos.....	32
8.2 Protocolo de sincronización.....	32
8.3 Protocolo para descongelar células EAhy 926.....	32
8.4. Protocolo para cultivo y siembra de células EAhy 926.....	32
8.5. Preparación DMEM.....	33
8.6. Preparación RPMI.....	33
8.7. Preparación Buffer salino (PBS).....	33
Referencias	34

Abreviaturas

GRc: Glóbulos Rojos control
GRi: Glóbulos Rojos infectados
GRni: Glóbulos Rojos no infectados
ATP: Adenosina Trifosfato
ADP: Adenosina Difosfato
AMP: Adenosina Monofosfato
ADO: Adenosina
API: Apirasa
S: Suramina
8PT: 8 Fenil Teofilina

1. Introducción

La malaria es una enfermedad causada por protozoos parásitos del género *Plasmodium* transmitidos por la picadura de mosquitos *Anopheles* infectados. Son cinco las especies de parásitos causantes de la malaria en humanos, siendo *Plasmodium falciparum* el parásito que genera las consecuencias más graves, lo que representa un importante problema de salud pública en todo el mundo. La malaria afecta a millones de personas cada año y causa numerosas muertes a nivel mundial (World Health Organization, 2020), especialmente en países en desarrollo con sistemas de salud deficientes.

En Argentina no hay casos autóctonos desde 2010; sin embargo, el mosquito del género *Anopheles* está presente en provincias del norte Argentino, como Salta, Jujuy y Misiones, por lo que se realizan actividades destinadas a la prevención y a evitar la reintroducción de la enfermedad en nuestro país. Especialmente por las elevadas temperaturas que está generando el cambio climático, que podrían ampliar el rango de acción de distintos vectores de enfermedades como el Dengue o la Malaria, resulta de relevante importancia generar líneas de investigación en el tema.

1.1. Ciclo de vida de *Plasmodium*

El género *Plasmodium* pertenece al filo Apicomplexa, son protistas endoparásitos de animales con un único complejo apical. Las cinco especies de *Plasmodium* que infectan al hombre son: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. El ciclo de vida (Figura 1) incluye un hospedador intermediario (hombre) y un hospedador definitivo (el mosquito).

El ciclo comienza cuando el mosquito hembra infectado pica al hombre para alimentarse, el parásito ingresa al hombre en forma de esporozoitos. En este hospedador se da el ciclo asexual del parásito que consta de un estadio exo-eritrocitario y un estadio intra-eritrocitario. En *P. falciparum*, durante el estadio exo-eritrocitario, los esporozoitos llegan al hígado ingresan a los hepatocitos y permanecen por diez días, se desarrollan y multiplican, hasta que generan la ruptura de la célula hospedadora y se liberan a sangre. Una vez que pasan al torrente sanguíneo en forma de merozoito, invaden los eritrocitos dando lugar al estadio intra-eritrocitario, en el cual ingresan por interacción de proteínas con receptores específicos de la membrana celular del eritrocito (Counihan et al. 2021). En esta fase de 48 horas de duración en el caso de *P. falciparum*, el parásito pasa por un estadio de anillo, trofozoito y esquizonte. El esquizonte rompe el glóbulo rojo, y se liberan a la sangre nuevas estructuras infectivas (merozoitos) que invadirán nuevos glóbulos rojos (GR) para así repetir el ciclo asexual en el hospedador humano. En el momento

de la ruptura del GR que contiene el parásito maduro se presentan las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

En determinado momento, una serie de factores como el clima, la parasitemia, las cepas de *Plasmodium*, la fiebre y otros factores desconocidos (Usui & Williamson 2021), desencadenan la diferenciación sexual, formándose gametocitos a partir de GR infectados en estadio de trofozoito inmaduro. En una nueva picadura de mosquito, los gametocitos masculino y femenino van a pasar al estómago del mosquito donde se formarán las gametas; luego, el macrogametocito sin flagelo se fusiona con el microgametocito con flagelo, dando un ooquineto. Este invade el intestino del mosquito y se desarrolla un ooquiste. Cuando el ooquiste se rompe se liberan los esporozoitos que posteriormente pasan a situarse en las glándulas salivales del mosquito. La inoculación de esporozoitos durante la picadura en un nuevo hospedador humano perpetúa el ciclo.

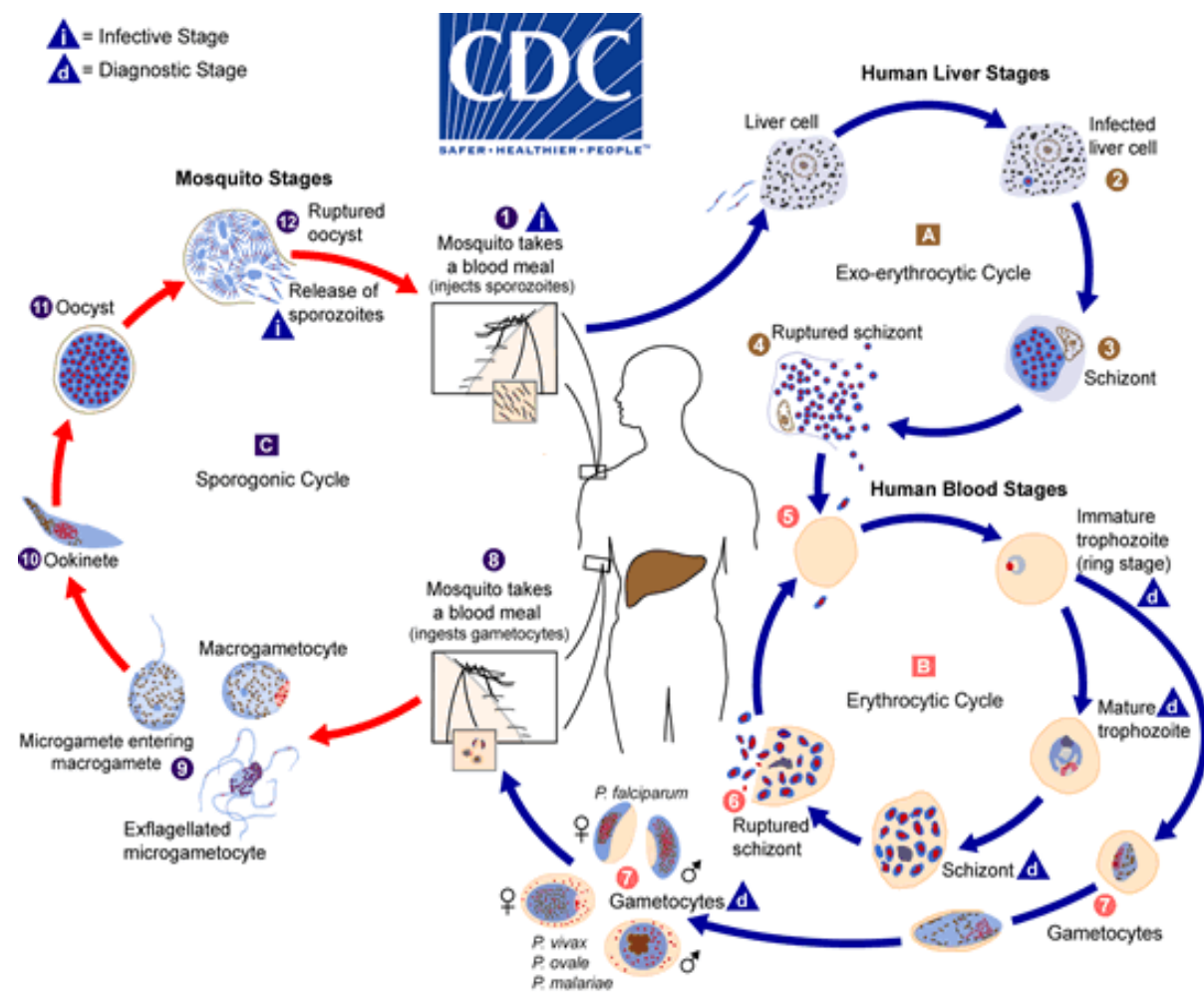


Figura 1: Ciclo de vida de *Plasmodium*. Tomado de la página web del CDC, Estados Unidos.

1.2. Síntomas y tratamiento de la enfermedad

Los primeros síntomas de la enfermedad son poco específicos y similares a los de una infección sistémica de origen viral: dolor de cabeza, debilidad, fatiga, malestar abdominal, dolores en articulaciones y músculos. El cuadro clínico clásico consiste en accesos febriles precedidos por escalofrío y seguidos de intensa sudoración, y se repiten cada 24, 48 ó 72 horas, según la especie de *Plasmodium*.

El tratamiento de la malaria consiste en la utilización de drogas que eliminen tanto las formas circulantes del parásito en sangre (parasitemia), como aquellas que persisten en el hígado, que son responsables de las recaídas de la enfermedad; además de drogas gametocidas, para garantizar el bloqueo de la transmisión (Gürbilek 2013). Las drogas recomendadas en el país para quimioprofilaxis a viajeros a zonas endémicas de paludismo son la doxiciclina y la mefloquina.

Además, desde el año 2019 comenzó a implementarse en algunos países de África un programa de vacunación coordinado por la Organización Mundial de la Salud. La vacuna RTS,S/AS01 (RTS,S) está en fase de prueba y se basa en una proteína recombinante del estadio pre-eritrocítico de *P. falciparum*. Es una herramienta más en la prevención de la malaria que surge del conocimiento básico de los mecanismos y el ciclo de vida del parásito (Monzón Llamas et al. 2021).

Durante la infección por malaria, la anemia es la principal manifestación clínica de la enfermedad. La destrucción de los GR infectados (GRi) solamente no explica los valores de anemia alcanzados, los GR no infectados (GRni) también contribuyen a la anemia y además hay una deficiencia en la eritropoyesis (Mohandas & An 2013). Es interesante mencionar que la anemia persiste aún luego del tratamiento antimalárico (Fernandez-Arias, Rivera-Correa, Gallego-Delgado, Rudlaff, Fernandez, Roussel, Götz, Gonzalez, S. Mohanty, et al. 2016).

1.3. Modificaciones en membrana

La presencia de *P. falciparum* dentro del GR induce importantes modificaciones en esta célula: los componentes de la membrana se reorganizan y se dan cambios tanto estructurales como bioquímicos. Proteínas del parásito interactúan con el citoesqueleto por lo que el GR pierde elasticidad y deformabilidad (Boddey & Cowman 2013) (Sisquella et al. 2017).

Además, en la membrana del GRi se ubican proteínas transportadoras del parásito que facilitan la entrada y salida de aniones orgánicos, aminoácidos, azúcares y nucleótidos. Este fenómeno es conocido como “nuevas vías de permeabilidad” (NPP por sus siglas en inglés)(Baumeister et al. 2006) (Akkaya et al. 2009) (Tanneur et al.

2005) (Huber 2012) y favorece al parásito en la obtención de ciertos nutrientes e iones necesarios, y en la eliminación de productos de desecho. Durante el desarrollo intraeritrocítico *P. falciparum* degrada la hemoglobina obteniendo los aminoácidos necesarios para sintetizar sus propias proteínas, generando como producto de desecho la hemozoína. La hemozoína es un cristal que se acumula en la vacuola digestiva del parásito.

Las modificaciones en la membrana del GRi le otorgan mayor rigidez, perdiendo la capacidad de deformación necesaria para pasar por los capilares de pequeño diámetro y por el bazo (Dondorp et al. 1997). El bazo tiene la capacidad de retener GR que no se encuentren en condiciones óptimas. Aquellos GR que son incapaces de circular por los sinusoides esplénicos son retenidos y fagocitados por macrófagos, eliminándose de la circulación sanguínea. En condiciones fisiológicas, esto evita que los capilares y vénulas se obstruyan con GR rígidos y senescentes.

1.4. Agregación

La agregación de los GR depende de la concentración y de la presencia de proteínas plasmáticas, siendo las más importantes en condiciones fisiológicas el fibrinógeno y las inmunoglobulinas. La mayor o menor tendencia de agregación de los GR depende de factores como la carga eléctrica superficial, conferida por las glicoforinas (glicocálix) ricas en ácido siálico. Éstas le otorgan al GR una carga superficial negativa, produciendo así un efecto de repulsión electrostática entre GRs, dando lugar a una reducción de la agregación eritrocitaria. Cuando la sangre se encuentra en reposo, los GR forman agregados en forma de “pilas de monedas” llamados “rouleaux”(Perelson & Wiegel 1982).

La enfermedad de malaria transcurre con problemas circulatorios, donde se forman agregados llamados “rosetas” por la unión adhesiva entre GRi con uno o varios GRni. Las interacciones proteína-proteína y la alteración de la carga de la membrana de los GR regulan la formación de estos agregados (Jayavanth & Park 2007). En la formación de rosetas intervienen una gran variedad de receptores del GR y proteínas del plasma, entre ellos, las glicoproteínas que determinan el grupo sanguíneo A y B, el receptor del complemento CR1/CD35, las inmunoglobulinas IgM e IgG, factores del complemento, glicoconjugados, CD36, entre otros componentes. Por otro lado, cada genoma de parásito tiene múltiples genes *var* que codifican adhesinas mediadoras de la formación de rosetas (Kraemer & Smith 2006), por lo que, la formación de rosetas difiere de unos aislamientos de *P. falciparum* a otros (Mercereau-Puijalon et al. 2008). Los principales ligandos son PfEMP1 y las proteínas RIFIN(Goel et al. 2015). La formación de rosetas afecta significativamente el flujo sanguíneo (Dondorp et al. 2008).

1.5. Citoadherencia

En las formas severas de malaria, existe una fuerte asociación entre el desarrollo de la enfermedad y el número de GRi en los vasos sanguíneos de pequeño calibre, los cuales se adhieren al endotelio vascular (citoadherencia) (Mohandas & An 2013) (Dondorp et al. 2000) y causan obstrucción de los mismos. Tanto la citoadherencia como la formación de rosetas están asociadas a cambios en la expresión de moléculas con propiedades adhesivas (Moxon et al. 2011). La citoadherencia está mediada por la interacción entre proteínas del parásito expresadas en la membrana del GR y distintas moléculas de adhesión en la célula endotelial (Zhu et al. 2011). Se cree que una mayor adhesión de GRi al endotelio vascular evita la circulación del parásito por el bazo y que sea eliminado por esta vía de la circulación. Algunos autores sostienen que la capacidad de adhesión continúa durante varias horas después del tratamiento antimalárico (Hughes et al. 2010).

La mayor adhesión de los GRi al endotelio vascular y un aumento en la agregación puede causar obstrucción en los capilares de pequeño diámetro, con consecuencias graves si el parásito logra pasar la barrera hematoencefálica y obstruir los vasos sanguíneos del cerebro. La malaria cerebral afecta principalmente a niños menores de cinco años, dejando consecuencias neurológicas y en el peor de los casos causando la muerte (Idro et al. 2010).

1.6. ATP como molécula de señalización

En condiciones de hipoxia e isquemia, el GR libera ATP al medio a través de un mecanismo regulado por canales y transportadores (Ellsworth et al. 2009). Una vez en el medio extracelular, el ATP interacciona con receptores purinérgicos (receptores P, por nucleótidos purínicos y pirimidínicos y adenosina) de manera autócrina y/o parácrina (Burnstock 2012); lo que lleva a la síntesis de vasodilatadores. Estos interaccionan con las células musculares que rodean al vaso y provocan vasodilatación (Ellsworth et al. 2016). La acumulación de ATP extracelular (ATPe) dependerá no sólo de la liberación del nucleótido sino también de su metabolismo extracelular; es decir, la hidrólisis a ADP, AMP y ADO (adenosina) por parte de enzimas de la membrana (ectonucleotidasas).

Los receptores P se dividen en dos grupos: receptores P1 (con alta afinidad por adenosina) y receptores P2 (con alta afinidad por nucleótidos di- y trifosfato) (Burnstock 2012). Los receptores P2 se dividen en los subtipos P2X y P2Y. Los receptores P2X son canales iónicos cuya activación por ATPe lleva a aumentos de la concentración citosólica de Ca^{2+} y/o Na^{+} . Los receptores P2Y son activados por ATP, ADP, UTP y UDP y están acoplados a proteínas G específicas, cuya activación lleva a aumentos en la concentración citosólica Ca^{2+} , o alteraciones de la concentración de AMP cíclico (Burnstock & Knight 2004).

La activación de los receptores P2 de los GR maduros estimula mecanismos de señalización que median la regulación de volumen, la liberación de eicosanoides, la exposición de fosfatidilserina, la hemólisis, la liberación de ATP y la susceptibilidad y/o la resistencia a infecciones (Sluyter 2015).

1.7. Glóbulos rojos no infectados

En humanos que transitan la enfermedad sin complicaciones la parasitemia es baja, alrededor de 3-4% son GRni, por lo que los restantes GR representan GRni. Los GRni son un sistema de estudio interesante, dado que son células que estuvieron en contacto con el parásito pero que, si bien no han sido infectadas, han sufrido cambios metabólicos y morfológicos escasamente caracterizados (Sabolovic & Hashimoto 1992) (Sabolovic et al. 1994).

Estas células contribuyen significativamente a la anemia, ya que por cada GRi que se lisa por la presencia del parásito, alrededor de 8 GRni son lisados en casos de infecciones con *P. falciparum* y 34 en los casos de infecciones con *P. vivax* (Collins et al. 2003). En cuanto al mecanismo, se observó que la infección de ratones por *Plasmodium* induce la generación de anticuerpos anti-fosfatidilserina que reconocen GRni y los destruyen (Fernandez-Arias, Rivera-Correa, Gallego-Delgado, Rudlaff, Fernandez, Roussel, Götz, Gonzalez, A. Mohanty, et al. 2016).

Los GRni están también involucrados en la citoadherencia, incluso sin haber estado en contacto directo con GRi. Recientemente, se ha demostrado que un factor soluble y lábil al calor, presente en el medio de cultivo de *P. falciparum*, promueve el fenotipo adhesivo en GRni (Dalimot et al. 2022).

En estudios previos con GRi se mostró una activación de la salida de ATP, que aumentó con la progresión del ciclo de infección (Alvarez et al. 2014). Luego, se vio que los GRni también sufren una activación de la liberación de ATP, hayan tenido o no contacto físico con GRi (Alvarez et al. 2022). Esta salida de ATP es facilitada por hemicanales de panexina 1, tanto en GRi como en GRni (Alvarez et al. 2014) (Alvarez et al. 2022). Se sabe que el ATPe y sus derivados generan modificaciones en la vasculatura a través de la interacción con células endoteliales (Ellsworth et al. 2016). Sin embargo, el efecto del ATPe y otros nucleósidos y nucleótidos en la formación de agregados y en la citoadherencia en GRni no ha sido un tema estudiado con profundidad. Este conocimiento podría contribuir al estudio de la alteración del flujo vascular en la patología de malaria.

2. Hipótesis

En cultivo los GRi están en contacto con los GRni y durante ese período los GRi liberan al medio factores que modifican la membrana plasmática de los GRni, lo cual favorece la agregación y la adhesión al endotelio de estas células.

3. Objetivo

Con el fin de determinar las implicancias de la interacción de GRi por *P. falciparum* con GRni, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1- Analizar agregación de GRni.
- 2- Analizar el perfil de adhesión de GRni a células endoteliales.

4. Materiales y métodos

4.1. Cultivo de *Plasmodium falciparum*

Para el cultivo de *P. falciparum* se utilizó la cepa NF-54, cambiando diariamente el medio de cultivo. El medio utilizado fue RPMI 1640 (con 22 mM de glucosa, 25 mM HEPES, 0,65 mM hipoxantina y 50 µg/ml de gentamicina). Este medio se denomina incompleto. Luego, se suplementa con 0,5% albumax II (medio completo). Se mantuvo a un hematocrito de 5 % en botellas de cultivo T25 a 37 °C agregando GR (grupo A, factor Rh positivo) de pacientes sanos obtenidos siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de ética en investigación clínica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) (Res (CD) N° 2169- 17570). La sangre obtenida de donantes voluntarios fue lavada con RPMI incompleto, 3 centrifugaciones (3 minutos a 900 xg). El plasma se conservó a 4°C y se descartó la fase intermedia que contiene glóbulos blancos y plaquetas, los GR se mantuvieron por aproximadamente 2 semanas. Todo el procedimiento se realizó en esterilidad.

El cultivo se mantuvo en presencia de una mezcla de gases que consta de 5% CO₂, 10% O₂ y 85% N₂, a una parasitemia de alrededor de 5%. La parasitemia se controló realizando frotis, los cuales, luego de teñidos con Giemsa, fueron observados al microscopio (Nikon E200) con un aumento de 100x. Se contó el número de GR infectados en relación a los GR totales, calculando un promedio de al menos 10 campos.

La manipulación de los cultivos se realizó en una cámara de bioseguridad 2 en el Laboratorio de Parasitología Clínica y Molecular (IMPAM-UBA-CONICET), dirigido por la Dra. Repetto (STAN-UBA-CONICET).

La sincronización del cultivo (presencia de un único estadio de infección intraeritrocítico) se realizó por tratamiento con sorbitol (Ver anexo).

4.2. Separación de GR infectados y no infectados por columna magnética

Suspensiones de GRi en estadio de trofozoito sincronizadas de parasitemia 3-6% fueron pasadas a través de una columna magnética (columna MACS LS, Miltenyi Biotec). Este procedimiento retiene a los GRi en estadio de trofozoito debido a las propiedades magnéticas del cristal de hemozoina (formado por degradación de la hemoglobina por parte del parásito), mientras que los GRni eluyen. Brevemente, las columnas fueron colocadas en un separador magnético y se lavaron con 5 ml de buffer salino (PBS) antes de usar (composición del PBS en el anexo). Los GR provenientes del cultivo se centrifugaron a 900 xg por 3 minutos y el pellet se resuspendió en 2 ml de PBS suplementado con albúmina 1%. La suspensión de GRi se colocó en la columna, donde los GRi quedaron retenidos y en el eluato quedaron los GRni (Figura 2). El mismo procedimiento se realizó con un cultivo de GR no parasitados para obtener la población control (GRc). Luego, de la separación, los GRc y los GRni fueron lavados con PBS y usados en los distintos experimentos.

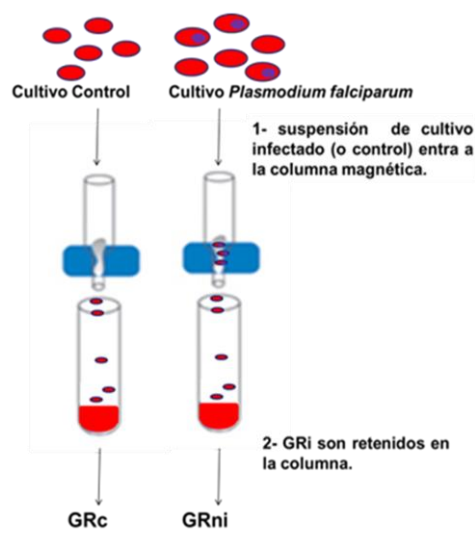


Figura 2: Purificación de GRni por columnas magnéticas. Los GRi en estadio de trofozoito quedan retenidos debido a las propiedades magnéticas de la hemozoina, mientras que los GRni eluyen. El mismo procedimiento se realiza con un cultivo de GR no parasitados para obtener la población control (GRc)

4.3. Cultivo de células endoteliales (EAhy 926)

Las células EAhy 926 fueron mantenidas en botellas T25, con medio DMEM alta glucosa con 10% de suero fetal bovino en estufa a 37°C y 5% CO₂. Para los experimentos de adhesión, células EAhy 926 fueron sembradas en placas de 24 pocillos (ver anexo).

Se ha demostrado que esta línea celular preserva características similares a las de las células endoteliales humanas primarias (Bauer et al. 1992) (Aranda & Owen 2009); el hecho de ser una línea celular ofrece muchas ventajas con respecto a los cultivos

primarios de células endoteliales en términos de uniformidad y reproducibilidad de cultivos.

4.4. Cuantificación de la agregación por transmitancia

Se midió la cinética de agregación en una suspensión de GRc por 4 min a 37°C en placas de 96 pocillos con 3 concentraciones de plasma (0, 50 y 100%) y 2 hematocritos (20 y 40%). Se midió la absorbancia a 670nm, calculando la transmitancia como $-10^{\text{ABSORBANCIA}}$ (BioTek Eynergy Hi). La transmitancia es directamente proporcional a la agregación de los GR. Se utilizó tripsina como control positivo, para eliminar cargas superficiales de la membrana de los GR; este tratamiento disminuye la repulsión electrostática entre las células, induciendo una mayor interacción y en consecuencia mayor agregación. Como control negativo se utilizó PBS; al no haber proteínas en el medio la agregación no se produce.

Una vez elegida la concentración de plasma y el hematocrito, se evaluó la agregación con diferentes tratamientos: ATP, ADP y AMP 1mM; siendo el tratamiento control plasma solo. El tiempo cero de las cinéticas corresponde al momento del agregado del plasma. Los tratamientos se realizaron por duplicado o triplicado con entre 1 y 3 muestras biológicas (N=1-3).

4.5. Cuantificación de la agregación por microscopía

Se midió la agregación en suspensiones de GRc y GRni obtenidos por columna (Figura 2). La suspensión de hematocrito de 1.5% con plasma se incubó en presencia y ausencia de ATP y ADP 1mM. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos por 30 minutos a 37°C.

Se tomaron microfotografías de al menos 10 campos (Nikon Eclipse TE300). Se calculó la agregación como: 1- porcentaje de área con células formando agregados respecto al área total, y 2- número de células aisladas, siendo esta una medida inversamente proporcional a la agregación.

4.6. Cuantificación de la adhesión a células EAhy 926

Se colocaron 4×10^4 - 8×10^4 células EAhy 926 en placas de 24 pocillos y se cultivaron a 37°C hasta que formaron una monocapa 100% confluyente. El día del experimento, se realizaron 3 lavados con PBS y se colocaron las suspensiones de GRc y GRni obtenidos por columna (Figura 2) y GRi (parasitemia 3-6%) en contacto con las células endoteliales. Las suspensiones de GRc, GRi y GRni se prepararon de la siguiente

manera: 10 μ l de cada tipo celular (GRc, GRi o GRni) de 10% hematocrito en un volumen final de 500 μ l de PBS se pre-incubaron por 15 minutos con diferentes tratamientos. Los tratamientos fueron: a) Apirasa (4 unidades/ml). La apirasa es una enzima que degrada el ATP y ADP del medio; b) 1 μ M de ATP, ADP, AMP y ADO y c) una mezcla (3V) que contiene: 10 μ M isoproterenol (agonista β -adrenérgico), 30 μ M forskolina (activador de la adenilato ciclasa) y 100 μ M papaverina (inhibidor de fosfodiesterasas). La mezcla 3V fue utilizada en trabajos previos e induce un aumento del contenido de AMPc en GR provocando una salida regulada de ATP (Montalbetti et al. 2011) (Alvarez et al. 2014) (Alvarez et al. 2022). Luego del agregado de los tratamientos sobre las células endoteliales se incubaron por 30 minutos a 37°C; posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y finalmente se tomaron microfotografías con un microscopio (Nikon Eclipse TE300) con un aumento de 40x. Se contó el número de GR adheridos a la monocapa en al menos 10 campos. El tratamiento control consistió en medio PBS. Los tratamientos se realizaron por triplicado con 3-6 muestras biológicas (N=3-6).

Algunos tratamientos fueron repetidos en presencia y ausencia de inhibidores no específicos de receptores P: suramina 100 μ M para inhibir los receptores P2 y 8-sulfofenilteofilina 100 μ M para inhibir los receptores P1.

Para demostrar que los tratamientos no afectan la adhesión de las células endoteliales a la placa, se realizó el ensayo de cristal violeta. El colorante se une electrostáticamente a las proteínas nucleares y tiñe el ADN. La cantidad de colorante absorbida por las células se mide espectrofotométricamente a 540 nm y se correlaciona con el número de células adheridas. Para este procedimiento, se cultivaron y trataron las células endoteliales de la misma manera que para los experimentos de adhesión, en ausencia de GR. Luego se fijaron con paraformaldehído 4% y después de lavar con PBS se agregó el colorante cristal violeta (0.5%) por 20 minutos. Se eliminó el exceso de colorante y se lavó exhaustivamente con agua. Finalmente, se solubilizó el colorante unido con SDS 1% y se midió la absorbancia (BioTek Eynergy Hi).

Para evaluar la viabilidad celular frente a los distintos tratamientos, se realizó el ensayo de MTT que consiste en medir la actividad de la reductasa mitocondrial. Se incuban las células EAhy 926 con mtt (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio) que es un compuesto color amarillo que puede ser reducido a formazan por la reductasa mitocondrial, virando de color. Se solubiliza con DMSO y se mide la absorbancia a 570nm.

4.7. Análisis estadístico

El análisis de imágenes fue realizado mediante el software ImageJ. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad. Las comparaciones entre resultados obtenidos con los distintos tratamientos se analizaron con Test de Student.

5. Resultados

5.1. Análisis de la agregación de GRni

Para poder analizar la agregación de los GR, se comenzó poniendo a punto las metodologías con GRc, probando dos hematocritos y distintas concentraciones de plasma.

Con el objeto de encontrar el hematocrito óptimo, se realizó una cinética en placa de 96 pocillos con GRc resuspendidos únicamente en plasma (100% plasma), con hematocritos de 20% y 40% (Figura 3), determinando el punto de máxima agregación alcanzado (Figura 4).

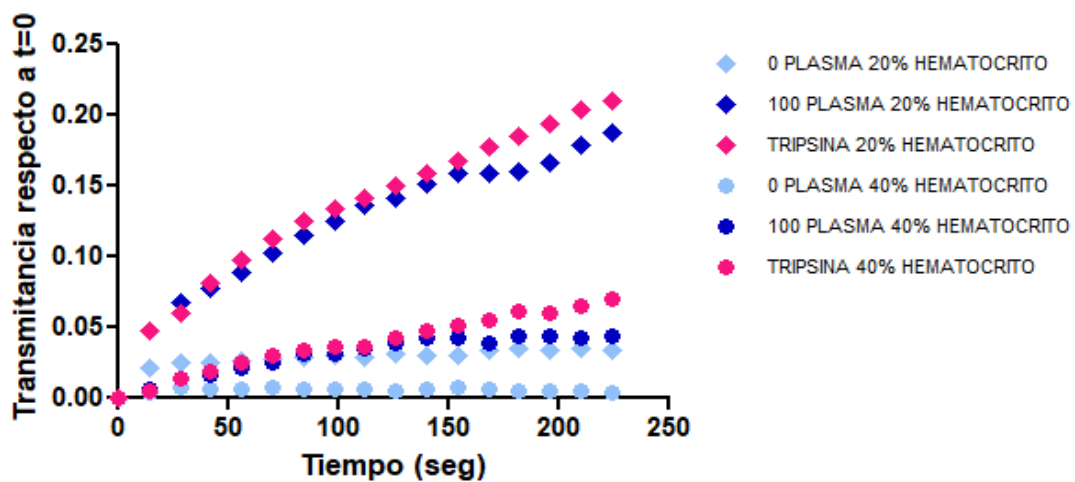


Figura 3: **Cinética de agregación.** Transmitancia relativizada a tiempo cero, para GRc con hematocrito 20% (rombo) o 40% (círculo), resuspendidos en plasma (100 plasma). Se utilizó tripsina como control positivo de agregación. Se calculó el promedio de dos réplicas (N=1).

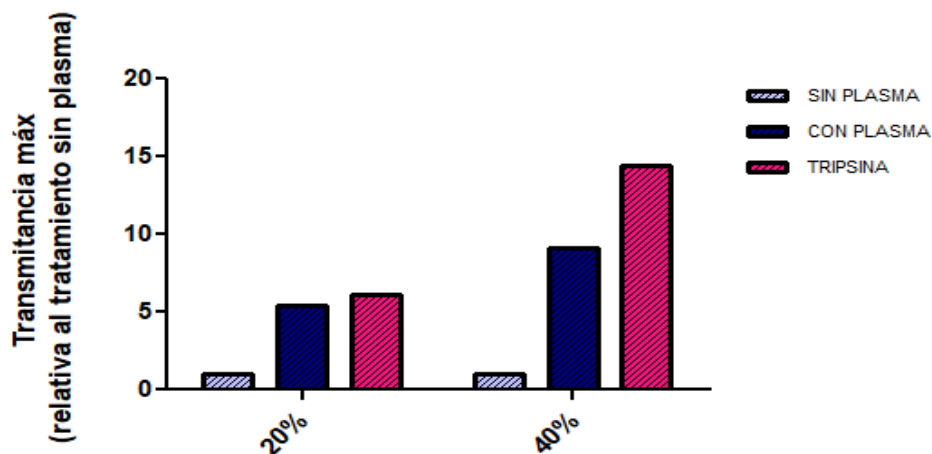


Figura 4: **Máxima agregación a los 4 minutos.** Se calculó promedio (N=1) de transmitancia máxima de GRc resuspendidos en plasma (100 plasma), relativo a una suspensión sin plasma, según cada hematocrito. Datos derivados de la Figura 3.

Dado que la agregación es dependiente del número de partículas y habiendo observado aumento tanto en 20% como en 40% hematocrito, en la condición con plasma respecto al tratamiento con PBS, se continuó evaluando la agregación de GRc con el hematocrito de 40%.

Luego, se probó disminuir la concentración de plasma (Figura 5). Una disminución al 50% tuvo un efecto drástico sobre la agregación, las curvas de 0 y 50 plasma se ven superpuestas en la cinética (Figura 5) y el punto de máxima agregación tampoco refleja diferencias entre ambas concentraciones (Figura 6). Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se continuaron las pruebas con GR resuspendidos en 100% plasma.

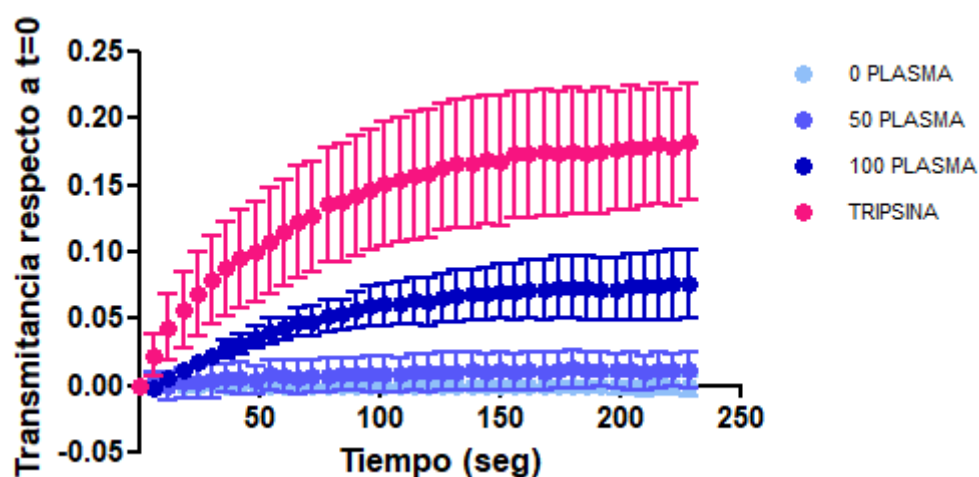


Figura 5: **Cinética de agregación.** Transmitancia relativizada a tiempo cero, para GRc (40%hematocrito) con PBS (0 plasma), PBS y plasma (50 plasma) o solo plasma (100 plasma). Se utilizó tripsina como control positivo de agregación. Se calculó promedio y error (N=3).

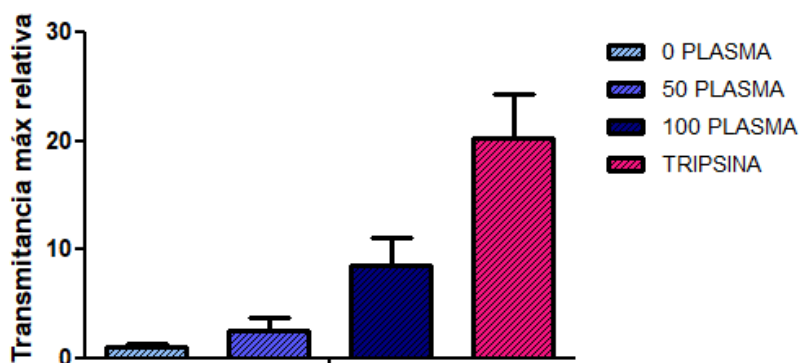


Figura 6: **Máxima agregación a los 4 minutos.** Se calculó promedio y error (N=3) de GRc (40%hematocrito), suspendidos en PBS y plasma (50 plasma) o solo plasma (100 plasma), relativo a una suspensión sin plasma. Datos derivados de la Figura 5.

Habiendo fijado un hematocrito de 40% en una suspensión 100% plasma, se evaluó cómo la presencia de nucleótidos (ATP, ADP, AMP) afecta la agregación de GRc. Para esto se incubaron los GRc con el plasma suplementado con o sin nucleótidos y se midió la cinética de agregación, de la cual se derivó el punto de máxima agregación (Figura 7 y 8, respectivamente). Los resultados con agregado de nucleótidos muestran un aumento significativo en la agregación con ADP, y una tendencia a una menor agregación con ATP y AMP. El objetivo de este ensayo fue detectar qué efecto tiene cada nucleótido por separado en la agregación de GRc, por lo que se usaron concentraciones altas de los mismos.

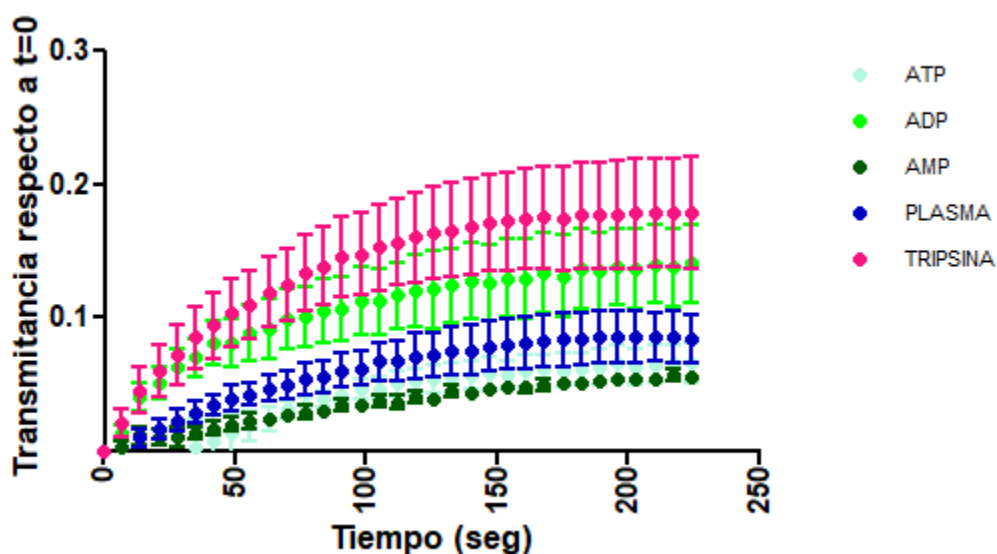


Figura 7: **Cinética de agregación con nucleótidos.** Transmitancia relativizada a tiempo cero, con GRc (40%hematocrito y 100 plasma) con diferentes tratamientos: ATP, ADP, AMP 1mM, o plasma solo; control positivo tripsina. Se calculó promedio y error (N=3)

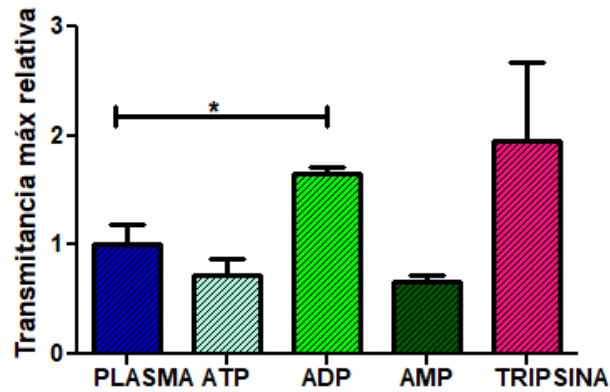


Figura 8: **Máxima agregación con nucleótidos a los 4 minutos.** Se calculó promedio y error (N=3) de GRc (40% hematocrito) relativo al tratamiento solo con plasma, de los tratamientos con nucleótidos (ATP, ADP, AMP 1mM). Datos derivados de la Figura 6.
*t test: PLASMA vs ADP p value=0,0295 (P < 0,05)

Se utilizó un segundo abordaje para evaluar la agregación dado que el método de transmitancia no es muy sensible, y se sumaron al análisis los GRni.

Para esto se observó la agregación por microscopía, incubando GRc o GRni con plasma sólo o plasma con nucleótidos (ATP, ADP) por 30 minutos a 37°C y se cuantificó a partir de fotografías de al menos diez campos a tiempo final.

En primer lugar, de cada fotografía se comparó el área con agregados respecto del área total en GRc y en GRni. Habiendo colocado el mismo número en ambas determinaciones, el porcentaje de área con agregados es mayor en GRni que en GRc (Figura 9 A) y, por lo tanto, el número de células aisladas es menor en GRni que en GRc (Figura 9 B).

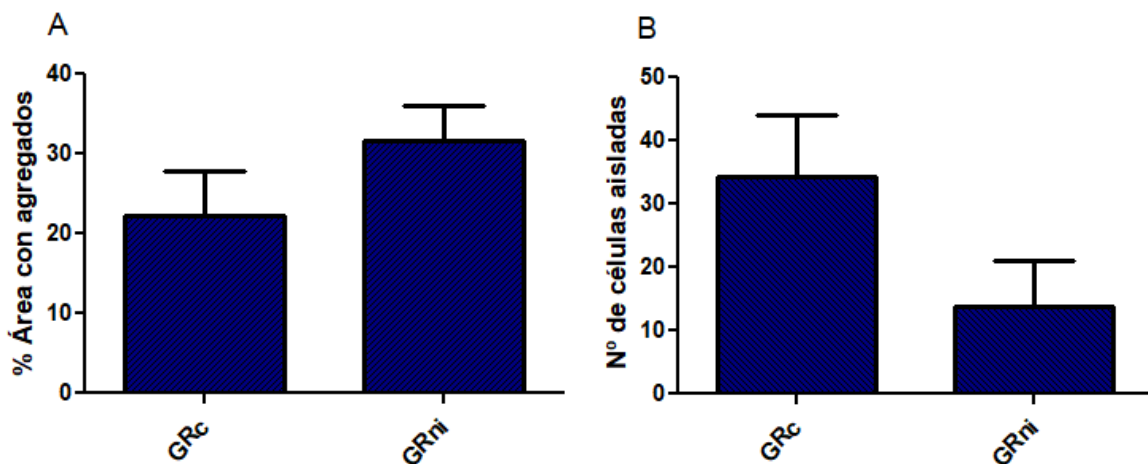


Figura 9 (A-B): **Tendencia de GRni a formar más agregados.** Cuantificación de la agregación al microscopio como porcentaje de área agregada (A) o como número de células que no forman parte de agregados (B), para GRc y GRni. Tratamiento con plasma solo. Se calculó promedio y error (N=3-4)

Luego, al evaluar el efecto de los nucleótidos, se observa una tendencia de los GRc a formar más agregados en presencia de ADP (Figura 10), que apoya los resultados de agregación en placa (Figura 7), aunque el error es grande y no hay diferencias significativas entre tratamientos. Mientras que en GRni parecería que los nucleótidos no tienen efecto sobre la agregación..

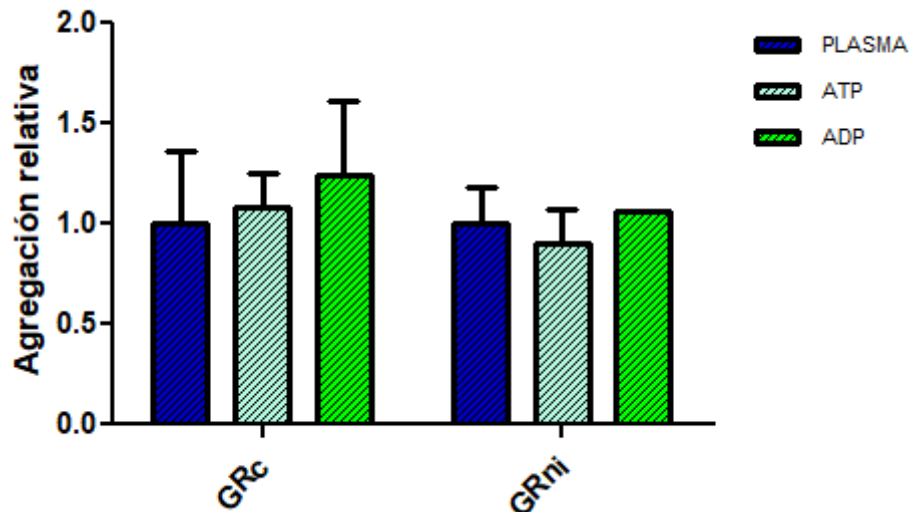


Figura 10: **Agregación por microscopía.** Cuantificación de la agregación a microscopio para GRc (izquierda) y para GRni (derecha). Se calculó promedio y error (N=1-4) relativo al tratamiento solo con plasma, de los tratamientos con nucleótidos (ATP,ADP 1mM).

El análisis cualitativo de las imágenes al microscopio muestra diferencias en el ordenamiento y volumen de los agregados que forman los GRc y los GRni (Figura 11). Los GRni forman agregados más voluminosos y desordenados, mientras que los GRc forman agregados apilados llamados rouleaux.

De estos resultados se puede concluir que los GRni forman agregados, que son diferentes a los agregados de GRc y que el ADP parecería estar involucrado en la formación de los mismos. Sin embargo, estos resultados son preliminares y es necesario aumentar el número de muestras biológicas.

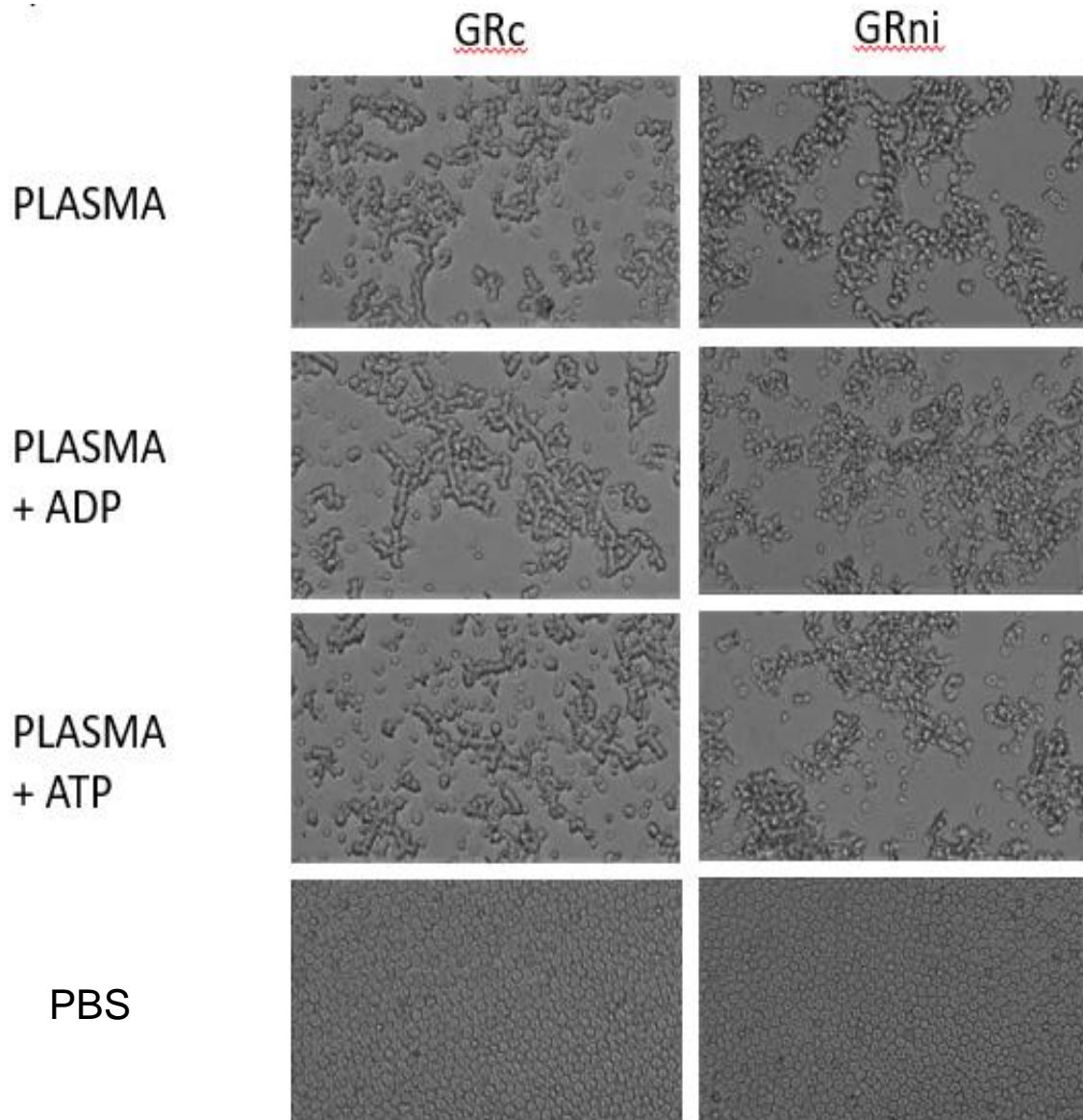


Figura 11: **Agregación diferencial de GRc y GRni.** Imágenes representativas resultantes de cada tratamiento al microscopio.

5.2. Análisis del perfil de adhesión de GRni a células endoteliales

En relación con el segundo objetivo, se evaluó la adhesión de GRc y GRni obtenidos por columna (sección 4.2) y GRi (parasitemia 3-6%) a las células endoteliales EAhy 926. El número de GRni adheridos respecto a GRc es mayor (Figura 12), aunque no de manera significativa, evidenciando que no sólo los GRi son altamente adhesivos (ver sección 1.5), sino que también los GRni tienden a aumentar su adhesión en ensayos *in vitro*. Cabe mencionar que se colocó el mismo número de GR de cada tipo celular. La parasitemia de la suspensión de GRi fue de 3 y 6%, por lo que la mayoría de esas células son GRni. Eso explicaría por qué no es significativamente mayor la adhesión de los GRi.

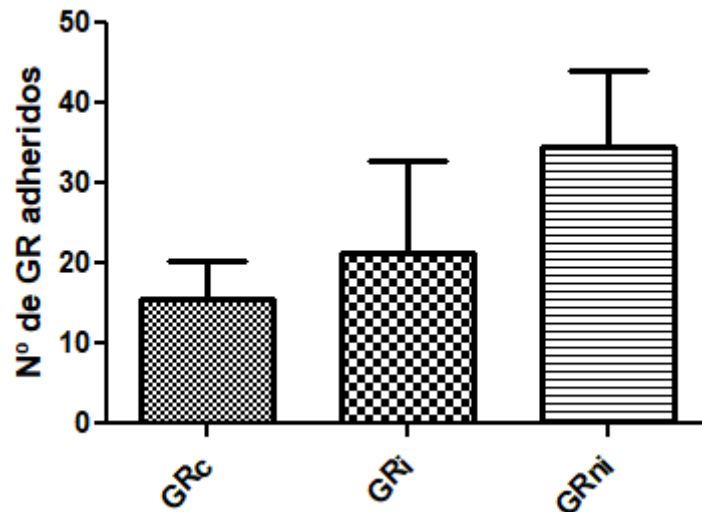


Figura 12: **Aumento en la adhesión de GRni.** Cuantificación al microscopio del número de GRc, GRi, GRni absolutos adheridos a células endoteliales. Se calculó promedio y error (N=3-6).

En la figura 13 se muestra una imagen representativa de los GR adheridos a la monocapa de células endoteliales luego de 30 minutos de tratamiento y posteriores lavados.

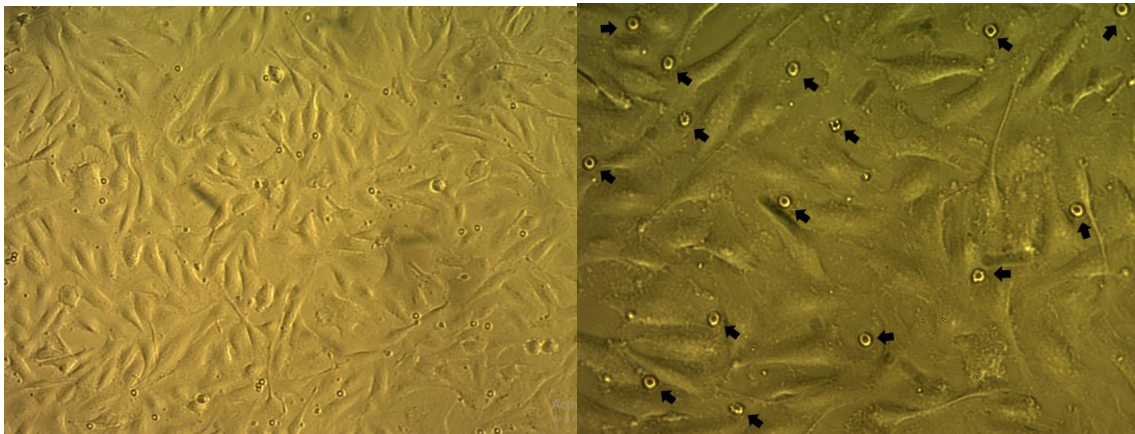


Figura 13: **Adhesión de GR a células endoteliales.** Imágenes de microscopía, representativas de la adhesión de GR a células endoteliales. Izquierda 10X, derecha 40X (con flechas negras se señalan los GR adheridos).

Se prosiguió a evaluar si los nucleótidos están involucrados en la adhesión de GRc, GRi y GRni sobre células endoteliales EAhy 926. Para esto, se realizaron ensayos en presencia de apirasa, enzima que degrada el ATP y ADP del medio. En las tres poblaciones de GR se observó una disminución de la adhesión respecto a los valores basales (línea punteada) (Figura 14); esto estaría indicando que en el medio podría haber ATP resultante del estímulo mecánico asociado a la manipulación de las células, ya que no se agregó ATP exógeno en este tratamiento. También podría deberse a la remoción de ATP/ADP basales, que están siempre presentes. El ADP

extracelular se podría estar generando de la hidrólisis de ATPe por acción de ectonucleotidasas.

La apirasa no sólo remueve el ATPe y el ADPe, sino que podría estar acumulando AMP, éste es sustrato de la 5'nucleotidasa que da como resultado ADO extracelular. La ADO es agonista de los receptores P1.

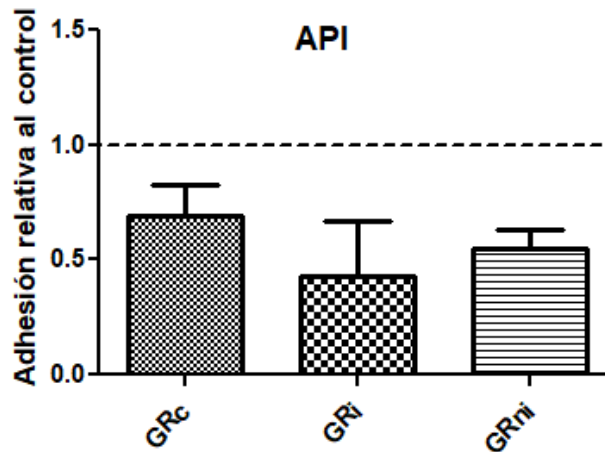


Figura 14: **Tendencia de disminución de la adhesión de GRc, GRi, GRni al ser incubados con apirasa (API 4U/ml).** Cuantificación al microscopio de número de GRc, GRi, GRni adheridos a células endoteliales (N: 3-6). Valores relativos al control con PBS (la línea punteada en 1 corresponde al tratamiento con PBS).

De acuerdo con estos resultados, parecería que al menos parcialmente la adhesión GR-célula endotelial está mediada por el ATPe o ADPe (Figura 14) generado por estímulo mecánico de estas células. Por ese motivo, se continuaron ensayos de adhesión adicionando nucleótidos y adenosina de manera exógena. Para analizar el efecto de los tratamientos sobre cada tipo de suspensión de GR y poder comparar entre ellos, se relativizaron los valores a sus respectivos controles con PBS (línea punteada) (Figura 15).

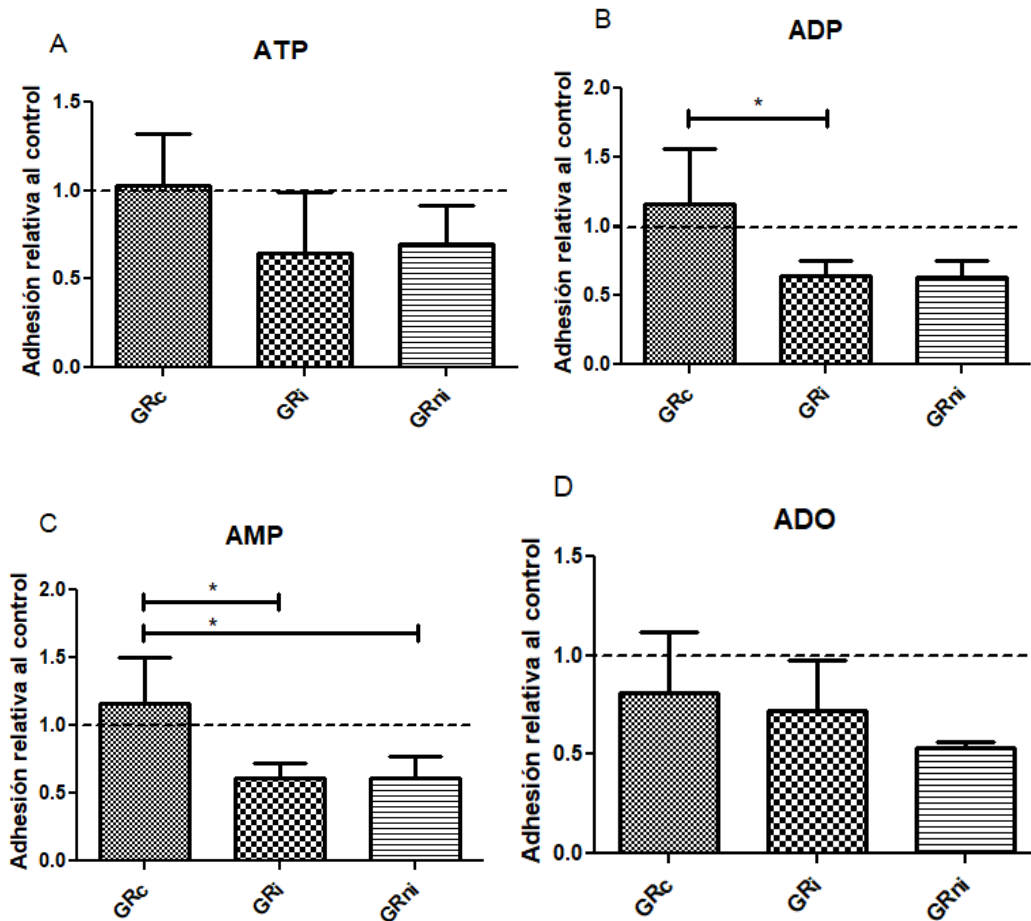


Figura 15 (A-D): **Efecto del agregado de nucleótidos en la adhesión.** Cuantificación al microscopio de número de GRc, GRI, GRni adheridos a células endoteliales (N: 3-6). Valores relativos al control con PBS (la línea punteada en 1 corresponde al tratamiento con PBS). Tratamientos con ATP (A), ADP (B), AMP (C), ADO (D) 1uM.

*t test: ADP GRc vs GRI p value=0,0410 (P < 0,05); AMP GRc vs GRI p value=0,0166 (P < 0,05); AMP GRc vs GRni p value=0,0394 (P < 0,05)

La adhesión no se vió afectada por el agregado de ATP (Figura 15A). Sin embargo, el tratamiento con ADP provocó una disminución significativa en la adhesión de GRI respecto a GRc; mientras que con AMP, tanto GRI como GRni mostraron diferencias significativas respecto a GRc (Figuras 15 B y C, respectivamente). El agregado de ADO parecería disminuir la adhesión de GRni pero el efecto resultó no significativo (Figura 15D). Entonces, los productos de hidrólisis de ATP (ADP y AMP) parecerían disminuir la adhesión en GRI y GRni. Esta disminución no se da en GRc, a menos que el ATPe sea removido del medio (Figura 14 y Figura 16).

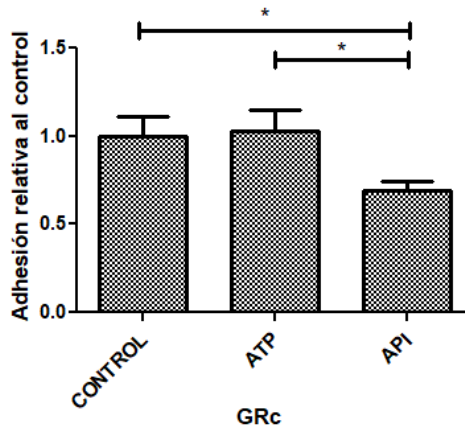


Figura 16: **Efecto del ATP en GRc.** Cuantificación al microscopio de número de GRc relativo al tratamiento con PBS (control).

*t test: CONTROL vs API p value=0,0330 (P < 0,05); ATP vs API p value=0,0294 (P < 0,05)

Luego, se evaluó un estímulo que induce la síntesis de AMPc intracelular. Se sabe que en GRs humanos y de otras especies de mamíferos, el aumento de AMPc estimula la liberación de ATP (Montalbetti et al. 2011). Se sabe también que la cantidad de ATP liberada vía panexina por GRni es mayor que en GRc con este estímulo (Alvarez, C.L. et al., 2022) pero no se conocía cuál era el efecto del 3V sobre la adhesión.

Por tal motivo, se incubaron GRc, GRi y GRni con 3V y luego se midió la adhesión, observándose que la misma no se alteró en GRc y GRni, aunque habría una tendencia no significativa hacia una disminución en GRi (Figura 17).

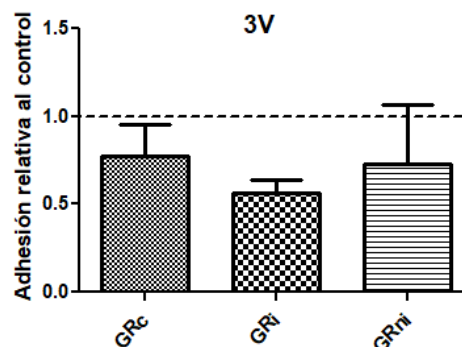


Figura 17: **Efecto del agregado de 3V en la adhesión.** Cuantificación al microscopio de número de GRc, GRi, GRni adheridos a células endoteliales (N: 3-6). Valores relativos al control con PBS (la línea punteada en 1 corresponde al tratamiento con PBS).

Nucleósidos di- y trifosfato de adenosina y uridina son capaces de activar distintos subtipos de receptores P, cuya señalización podría alterar la adhesión. Por ende, se incubaron GRc y GRni con bloqueantes genéricos de los receptores P1 (8 fenilteofilina, 8PT) y los receptores P2 (suramina, S) (Figura 18).

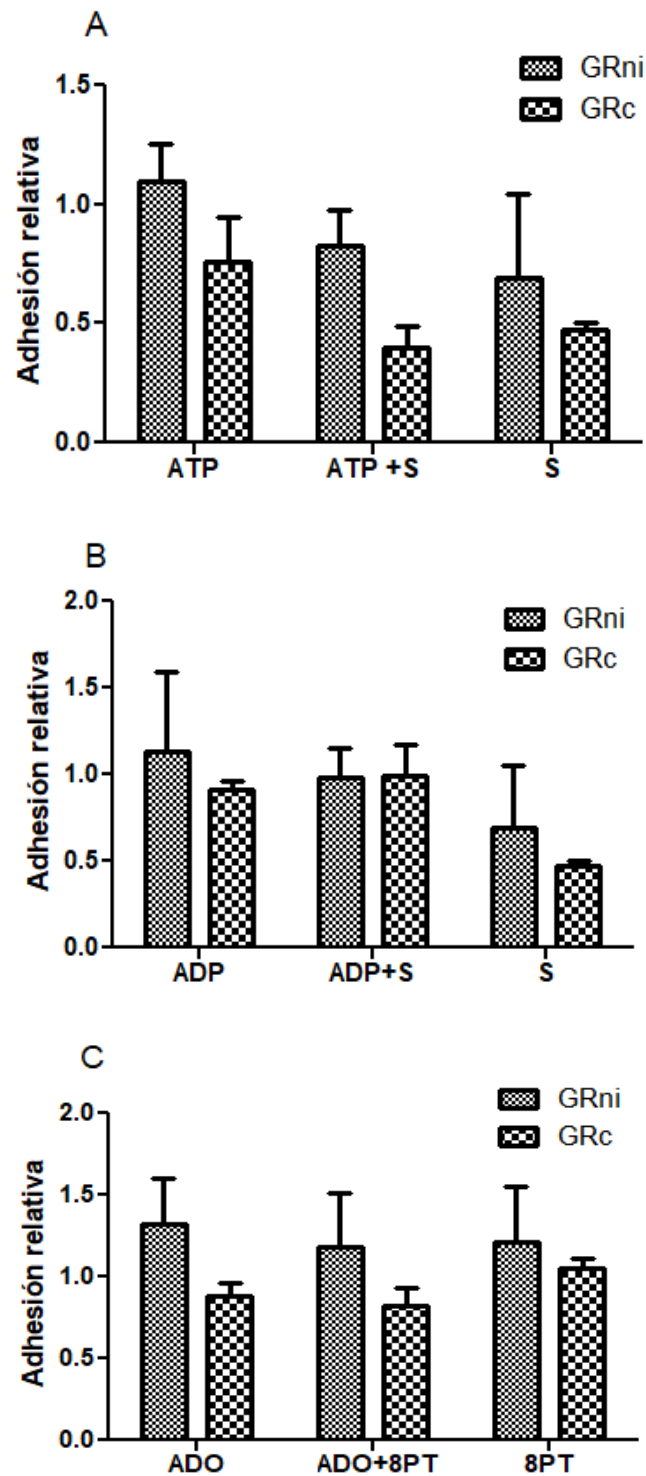


Figura 18 (A-C): **Efecto con bloqueantes de receptores P1 y P2.** Cuantificación al microscopio de número de GRc o GRni adheridos a células endoteliales (N: 2). Valores relativos al control con PBS. A: ATP; ATP y suramina; suramina; B: ADP; ADP y suramina; suramina; C: ADO; ADO y 8PT; 8PT. Concentraciones nucleótidos 1uM, S (suramina 100uM), 8PT (8 fenil teofilina 100uM).

En esta serie de experimentos no se observó la disminución de la adhesión que se registró antes con ADP y AMP (Figura 15 B y C) y la suramina *per se* disminuyó la

adhesión (Figura 18). Tampoco disminuyó la adhesión con ADO en presencia o ausencia de 8 PT, y la 8 PT sola tampoco tuvo efecto. Estos resultados son preliminares y es necesario repetirlos.

Cabe mencionar que los tratamientos no afectan la adhesión de las células endoteliales a la placa ni su viabilidad (Figura 19 y Figura 20). Se puede decir que se mantuvo constante el número de células endoteliales por pocillo.

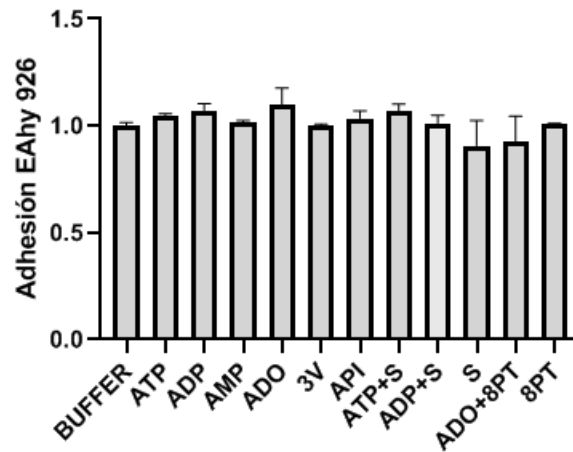


Figura 19: **Los tratamientos no afectan la adhesión de las células endoteliales.** Ensayo de cristal violeta como control de la adherencia de las células EAhy 926 a la placa (N=2). Valores relativos al control con PBS. Tratamientos: ATP, ADP, AMP, ADO (1uM) ; 3V ; API (4U/ml) ; S (suramina 100uM); 8PT (8 fenil teofilina 100uM)

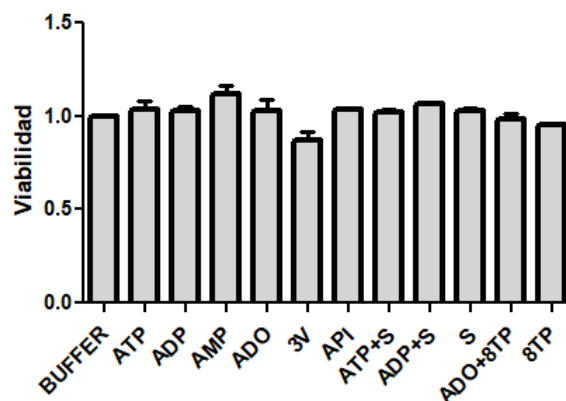


Figura 20: **Los tratamientos no afectan la viabilidad de las células endoteliales.** Ensayo de MTT como control de la viabilidad de las células EAhy 926 (N=2). Valores relativos al control con PBS. Tratamientos: ATP, ADP, AMP, ADO (1uM) ; 3V ; API (4U/ml) ; S (suramina 100uM); 8PT (8 fenil teofilina 100uM)

6. Discusión

La organización molecular de la membrana del GR influye en su morfología y función. La membrana es una estructura dinámica (Da Costa et al. 2016) que posibilita que los GRs puedan modificar su forma y atravesar capilares de diámetro pequeño, incluso menores a su propio diámetro, y llegar a todo el organismo transportando gases y nutrientes por el torrente sanguíneo. Tanto la deformabilidad como la agregación de los GRs son factores determinantes para llevar a cabo esta función.

En cuanto a la agregación, en la malaria la obstrucción microvascular desencadena una patología grave (Dondorp et al. 2008). La formación de rosetas no sólo afecta la circulación sanguínea sino que además facilita el contacto entre GRi y GRni, permitiendo incluso la transferencia de lípidos oxidados entre ambas membranas lo cual sería la causa de la fagocitosis de GRni (Uyoga et al. 2012). Desde el descubrimiento de las rosetas a fines de la década del '80, se han postulado diferentes mecanismos de formación y roles en la patología de la enfermedad y aún hay muchos aspectos desconocidos (Lee et al. 2022) sobre todo en relación a los GRni.

Otro tipo de comunicación entre estos dos tipos celulares (GRi y GRni), es la mediada por vesículas extracelulares (VE). Las VE derivadas de GRi se encontraron elevadas en plasma en pacientes con malaria severa, conteniendo tanto proteínas humanas como del parásito, y distintos tipos de RNAs. Además de demostrarse la transferencia de ácidos nucleicos entre GRs mediada por VE (Regev-rudzki et al. 2013) se pudo detectar la incorporación de VE que contenían RNA del parásito por células endoteliales de médula ósea (Babatunde et al. 2018). Las VE resultan un mecanismo interesante para tratar de explicar la similitud en ciertas características de los GRni y los GRi, y la mayor adhesión al endotelio.

En este trabajo, primero se utilizó el espectrómetro de placa para determinar la agregación de GRs. Este sistema requiere un hematocrito de 40% lo cual implica un gran esfuerzo de cultivo aunque la determinación sea rápida (aproximadamente 5 minutos). Luego, se utilizó el microscopio para observar los agregados. De esta manera, se pudo mostrar un perfil de agregación anormal asociado a la malaria. Mientras que en los GRc los agregados adoptan la forma de rouleaux (apilamiento de discocitos bicóncavos) que al enlazarse lateralmente se convierten en redes filamentosas más o menos reticuladas, en los GRni los agregados son amorfos e irregulares (Figura 11). Estos últimos se parecen a aquellos que se encuentran en los pacientes con vasculopatías (Arrigo 2008), se los conoce como clusters (agrupamiento de GRs en forma desordenada y globular), y reflejan una interacción célula-célula anormal.

La alteración en la agregación podría estar asociada a una disminución en la carga eléctrica superficial de los GRs, la cual está mediada principalmente por la presencia de ácido siálico presente en oligosacáridos unidos a proteínas en la membrana

celular. Ya ha sido demostrado que la pérdida de ácido siálico aumenta la agregación (Arrigo 2008) porque disminuye la carga neta de la superficie, proceso que lleva a una mayor interacción entre GRs que se pone de manifiesto por alteraciones en el patrón de agregación. En este sentido, sería interesante medir la carga eléctrica superficial de los GRni y compararlo con los GRc.

En relación al tratamiento con nucleótidos, el ADP facilitaría la agregación en GRc. La magnitud del aumento es semejante al tratamiento con tripsina en GRc (Figuras 7 y 8). La tripsina es una enzima que rompe los enlaces peptídicos en el extremo carboxilo terminal de los aminoácidos lisina y arginina de proteínas. En el caso de GRs, su blanco principal son las glicoproteínas de membrana responsables de la carga neta superficial. En consecuencia al tratar GR con esta enzima la repulsión eléctrica disminuye y la agregación de GR aumenta. En GRni parecería que los nucleótidos no tienen efecto sobre la agregación, pero son resultados con pocas muestras biológicas (bajo N) y con gran variabilidad. Se requieren más ensayos para confirmar estas tendencias.

En cuanto a la adhesión, en las formas severas de malaria existe una fuerte asociación entre el desarrollo de la enfermedad y el número de GRi adheridos al endotelio vascular (citoadherencia) causando la obstrucción de los vasos. La citoadherencia está asociada a cambios en la expresión de moléculas con propiedades adhesivas tanto en la superficie celular del GRi como de la célula endotelial (Rozier et al. 2007). A pesar de que los GRs son considerados células no adhesivas, expresan en su membrana receptores de adhesión. Si bien este campo ha sido estudiado, hay pocos trabajos dedicados al estudio de GRni y muy pocos donde se asocie la adhesión con la mayor capacidad de liberar ATP por parte de GRs (Zhu et al. 2011). En la regulación del flujo sanguíneo interviene, además de la agregación de GR que determina la viscosidad, el ATP y sus productos de hidrólisis. Éstos, al interactuar con receptores purinérgico del endotelio de los vasos pueden inducir vasodilatación.

En este trabajo, el número de GRni adheridos a células endoteliales EAhy 926 es mayor que el número de GRc (Figura 12), evidenciando que, no sólo se adhieren más los GRi como indica la bibliografía, sino que también los GRni aumentan su adhesión *in vitro* respecto a los GRc. Cuando se agregó apirasa para evaluar el efecto del ATP extracelular la adhesión disminuyó, esto estaría indicando que en el medio podría haber ATP generado por el estímulo mecánico asociado a la manipulación de las células. El estímulo mecánico ha sido probado como estímulo para la salida de ATP tanto en GR (Wan et al. 2011) como en otros tipos celulares (Espelt et al. 2013). Sin embargo, el agregado de ATP exógeno no afectó la adhesión (Figura 15). Dado que el agregado de ADP y AMP disminuyó la adhesión de GRi y GRni respecto a GRc (Figura 15), se podría pensar que las moléculas responsables del efecto de la

adhesión son los productos de hidrólisis de ATP. Por ende, sería apropiado realizar experimentos con análogos no hidrolizables de ATP o en presencia de inhibidores de enzimas ectonucleotidasas para comprobarlo.

Algunos autores relacionan el aumento en el AMPc intracelular de GRi con un aumento en la rigidez de la membrana, que puede observarse también en GRc al adicionar un análogo permeable de AMPc (Paul et al. 2019). A su vez, relacionan el aumento de AMPc con una mayor adhesión a fibronectina. En este trabajo, el estímulo adrenérgico (3V), que genera un aumento del AMPc y lo mantiene elevado (Montalbetti 2011), no mostró modificaciones en la adhesión de GRni (Figura 17).

En relación al ensayo de adhesión con los inhibidores de los receptores P, los resultados son preliminares y es necesario repetirlos.

Para evaluar si el efecto de los nucleótidos está dado sobre GRs y/o sobre las células endoteliales, a futuro se podrían incubar primero las células endoteliales con los distintos tratamientos, hacer lavados y recién después agregar los GRs. De esta manera, si se cuantifica un efecto sobre la adhesión de GRs se deberá a la interacción de los nucleótidos directamente con la monocapa de células endoteliales.

Por otro lado, se podría utilizar la misma metodología de este trabajo pero luego de la incubación de los GRs con los distintos tratamientos, se deberían eliminar los tratamientos por lavado, y después agregar los GRs sobre la monocapa de células endoteliales. De esta manera, el efecto sobre la adhesión se debería a la interacción de los nucleótidos con los GRs.

7. Conclusión

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio revelaron diferencias significativas en los agregados formados por GRni en comparación con los GRc. También las diferencias fueron marcadas en la adhesión de cada tipo de GR a las células endoteliales EAhy 926, siendo los GRni los que presentaron mayor fenotipo adhesivo. Estos resultados aunque preliminares, evidencian que los GRi afectan a los GRni cambiando el perfil de agregación y adhesión.

Tanto la agregación como la adhesión se vieron afectadas por la presencia de nucleótidos. El ADP parecería generar un aumento en la agregación de GRc y se plantea seguir evaluando cómo afecta a GRni. La eliminación de los nucleótidos del medio parece disminuir la adhesión tanto de GRc como GRni; mientras que, concentraciones altas de ADP, AMP y ADO podrían disminuir la adhesión únicamente en GRni.

Por otro lado, entender el efecto diferencial de los nucleótidos sobre la agregación y adhesión de los GRni y GRc puede ser útil para la generación de futuras terapias tendientes a inhibir receptores P de manera directa, o, vías involucradas en la señalización.

8. Anexo

8.1. Protocolo para descongelar parásitos

Los viales se retiran del tanque de nitrógeno y se transfieren a un tubo falcon de 15ml. Se agrega por goteo 0,1 volumen de NaCl 12%, y luego 10 volúmenes de NaCl 1,2%, mientras se agita. Se agregan 5 ml de medio RPMI completo y se centrifuga a 2500 rpm por 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se vuelven a adicionar 5 ml de medio RPMI completo y GR para obtener un hematocrito de aproximadamente 5%. Se pasa a una botella T25, agregando la mezcla de gases y se conserva en estufa a 37°C.

8.2. Protocolo de sincronización

Se transfiere el contenido de la botella a un tubo falcon de 15 ml. Se centrifuga 3 min a 900 xg y se elimina el sobrenadante. Sobre el pellet se agregan 10 ml de sorbitol 5% (en agua), se resuspende y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se centrifuga, se elimina el sobrenadante y se adicionan 5 ml de medio RPMI completo. Se coloca la suspensión en una nueva botella de cultivo T25, agregando la mezcla de gases y se conserva en estufa a 37°C.

8.3. Protocolo para descongelar células EAhy 926

Se toma un vial del tanque de nitrógeno, se descongela en flujo y se coloca en una botella T25. Se agregan 500 µl de suero fetal bovino y 4,5ml de DMEM alta glucosa. Se coloca en estufa a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente se realiza cambio de medio.

8.4. Protocolo para cultivo y siembra de células EAhy 926

- 1- Volcar el medio
- 2- Lavar el DMEM con PBS (porque el medio inhibe la reacción de la tripsina, que es el paso siguiente).
- 3- Agregar 1 ml de tripsina
- 4- Incubar a 37°C por 5 min, o hasta ver que se hayan despegado las células
- 5- Agregar 2-3 ml de DMEM para cortar la reacción y colectar todo en un tubo Falcon de 15 ml

Para contar las células:

- 1- Tomar 30 µl de la suspensión de células
- 2- Agregar 30 µl de colorante (Tripan Blue)
- 3- Colocar en la Cámara de Neubauer y contar en los 4 cuadrantes externos
- 4- El promedio de los cuatro cuadrantes se multiplica por la dilución (2) y por 10000. Así se obtiene el número de células en células/ml.

Para sembrar botellas T25:

- 1- Colocar 0.5x10⁶ células por botella
- 2- Agregar 5 ml de medio DMEM. Incubar a 37°C.

8.5. Preparación DMEM:

- 1- Pesar 13.37 g de DMEM
- 2- Agregar 3.7 g de NaHCO_3
- 3- Llevar a volumen de 1 L, disolver bien en agitación y medir el pH.
- 4- Esterilizar por filtración, poro de 0.22 μm . Agregar Antibióticos y guardar a 4°C.

8.6. Preparación RPMI:

- 1- Pesar 10.4 g de RPMI
- 2- Agregar 5.98 g de Hepes, 2 g de glucosa, 2 g de bicarbonato de sodio, 50 mg de hipoxantina, 5 g de Albumax II y 300 mg de glutamina.
- 3- Llevar a volumen de 1 L, disolver bien en agitación y medir el pH.
- 4- Esterilizar por filtración, poro de 0.22 μm . Agregar 20 mg de gentamicina y guardar a 4°C.

8.7. Preparación Buffer salino (PBS):

- 1- Pesar (en g) NaCl 8.0; KCl 0.2; Na_2HPO_4 2.16; KH_2PO_4 0.2; CaCl_2 0.1 y MgCl_2 0.1.
- 2- Disolver en 1 L de agua destilada
- 3- Ajustar pH con HCl .

Referencias

- Akkaya, C. et al., 2009. The Plasmodium falciparum-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 457(5), pp.1035–1047.
- Alvarez, C.L. et al., 2022. Homeostasis of extracellular ATP in uninfected RBCs from a Plasmodium falciparum culture and derived microparticles. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1864(10).
- Alvarez, C.L. et al., 2014. Regulation of extracellular ATP in human erythrocytes infected with Plasmodium falciparum. *PLoS ONE*, 9(5).
- Aranda, E. & Owen, G.I., 2009. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biological Research*, 42(3), pp.377–389.
- Arrigo, D., 2008. Ácido siálico sérico y carga aniónica eritrocitaria en pacientes diabéticos e hipertensos . Posible impacto hemorreológico .
- Bauer, J. et al., 1992. In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: Contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *Journal of Cellular Physiology*, 153(3), pp.437–449.
- Baumeister, S. et al., 2006. Evidence for the involvement of Plasmodium falciparum proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Molecular Microbiology*, 60(2), pp.493–504.
- Boddey, J.A. & Cowman, A.F., 2013. Plasmodium nesting: Remaking the erythrocyte from the inside out. *Annual Review of Microbiology*, 67, pp.243–269.
- Burnstock, G., 2012. Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *British Journal of Pharmacology*, 167(2), pp.238–255.
- Collins, W.E., Jeffery, G.M. & Roberts, J.M., 2003. A retrospective examination of anemia during infection of humans with Plasmodium vivax. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4), pp.410–412.
- Da Costa, L. et al., 2016. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 56(1), pp.9–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.09.001>.
- Counihan, N.A., Modak, J.K. & de Koning-Ward, T.F., 2021. How Malaria Parasites Acquire Nutrients From Their Host. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(March), pp.1–10.
- Dalimot, J.J. et al., 2022. Malaria-associated adhesion molecule activation facilitates the destruction of uninfected red blood cells. *Blood Advances*, 6(21), pp.5798–5810.
- Dondorp, A.M. et al., 2000. Abnormal Blood Flow and Red Blood Cell Deformability in Severe Malaria. *Parasitology today*, 16(6), pp.228–232.
- Dondorp, A.M. et al., 2008. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *Journal of Infectious Diseases*, 197(1), pp.79–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171289>.
- Dondorp, A.M. et al., 1997. Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 57(5), pp.507–511.
- Ellsworth, M.L. et al., 2009. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 24(2), pp.107–16.
- Ellsworth, M.L., Ellis, C.G. & Sprague, R.S., 2016. Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle. *Acta*

- Physiologica*, 216(3), pp.265–276.
- Espelt, M. V et al., 2013. On the role of ATP release, ectoATPase activity, and extracellular ADP in the regulatory volume decrease of Huh-7 human hepatoma cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 304(10), pp.C1013-26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485713>.
- Fernandez-Arias, C., Rivera-Correa, J., Gallego-Delgado, J., Rudlaff, R., Fernandez, C., Roussel, C., Götz, A., Gonzalez, S., Mohanty, A., et al., 2016. Anti-Self Phosphatidylserine Antibodies Recognize Uninfected Erythrocytes Promoting Malarial Anemia. *Cell host & microbe*, 19(2), pp.194–203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26867178>.
- Fernandez-Arias, C., Rivera-Correa, J., Gallego-Delgado, J., Rudlaff, R., Fernandez, C., Roussel, C., Götz, A., Gonzalez, S., Mohanty, S., et al., 2016. Erythrocytes Promoting Malarial Anemia. *Cell Host and Microbe*, 19(2), pp.194–203.
- Goel, S. et al., 2015. RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria. *Nature Medicine*, 21(4), pp.314–321.
- Gürbilek, N., 2013. Guía De Vigilancia Para La Prevención Del Restablecimiento Del Paludismo En Argentina. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp.1689–1699.
- Huber, S.M., 2012. Purinoceptor signaling in malaria-infected erythrocytes. *Microbes and Infection*, (May), pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.04.009>.
- Hughes, K.R., Biagini, G.A. & Craig, A.G., 2010. Continued cytoadherence of Plasmodium falciparum infected red blood cells after antimalarial treatment. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 169(2), pp.71–78. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.09.007>.
- Idro, R. et al., 2010. Cerebral malaria: Mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatric Research*, 68(4), pp.267–274.
- Jayavanth, S. & Park, B.C., 2007. Microrheologic dysfunctions in blood during malaria. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(1), pp.111–120.
- Kraemer, S.M. & Smith, J.D., 2006. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Current Opinion in Microbiology*, 9(4), pp.374–380.
- Lee, W.C., Russell, B. & Rénia, L., 2022. Evolving perspectives on rosetting in malaria. *Trends in Parasitology*, 38(10), pp.882–889. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.08.001>.
- Mercereau-Puijalon, O., Guillotte, M. & Vigan-Womas, I., 2008. Rosetting in Plasmodium falciparum: A cytoadherence phenotype with multiple actors. *Transfusion Clinique et Biologique*, 15(1–2), pp.62–71.
- Mohandas, N. & An, X., 2013. Malaria and Human Red Blood Cells. *Med Microbiol Immunol.*, 201(4), pp.593–598.
- Montalbetti, N. et al., 2011. Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), pp.38397–38407.
- Monzón Llamas, L., Cobos Muñoz, D. & Merino Amador, P., 2021. Las vacunas de la malaria y su potencial aportación para el control y eliminación de la enfermedad. *Revista de Investigación y Educación en Ciencias de la Salud (RIECS)*, 6(S1), pp.30–37.
- Moxon, C.A., Grau, G.E. & Craig, A.G., 2011. Malaria : modification of the red blood cell and consequences in the human host. , pp.670–679.
- Paul, A. et al., 2019. Studying the rigidity of red blood cells induced by Plasmodium falciparum infection. *Scientific Reports*, 9(1), pp.1–4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42721-w>.

- Rozier, M.D., Zata, V.J. & Ellsworth, M.L., 2007. Lactate interferes with ATP release from red blood cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 16, pp.3038–3042.
- Sabolovic, D. et al., 1994. Alterations of uninfected red blood cells in malaria. *Parasitol Res*, 80, pp.70–73.
- Sabolovic, D. & Hashimoto, N., 1992. Alterations of uninfected in vitro and red blood cell membranes growth during in vivo parasite Domagoj Sabolovic * and Nobuya Hashimoto **. *Symposium: Cell Electrophoresis-Present and Future*, 36(6).
- Sisquella, X. et al., 2017. Plasmodium falciparum ligand binding to erythrocytes induce alterations in deformability essential for invasion. *eLife*, 6, pp.1–20.
- Sluyter, R., 2015. P2X and P2Y receptor signaling in red blood cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(October), pp.1–7. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmolb.2015.00060/abstract>.
- Tanneur, V. et al., 2005. Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. *The FASEB Journal*, 27(1), pp.1–27.
- Usui, M. & Williamson, K.C., 2021. Stressed Out About Plasmodium falciparum Gametocytogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(December), pp.1–12.
- Uyoga, S. et al., 2012. Transfer of 4-hydroxynonenal from parasitized to non-parasitized erythrocytes in rosettes . Proposed role in severe malaria anaemia. *British Journal of Haematology*, 157, pp.116–124.
- Wan, J., Forsyth, A.M. & Stone, H.A., 2011. Red blood cell dynamics: From cell deformation to ATP release. *Integrative Biology*, 3(10), pp.972–981.
- Zhu, H. et al., 2011. Impaired adenosine-5⁻-triphosphate release from red blood cells promotes their adhesion to endothelial cells: A mechanism of hypoxemia after transfusion*. , 39(11).
- Babatunde, K.A. et al., 2018. Malaria infected red blood cells release small regulatory RNAs through extracellular vesicles. *Scientific Reports*, 8(1), pp.1–15.
- Burnstock, G. & Knight, G.E., 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology*, Vol.240, 240, p.31–+.
- Perelson, A.S. & Wiegel, F.W., 1982. The equilibrium size distribution of rouleaux. *Biophysical Journal*, 37(2), pp.515–522. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(82\)84697-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(82)84697-3).
- Regev-rudzki, N. et al., 2013. Resource Cell-Cell Communication between Malaria-Infected Red Blood Cells via Exosome-like Vesicles. *Cell*, 153(5), pp.1120–1133. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.029>.