



**AGLUTINACION DE MICROVESICULAS ERITROCITARIAS
POR AUTOANTICUERPOS DE PACIENTES CON ANEMIA
HEMOLITICA AUTOINMUNE COMO UN EVENTO
INDEPENDIENTE DEL CITOESQUELETO**

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

PRESENTA

M.C.P. JOSE CARLOS JAIME PEREZ

MONTERREY, NUEVO LEON

ABRIL DE 1991

TD
RC641
.7
.H4
J3
1991
c.1



1080125921

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

AGLUTINACION DE MICROVESICULAS ERITROCITARIAS POR
AUTOANTICUERPOS DE PACIENTES CON ANEMIA HEMOLITICA
AUTOINMUNE COMO UN EVENTO INDEPENDIENTE DEL
CITOESQUELETO

TESIS
QUE EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA
PRESENTA

M.C.P. JOSE CARLOS JAIME PEREZ

MONTERREY, NUEVO LEON

ABRIL DE 1991

FD
64
-7
H4
J3
1991



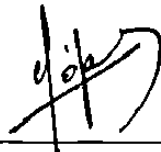
EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL SERVICIO DE
HEMATOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA,
EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO
LEON Y EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN MEDICINA
DE TRANSFUSION DE LA UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA
EN SAN DIEGO

ASESORES


DR. med. JUAN ANTONIO CUELLAR LOPEZ
SERAFEIM P. MASOUREDIS, M.D., Ph.D
EDWARD J. VICTORIA, Ph.D

ACEPTADA POR LA SUBDIRECCION DE INVESTIGACION
Y ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA FACULTAD
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE NUEVO LEON

PRESIDENTE:



SECRETARIO:



PRIMER VOCAL:

Serafin P. Vasquez

SEGUNDO VOCAL:

Serafin

TERCER VOCAL:

J. Repulveda

DEDICATORIA

A MI ESPOSA Y MIS PADRES

POR SU ABSOLUTA CONFIANZA Y CONSTANTE APOYO

AGRADECIMIENTOS

DR. JUAN ANTONIO CUELLAR LOPEZ

PORQUE GRACIAS A SU CONSTANTE DESEO DE MEJORIA Y
ACERTADA CRITICA ESTE TRABAJO LLEGO A BUEN FIN

DR. LUIS JAVIER MARFIL RIVERA

POR SU ABSOLUTO E INCONDICIONAL APOYO A LA PRESENTE
INVESTIGACION

DR. SERAFEIM P. MASOUREDIS

POR SU CONSTANTE ESTIMULO, DISPOSICION DE AYUDA
Y SUS VALIOSAS ENSEÑANZAS

VI

INDICE	PAGINA
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	9
MATERIAL	10
METODOS:	
Preparación de eluidos	15
Obtención de vesículas a partir de globulos rojos	17
Detección de aglutinación mediada inmunologicamente en microvesiculas eritrocitarias	22
Detección de fijación inmunespecifica de moléculas de IgG sobre la membrana vesicular	23
Determinación de la actividad especifica de la proteína A iodínada	26
Conversión del número de cuentas por minuto a número de moléculas de IgG	27
Determinación del porcentaje de proteína integral de membrana en las microvesículas	27

VII

RESULTADOS:	PAGINA
Tabla No. 1	30
Figura No.1	32
Tabla No. 2	33
Tabla No. 3	35
Tabla No. 4	36
Tabla No. 5	37
Tabla No. 6	38
Tabla No. 7	39
DISCUSION	40
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47

INTRODUCCION

La aglutinación eritrocitaria mediada inmunológicamente ha sido un tema frecuente de investigación; éste fenómeno ha sido particularmente importante en la inmunohematología, en donde es el punto final de las pruebas clínicas (1).

Aunque diversos factores para la producción de la aglutinación han sido identificados, particular importancia se le ha dado al papel desempeñado por el citoesqueleto del glóbulo rojo; estudios recientes han sugerido que para que la hemaglutinación tenga lugar es indispensable la presencia del citoesqueleto celular (2,3).

Debido a su accesibilidad el eritrocito es ideal para el estudio de la aglutinación, así como de la constitución bioquímica y fisiología celular. La mayoría del conocimiento de la estructura y función de membranas celulares ha sido derivado del estudio de la membrana del glóbulo rojo. De ésta manera se han estudiado la asimetría de la doble capa de lípidos de la membrana eritrocitaria (4,5,6), las interacciones entre membrana y citoesqueleto (7,8,9), el transporte transmembranoso (10,11), y la fusión y agregación de

membranas (12,13); muchos de éstos datos han sido aplicados a la célula en general.

Algunos inconvenientes al utilizar la membrana del eritrocito tales como la dificultad para distinguir entre los eventos de membrana y los del citoesqueleto, así como la heterogeneidad estructural de la membrana estimularon el desarrollo de procedimientos para la obtención de estructuras de membrana libres del citoesqueleto, denominadas microvesículas eritrocitarias (14,15,16).

Las microvesículas contienen esencialmente las proteínas transmembranas mayores, careciendo de espectrina, ankirina y actina (15,17,18) y son generadas a partir de eritrocitos intactos durante un proceso que comprende una serie de cambios en forma y estructura que se inician con la transformación del normocito a discocito, el cual progresa sucesivamente a equinocito y esferoequinocito. Este último libera las vesículas libres del citoesqueleto (15,19,20,21); el eritrocito que ha sufrido microvesiculación se transforma en un esferocito (22).

El uso de microvesículas para el estudio de propiedades de la membrana resulta ideal debido a la simplicidad de

su constitución estructural; adicionalmente, se ha demostrado que algunos de los aloantígenos del eritrocito, como el antígeno D del sistema Rh, retienen su reactividad antigénica en las microvesículas, sugiriendo que dicha reactividad es independiente del citoesqueleto (23).

La hemaglutinación mediada inmunológicamente en eritrocitos intactos se produce en dos etapas, la primera o de sensibilización es invisible y representa el acoplamiento de moléculas de anticuerpo a los determinantes antigénicos sobre la superficie del glóbulo rojo; la segunda fase o de aglutinación propiamente dicha, es observable y resulta de una sucesión de colisiones al azar entre células rojas sensibilizadas, lo que conduce al entrecruzamiento de dichas células por puentes representados por moléculas de anticuerpo; ambas fases de la aglutinación tienen lugar de manera simultánea (1).

La participación del citoesqueleto como requisito indispensable para la producción de la hemaglutinación no ha sido claramente establecida; sin embargo, dos líneas de evidencia sugieren que la aglutinación está condicionada a la presencia del citoesqueleto.

La primera proviene del trabajo de Gokhale y Mehta, quienes estudiaron la aglutinabilidad de microvesículas libres del citoesqueleto utilizando la lectina concanavalina A (2).

En ese trabajo las microvesículas derivadas de eritrocitos aglutinables por concanavalina A no exhibieron ésta propiedad.

La falta de aglutinación vesicular persistió después del tratamiento con diversas proteasas, a pesar de que en ausencia del citoesqueleto la movilidad del receptor de la concanavalina A, la banda 3, incrementa su movilidad 250 veces en el plano de la membrana (24), éste incremento favorece la aglutinación pero podría ser neutralizado por la pérdida de la deformabilidad que es un factor importante en la aglutinación conferido por la presencia en el citoesqueleto de proteínas contráctiles como la miosina, tropomiosina y troponina (25-29)

La conclusión en ese trabajo fué que la ausencia del citoesqueleto fué el factor determinante para explicar la pérdida de la aglutinabilidad en las microvesículas.

La segunda línea que señala la importancia del citoesqueleto en la aglutinación deriva de la investigación de la inmunoreactividad de aloantígenos del eritrocito en las microvesículas, (3,23); en éste caso se utilizaron microvesículas derivadas de eritrocitos Rh(o) D positivas, sensibilizadas con eluidos potentes e incubadas con una preparación de antiglobulina humana marcada con ¹²⁵ Iodo; aunque la inmunoreactividad del antígeno D fué retenida, en éste caso tampoco se detectó aglutinación vesicular, (3).

La conclusión en dicho estudio fué que la presencia del citoesqueleto podría ser un requisito indispensable para la aglutinación.

Con los antecedentes de las dos líneas de investigación arriba mencionadas surgió la idea de demostrar que la aglutinación puede llevarse a cabo en ausencia del citoesqueleto.

Para éste fin se seleccionó el modelo de microvesículas eritrocitarias libres del citoesqueleto por su riqueza relativa de banda 3, en combinación con eluidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune, cuya especificidad anti banda 3 fué recientemente demostrada por el grupo de Masouredis, (30).

Los autoanticuerpos de tipo IgG producidos en la anemia hemolítica autoinmune de tipo caliente son capaces de producir un evento hemolítico y anemia; el diagnóstico de ésta enfermedad es hecho por medio de una prueba de antiglobulina humana positiva, (31).

En un alto porcentaje de los casos de pruebas de antiglobulina humana positivas los autoanticuerpos antieritrocitarios son producidos por individuos sanos, sin disminución en la vida media del eritrocito (32); asimismo, el 20% de los pacientes que ingieren el agente antihipertensivo Aldomet desarrollan una prueba de antiglobulina humana positiva, aunque solo el 1% experimentará hemólisis (33).

Los anticuerpos en la anemia hemolítica autoinmune pueden ser separados serológicamente en dos grupos; aquellos casos en los que no existe una especificidad obvia, y el grupo que comprende los casos en los que se puede determinar la identidad del antígeno involucrado (34,35).

Diversos estudios han tratado de caracterizar serológicamente estos autoanticuerpos; los resultados no han mostrado una correlación clínica constante, ya que patrones similares de reactividad han sido

demostrados en pacientes con anemia hemolítica autoinmune y en donadores de sangre sanos con pruebas de antiglobulina humana positivas (36,37).

La heterogeneidad en la reactividad serológica se extiende a la confusa etiología de la enfermedad (38).

Hasta 1953 los autoanticuerpos en la anemia hemolítica autoinmune fueron considerados inespecíficos, (39). A partir de esa fecha diversos estudios sugirieron que los autoanticuerpos estaban dirigidos contra antígenos del sistema Rh (34-36,40,41).

Sin embargo, un grupo igualmente numeroso de trabajos ha aportado evidencia de que los antígenos de dicho sistema no se encuentran involucrados o participan en un muy pequeño porcentaje de los casos (42-50).

El descubrimiento de la identidad del antígeno en la anemia hemolítica autoinmune fué llevado a cabo en una serie de trabajos del grupo de Masouredis y Victoria, quienes estudiaron inicialmente eluidos iodinados de donadores normales con pruebas de antiglobulina humana positivas.

En el primer estudio se demostró una reactividad del 50% de los eluidos con células Rh null, lo que es

inconsistente con una especificidad relacionada al sistema Rh (51).

En su segundo trabajo este grupo caracterizó los eluidos de donadores normales Coombs-positivos (52); 6 sub-poblaciones fueron identificadas en cada uno de los eluidos, ninguna dirigida contra aloantígenos del sistema Rh.

En el tercer reporte (53) se caracterizó el eluido de un paciente con anemia hemolítica autoinmune, probandose que el auto-anticuerpo estaba dirigido a un antígeno topográficamente independiente del sistema Rh, con una densidad de un millón de copias por eritrocito, lo que sugirió una especificidad anti-banda 3, basandose en tan elevada densidad, (54).

La banda 3 es la molécula que conecta el citoesqueleto a la superficie interna de la membrana plasmática y funciona como un transportador aniónico, (55,56); estructuralmente se divide en dos dominios, uno con la actividad de intercambio aniónico y otro que participa en las interacciones con el citoesqueleto (57,58).

Recientemente éste grupo probó que el antígeno en la anemia hemolítica autoinmune es la banda 3 (30)

HIPOTESIS

La evidencia sugiere que la presencia del citoesqueleto es una condición sine qua non para la aglutinación.

La disponibilidad de microvesículas libres de citoesqueleto, en las que la banda 3 predomina, en combinación con el descubrimiento de que ésta misma constituye el antígeno contra el cual están dirigidos los anticuerpos de tipo IgG en la anemia hemolítica autoinmune estimularon la siguiente hipótesis:

La aglutinación, como un fenómeno mediado inmunológicamente, puede verificarse en ausencia del citoesqueleto.

MATERIAL**A) SANGRE**

Para la preparación de eluidos un mínimo de 10 ml de sangre fueron obtenidos, previo consentimiento, de 10 pacientes con anemia hemolítica autoinmune con la aprobación del comité hospitalario correspondiente.

Para la preparación de microvesículas un mínimo de 35 ml de sangre venosa fueron obtenidos de 3 donadores voluntarios.

Veinte eluidos de donadores sanos con una prueba de antiglobulina humana positiva fueron obtenidos por cortesía del Dr. George Garraty, Director, Banco de Sangre de la Cruz Roja Americana, Los Angeles-Orange County, California.

B) REACTIVOS

Antisueros anti -D,C,E,c,e,K,k,Fy a,Fy b,Jk a, Jk b,M,N,S. Gamma Biologicals Inc., Houston, Tx.

Reactivo de antiglobulina humana, Gamma Biologicals Inc., Houston, Tx.

Solución salina isotónica amortiguadora con tricina: cloruro de sodio (Sigma Chemical Co.), 150 mmol/l + tricina sódica (Aldrich Chemical Co.), 10 mmol/l

Solución salina isotónica + tricina + fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF)

Agregar PMSF (Sigma Chemical Co.), 0.2 mmol/l

a la solución amortiguadora con tricina sódica.

Solución salina amortiguadora con fosfatos: cloruro de sodio (Sigma Chemical Co.), 150 mmol/l, fosfato de potasio (Sigma Chemical Co.), 0.015 M.

EDTA (Sigma Chemical Co.) : 390 mmol/l

Cloruro de calcio (Aldrich) : 1.0 M

Ficoll-Paque: Pharmacia, Piscataway, N.J.

Filtros de 2.0, 1.2 y 0.45 μ : Millipore, Bedford, Mass.

Albúmina sérica bovina: Sigma Chemical Co.

Solución "reveladora" para ensayo de Lowry: a) Carbonato de sodio (Aldrich Chemical Co.), 2% peso/volumen en hidróxido de sodio (Aldrich Chemical Co.), 0.1 N; b) Sulfato de cobre (Aldrich Chemical Co.), 0.5% peso/volumen; c) tartrato de sodio y potasio (Sigma Chemical Co.), 1% peso/volumen; mezclar 48 partes de "a" + 1 de "b" + 1 de "c"

Reactivo de Folin: Sigma Chemical Co.

Trasyolol: Mobay Chemical Co. New York

Solución de elución ácida: glicina (Sigma Chemical Co.) 100 mmol/l, cloruro de sodio (Sigma Chemical Co.), 100mmol/l, pH 2.1

Hidróxido de sodio (Aldrich Chemical Co.), 1% peso/volumen

Azida de sodio (Aldrich Chemical Co), 1% peso/volumen

Proteína A, ^{125}I , Amersham, Arlington Heights, Ill

C) EQUIPO

Centrífuga modelo CL, International Equipment Co.,
Needham, Mass.

Incubador con baño de agua y agitador, counter top
shaker bath, Forma modelo 2568, Hartford CT.

Potenciómetro digital, Beckman Instruments Inc., modelo
43, Fullerton, CA.

Tubos de polipropileno, 50 ml, Scientific Products C-
4039-50, McGaw Park, Il.

Centrífuga modelo TJ-6, Beckman Instruments
Inc., Fullerton, CA.

Ultracentrífuga Sorvall, modelo RC-2B, CA.

Microscopio de contraste de fase, Carl Zeiss, West
Germany.

Espectrofotómetro, Carl Zeiss, West Germany.

Contador de emisión gamma, Beckman Instruments
Inc., Fullerton, CA.

Equipo de flebotomía:

Jeringas de 10,20 y 60 ml, Beckton Dickinson and Co.

Agujas Vacutainer No. 21, Beckton Dickinson and Co.

Tubos Vacutainer de 10 ml con EDTA, Beckton Dickinson and Co.

Tubos Vacutainer de 10 ml con EDTA, Beckton Dickinson and Co.

Adaptador para tubos Vacutainer, Beckton Dickinson and Co.

Sigma Chemical Co. St. Louis Missouri

Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee, Wisconsin

Vacutainer systems, Beckton Dickinson and Co., Rutherford, New Jersey

MÉTODOSPreparación de eluidos.

Los eluidos fueron preparados a partir de sangre total anticoagulada con EDTA o citrato trisódico. El método de elución fué el de elución ácida de Rekvig y Hannestadk (59).

Los eritrocitos fueron lavados 4 veces inmediatamente después de retirados en al menos 4 volúmenes de solución salina normal amortiguada fría; la centrifugación final se hizo a 3,000 rpm a 4°C para obtener un hematocrito de 80%. Después del lavado final se midió el volumen de eritrocitos empaquetados que se obtuvo y sin pérdida de tiempo se agregó un volumen igual de solución de elución ácida, invirtiendo en 3 ocasiones y sin ninguna demora se centrifugó a 3,000 rpm a 4°C por exactamente 3 minutos.

La solución de elución debe tener un pH de 2.1 y debe encontrarse a una temperatura de 0°C, para lo cual fué mantenida en un recipiente con hielo y agua.

Después de la centrifugación se recuperó el sobrenadante por aspiración, evitando al máximo la contaminación con eritrocitos; el eluido adquirió una

coloración café rojiza y un pH cercano a 3.0.

El pH se ajustó a 6.5 con una solución de hidróxido de sodio al 1%, lo cual produjo un precipitado de hemoglobina, produciendo un sobrenadante de color ambarino; el precipitado se eliminó por una centrifugación a 21,000 rpm por 45 minutos a 4°C; el eluido, ahora de un color ambarino transparente, fue transferido a un tubo limpio e incubado por 60 minutos a 56°C, con el fin de precipitar proteínas adicionales.

El eluido se centrifugó en las mismas condiciones y el sobrenadante fue concentrado por ultrafiltración al 40% de su volumen original y transferido a una membrana de diálisis de 0.32 mL por cm de longitud, previamente humedecida por 15 minutos en agua destilada.

El eluido fue equilibrado por diálisis contra solución salina amortiguadora, pH 6.5, con aprotinina y azida de sodio a concentraciones finales de 100 unidades de inhibidor de kalicreína por mililitro y 0.1%, respectivamente; el título de antiglobulina fue obtenido con dobles diluciones del eluido (60)

Posteriormente los eluidos fueron centrifugados a 35,000 g por 30 minutos, transferidos a tubos de plástico nuevos y almacenados a 4°C.

Obtención de vesículas a partir de glóbulos rojos.

Se utilizó una modificación del método descrito por Leonards y Okhi (61). 35 ml de sangre venosa fresca fueron obtenidos de voluntarios y anticoagulados con citrato de sodio, previa fenotipificación con antisueros comerciales con actividad anti-D,-C,-E,-c,-e,-K,-k-Fya,-Fyb,-Jka,-Jkb.

Después de una centrifugación a 2,000 rpm por 10 minutos el plasma sobrenadante fué deshechado; posteriormente los eritrocitos fueron lavados en 5 ocasiones con solución salina isotónica amortiguadora con tricina mantenida a 45°C; el lavado final se llevó a cabo en el mismo medio conteniendo fenilmetilsulfonilfluoruro, como inhibidor de proteasas.

En cada uno de los lavados se deshechó la interfase con los leucocitos.

En seguida 7 ml de los eritrocitos, lavados y empaquetados a un porcentaje de 80%, fueron diluídos a 40 ml con la solución amortiguadora conteniendo tricina previamente incubada a 45°C y equilibrados a la misma temperatura por un período de 15 minutos con agitación continua.

Para la generación de microvesículas se llevó a la célula a aislar una porción de su membrana, sin el citoesqueleto; esto se logró titulando la suspensión de glóbulos rojos con EDTA y CaCl_2 ; el parámetro más importante para éste proceso no reside en una concentración molar específica, sino en la relación entre eritrocitos/EDTA/ CaCl_2 .

La titulación se llevó a cabo agregando EDTA y CaCl_2 en incrementos; inicialmente se agregaron 500 μl de EDTA a la suspensión de eritrocitos a 45°C , incubándose durante 15 minutos con agitación continua; después se agregaron 500 μl de la solución de CaCl_2 , incubando en las condiciones anteriores. Las adiciones subsecuentes de EDTA y CaCl_2 fueron simultáneas, a un volumen de 350 μl y separadas por períodos de incubación de 15 minutos en las condiciones citadas inicialmente.

El proceso de microvesiculación se vigiló preparando laminillas de la suspensión cada 10 minutos con revisión en el microscopio de contraste de fase hasta comprobar que más del 50% de los eritrocitos habían vesiculado o estaban en proceso de vesiculación; en éste punto se suspendieron las adiciones de EDTA/ CaCl_2 , incubando por un periodo adicional de 15 minutos; en

ésta etapa se observó una significativa formación de vesículas y esferocitos o células madre; el proceso entero requiere de entre 8 y 10 adiciones de EDTA/CaCl₂ y debe llevarse a cabo sin hemólisis.

El paso siguiente consistió en separar las vesículas del resto de los eritrocitos. Para lograrlo se dividió la suspensión en 8 porciones de 7 ml que se depositaron con una pipeta Pasteur en tubos de polipropileno conteniendo 25 ml de Ficoll-Paque; los tubos se centrifugaron a 800 rpm durante una hora a temperatura ambiente; en seguida la capa superior del gradiente conteniendo las vesículas y eritrocitos contaminantes fué transferida a un tubo único de 50 ml y filtrada sucesivamente a través de 2 filtros, el primero con un diámetro de poro de 2.0 μ y el segundo de 1.2 μ ; ésta doble filtración permite eliminar los remanentes celulares y obtener una preparación de vesículas purificada.

La preparación fué evaluada bajo el microscopio de contraste de fase para certificar la ausencia de eritrocitos contaminantes; en seguida la suspensión de vesículas fué lavada tres veces con 40 ml de la solución amortiguadora con tricina, centrifugando a 17,000 rpm por 30 minutos.

Al terminar la fase de lavado se resuspendió el botón de microvesículas en 6.0 ml de solución salina amortiguadora con tricina y el contenido de proteína vesicular fué determinado por una modificación del método de Lowry (62), con albúmina sérica bovina (BSA), como estándar.

Las determinaciones se hicieron por duplicado de la siguiente manera: a los tubos 1 y 2 se les agregaron 100 μ l de agua; 3 y 4:5 μ l de BSA + 95 μ l de agua; 5 y 6:10 μ l de BSA + 90 μ l de agua; 7 y 8:20 μ l de BSA + 80 μ l de agua; 9 y 10:30 μ l de BSA + 70 μ l de agua; 11 y 12:40 μ l de BSA + 60 μ l de agua; 13 y 14:50 μ l de BSA + 50 μ l de agua; 15 y 16:5 μ l de la suspensión de vesículas obtenidas + 95 μ l de agua; 17 y 18:10 μ l de susp. de vesículas + 90 μ l de agua; 19 y 20:20 μ l de susp. de vesículas + 80 μ l de agua.

En seguida a todos los tubos se les agregó 1.0 ml de la solución reveladora y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente; después se agregaron a cada tubo 100 μ l del reactivo de Folin diluido y se dejaron en incubación por 30 minutos a temperatura ambiente; la densidad óptica se leyó a 650 nm y los resultados fueron graficados en papel milimétrico para construir

la curva estándar y determinar la concentración de proteína vesicular de los tubos problema.

Para éste fin el promedio de la lectura directa de cada par de tubos en la curva estándar fué dividido entre el número de μl de la suspensión de vesículas agregados a cada uno de ellos; en seguida la concentración obtenida en los 3 pares de tubos conteniendo la suspensión de microvesículas fueron promediados para obtener la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la suspensión original. La obtención total de proteína microvesicular se obtuvo multiplicando esta última concentración por el volúmen total.

Después de un lavado final a 21,000rpm por 45 minutos a 4°C el sobrenadante fué deshechado y el botón resuspendido en una solución conteniendo trasylol al 1%, para obtener una concentración final cercana a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, manteniendose a 4°C hasta su utilización.

La pureza de las preparaciones fué evaluada por electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecíl sulfato sódico realizada de acuerdo al método de Laemmli (63), fantasmas eritrocitarios preparados por el método descrito por Victoria y Mahan fueron utilizados como estándar (64); una de las preparaciones fué tratada

con hidróxido de sodio para la remoción de las proteínas periféricas residuales y clarificación de la imagen electroforética, de acuerdo a un método previamente descrito (64); la nomenclatura de las bandas fué asignada de acuerdo a la propuesta por Fairbanks et al, (65).

Detección de aglutinación mediada inmunológicamente en microvesículas eritrocitarias:

En ésta serie de experimentos se incluyeron tres grupos, en el primero se estudiaron 20 eluidos de donadores sanos con una prueba de antiglobulina humana positiva; el segundo consistió de 13 aloanticuerpos contra grupos sanguíneos usuales, incluyendo al sistema Rh; en el tercero se incluyeron 10 eluidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune; como control negativo se utilizaron suero humano y solución salina amortiguadora normal.

En tubos de polipropileno de 50 ml se incubaron por duplicado 300 μ g de proteína vesicular con un volúmen de 150 μ l del eluido, antisuero o control respectivo por una hora, a 37°C con agitación continua.

En seguida las preparaciones fueron lavadas en cuatro ocasiones con solución salina amortiguadora normal, a

4°C por 30 minutos a 21,000 rpm.

Al finalizar el último lavado se agregaron 100 μ l del reactivo de antiglobulina humana monoclonal (anti-IgG) a cada uno de los tubos y se centrifugaron a 5000 rpm.

Inmediatamente después, las preparaciones fueron examinadas por dos observadores en forma macroscópica y en caso de no detectarse aglutinación una pequeña cantidad fué transferida por aspiración cuidadosa a un portaobjetos y examinada bajo el microscopio de contraste de fases.

Una calificación del grado de aglutinación de cada preparación fué asignada de acuerdo a los criterios establecidos, (60).

Detección de fijación inmunespecífica de moléculas de autoanticuerpo IgG sobre la membrana vesicular.

Se llevó a cabo utilizando una preparación comercial de proteína A iodada; una tasa de combinación cercana a 1 ha sido determinada entre la proteína A y la IgG (66).

En ésta serie de experimentos se estudiaron 6 eluidos obtenidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune y 2 eluidos de donadores de sangre normales con una prueba de antiglobulina humana positiva.

El control positivo consistió de un eluido con actividad anti-D con un título de 2048 incubado con vesículas D +.

Como control negativo para la detección de fijación inespecífica de IgG se utilizó suero humano diluido 1:10 y solución salina amortiguadora normal.

300 μg de proteína vesicular fueron incubados, por duplicado, en tubos de polipropileno de 50 ml con un volumen de 150 μl de los eluidos o control respectivos, por una hora a 37°C con agitación continua.

El paso siguiente consistió de una serie de 4 lavados con la solución salina amortiguadora normal, a 4°C por 30 minutos a una velocidad de 21,000 rpm; inmediatamente después se agregaron 20 μl de la preparación de Proteína A ^{125}I cuya actividad específica fué previamente determinada y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos.

Para tener una referencia del punto de la curva de saturación en la que se trabajó, 100 μl de proteína A iodinada fueron utilizados en un caso.

A continuación se lavó en 3 ocasiones en las condiciones anteriormente descritas para eliminar el

exceso de Proteína A iodada.

En seguida el botón de microvesículas fué resuspendido en 1 ml de solución salina amortiguadora normal y transferido en dos pasos a tubos de conteo nuevos, procediéndose al conteo de actividad radiactiva en el contador gamma.

Con objeto de determinar la dilución y volumen final de proteína A iodada a utilizar para la detección de IgG inmunoespecíficamente unida a la membrana vesicular, se determinó primero la actividad específica por μl de la preparación original de proteína A ^{125}I por medio de las cuentas por minuto de una alícuota diluída apropiadamente.

Un paso previo a la dilución de la proteína A consistió en la filtración de la misma a través de un filtro millipore de $0.45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro, para eliminar cualquier posible agregado.

Determinación de la actividad específica de la ProteínaA ¹²⁵I:

El contenido inicial de proteína A ¹²⁵I fué de 3.3 $\mu\text{g/ml}$ como masa total, la cual fué diluída a 2 ml con una solución amortiguadora de salina normal conteniendo 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de proteína A no radiactiva de manera que la masa total fué de 3.6 μg en 2 ml o sea 1.8 μg de proteína A/ml.

Una alicuota de 10 μl de esta solución fué diluída a un ml con solución salina amortiguadora normal y finalmente a 25 ml con la misma solución; en seguida alicuotas de 100 μl fueron contadas por triplicado obteniéndose una cuenta promedio de 3,988 cpm las cuales multiplicadas por el factor de dilución de 250 dieron un resultado de 9.97×10^5 en 0.01 ml de la solución original de Proteína A ¹²⁵I = 9.97×10^7 cpm/ml lo cual al ser dividido por la masa de proteína A de 1.8 $\mu\text{g/ml}$ dió como resultado una actividad específica de 5.54×10^7 cpm/ μg de Proteína A ¹²⁵I.

Conversión del número de cuentas por minuto a número de moléculas de IgG:

La radiactividad específica por μg de proteína A iodínada, en $\text{cpm}/\mu\text{g}$, fué comparada con el número de cpm del tubo problema las cuales fueron transformadas a masa en gramos; el resultado fué dividido por el peso molecular de la proteína A (42,000) para obtener el número de moles de IgG; para transformar el número de moles a número de moléculas se multiplicó por el número de Avogadro (6.023×10^{23}). El resultado final fué el número de moléculas de IgG inmuno-específicamente unidas a la membrana vesicular en ese tubo en particular.

Determinación del porcentaje de proteína integral de membrana en las microvesículas

La cantidad de proteína integral de la membrana de la vesícula es estimada alrededor de 4% del total de proteína vesicular, la cual es igual a la suma de hemoglobina más la proteína integral de membrana (3); éste cálculo asume que la concentración de hemoglobina en las vesículas es equivalente, proporcionalmente hablando, a la del eritrocito intacto, de manera que una vesícula típica de 0.5μ de diámetro contiene 0.022 pg de Hb; la cantidad de proteína integral de la membrana

vesicular se calcula usando la cantidad conocida de proteína integral de membrana por μm^2 de área de superficie del eritrocito.

Se considera que el 31% de la proteína de la membrana del eritrocito se segrega en las vesículas, esencialmente como banda 3 y bandas PAS.

Basados en los datos anteriores, si en el eritrocito la cantidad de proteína integral de membrana por μm^2 es de 5.7×10^{-10} mg, el 31% sería igual a $5.7 \times 10^{-10} \times 0.31 = 1.77 \times 10^{-10}$ mg/eritrocito, dividido entre el área de superficie del eritrocito de $145 \mu\text{m}^2 = 1.22 \times 10^{-12}$ mg de proteína integral de la membrana / μm^2 .

Las vesículas de $0.5 \mu\text{m}$ de diámetro tienen un área de superficie de $0.786 \mu\text{m}^2$, de manera que $1.22 \times 10^{-12} \times 0.786 = 9.59 \times 10^{-4}$ pg de proteína integral de membrana/vesícula, de donde 9.59×10^{-4} pg de proteína integral de membrana divididos entre 0.022 pg de hb = 4.4%, (3).

Para estudiar el punto anterior se utilizaron 5 diferentes preparaciones a cada una de las cuales se les determinó el contenido total de proteína, incluyendo hemoglobina, por el ensayo habitual de Lowry; éstas preparaciones fueron sometidas a tratamiento con

digitonina (60), para liberarlas de su hemoglobina y un segundo ensayo de Lowry fué realizado en las mismas. Con base en éstos dos valores se comparó el contenido de proteína de las preparaciones de vesículas antes y después del tratamiento con digitonina, para obtener el porcentaje de proteína integral de la membrana.

RESULTADOS

Los resultados de las diferentes preparaciones de microvesículas son resumidos en la tabla # 1; la obtención fué uniforme y la cantidad de 300 μg de proteína por tubo a ser utilizada fué seleccionada tomando en cuenta la necesidad de optimizar el uso de la misma y de la proteína A iodizada.

Prep. No.	Proteína Vesicular $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Proteína total	Volúmen Requerido para 300 μg
1	1.83	11,000 $\mu\text{g}/6\text{ml}$	164 μl
2	2.40	14,460 $\mu\text{g}/6\text{ml}$	125 μl
3	2.00	12,000 $\mu\text{g}/6\text{ml}$	150 μl
4	2.00	12,000 $\mu\text{g}/6\text{ml}$	150 μl
5	2.20	13,200 $\mu\text{g}/6\text{ml}$	137 μl

Tabla No. 1 Obtención de microvesículas eritrocitarias en diferentes preparaciones.

La electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecíl sulfato sódico (SDS-PAGE) demostró la pureza de las preparaciones, como se puede observar en la figura # 1, en la cual se incluyó una preparación tratada con hidróxido de sodio (línea B) para remover las proteínas periféricas de la membrana sin extraer las proteínas integrales; en ésta electroforésis las líneas A y C del gel fueron cargadas con 75 μg de proteína total mientras que en la línea B se utilizaron 150 μg .

Las características de los diversos fluidos de
 pacientes con anemia hemolítica autoinmune son
 resumidas en la tabla

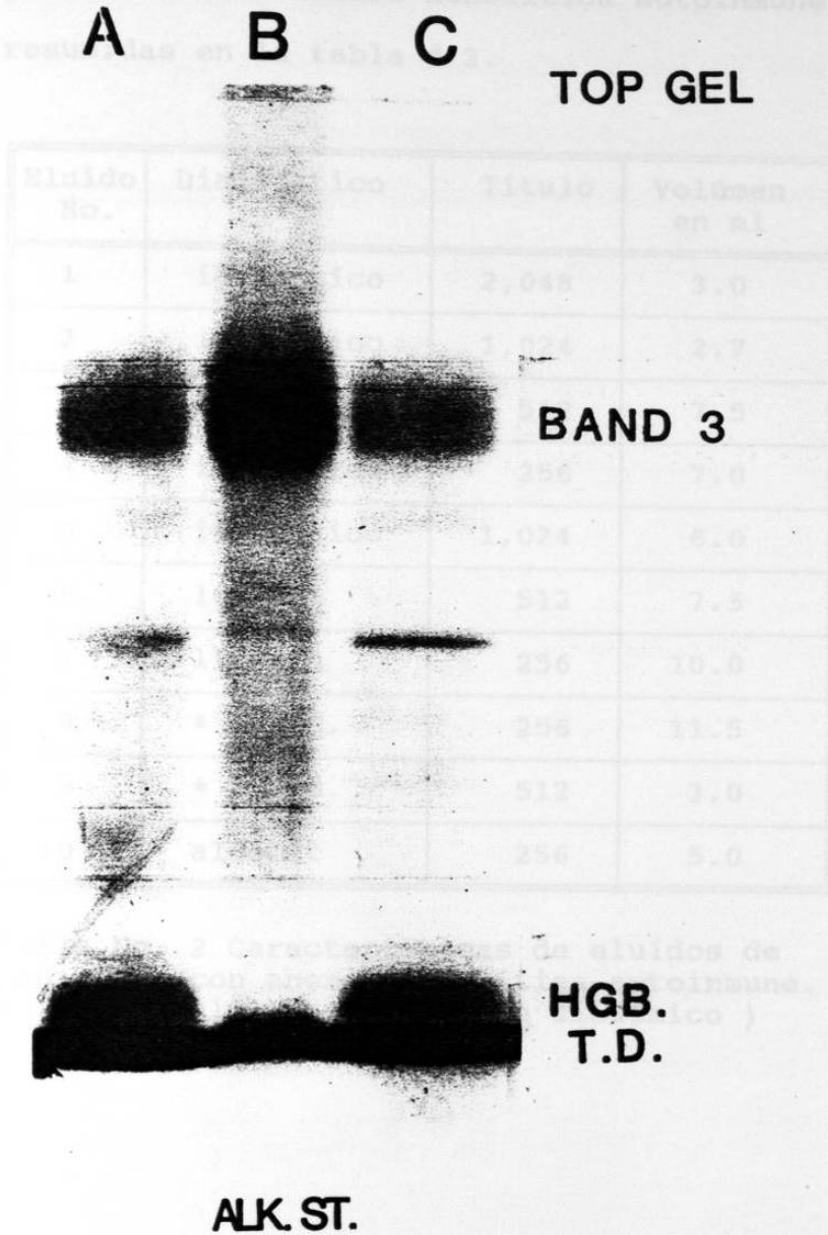


Figura No. 1 Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico de 3 preparaciones vesiculares.

Las características de los diversos eluidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune son resumidas en la tabla # 2.

Eluido No.	Diagnóstico	Título	Volúmen en ml
1	idiopático	2,048	3.0
2	idiopático	1,024	2.7
3	idiopático	512	7.5
4	idiopático	256	7.0
5	idiopático	1,024	6.0
6	linfoma	512	7.5
7	linfoma	256	10.0
8	* L.E.S.	256	11.5
9	* L.E.S.	512	3.0
10	aldomet	256	5.0

Tabla No. 2 Características de eluidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune.
* L.E.S. (lupus eritematoso sistémico)

En la tabla No. 3 se muestran los resultados de los experimentos de aglutinación vesicular utilizando los eluidos obtenidos de donadores normales con una prueba de antiglobulina humana positiva.

Eluido No.	Título	Aglutinación
1	16	-
2	32	-
3	16	-
4	256	++
5	32	-
6	32	-
7	4	-
8	8	-
9	2	-
10	16	-
11	16	-
12	128	++
13	8	-
14	8	-
15	256	-
16	128	-
17	64	+
18	16	-
19	2	-
20	2	-
*21 BNS	-	-
22 SUERO	-	-

Tabla No. 3 Aglutinación con eluidos de donadores sanos con prueba de antiglobulina humana positiva.
*BNS: Sol'n salina amortiguadora normal

La tabla No. 4 muestra los resultados de los diferentes experimentos en los que se estudio la aglutinabilidad vesicular mediada por aloanticuerpos con especificiad para los antígenos de grupos sanguíneos.

Antisuero	Título	Aglutinación
Anti - D	2,048	++
Anti - C	64	-
Anti - E	64	-
Anti - c	128	-
Anti - e	32	-
Anti - Fy ^a	16	-
Anti - Fyb	16	-
Anti - Jk ^a	16	-
Anti - Jkb	32	-
Anti - K	32	-
Anti - k	64	-
Anti - M	32	-
Anti - N	8	-
Anti - S	8	-
*BNS	-	-
Suero	-	-

Tabla No. 4 Aglutinación con antisueros contra antígenos eritrocitarios usuales.

* solución salina amortiguadora normal

Los resultados de los estudios de aglutinabilidad vesicular utilizando los eluidos recuperados de los pacientes sufriendo de anemia hemolítica autoinmune son expresados en la tabla No. 5.

Eluido No.	Título	Aglutinación
1	2,048	4+
2	1,024	4+
3	512	4+
4	256	4+
5	1,024	4+
6	512	4+
7	256	4+
8	256	4+
9	512	4+
10	256	4+
*BNS		-
Suero		-

Tabla No. 5 Aglutinación con eluidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune.

* Solución salina amortiguadora normal

La tabla No.6 resume los resultados obtenidos en el grupo de experimentos diseñados para demostrar la inmunoespecificidad de la fijación de los diferentes autoanticuerpos a las respectivas preparaciones de vesículas eritrocitarias. En éste grupo de experimentos se incluyeron 6 eluidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune, un eluido anti-D, 2 de donadores sanos con una prueba de antiglobulina humana positiva y los respectivos controles.

No.	Eluido	C.P.M. *	Mol.de IgG **
1	Paciente 1	1;161,858	3.0×10^{11}
2	Paciente 2	890,883	2.3×10^{11}
3	Paciente 3	574,453	1.48×10^{11}
4	Paciente 4	466,360	1.20×10^{11}
5	Paciente 5	610,240	1.57×10^{11}
6	Paciente 6	586,916	1.51×10^{11}
& 7	Paciente 1	4;081,041	1.05×10^{12}
8	Anti - D	367,447	9.51×10^{10}
9	Donador #4	604,710	1.56×10^{11}
10	Donador #12	511,766	1.32×10^{11}
11	B.N.S.	6,953	1.79×10^9
12	Suero	22,220	5.75×10^9
13	Suero	29,865	7.73×10^9

Tabla No. 6 Fijación inmunoespecífica de los diferentes eluidos a vesículas eritrocitarias.

* Cuentas por minuto, promedio de dos determinaciones.

** Móléculas de inmunoglobulina G.

& Se agregaron 100 μ l de proteína A ¹²⁵I.

La tabla # 7 muestra los resultados obtenidos en los experimentos dirigidos a determinar el porcentaje de proteína vesicular constituido por proteína integral de membrana, con exclusión de la pequeña fracción de proteínas periféricas y de la hemoglobina.

proteína original en μg	proteína en μg después de tx. con digitonina	% de p.i.m *
10,600	500	4.7
9,000	415	4.6
1,540	61	4.0
5,000	219	4.4
5,000	195	3.9
		$\bar{X} = 4.3$

Tabla No. 7 Proteína integral de membrana en las microvesículas eritrocitarias.

* Proteína integral de membrana.

DISCUSION

El empleo de la metodología de Leonards y Okhi para la generación de microvesículas resultó en la obtención de preparaciones abundantes, tabla No. 1, y libres de las diferentes proteínas presentes en el citoesqueleto de la célula roja intacta, lo que fué confirmado por electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecíl sulfato sódico, figura 1; una de las preparaciones fué tratada previamente con hidróxido de sodio para la remoción de proteínas periféricas con el objeto de clarificar la imagen electroforética comprobándose la preponderancia de la banda 3 en la constitución de la membrana vesicular.

La tabla No. 2 muestra que los eluídos utilizados fueron representativos, en su origen y características serológicas, de los pacientes con anemia hemolítica autoimmune por autoanticuerpos de tipo IgG, con una distribución consistente con la anteriormente reportada en la literatura (38).

Los experimentos diseñados para estudiar la presencia de aglutinación microvesicular demostraron que tres (15%) de los veinte autoanticuerpos generados en individuos sanos, fueron capaces de producir una débil

aglutinación revelada por el reactivo de antiglobulina humana monoclonal; en los 17 casos restantes (85%) no fué posible detectarla, tabla No. 3.

Aunque los tres eluidos capaces de producir aglutinación tuvieron el título más elevado de éste grupo, otros dos con títulos similares no aglutinaron las vesículas, probablemente evidenciando las diferencias en especificidad de las numerosas subpoblaciones características de éstos eluidos, en los que se han definido al menos seis subpoblaciones de autoanticuerpos diferentes (52).

Al analizar los resultados obtenidos con el eluido y los antisueros con especificidad hacia diversos aloantígenos, tabla No. 4, solamente en el caso del anti-D se obtuvo una discreta aglutinación, la cual puede explicarse sobre la base del elevado título de este eluido en particular (2048), y la relativa riqueza de las vesículas en antígeno D al provenir éstas de eritrocitos con el fenotipo R_1R_1 .

Por otra parte, ha sido documentado que la cantidad de anti-D que se fija a las vesículas es proporcionalmente mayor en un 300% que aquella que se une a los globulos rojos de los que se generaron las mismas (23); éste

mismo efecto no ha sido determinado para el resto de los aloantígenos estudiados en éste trabajo.

Es importante mencionar el hecho de que los títulos de los restantes aloantisueros, que no causaron aglutinación, fueron los correspondientes a preparaciones comerciales.

Los resultados obtenidos con los eluidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune demostraron que la aglutinación vesicular mediada inmunológicamente puede ser producida de manera inequívoca por los mismos, tabla No. 5.

Tales resultados confirmaron la hipótesis de éste trabajo de que la aglutinación mediada inmunológicamente puede producirse en ausencia del citoesqueleto.

Que la aglutinación obtenida fué un fenómeno mediado inmunológicamente fué comprobado en los experimentos diseñados para el efecto, en los que se utilizó proteína A ¹²⁵I para la inmunodetección y cuantificación de moléculas de IgG sobre la superficie de la membrana vesicular; los resultados de dichos experimentos, resumidos en la tabla No. 6, expresan el número final

estimado de moléculas de proteína A, que son equivalentes al número de moléculas de IgG sobre la membrana vesicular, ya que existe una relación de 1 entre ambas (66).

En el caso particular del tubo No. 7, correspondiente al paciente No. 1, se utilizaron 100 μ l de la solución de Proteína A 125 I en lugar de los 20 μ l de los tubos restantes; el resultado fué un aumento casi proporcional en la cantidad de moléculas detectadas, reflejando que las condiciones experimentales no fueron las de saturación.

Los resultados de los controles simultáneos, en los que los autoanticuerpos fueron sustituidos por solución salina amortiguadora normal y por suero humano normal reflejan que la fijación de IgG de manera inespecífica fué negligible.

El número de moléculas de anticuerpo detectadas en los diferentes experimentos mostró cierta variación explicada por al menos tres circunstancias: las diferencias en el título de los diferentes eluidos, reflejando no solo variación en el contenido del anticuerpo correspondiente sino en el grado de su inmunoafinidad; el hecho de que los pacientes de los que

se obtuvieron los eluidos estaban en diferentes etapas de evolución de la enfermedad y finalmente, el que dichos experimentos no fueron realizados bajo condiciones de saturación de sitios antigénicos.

Con respecto a la determinación del porcentaje de proteína integral de membrana en las vesículas, excluyendo la hemoglobina, los ensayos de Lowry en 5 preparaciones originales y después de su tratamiento con digitonina demostraron que, en promedio, éste porcentaje es de 4.3%, confirmando lo sugerido por Branks y colaboradores (3).

Los resultados obtenidos implican que durante el proceso de vesiculación el citoesqueleto en su totalidad es retenido por la célula roja, mientras que las proteínas de la membrana eritrocitaria sufren una segregación al azar, no selectiva y funcional, lo que se reflejó en que el antígeno D mantuvo su inmunoreactividad en las microvesículas, comprobando que en su caso no es necesaria la asociación con el citoesqueleto del polipéptido en el que reside dicho antígeno para la expresión de su reactividad (23).

CONCLUSIONES

El grado de aglutinación obtenido con los eluidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune confirma sin lugar a dudas la hipótesis de éste trabajo de que el combinar anticuerpos con una elevada inmunoafinidad con estructuras de membrana exhibiendo el antígeno respectivo a una elevada densidad, como lo es la banda 3 en las microvesículas eritrocitarias, es suficiente para producir el fenómeno de aglutinación en ausencia del citoesqueleto celular.

Los resultados comprueban que el citoesqueleto no es necesario para la producción de la aglutinación mediada por mecanismos inmunes bajo las condiciones descritas.

Estas condiciones fueron la utilización de vesículas libres de citoesqueleto e inmunoreactivas, ricas en banda 3, en combinación con el reciente descubrimiento de que es ésta la proteína contra la cual está dirigido el autoanticuerpo en los pacientes con anemia hemolítica autoinmune.

Las implicaciones de éstos resultados inciden de manera directa sobre los conceptos clásicos de la aglutinación en los que la deformabilidad, la contractilidad y otras

propiedades conferidas por el citoesqueleto a la membrana celular han sido consideradas como indispensables para la producción de la misma.

Factores como la inmutuafinidad del anticuerpo, la densidad antigénica, la movilidad y capacidad de polarización del antígeno, parecen ser suficientes para compensar la falta del citoesqueleto durante la aglutinación.

Adicionalmente, los datos obtenidos aportan evidencia de que la expresión de la reactividad antigénica en el eritrocito intacto es independiente del citoesqueleto, lo cual ha sido sugerido para el antígeno D (23).

La proteína integral de la membrana vesicular constituyó en promedio el 4.3% de la proteína total en las vesículas estudiadas; éste conocimiento permitirá el diseño de modelos experimentales cuantitativos, bajo condiciones de saturación de sitios antigénicos, para evaluar la hipótesis de segregación al azar de los antígenos de grupos sanguíneos durante el proceso de vesiculación eritrocitaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Steane EA, Greenwalt TJ. Erythrocyte agglutination. In: Sandler SG, Schanfield MS, eds. Immunobiology of the erythrocyte. New York: Alan R. Liss; 1979

- 2.- Gokhale SM, Mehta NG. Concanavalin A agglutinability of membrane-skeleton-free vesicles and aged cellular remnants derived from human erythrocytes. Is the membrane skeleton required for agglutination? *Biochim J* 1987;241:513-520

- 3.- Branks MJ, Victoria EJ, Masouredis SP. Red cell alloantigens in skeletal-free^o microvesicles. Submitted for publication

- 4.- Bretscher MS. Phosphatidyl-ethanolamine: differential labelling in intact cells and ghosts of human erythrocytes by a membrane impermeable reagent. *J Mol Biol* 1972;71: 523-528

- 5.- Bretscher MS. Membrane structure: some general principles. *Science* 1973;181:622-629
- 6.- Zwaal RFA, Roelfosen B, Confurius P, Van Deenen LLM. Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. *Biochim Biophys Acta* 1975; 406:83-96
- 7.- Elgsaeter A, Shotton DM, Branton D. Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts. The influence of spectrin aggregation. *Biochim Biophys Acta*. 1976;426:101-122
- 8.- Golan DE, Veatch W. Lateral mobility of band 3 in the human erythrocyte membrane studied by fluorescence photobleaching recovery: evidence of control by cytoskeletal interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:2537-2541
- 9.- Patel VP, Fairbanks G. Spectrin

- phosphorylation and shape change of human erythrocyte ghosts. *J Cell Biol* 1981;88:430-440
- 10.- Cooke GMW, Heard DH, Seaman GVF. Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature* 1961;191:44-47
- 11.- Jones MN, Nickson JK. Monosaccharide transport proteins of the human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1981;650:1-20
- 12.- Volsky DJ, Loyter A. Role of Ca^{++} in virus induced membrane fusion. *J Cell Biol* 1978; 78:465-479
- 13.- Knutton S. Studies of membrane fusion V. Fusion of erythrocytes with non-haemolytic sendai virus. *J Cell Sci* 1979;36:85-96
- 14.- Allan D, Billah MM, Finean JB, Michel RH. Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular $[Ca_2^+]$. *Nature* 1976;261:58-60

- 15.- Lutz HU, Liu SC, Palek J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. *J Cell Biol* 1977;73:548-560
- 16.- Ott P, Hope MJ, Verkleis AJ, Roelfosen B, Brodbeck U, Van Deenen LLM. Effect of dimyristoyl phosphatidylcholine on intact erythrocytes. Release of spectrin-free vesicles without ATP depletion. *Biochim Biophys Acta* 1981;641:79
- 17.- Wagner GM, Schwartz RS, Chiu DTY, Lubin BH. Membrane phospholipid organization and vesiculation of erythrocytes in sickle cell anemia. *Clin Haematol* 1985;14:183-200
- 18.- Herrman A, Lentsch P, Lassmann G, Ladhoff AM, Donath E. Spectroscopic characterization of vesicle formation on heated human erythrocytes and the influence of the antiviral agent amantadine. *Biochim Biophys Acta* 1985;812:277-285
- 19.- Bessis M. La forme et la déformabilité des

- érythrocytes normaux et dans certaines
anémies hémolytiques congénitales. *Nouv Rev
Fr Hematol* 1977;18:75-94
- 20.- Laczko J, Feo CJ, Phillips W. Discocyte-
echinocyte reversibility in blood stored in
CPD over a period of 56 days *Transfusion*.
1979;19:379-388
- 21.- Lutz HU, Lomant AJ, Mc Millan P, Wherli E.
Rearrangements of integral membrane
components during in vitro aging of sheep
erythrocytes membranes. *J Cell Biol* 1977;
74:389-398
- 22.- Bessis M, Mondon P. La microsphérulation et
les formes myéliniques des globules rouges.
Nouv Rev Fr Haematol 1972;12:443-454
- 23.- Victoria EJ, Branks MJ, Masouredis SP.
Immunoreactivity of the Rh(o) D antigen in
cytoskeleton free vesicles. *Transfusion*
1987;27:32-35
- 24.- Haest CWM. Interactions between membrane

skeleton proteins and the intrinsec domain of the erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1982;694:331-352

- 25.- Marquardt MD, Gordon JA. Glutaraldehyde fixation and the mechanism of erythrocyte agglutination by concanavalin A and soybean agglutinin. *Exp Cell Res* 1975;91:310-316
- 26.- Fowler VW, Davis JQ, Bennett V. Human erythrocyte myosin: identification and purification. *J Cell Biol* 1985;100:51-55
- 27.- Wong AL, Kiehart D, Pollard TD. Myosin from human erythrocytes. *J Biol Chem* 1985;260:46-49
- 28.- Fowler VM, Bennett V. Erythrocyte membrane tropomyosin. *J Biol Chem* 1984;279:5978-5989
- 29.- Bennett V. The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Annu rev Biochem* 1985; 54:273-304

- 30.- Victoria EJ, Pierce SW, Branks MJ, Masouredis SP. IgG red blood cell autoantibodies in autoimmune hemolytic anemia bind to epitopes on red blood cell membrane protein band 3 glycoprotein. *J Lab Clin Med* 1990;115:74-78
- 31.- Petz LD, Garraty G. acquired immune hemolytic anemias. New York: Churchill Livingstone, 1980
- 32.- Gorst DW, Rawlinson VI, Merry AH, et al. Positive direct antiglobulin test in normal individuals. *Vox Sang* 1980;38:99-105
- 33.- Worlledge SM. Autoantibody formation associated with methyl dopa (Aldomet) therapy. *Br J Haematol* 1969;16:5-8
- 34.- Dacie JV. Autoimmune hemolytic anemia. *Arch Int med* 1975;135:1293-1230
- 35.- Weiner W, Batty PA, Cleghorn TE, Marson FGW, Meynell MJ. Serological findings in a case of haemolytic anemia, with some general observations on the pathogenesis of this

- syndrome. Br Med J 1953;2:125-128
- 36.- Weiner W, Vos GH. Serology of acquired hemolytic anemia. Blood 1963;22:606-613
- 37.- Issit PD, Pavone BG. Critical reexamination of the specificity of Rh antibodies in patients with a positive direct antiglobulin test. Br J Haematol 1978;38:63-74
- 38.- Russell NH, Bellingham AJ. Autoimmune haemolytic anaemia. Clinics in Immunology and Allergy 1985;5:639-647
- 39.- Dacie JV. The haemolytic anaemias, part II: the autoimmune haemolytic anaemias. 2 nd Ed. New York, Grune and Stratton Inc. 1963
- 40.- Race RR, sanger R, Selwyn GJ. Possible deletion in human Rh chromosome : a serological and genetical study. Brit J Exp Path 1951;32:124-135
- 41.- Dacie JV, Worlledge, SM. Autoimmune hemolytic anemias. Prog Hemat 1969;6:82-120
- 42.- Celano, MJ, Levine P. Anti-Lw specificity in

autoimmune acquired hemolytic anemia
Transfusion 1967;7:265-268

- 43.- Bell CA, Zwicker H, Sacks HJ. Autoimmune hemolytic anemia :routine serological evaluation in a general hospital population. Amer J Clin Path 1973;60;903-911
- 44.- Issit PD, Pavone BG, Goldfinger D, et al. Anti-Wrb and other autoantibodies responsible for positive direct antiglobulin tests in 150 individuals. Br J Haematol 1976;34:5-18
- 45.- Van loghem, Van der Hart M. Varieties of specific autoantibodies in acquired hemolytic anemia. Vox Sang 1954;4:2-11
- 46.- Dausset J, Colombani J, Jean RG, et al. Sur un cas d'anemie hemolytique aigue de L'enfant avec presence d'une hemolysine immunologique et d'un pouvoir anticomplementaire du serum. Sang 1957;28:352-354
- 47.- Nugent ME, Colledge KI, Marsh LW. Autoimmune hemolytic anemia caused by anti-U. Vox Sang

1971;20:519-525

- 48.- Dube VE, House RF, Jr, Moulds J, et al.
Hemolytic anemia caused by auto anti-N. Amer
J Clin Path 1975;63:828-831
- 49.- Cohen DW, Garraty G, Morel P, Petz LD.
Autoimmune hemolytic anemia associated with
IgG auto anti-N. Transfusion 1979;19:329-331
- 50.- Symansky IO, Roberts PL, Rosenfield RE. Anti-
A autoantibody with severe intravascular
hemolysis. N Eng J Med 1976;294:995-996
- 51.- Masouredis SP, Branks MJ, Victoria EJ.
Antiidiotypic IgG crossreactive with Rh
alloantibodies in red cell autoimmunity.
Blood 1987;70:710-715
- 52.- Masouredis SP, Branks MJ, Pierce SW, Victoria
EJ. Non hemolytic red cell autoantibodies
consist of multiple immunoglobulin G
populations directed against complex membrane
epitopes. J Lab Clin Med 1989;113:569-576
- 53.- Masouredis SP, Branks MJ, Pierce SW, Victoria

EJ, an IgG red cell autoantibody from a patient with hemolytic anemia that binds to a 95 Kd membrane protein at a million sites per cell [abstract]. Twenty second congress of the International Society of Hematology, Milan, Italy. Aug 28-Sept 2, 1988

- 54.- Steck TL. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J Cell Biol* 1974;62:1-19
- 55.- Bennett V. The molecular basis for membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes. *J Cell Biochem* 1982;18:49-65
- 56.- Macara IG, Cantley LC, in: *Cell Membrane Methods and Reviews*. Elson E, Frazier W, and Glazer L, eds. Plenum, New York 1982;41-87
- 57.- Knauf PA, in: *Current Topics in Membrane Transportation*, 1979;12:249-263
- 58.- Kopito RR, Lodish HF. Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature* 1985;316:234-238

- 59.- Rekvig OP, Hannestad K. Acid elution of blood group antibodies from intact erythrocytes. Vox Sang 1977;33:280-285
- 60.- Technical Manual of the American Association of Blood Banks. Widman Fk, ed. Ninth edition, American Association of Blood Banks, Arlington, Virginia; 1985:91-101
- 61.- Leonards KS, Ohki S. Isolation and characterization of large (0.5-1.0 μ) cytoskeleton-free vesicles from human and rabbit erythrocytes. Biochim Biophys Acta 1983;728:383-393
- 62.- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275
- 63.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685
- 64.- Victoria EJ, Mahan LC. Some properties of alkali extracted red cell ghosts membranes. Biochim Biophys Acta 1981;644:226-232

- 65.- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH.
Electrophoretic analysis of the mayor
polypeptides of the human erythrocyte
membrane. *Biochemistry* 1971;10:2606-2617
- 66.- Gray LS, Masouredis SP. Interaction of ¹²⁵I-
protein A with erythrocyte-bound IgG. *J Lab
Clin Med* 1982;99:399-403



ON T

