

USO DE UN MODELO DE ADSORCIÓN SIMPLE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLICOFORINA "A" SOBRE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

B.D. Riquelme*, N.G. de Isla, J.R. Valverde, R.J. Rasia y J.F. Stoltz

Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario - Instituto de Física de Rosario (CONICET-UNR), Argentina - Lab. Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Faculté de Médecine, Université Henry Poincaré, France Suipacha 531 - (2000) - Rosario - Argentina
e-mail: riquelme@ifir.ifir.edu.ar

Se modeliza la adhesión de anticuerpos monoclonales (mAb) sobre la membrana eritrocitaria (GR) con el modelo de adsorción de Langmuir, suponiendo que un anticuerpo se liga únicamente a un antígeno. La cantidad de mAb ligados durante cierto tiempo es proporcional a la concentración de mAb en solución, al número de antígenos presentes sobre la célula y a las características del mAb. En consecuencia, la cantidad de mAb ligado es proporcional al número de antígenos, aun antes de que el equilibrio sea alcanzado. Usando este modelo se determinó el número de Glicoforina A (GPA) sobre el GR, analizando las mediciones obtenidas por citofluorimetría de flujo en soluciones de GR incubados con muy bajas concentraciones de mAb anti-GPA. El número de GPA por célula es obtenido sin el problema de la aglutinación eritrocitaria, por lo que este método es más preciso que los habituales, ya que la aglutinación durante las mediciones resulta en agrupamientos celulares que son contados como una única célula, dando valores incrementados de fluorescencia, forward y side scattering. El número de sitios GPA obtenido coincide con los de la bibliografía, pudiendo utilizarse esta técnica para cuantificar otros antígenos de GR, siempre y cuando pueda suponerse que la unión es uno a uno.

The statistical form of the Langmuir adsorption isotherm was used to modeler the adhesion of monoclonal antibodies (mAb) to the erythrocyte membrane (GR). For this, one antibody is assumed to bind exactly one antigen on the erythrocyte membrane. The amount of antibodies present on the cell after a given time equals to the amount of antibodies bound during this time. Flow cytometric analysis of RBC is usually used to quantify the antigen density. Red blood cells in native state (non fixed) were utilized. Agglutination during measurement may result in clumps of several cells, which are counted as single cells. Then, forward scattering, side scattering and fluorescence will be increased. To avoid the agglutination problem, we measured the fluorescence intensity for the sample incubated at different slow anti-GPA concentrations. The number of GPA sites obtained for samples from health donors were similar to those found in literature. A simple method to quantify GPA sites on erythrocytes was developed. It could be applied to quantify other membrane antigens whenever one antibody is assumed to bind exactly one antigen.

I. INTRODUCCIÓN

Las glicoforinas ⁽¹⁾ (GP) constituyen el grupo de proteínas transmembranales de los glóbulos rojos (GR), siendo la glicoforina A (GPA) la predominante. Sus dos formas alélicas definen los tipos M y N del sistema de grupo sanguíneo MN. Debido a su alto contenido en ácido siálico, estas moléculas proporcionan aproximadamente el 60% de la carga negativa de los GR. En consecuencia juega un rol importante en la regulación de las interacciones GR-GR, así también como de las interacciones de los GR con el endotelio vascular y las otras células circulatorias.

La cuantificación de antígenos y proteínas sobre la membrana de los GR se realiza en la actualidad por diversos métodos. Se utilizan habitualmente la técnica radiométrica con proteínas y anticuerpos marcados radiactivamente, así también como la técnica de microscopía electrónica ⁽¹⁾. Langlois *et al.* ⁽²⁾ han utilizado el análisis por citometría de flujo para la cuantificación de determinantes específicos de glicoforina sobre eritrocitos humanos en células fijadas

con aldehidos. La fijación es utilizada comúnmente para disminuir la aglutinación eritrocitaria la cual es un problema en las mediciones citofluorimétricas, ya que la aglutinación durante las mediciones resulta en agrupamientos celulares que son contados como una única célula, dando valores incrementados de fluorescencia, forward y side scattering. Sin embargo, se ha demostrado que la fijación de las células resulta en una significativa disminución del número de sitios antigénicos detectados, con relación a los sitios existentes en los RBC nativos (no fijados) ⁽³⁾.

En este trabajo se utiliza la citometría de flujo ^(4, 5) para cuantificar la GPA en la membrana eritrocitaria en células en estado nativo (no fijadas). Para evitar el problema de la aglutinación eritrocitaria se incubaron las muestras con diluciones muy bajas de anticuerpo monoclonal anti-GPA y el número de sitios por RBC fue determinado utilizando el modelo de adhesión simple de Langmuir. Este modelo ha sido aplicado anteriormente con éxito por Stoltz *et al.* ⁽⁶⁾ para determinar el número de Ca⁺⁺ adsorbido sobre la membrana eritrocitaria.

* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

En el modelo más simple que permite describir la interacción de anticuerpos con antígenos presentes en la membrana eritrocitaria, es necesario considerar las siguientes hipótesis:

- la adsorción se realiza solamente en sitios antigénicos específicos sobre la superficie de la membrana,
- todos estos sitios antigénicos están ocupados para la concentración de saturación,
- a cada sitio antigénico puede ligarse un único anticuerpo,
- la superficie eritrocitaria es energéticamente homogénea para el anticuerpo, y no hay interacción entre los anticuerpos vecinos ligados,
- no hay movimiento de los anticuerpos ligados sobre la superficie de la membrana.

La forma estadística de la isoterma de adsorción de Langmuir puede ser usada para describir la unión de un anticuerpo (Ab) a un antígeno (Ag) sobre la superficie de la membrana eritrocitaria:

$$\langle n \rangle = m_r \frac{K_a m_l}{1 + K_a m_l} \quad (1)$$

donde $\langle n \rangle$ es el número promedio de sitios ligados, K_a es la constante de afinidad a la unión, m_r es la densidad de receptores (sitios antigénicos por célula), y m_l es la concentración de ligandos (anticuerpos).

Esta ecuación puede representarse como sigue:

$$\frac{1}{\langle n \rangle} = \frac{1}{m_r} + \frac{1}{K_a m_r} \frac{1}{m_l} \quad (2)$$

En consecuencia, para una adsorción simple de Langmuir, un gráfico de $1/\langle n \rangle$ versus $1/m$ da una línea recta con pendiente $1/K_a m_r$ y ordenada al origen $1/m_r$. Por lo tanto, la densidad de sitios GPA, m_r , puede obtenerse aproximando con este modelo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de sangre provenientes de dadores sanos, extraídas por venipuntura en recipientes estériles conteniendo EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron almacenadas a 4°C y analizadas dentro de las 24 horas de extraídas.

Las suspensiones de GR para las mediciones con el citómetro de flujo fueron preparadas de acuerdo con el protocolo recomendado por el "4th International Workshop on Monoclonal Antibodies against Human Red Blood Cells and Related Antigens" (adaptado de Wagner & Flegel)⁽⁷⁾. En forma resumida: 50 µL de una suspensión de GR en PBS al 2% fueron incubadas 30 minutos a 37°C con 50 µL de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal de ratón específico (mAb anti-GPA), provisto por el Dr. Blanchard (EFS Nantes, Francia). Se utiliza la técnica de inmunofluorescencia indirecta, donde el anticuerpo secundario es un anticuerpo monoclonal de cabra IgG conjugado específico para IgG de ratón fluoresceinado (SIGMA Chemical Co., F-414) incubándose a 20°C durante 30 min. Después de lavar dos veces en PBS, la suspensión

fue aspirada a través de una aguja 23-G para desarmar los posibles aglutinados.

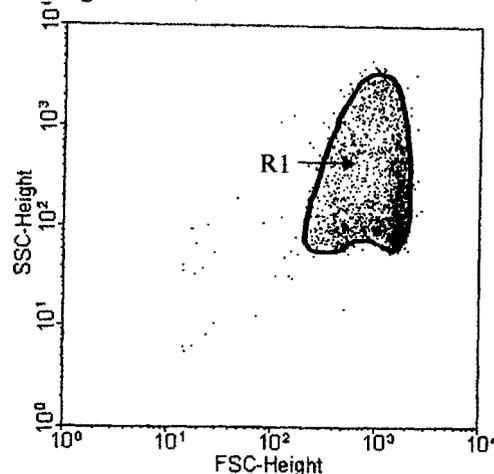


Figura 1: Dot plot de la intensidad de luz dispersada lateralmente (SSC) vs. la dispersada hacia adelante (FSC) para una muestra control, indicándose la región característica correspondiente a GR normales (R1).

Determinaciones con el Citómetro de flujo

Las determinaciones citofluorimétricas fueron realizadas en un FACScan (Becton Dickinson). En este instrumento, las células en suspensión monodispersa, son introducidas a gran velocidad (aproximadamente 1 m/s) en una vena líquida. Por focalización hidrodinámica, cada célula fluorescente (marcada intrínseca o extrínsecamente) desfila una a una delante de un sistema de fuentes luminosas y genera diferentes señales ópticas (reflexión, refracción, difracción, fluorescencia). Estas son seleccionadas con la ayuda de espejos y filtros apropiados antes de ser recogidas por los detectores (fotomultiplicador o fotodiodos) y luego digitalizadas. Después del registro, los programas informáticos restituyen los datos por combinación de los parámetros (granulosidad relativa, tamaño relativo e intensidad de fluorescencia relativa) en la forma de distribución mono (histograma) o bi-paramétrica (citograma).

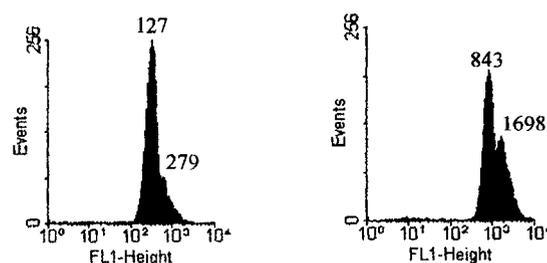


Figura 2: Histogramas de fluorescencia correspondientes a muestras tratadas con diferentes concentraciones de mAb.

Para cada muestra se registraron los datos correspondientes a 20,000 células (eventos) usando amplificación logarítmica. Para el análisis de los datos se utilizó el programa WinMDI versión 2.8 (Windows Multiple Document Interface, Flow Cytometry Application). Para la determinación cuantitativa del número de sitios antigénicos superficiales unidos al anticuerpo fluorescente⁽⁸⁾, se utilizó un kit de calibración (DAKO QIFIKIT®, cod. K0078).

Para calcular de acuerdo con la ecuación 2, la densidad de sitios GPA, se representó la inversa del número de sitios ligados en función de la inversa de las concentraciones de mAb anti-GPA.

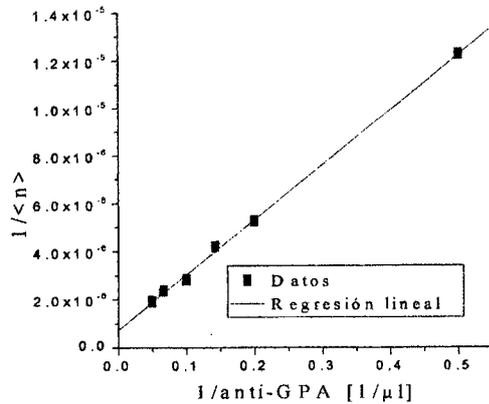


Figura 3: Inversa del número de sitios antigénicos ligados ($1/\langle n \rangle$) versus la inversa de la cantidad de anti-GPA, ajustada por una línea recta de acuerdo con la ecuación 2.

RESULTADOS

En la figura 1 se encuentra la representación en dot plot de la intensidad de luz dispersada lateralmente (side scattering: SSC) vs. la dispersada hacia adelante (forward scatter: FSC) para una muestra control, indicándose la región característica correspondiente a GR normales (R1).

La figura 2 presenta los histogramas de fluorescencia correspondientes a muestras tratadas con diferentes concentraciones de mAb. En las figuras los histogramas de fluorescencia tienen un pico principal bien definido con muy pequeña varianza, y un pico secundario en FL1, el cual aumenta con la concentración de mAb. La intensidad del pico secundario es prácticamente el doble de la del pico principal, por lo que podría ser producida por la presencia de dobletes en la R1, pero para afirmar esto, sería necesario un estudio estadístico más detallado. La presencia del pico secundario conduciría a una distribución asimétrica de FL1 para altas concentraciones de mAb. Tal distribución asimétrica fue observada por Bernemann *et al.*⁽³⁾ en la cuantificación de antígenos A de la membrana eritrocitaria por citometría de flujo. En nuestras determinaciones del número de sitios, hemos utilizado solamente los valores de FL1 correspondientes al pico principal, para asegurarnos que corresponden a células individuales.

La figura 3 muestra la gráfica de $1/\langle n \rangle$ versus $1/\text{cantidad de anti-GPA}$, la cual es ajustada por una línea recta de acuerdo con la ecuación 2. En la Tabla 1 se encuentran los valores de densidad antigénica obtenidos para 8 muestras normales analizadas. Los factores de regresión mostrados en la tabla 1 indican que el ajuste lineal es satisfactorio. Los resultados coinciden con los

hallados en la bibliografía, y van desde 300.000 a 1.300.000 sitios por célula, siendo los errores de cada determinación, inferiores al 15%.

TABLA 1: PARÁMETROS OBTENIDOS

Muestra	$m_r \times 10^5$	R
1	5.58 ± 0.79	0.99693
2	4.49 ± 0.15	0.98224
3	6.35 ± 0.78	0.99343
4	12.60 ± 1.5	0.99581
5	6.88 ± 0.70	0.98181
6	3.60 ± 1.45	0.97090
7	3.38 ± 0.21	0.99966
8	3.13 ± 0.40	0.99480

V. CONCLUSIONES

La unión de los anticuerpos monoclonales anti-GPA a los sitios GPA sobre la membrana del GR puede ser descrita por el modelo de adsorción de Langmuir. Esto permite determinar el número de sitios GPA sobre la membrana del GR reconocidos por el anticuerpo utilizado.

Esta aproximación podría también ser aplicada en la cuantificación de otros sitios antigénicos sobre la membrana del GR, siempre y cuando se pueda considerar que un anticuerpo se une exactamente con un antígeno. La importancia de este método radica en la minimización del problema de la aglutinación eritrocitaria en células nativas, y presenta la ventaja, con respecto a los tradicionales, de que no requiere la separación entre los anticuerpos libres y los ligados, lo que lo hace más sencillo y rápido.

REFERENCIAS

- 1 - Shotton D.M. In "Electron Microscopy of Proteins". J. R. Harris, Ed., 205-330 (1983).
- 2 - Langlois R, Bigbee W and Jensen R. *J. Immunology*, **134**, 4009-4017 (1985).
- 3 - Berneman ZN, van Bockstaele DR, Uyttenbroeck WM, Van Zaelen C, Cole-Dergent J, Muylle L, and Peetermans ME. *Vox Sang.*, **61**, 265-274 (1991).
- 4 - Wagner F, Flegel WA. *Infusion therapy and transfusion Medicine*, **25**, 342-346 (1998).
- 5 - Dignant-George F and Sampol J. *Revue Française de Laboratoire*, **287**, 83-86 (1996).
- 6 - Stoltz JF, Streiff F, Larcan A, Niclause M. *J. Chimie Physique*, **10**, 1555-1556 (1971).
- 7 - Wagner F and Flegel W. In "Aspects of the Flow-cytometric analysis of red Blood Cells". Gutensohn K., Sonnenborn H. and Kuehnl P. Ed., Clin. Lab. Pub., Heidelberg, 95-103 (1997).
- 8 - Latger-Carnard V, Regnault V, Dumas D, Virion JM, Schooneman JF, Stoltz JF, Lecompte T. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **58**, 337-343 (2000).