

FUNCIONALIDAD DE POLICATIONES SINTÉTICOS PARA EL ENMASCARAMIENTO DE SITIOS ANTIGÉNICOS MEDIANTE MÉTODOS ÓPTICOS

FUNCTIONALITY OF SYNTHETIC POLICATIONS FOR THE MASKING OF ANTIGENIC SITES BY MEANS OF OPTICAL METHODS

M.F. Relancio[♥], B. Riquelme^{♥♦}, D. Dumas^{*}, A. Fontana[♦], A. Alessi[♦], P. Foresto[♦],
C. Grandfils^{*} y J. Valverde[♦]

♥Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, IFIR (CONICET-UNR), Rosario, Argentina

♦Fac. Cs. Bioq. y Farm., Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531 (2000) Rosario, Argentina

♣ Lab. Méc. et Ing. Cellulaire et Tissulaire, Universidad Henry Poincaré, Nancy, France

? Centre Interfacultaire des Biomatériaux (CEIB), Université de Liège, Belgique

e-mail: hrelancio@yahoo.com.ar, riquelme@ifir.edu.ar

En este trabajo se analiza la capacidad de dos policationes sintéticas (Semo B86 y Semo B124) para enmascarar sitios antigénicos de la membrana del glóbulo rojo. El análisis se hizo sobre imágenes digitales obtenidas por microscopía convencional y confocal evaluando la morfología y distribución de las células aglutinadas mediante los anticuerpos monoclonales específicos anti-AB y anti-glicoforinas A, B y C. Los resultados muestran el enmascaramiento de ciertos sitios antigénicos, siendo esta información de gran utilidad para evaluar y perfeccionar la funcionalidad de los policationes estudiados.

Palabras Claves: policationes, glicoforina, imágenes digitales, glóbulo rojo, microscopía, transfusión

The aim of this work is to analyse the functionality of two specially designed synthetic polycations (Semo B86 y Semo B124) in order to obtain the masking of antigenic determinants by binding to the erythrocyte membrane. We applied the image digital analyses from conventional and confocal microscopy in order to assess the morphology and distribution of agglutinates cells with specific monoclonal antibodies anti-AB and anti-glycophorin A, B and C. These measurements show the possible camouflage of different specific antigenic sites, which would give relevant information about the functionality of the polycations were studied.

Key Words: polycations, glycophorin, image digital, red blood cell, microscopy, transfusion

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han hecho muchos esfuerzos para clarificar la relación entre las propiedades macromoleculares de los policationes (peso molecular, densidad de carga, flexibilidad, etc.) y sus efectos sobre las células sanguíneas. En particular, existen estudios sobre la interacción entre el polietilenglicol (PEG) y los glóbulos rojos humanos (GR) para producir el enmascaramiento de los antígenos A y B. Así, los GR-PEG podrían ser transfundidos, independientemente de los grupos ABO del dador y del receptor^{(1) (2) (3) (4)}. Sin embargo, se han observado serios inconvenientes en los estudios *in vivo*, por lo cual los últimos esfuerzos se han centrado en el desarrollo de polímeros que presenten una mayor biocompatibilidad al transfundirse los glóbulos rojos enmascarados.

En este trabajo se analiza la funcionalidad de nuevos policationes de origen sintético, especialmente diseñados con el fin de lograr el enmascaramiento de determinantes antigénicos por unión selectiva de los mismos sobre la membrana del glóbulo rojo, y de conseguir una óptima biocompatibilidad con las células sanguíneas.

Mediante el análisis digital de imágenes obtenidas por microscopía convencional y confocal, se evaluó la

funcionalidad de dos policationes sintéticas (Semo B86 y Semo B124), midiendo las características de la aglutinación por anticuerpos monoclonales específicos anti-AB y anti-glicoforinas A, B y C, de los glóbulos rojos tratados. Se analizaron las imágenes digitales de los aglutinados celulares mediante un programa que permite el procesamiento de las mismas con el fin de evaluar la morfología y la distribución de dichos aglutinados. Estas mediciones brindarían información cuantitativa sobre el posible enmascaramiento de los sitios antigénicos en estudio, evaluando de esta manera la funcionalidad de los policationes estudiados.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Suspensión de GR

Las muestras de sangre provenientes de donadores sanos (grupo sanguíneo A), fueron recolectadas en recipientes estériles conteniendo EDTA como anticoagulante. Los GR fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) de pH = 7.4 y 295 mOsmol/kg.

Policationes estudiados

Se utilizaron soluciones de los policationes Semo B86 y Semo B124^{(5) (6) (7)} a las concentraciones 2, 50 y 250 µg/ml en PBS.

Interacción entre los policationes y los GR

Se incubó 1 ml de la solución del polication (2, 50 y 250 µg/ml) con 1 ml de una suspensión de GR en PBS al 12% (v/v) a una temperatura de (25.0 ± 0.5) °C bajo agitación lateral durante 45'. Finalmente se lavaron los GR 3 veces con PBS para la evaluación de la funcionalidad.

Aglutinación de GR con anticuerpos

Los GR lavados fueron incubados con diluciones aglutinantes de los anticuerpos anti-AB (Wiener-Lab) y anti-glicoforina (Blanchard) a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en PBS-albúmina al 0.5 %.

Para el control, la aglutinación de los GR fue confirmada en presencia de los anticuerpos sin el tratamiento previo de los GR con los policationes.

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GLICOFORINA UTILIZADOS

ANTICUERPOS	GLICOFORINAS ESPECÍFICAS	CONCENTRACIÓN [µg/ml]
NaM167-8A2 (3-16)	GPA(débil)+GPB	55
NaM228-8F9 (3-18)	GPA+ GPB	76
64-5B11 (3-22)	GPC	34
NaM26-3F4 (3-46)	GPA(débil)+GPB	65
NaM10-6G4 (3-47)	GPA	53

Microscopía confocal

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron utilizadas para estudiar la influencia de los policationes sobre la aglutinación de glóbulos rojos inducida por las anti-glicoforinas⁽⁸⁾. Estas proteínas de membrana fueron localizadas luego del marcaje con el anticuerpo secundario acoplado con el fluoróforo Alexa488TM ($\lambda_{ex}=495nm$, $\lambda_{em}=519nm$) y dirigido específicamente a las glicoforinas A, B, C (GPA, GPB y GPC). Luego, los GR fueron marcados con el marcador lipofílico DiI 3,3'-perclorato de dioctadeciloxacarbo-cianina (2.15mM, Molecular Probes, $\lambda_{ex}=549nm$, $\lambda_{em}=565nm$).

Para la obtención de las series de imágenes y el análisis espectral, se utilizó un microscopio confocal Leica Microsystems TCS SP2-AOBS equipado con un beamsplitter acusto-óptico, un láser de Argón (457nm, 476nm, 488nm, 514nm) y un láser de HeNe (543nm y 633nm). Los anchos de banda de las longitudes de onda fluorescentes detectadas, fueron optimizados para cada canal a la máxima emisión (494-543 para Alexa488TM y 529-589 para DiI, respectivamente). Las adquisiciones regulares resultaron en secuencias espectrales de 30

imágenes en el rango 392-684 (separación de 22 nm). Las emisiones de fluorescencia fueron registradas dentro del disco de Airy (apertura total de 28,26 Å) y se obtuvieron para cada caso imágenes en matrices 512 x 512.

Microscopía convencional

Se utilizó un microscopio invertido Union Optical, con una magnificación de 100x y una cámara CCD "frame grabber" (Sony XC-75) ubicada en el tubo ocular del microscopio y conectada a un Sistema que permite el Procesamiento Digital de las Imágenes (IPPLUS System).



Figura 1: Imagen del microscopio invertido con la cámara CCD adaptada en un ocular.

Para los dos tipos de imágenes registradas (confocal y convencional), se contaron los aglutinados de más de cuatro células y en cada uno de ellos se hicieron medidas de área (A) y perímetro (p) obteniéndose el promedio de los mismos, los cuales se utilizaron para calcular el factor de forma de los aglutinados mediante la ecuación⁽⁹⁾:

$$ASP = \frac{4\pi}{p^2} \quad (1)$$

De esta forma, este parámetro cuantifica la forma geométrica predominante en la muestra de los aglutinados.

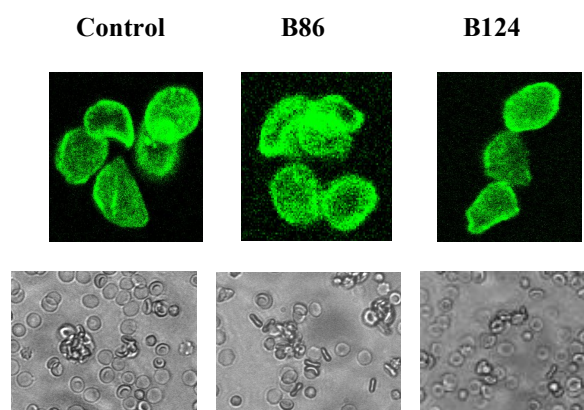


Figura 2: Imágenes de los aglutinados obtenidas por microscopía confocal (superior) y microscopía convencional (inferior).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 3 se observa un comportamiento diferente de los policaciones sobre la aglutinación de GR mediada por anticuerpos anti-glicoforinas. Los policaciones Semo B86 y Semo B124 disminuyen la aglutinación respecto del control para todos los anticuerpos utilizados, excepto para el 3-18, el cual muestra una baja fuerza aglutinante. Este comportamiento podría deberse a una diferente accesibilidad de los sitios antigénicos de las glicoforinas para cada uno de los policaciones, existiendo así un posible camuflaje de estos sitios dependiendo de la especificidad de los anticuerpos 3-16, 3-22, 3-46 y 3-47. Estos hallazgos podrían proveer de mayor información sobre los mecanismos de la interacción de estos policaciones con la membrana del GR.

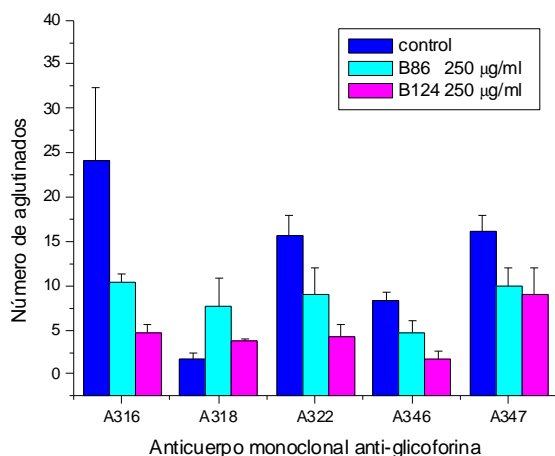


Figura 3: Número de aglutinados para las muestras control y tratadas con los policaciones Semo B86 y Semo B124 aglutinados mediante las anti-glicoforinas.

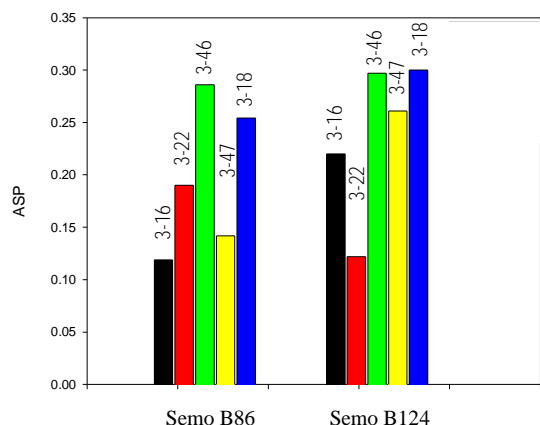


Figura 4: Variación del ASP para los dos policaciones (Semo B86 y Semo B124) con los distintos anticuerpos.

En la figura 4 se observa que el ASP de los GR aglutinados y tratados con el policación Semo B124 es mayor que para los tratados con el Semo B86 para todos los anticuerpos anti-glicoforina analizados, a excepción del 3-22 donde ocurre lo contrario. Para el anticuerpo 3-22 el ASP no varía notablemente y la diferencia es mayor para los anticuerpos 3-16 y 3-47. Un aumento del

ASP indica que los aglutinados son más globulares⁽⁹⁾ lo cual se debería a una mayor energía de aglutinación, es decir que en los GR tratados con el policación Semo B86, la energía de aglutinación es menor que en los GR tratados con el Semo B124.

Por los resultados obtenidos en microscopía convencional, no se observaron diferencias significativas sobre la aglutinación mediada por anticuerpos anti-AB en los GR A tratados con ambos policaciones respecto de la muestra control.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados muestran un comportamiento diferente de la aglutinación de los glóbulos rojos mediada por anticuerpos monoclonales anti-glicoforinas dependiendo de la naturaleza del policación empleado, lo que permite inferir que se logró un enmascaramiento antigénico específico de dichos sitios.

Para el caso de los sitios antigénicos del grupo A del sistema ABO, no se ha observado un enmascaramiento específico de los mismos por estos dos policaciones analizados.

Este estudio provee herramientas útiles para evaluar la funcionalidad y así optimizar el desarrollo de nuevos policaciones sintéticos para su aplicación en transfusión sanguínea.

Referencias

1. Moreau E, Ferrari I, Drochon A, Chapon P, Vert M, Domurado D. Interactions between red blood cells and lethal, partly quaternized tertiary polyamine. J of Controlled Release, **64**:115-128 (2000).
2. Garratty G. Progress in modulating the RBC membrane to produce transfusable universal/stealth donor RBC. Transfusion Medicine Reviews, **18**(4):245-256 (2004).
3. Murad K, Mahany K, Brugnara C, Kuypers F, Eaton J, Scott M. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypoly(Ethylene glycol). Blood, **93**(6):2121-2127 (1999).
4. Bradley A, Murad K, Regan K, Scott M. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. Biochimica et Biophysica Acta, **1561**:147-158 (2002).
5. Riquelme, B; Dumas, D; Fontana, A; Alessi, A; Foresto, P; Grandfils, C; Stoltz, J; Valverde, J. In Biophotonics and New Therapy Frontiers, **6191** (2006).
6. Pantoustier, N; Moins, S; Wuatier, M; Degée, P; Dubois, P. Chem Comm **3**, 340-1 (2003).
7. Ydens S; Moins, F; Botteman, P; Degée, P; Dubois, P. E-Polymer **39**, 1-7 (2004).
8. Piroton, S; Muller, C; Pantoustier, N; Botteman, F; Collinet, S; Grandfils, C; Dandrifosse, G; Degée, P; Dubois, P; Raes, M. Pharm. Res, **21**, 1471-1479 (2004).
9. Foresto, P, D'Arrigo, M, Carrera, L, Etcheparre, R, Valverde, J, Rasia, R. Evaluation of red blood cell aggregation in diabetes by computerized image analysis. Medicina, **60**:570-572 (2000).