

ANALISIS DE LA RESISTENCIA OSMOTICA DE GLOBULOS ROJOS HUMANOS INCUBADOS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GPA

N.G. de Isla¹, J.R. Valverde^{2,3}, R.J. Rasia^{2,3}, J.F. Stoltz¹, B.D. Riquelme^{2,3}

¹Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire - UMR CNRS 7563 et IFR 111 Bioingenierie - Facultad de Medicina, Universidad Henry Poincaré Nancy 1, Vandoeuvre-lès-Nancy, Francia

²Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531 - (2000), Rosario, Argentina

³Instituto de Física Rosario (IFIR), CONICET-UNR
e-mail: riquelme@ifir.ifi.edu.ar

La glicoforina A (GPA) es la sialoglicoproteína predominante en la superficie de los glóbulos rojos humanos (GR). En estado nativo, la GPA no interactúa significativamente con el citoesqueleto de la membrana del glóbulo rojo aunque se ha observado que la unión de anticuerpos específicos puede producir una alteración en las propiedades mecánicas de la membrana. Para evaluar este efecto se utilizó un Fragilímetro. Este instrumento permite determinar la resistencia osmótica de la membrana de los glóbulos rojos (GR) por medio de la medida de la extinción de un haz láser proyectado a través de una suspensión de GR. Esta suspensión está sujeta, por difusión, a una variación continua de salinidad desde un equilibrio isotónico (154 mM de NaCl) a uno hipotónico (25 mM de NaCl). La variación de la presión osmótica induce sobre los GR una lisis progresiva, la cual conduce a un cambio de la intensidad de la luz transmitida. Las determinaciones se realizaron con muestras de sangre de dadores sanos, incubadas con distintas concentraciones de un anticuerpo monoclonal anti-GPA. La determinación de los valores de hemólisis inicial, 50 % y total permiten la evaluación de la fragilidad de la célula a través de su resistencia osmótica membranal. Nuestros resultados muestran un aumento de la resistencia osmótica a medida que aumenta la cantidad de anticuerpo incorporado durante la incubación. Esto podría deberse a que la unión de los anticuerpos específicos induce un cambio conformacional en el dominio citoplásmico, que resulta en su asociación aumentada con el citoesqueleto de los GR, disminuyendo en consecuencia, la deformabilidad de su membrana.

Glycophorin A (GPA) is the predominant sialoglycoprotein on human red blood cells (RBC) surface. In its native state, GPA does not significantly interact with the red cell membrane skeleton but it has been showed that the binding of specific antibodies to GPA can produce an increase in membrane rigidity. To study this effect a Fragilimeter was used. This device allows determining the osmotic resistance of RBC by measuring the extinction of a laser beam projected across a RBC suspension. The suspension is subject, by diffusion, to a variation of salinity from an isotonic equilibrium (154 mM of NaCl) to a hypotonic one (25 mM of NaCl). The variation of osmotic pressure induces a progressive lysis on RBC and a change in the extinction of the transmitted light. Determinations were made with blood samples from healthy donors incubated with different concentrations of monoclonal antibody anti-GPA. Initial, 50% and total hemolysis values allow the evaluation of the cell fragility by its membrane resistance. Our results show an increase in osmotic resistance with the increase of the amount of monoclonal antibody added. It could be produce because the binding of specific antibodies to GPA induces a conformational change in the cytoplasmic domain of the protein that results in its increased association with the membrane skeleton. As a consequence, membrane deformability decreases.

I. INTRODUCCIÓN

La ósmosis es un fenómeno de difusión entre dos soluciones de concentraciones diferentes a través de una membrana permeable o semipermeable (el solvente pasa de la solución menos concentrada a la más concentrada). Pfeffer⁽¹⁾ desde 1877 ha estudiado la presión osmótica y puso en evidencia su importancia en la biología. Van't Hoff⁽²⁾ mostró de manera aproximada la relación existente entre la presión hidrostática observada y la concentración de soluto en dos compartimentos separados por una membrana semi-permeable.

El conocimiento de las propiedades físicas de la membrana del glóbulo rojo (GR), y en especial de su resistencia osmótica, es de gran interés para los hematólogos ya que este parámetro se encuentra alterado en numerosas patologías hemolíticas⁽³⁾. Este

fenómeno está caracterizado en primer lugar por modificaciones morfológicas (el GR toma la forma esférica) y en segundo lugar por la formación de poros intramembranales que inducen la lisis celular por el movimiento de agua hacia el interior y de hemoglobina hacia el exterior de la célula⁽⁴⁾. Es por ello que la medida de la resistencia osmótica de los GR es un parámetro relevante en la evaluación de su estado físico.

La glicoforina A (GPA) es la sialo-glico-proteína predominante en la membrana de los GR humanos, estando presente en un rango de 3 a 12 x 10⁵ moléculas de GPA por GR normal^(5,6). La GPA, debido a su alto contenido de ácido siálico es el mayor contribuyente a la carga neta negativa de la membrana de GR maduro. A través de repulsiones de carga, la GPA juega un rol crítico en la minimización de las interacciones célula-

célula durante la circulación. La glicoproteína madura consiste de 131 aminoácidos, 72 de los cuales son extracelulares. El contenido total de carbohidratos es aproximadamente el 60% de la masa de la proteína, representado por 16 cadenas oligosacaridas⁽⁷⁾. En estado nativo, la GPA no interactúa significativamente con el citoesqueleto de la membrana del GR⁽⁸⁾.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la unión de anticuerpos monoclonales, dirigidos a la GPA de los GR, resultante en un incremento de la asociación de la proteína con el esqueleto de la membrana, afecta la resistencia osmótica de la membrana. Para ello se utilizó un aparato denominado FRAGILIMETRO^(9,10), el cual estima la resistencia osmótica de glóbulos rojos, por diálisis lenta, en forma automática.

II. MÉTODOS

Preparación de las muestras

Las muestras de sangre fueron centrifugadas durante 15 minutos, a fin de obtener un concentrado de GR, el cual fue lavado con una solución salina tampón fosfato (PBS) C1Na 0.154 M. Luego, se incubaron 50 µl de la suspensión de GR al 2% con concentraciones crecientes de anticuerpo monoclonal anti-GPA (concentración 43 µg/ml) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente los glóbulos rojos fueron lavados con PBS a fin de eliminar el excedente de anticuerpo que no se ha unido a las células. Para realizar las mediciones de resistencia osmótica, se diluyeron 5 µl de GR en 390 µl de PBS.

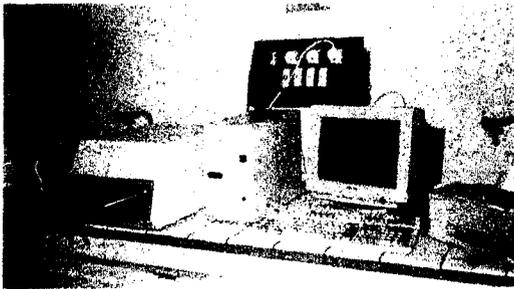


Figura 1. En esta imagen se puede observar el Fragilímetro, el cual trabaja conectado a una PC donde un software controla la adquisición y procesamiento de las señales.

Principio de la medida

En el porta-muestra, constituido por un tubo de membrana semipermeable de celulosa, se introducen 160 µl de suspensión de GR. Luego, éste es introducido en un recipiente que contiene 90 ml de agua destilada, termostata a 37°C. La difusión de iones desde la muestra hacia el recipiente induce una disminución progresiva en la concentración de iones intramembranal. La fuerza iónica de la suspensión de GR varía progresivamente desde 0.154 M a 0.025 M NaCl. El volumen de los GR aumenta lentamente y luego dejan escapar su contenido intracelular de hemoglobina. Al mismo tiempo, un diodo láser emite un haz de luz monocromática ($\lambda = 810 \text{ nm}$) atravesando la muestra. La medida de la intensidad de luz transmitida permite obtener información acerca del fenómeno. El

seguimiento de la hemólisis debido a la variación de la concentración salina de la muestra se realiza a través de las variaciones en la intensidad de luz transmitida por la solución. La medida simultánea de la transmisión permite apreciar las modificaciones geométricas de la morfología celular antes y en el curso de la hemólisis. Además, la evolución de la concentración salina de la muestra es medida por 2 sondas de conductancia ubicadas en el recipiente.

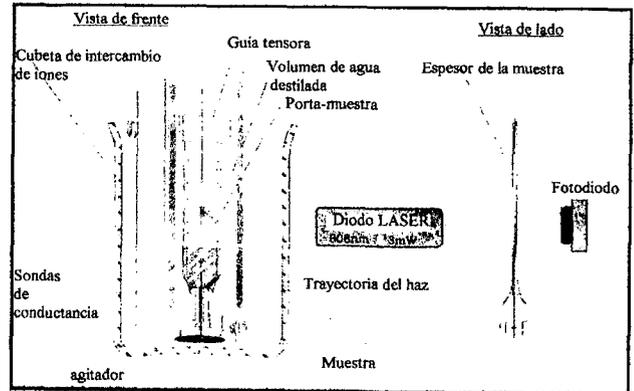


Figura 2. Representación esquemática de la unidad de medida del aparato.

La calibración de la conductividad del contenido del porta-muestra, se realiza introduciendo primero 160 µl de agua destilada (0% de conductividad), reemplazándola luego por 160 µl de PBS (100% de conductividad). Luego de esta operación de calibración, se introduce la muestra en el porta-muestras y el resto de la operación se realiza automáticamente. Un software controla la adquisición y el procesamiento de las señales.

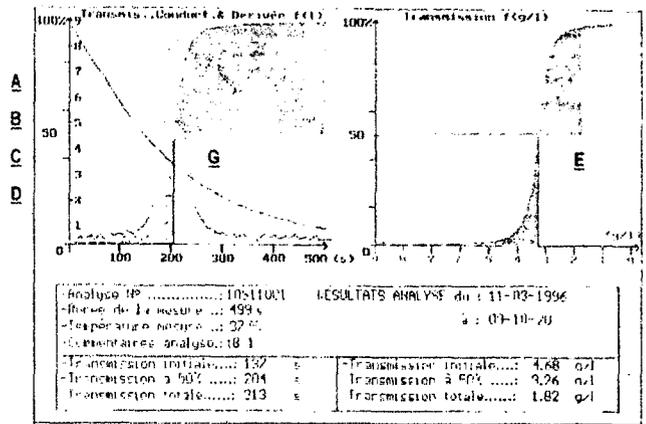


Figura 3. Curvas tipo de transmisión de luz obtenidas para una muestra de sangre normal sin la presencia de anticuerpos.

III. RESULTADOS

Los resultados (curva de hemólisis) son representados como curvas de transmisión de la luz (Figura 3) en función del tiempo (curva A, sector G) y en función de la concentración salina (curva D, sector E). La determinación de los umbrales de transmisión inicial, a 50 % y total permiten apreciar las

características de la hemólisis. Las curvas de hemólisis trazadas en función del tiempo y en función de la evolución de la concentración de NaCl son representadas sobre una escala relativa (0 y 100%). El 0% corresponde al estado inicial, cuando la transmisión de la luz es la más débil. Durante la hemólisis, la variación de intensidad de difusión induce un aumento de la intensidad luminosa recibida por el fotiodo. El 100% corresponde a la máxima intensidad de transmisión. Sobre la zona G de la Figura 3 se muestran también, en función del tiempo, la curva de la evolución de la concentración salina en la muestra (B) y derivada de la curva de transmisión (C). El error en los valores obtenidos es inferior al 5%.

TABLA 1. MUESTRA INCUBADA CON CANTIDADES CRECIENTES DE ANTICUERPO MONOCLONAL, EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

cantidad anti-GPA [μl]	Tiempo de hemólisis [s]		
	inicial	50%	total
0	257	348	497
2	263	353	505
5	265	362	509
10	259	357	501
20	273	360	502
40	283	392	534

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para una muestra tratada con concentraciones crecientes de anticuerpo monoclonal. En la misma se presentan los umbrales de transmisión inicial, a 50 % y total, expresados en unidades de tiempo. Estos valores se han representado en la Figura 4. En la tabla 2 se presentan los resultados pertenecientes a la misma muestra expresados en unidades de concentración de NaCl. Es importante notar la asimetría existente en la curva de hemólisis, ya que el tiempo en alcanzar el 50 % ($t_{0-50} = 95 \pm 8$ s) es menor que el necesario para llegar del 50% a la hemólisis total ($t_{50-100} = 146 \pm 4$ s).

TABLA 2. MUESTRA INCUBADA CON CANTIDADES CRECIENTES DE ANTICUERPO MONOCLONAL, EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl.

cantidad anti-GPA [μl]	Concentración de NaCl en la muestra [g/l]		
	inicial	50%	total
0	4.64	3.7	2.59
2	4.47	3.55	2.39
5	4.56	3.54	2.42
10	4.65	3.69	2.62
20	4.33	3.48	2.43
40	4.33	3.32	2.33

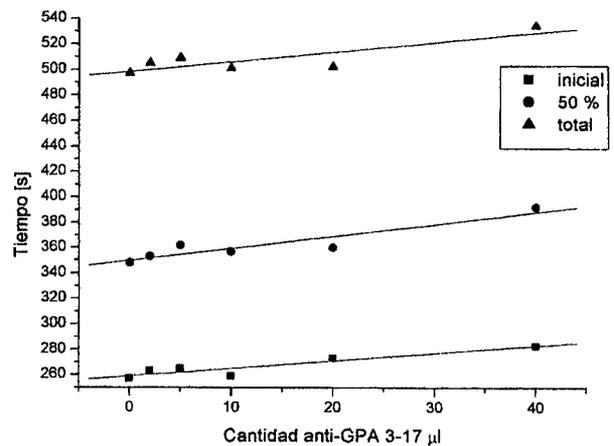


Figura 4. Gráfica realizada a partir de los valores de tiempo presentados en la Tabla 1.

IV. DISCUSION

Los resultados indican que en las muestras de sangre humana analizada, se produce una disminución de la fragilidad membranal por el pegado en la superficie de anti-GPA, lo que se podría explicar por una rigidización de la membrana, así también por la suposición de que los anti-GPA ligados actúan como una barrera entre el medio de suspensión y la membrana celular, retardando el tiempo para el cual se inicia la hemólisis. Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos por otros autores que indican que la unión de anticuerpos específicos induce un cambio conformacional en el dominio citoplásmico de la proteína. Este fenómeno es el resultado de un incremento de la asociación con el citoesqueleto de la membrana, lo que provocaría una disminución de la deformabilidad de la membrana⁽⁸⁾.

REFERENCIAS

1. D.A. Dawes. Problèmes de biochimie. Masson ed (Paris), 1975, 415-417.
2. A. Berkaloff, J. Bourguet, P. Favard, J-C. Lacroix. Biologie et Physiologie cellulaires I, Membrane plasmique. Herman ed. (Paris), Collection Méthods, 1977, 32-35.
3. M. Wintrobe, G. Lee. Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed Baltimore ed: Williams & Wilkins, 1999.
4. E. Beutler, B. Coller, T. Kipps, U. Seligsohn. Williams HEMATOLOGY. Sixth Edition. Mc Graw Hill, Medical Publishing Division, 2001, 271-288; 333-344.
5. R. Langlois, W. Bigbee, R. Jensen. The Journal of Immunology, 1985, 134:4009-4017.
6. D.M. Shotton. In Electron Microscopy of Proteins, J.R.Harris, ed., 1983, Vol. 4, 205-330.
7. M. Tomita, H. Furthmayr, V.T. Marchesi. Biochemistry, 1978, 17:4756-4770.
8. J.A. Chasis, M.E. Reid, R.H. Jensen, N. Mohandas. J Cell Biol, 1988, 107:1351-1357.
9. J. Didelon, W. Blondel, P. Mazon, S. Muller, T. Gigout, M. Gentils, G. Cauchois, J-F. Stolz. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2000, 23:31-42.
10. J. Didelon, T. Gigout, D. Dumas, J-C. Humbert, G. Cauchois, M. Gentils, J-F. Stolz. Innov. Techn. Biol. Med. 1996, 14:337-351.