



Análisis de la energía de adhesión intercambiada en la unión CD44-hialuronato.

D'Arrigo, Mabel
Riquelme, Bibiana
Valverde, Juana
Foresto, Patricia

Recibido: Febrero 2009 – Aceptado: Abril 2009

Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario
Grupo de Óptica Aplicada, Instituto de Física Rosario
(CONICET-UNR),
Suipacha 531- Rosario 2000- Argentina

E-mail: darrigomabel@yahoo.com.ar

Correspondencia a la autora:

Dra. Mabel D'Arrigo:

Mendoza 3510 Piso 6º \ 2000 Rosario \ Argentina.

Tel -fax: +54 - 341 - 5688212

El CD44, glicoproteína de membrana involucrada en la adhesión celular, es similar al receptor de hialuronato con respecto a su peso molecular, punto isoeléctrico, presencia de grupos fosfatos, distribución tisular y asociación con filamentos de actina.

La conexión entre el receptor de hialuronato y CD44 fue inicialmente sugerido por los estudios de Goldstein et al ^[11,12, 13] y Stamenkovic et al ^[14]. Estos trabajos reportaron que el dominio extracelular del CD44 es homólogo a la región que une hialuronato de la proteína unida el cartílago. Este encuentro sugiere que el CD44 es capaz de unir hialuronato, y así semejarse fuertemente al receptor.

El hialuronato está altamente distribuido en la matrix extracelular y ha sido implicado en muchos fenómenos biológicos, incluyendo adhesión célula-célula, migración celular, desarrollo embrionario y patogénesis.

Muchas investigaciones han sido realizadas para dilucidar las interacciones de células sanguíneas-células vasculares y han estado enfocadas sobre reacciones entre plaquetas-pared vascular y más recientemente sobre interacciones leucocitos-célula endotelial. Mayores desarrollos han sido posibles luego de la identificación de las bases moleculares de estos procesos, los receptores glicoproteicos de las plaquetas y las selectinas e integrinas leucocitarias.

Desde la descripción de una anormal interacción de eritrocitos con el endotelio en ciertas patologías como anemia, diabetes mellitus, hipertensión, vasculopatías y malaria, las bases moleculares de la anormal adhesión de eritrocitos a las células endoteliales ha sido bien estudiados en estos últimos años. Diferentes propuestas han sido usadas para determinar interacciones eritrocitos-endotelio. La interacción entre superficies celulares es un importante fenómeno en la microcirculación ^[16, 17], la formación de "rouleaux" causa detención del flujo; la agregación de plaquetas es la responsable de la trombosis y la interacción de eritrocitos y leucocitos con el endotelio vascular tiene influencias importantes sobre el flujo circulatorio en la salud y en la enfermedad.

Como en todo proceso de interacción celular, la adhesión eritrocito - hialuronato se produce con intercambio energético. Es por ello que resulta importante poder determinar la energía intercambiada en la reacción, puesto que este valor suministra una estimación de la potencia de la misma.

El objetivo de este trabajo fue medir la energía específica (γd) del receptor de hialuronato eritrocitario (CD44) a su ligando bajo condiciones de flujo. El presente trabajo trata de comprender más claramente la relación entre el CD44 y su ligando hialuronato.

Introducción

El receptor de hialuronato, una glicoproteína de 85 kD, es el responsable de la adhesión de células a hialuronato y condroitin sulfato en la matrix extracelular. Este receptor está presente sobre una variedad de células incluyendo macrófagos, células epiteliales y algunas neuronas. En el caso del epitelio, está preferentemente expresado sobre células en proliferación. El receptor de hialuronato parece estar asociado con filamentos de actina, una característica que debe permitir medir señales transmembranales entre la matrix extracelular y el citoesqueleto ^[1, 2, 3, 4, 5, 6].

Esta glicoproteína ha sido estudiada por diferentes autores en distintos trabajos, ha sido referida como Pgp-1, Ly-24, ECMMRIII, gp90 y H-CAM. Estudios posteriores han relacionado que esta proteína está fuertemente relacionada o es idéntica a otra, y representa el CD44, uno de los "cluster" de diferenciación antigénicos en leucocitos y eritrocitos. La proteína CD44 media la interacción entre leucocitos y células endoteliales altas durante el *homing* de linfocitos ^[7,8,9,10].

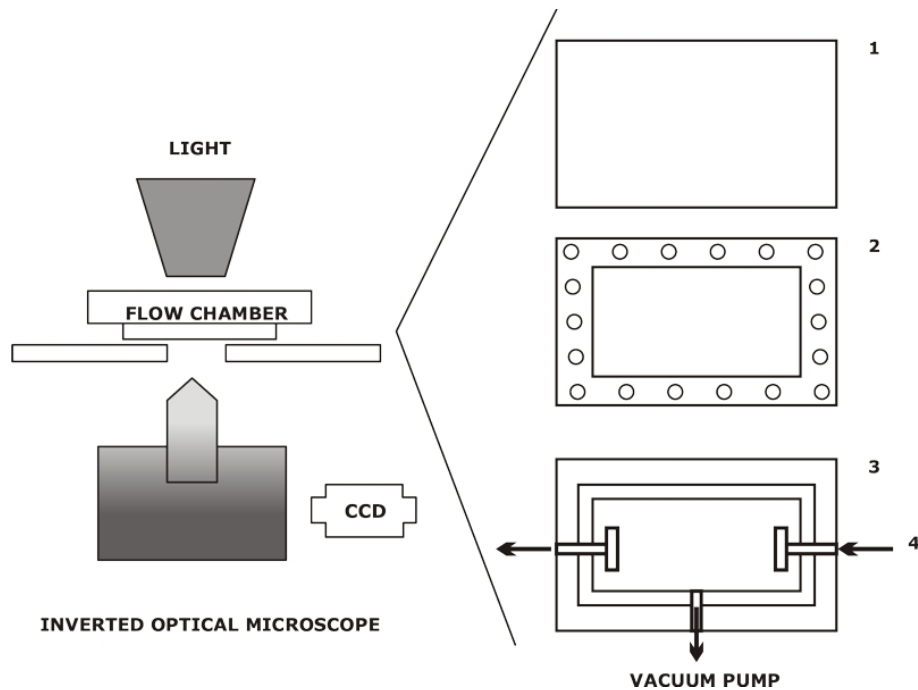
Materiales y Métodos

- **Medio de suspensión:** (PBS-HSA): PBS (pH 7.4, 295±5 mOsm/Kg) con 0.25% de albúmina bovina (HSA).
- **Solución de Hialuronato:** (Hyaluronic acid sodium salt from human umbilical cord H1876 Lot 77H0544 Sigma) fue diluido al 2% (p/v) en PBS. Esta solución fue usada.
- **Glóbulos rojos:** Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción de 15 dadores sanos y anticoaguladas con EDTA Na₂. Cada muestra fue centrifugada a 300 g durante 10 minutos. Luego el plasma fue separado. Los glóbulos rojos (RBC) fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) (pH 7.4, 295 mOsm/kg) y resuspendidos a una concentración de 0.07% (V/V) en el medio de suspensión

Las experiencias se llevaron a cabo utilizando una cámara de adhesión o cámara de flujo controlado diseñada y construida sobre la base de la cámara propuesta por Richardson.

Esta cámara está constituida por una lámina de hule de silicona de 0.25 mm de espesor, intercalada entre una base gruesa (12 mm) de acrílico transparente de 67 x 43 mm y un cubreobjeto de vidrio de las mismas dimensiones. En la lámina de hule se ha practicado un corte rectangular de 45 x 18 mm que constituye el canal de flujo. En la base de acrílico se han practicado, en los extremos del canal de flujo, dos aberturas rectangulares verticales de 3 x 16 mm, por una de las cuales ingresa el flujo líquido que egresa por la opuesta. La base de acrílico presenta una hendidura perimetral conectada exteriormente a una bomba, la que produce el vacío entre la base, el hule y el cubreobjetos, de manera que sella herméticamente el canal de flujo.

La cámara así montada se coloca, con el cubreobjetos hacia abajo, en la platina de un microscopio óptico invertido. En el tubo ocular del microscopio se ha adaptado una pequeña cámara CCD conectada a un Procesador Digital de Imágenes (PDI). El PDI constituido por la cámara, un "frame grabber" y el monitor de alta resolución, está conectado "on line" a una PC en la cual se ejecuta el procesamiento de las imágenes digitalizadas por medio del programa IPPLUS (Image Pro Plus).

**Figura 1:**

Dibujo esquemático de la Cámara de flujo, donde:

1. Vidrio de cubierta
2. Film de teflón
3. Base de acrílico
4. Bomba de infusión
5. **CCD** dispositivo conectado a procesador de imagen digital (IPPLUS System).

Se trabajó con muestras de sangre de dadores normales y anticoaguladas con EDTA. Luego de la centrifugación, los eritrocitos fueron lavados tres veces con PBS. Los glóbulos rojos (GR) fueron resuspendidos en PBS al 2% e incubados con hialuronato 30 minutos.

Las suspensiones de GR y hialuronato fueron introducidas en el canal de flujo y dejadas en reposo 10 minutos. Con una bomba de infusión se aumentó la velocidad de flujo desde 50 ml/minuto hasta 450 ml/hora. Con el digitalizador se tomaron imágenes a medida que se aumentaba la velocidad del flujo. Las imágenes se pueden diagramar como se muestra en la figura 2, donde es postulado el concepto de rotación de la membrana eritrocitaria y posterior rotura de los puentes formados con el hialuronato.

El shear stress de la pared actúa sobre la tensión (τ) aplicada sobre la superficie superior de las células adheridas. El τ fue calculado considerando el espesor (h), el ancho (a) de la cámara de flujo, el caudal (Q) y la viscosidad del medio de suspensión (η_0) de la siguiente manera:

$$\tau = \frac{6 \cdot Q \cdot \eta_0}{h^2 \cdot a} \quad (1)$$

Las medidas de los valores obtenidos fueron expresados como la media la media \pm desvío estándar (DS). El número de mediciones experimental fue $n = 15$.

Análisis Teóricos

Skalak *et al.* [5] propone una ecuación diferencial de conservación de energía, la cual ha sido aplicada a nuestros estudios con la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial W}{\partial t} = -\gamma \cdot \frac{\partial A}{\partial t} \quad (2)$$

Donde γ es la energía específica de adhesión (por unidad de área) y A es el área adherida por la membrana celular. En este trabajo, la energía específica de adhesión es la energía requerida para separar el área adherida de la membrana del eritrocito y la superficie sólida cubierta con las moléculas de hialuronato.

La energía específica requerida γ para despegar la superficie celular adherida al piso del canal puede ser obtenida a partir del cálculo del trabajo ($\langle W \rangle$) realizado por shear stress de la pared celular:

$$\gamma = \frac{\langle W \rangle}{A_i}$$

donde A_i es el área celular despegada.

El trabajo fue medido por el producto de las fuerzas actuantes sobre la superficie celular adherida y la distancia de desplazamiento de la célula desde su posición inicial [6]. El trabajo total fue estimado integrando el área bajo la curva de fuerza aplicada (F) versus la distancia de desplazamiento (D_i). Se podría asumir que hay una relación lineal entre la fuerza y la distancia (para el 50% de separación). A partir de la integral se puede despejar el producto $F \cdot D_i$ y en consecuencia los resultados experimentales:

$$\gamma = \frac{F \cdot D_i}{2 \cdot A_i}$$

donde D_i es la longitud del desplazamiento de la célula.

Considerando que $F = \tau \cdot A_0$, donde A_0 es el área de la superficie superior de la célula en la cual el shear stress es aplicado, resulta:

$$\gamma = \frac{\tau \cdot A_0 \cdot D_i}{2 \cdot A_i} = \frac{\tau \cdot D_i}{2 \cdot \Phi} \quad (3)$$

donde Φ es definido como A_i/A_0 y representa la fracción de la superficie celular despegada.

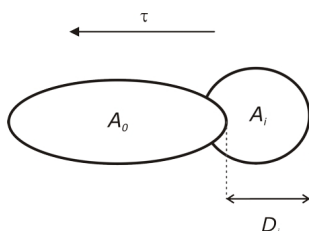


Figura 2: Representación esquemática de los RBC desplazados en la dirección del flujo, donde D_i es la longitud de desplazamiento de la célula, A_0 representa el área de la superficie celular sobre la cual se ejerce el shear stress y A_i es el área de la superficie celular despegada

El grado de separación de la célula adherida en respuesta a la velocidad de flujo fue correlacionada con la energía específica requerida para su separación. La Figura 2 muestra el desplazamiento de los RBC en la dirección al flujo.

Resultados

Las experiencias fueron realizadas sobre 15 muestras de glóbulos rojos. El shear stress fue calculado a partir de las dimensiones del microcanal y el caudal indicado por la bomba de infusión. El piso de canal fue explorado microscópicamente mientras la suspensión estaba en el estado estacionario. En cada experiencia, fue seleccionado un campo para ser observado, registrado y analizado.

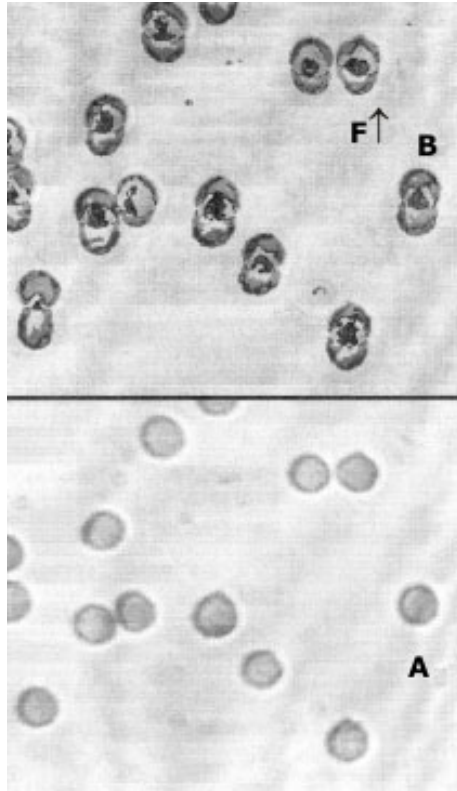


Figura 3:

Registro de imágenes digitalizadas correspondientes a la adhesión de RBC a hialuronato.

A: Imagen a $Q = 0 \text{ mm}^3/\text{min}$.

B: Superposición de la imagen A con la imagen correspondiente a $Q = 400 \text{ mm}^3/\text{min}$ mostrando que los RBC se desplazan en dirección al flujo (τ).

Tabla 1

Energía específica de desagregación (γ) por la interacción del hialuronato-CD44.

Q: velocidad de flujo

γ : energía específica de adhesión (por unidad de área)

$\phi = A_i/A_0$: fracción de la superficie celular despegada

D_i: longitud de desplazamiento de la célula

A₀: área proyectada de la superficie celular sobre la cual actúa el shear stress

A_i: área celular despegada

La figura 3 muestra el registro de las imágenes digitalizadas correspondientes a la adhesión de los glóbulos rojos al hialuronato.

Al principio del proceso de separación, uno podría asumir que los puentes moleculares están homogéneamente distribuidos sobre el área contacto de la membrana adherida. Esta condición puede ser aceptada hasta que el contacto del área se acerca al 50 % del valor original. Después de la aplicación del shear stress, la célula adherida fue separada de la superficie sólida cubierta por hialuronato. Los resultados se muestran en la Tabla I.

*Mean \pm SD

Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	A ₀ * (μm^2)	A _i * (μm^2)	D _i * (μm)	$\Phi^* = A_i/A_0$	τ (10^{-3} Pa)	γ^* ($10^{-9} \text{ J}/\text{m}^2$)
0	51.3 \pm 1.3	0	0	0	0	0
30	52.6 \pm 1.3	23.7 \pm 0.7	2.7 \pm 0.9	0.45 \pm 0.02	2.93	9 \pm 3
60	51.4 \pm 1.3	23.6 \pm 0.8	2.9 \pm 0.8	0.46 \pm 0.03	5.87	18 \pm 6
100	51.9 \pm 1.3	24.4 \pm 0.9	3.0 \pm 0.5	0.47 \pm 0.03	9.78	31 \pm 7
150	48.7 \pm 1.0	23.7 \pm 1.5	3.1 \pm 0.5	0.49 \pm 0.04	14.67	46 \pm 12
200	51.8 \pm 1.3	31.7 \pm 1.7	3.4 \pm 1.1	0.61 \pm 0.05	19.56	55 \pm 22
400	52.2 \pm 1.9	37.5 \pm 0.6	5.3 \pm 0.9	0.72 \pm 0.04	39.11	145 \pm 27
800	51.0 \pm 2.0	38.6 \pm 1.2	5.2 \pm 0.5	0.76 \pm 0.05	78.22	271 \pm 43

Estimando las fuerzas aplicadas por el fluido externo y el trabajo gastado en la separación de las células de la superficie sólida, los valores de energía de adherencia específica (γ) han sido calculados y se muestran en la figura 4 como una función del ϕ .

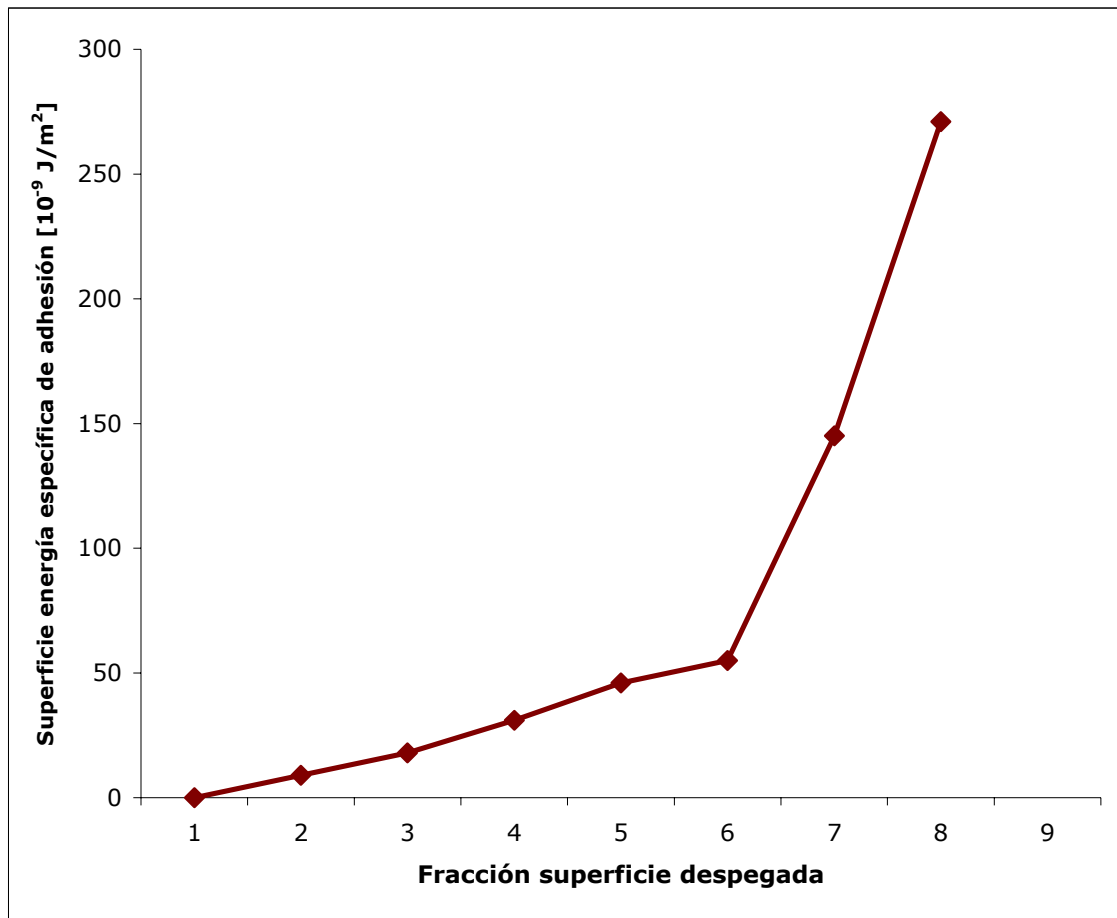


Figura 4:

La superficie de energía específica de adhesión γ como función de la fracción de la superficie despegada

$$\Phi = \frac{A_i}{A_o}$$

Discusión

Las experiencias realizadas con la cámara de flujo fueron aplicadas a la fuerza de adhesión de adherencia intercelular ^[19]. Los datos mostrados en la tabla 1, similares al gráfico encontrado en la referencia ^[15], confirman la teoría que la energía de adhesión no es constante y que hay alguna redistribución de las uniones a medida que el proceso de separación celular progresa.

La energía específica incrementa a medida que las células se separan. Estos experimentos mostraron que la fuerza adhesiva fue mantenida incluso cuando se redujo el área de contacto a un mínimo. De lo cual surge que la energía de adhesión aparece aumentar con la disminución del área de contacto. Estos resultados implican algún cambio de uniones moleculares, produciendo una concentración aumentada de puentes de unión en el área restante de adherencia. Los estudios de Skalak han confirmado este fenómeno ^[15], conduciendo a la conclusión que el valor de energía máximo es producido cuando hay una separación total de célula.

La γ aumenta a medida que la célula es separada, de lo que se deduce, que el máximo valor de γ resulta en el momento de la ruptura total. Esto parecería indicar que durante el proceso de separación se establece un constante estado de equilibrio pues se van formando tantos anclajes nuevos como los que se destruyen.

La separación mecánica de membranas celulares mutuamente adheridas, se produce en forma similar a la extracción de cintas adhesivas (*peeling*). Aparentemente algunos anclajes se van desplazando para concentrarse en la zona de adhesión, lo que conduciría a que la γ aumenta en la medida que se reduce el área adherida, siendo máxima en el momento en que esta última tiende a cero.

Las γ calculadas están dentro de los valores determinados para otros tipos de adhesión celular (aglutinación por lectinas y por anticuerpos específicos). Esto parece indicar que el método de determinación por análisis de imágenes digitalizadas obtenidos en la cámara de flujo es muy aceptable y puede ser aplicado en otros tipos de interacción celular. Al lograr establecer la variación de área específica adherida y aplicarla a la ecuación de conservación de la energía, se pudo estimar la energía específica de adhesión γ , lo cual puede ofrecer una significativa ayuda en la comprensión de numerosos fenómenos fisiológicos y patológicos.

La γ aumenta a medida que la célula es separada, de donde se deduce, que el máximo valor debe producirse en el momento de la ruptura total. Esto parecería indicar que, durante el proceso de separación, se establece un constante estado de equilibrio pues se van formando tantos anclajes nuevos como los que se destruyen.

Conclusión

La metodología propuesta es simple, rápida, reproducible y una herramienta no convencional para estimar la energía específica de adhesión. Las energías específicas de adhesión calculadas resultaron (tabla 1] dentro del rango de valores (0.6×10^{-7} J/m² con una densidad de superficie de lectinas de 350 moléculas/ μm^2) determinada por otros tipos de adhesiones celulares (aglutinación por lectinas y por anticuerpos) Este trabajo indica que este método usado para determinar energía de adhesión específica por análisis de imágenes digitalizadas en cámara de flujo es conveniente para ser utilizado en otros tipos de adhesiones intercelulares. Diversos estudios han demostrado que la adhesión celular está involucrada en desordenes cardiovasculares ^[18]. El método propuesto puede contribuir a la comprensión de diversos fenómenos fisiológicos o patológicos como vasculopatías como diabetes e hipertensión.

Bibliografía

- [1] Evans E., Berk D., Leung A. and Mohandas N. Detachment of agglutinins bonded red blood cells. II. Mechanical energies to separate large contact cells. *Biophys. J* 1991, vol 59, p 849-860.
- [2] Frangos J. A., Eskin S. G., McIntire L. V. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 1981, vol 227, p 1477.
- [3] Patrick Ch, Rangarajan S., McIntire L.V. (Ch 110). Fluid shear stress effects on cellular function. *in The Biomedical Engineering Handbook* (Bronzino J.D. Ed.) CRC Press and IEEE Press 1995, p 1636-1655.
- [4] Skalak R., Impelluso T. Schmalzer E. A. and Chien S. Theoretical modeling of filtration of blood cell suspensions. *Biorheology* 1983, vol20, p 41-56.
- [5] Arruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C.B., and Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990, vol 61, p1303-1313.
- [6] Sun L. A., Kabat E. A. and Chien S. Interaction of lectins with membrane receptors on erythrocyte surfaces. *J. of Cell Biol.* 1985, vol 101, p 646-651.
- [7] Lacy B. E. and Underhill C.B. The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J. Cell Biol.* 1987, vol 105, p 1395-1404.
- [8] Martine Culty, Kensuke Miyake, and Charles Underhill. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *The Journal of Cell Biology* 1990, vol. 111 N°6 Pt1, p 2765-2774.
- [9] Kensuke Miyake, Underhill B. Lesley J. and Kincade P. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in Hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 1990, vol 172, p 069-075.
- [10] Ghosh P. The role of hyaluronic acid. *Clin. Exp. Rheumatol* 1994, vol 12:1, p75-82.
- [11] Chappey O., Wautier M. P., and J.L. Wautier Adhesion of erythrocytes to endothelium in pathological situations a review article *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 1994, vol 36, p 281-288.
- [12] Cartron J. P., Vers une approche moléculaire de la structure du polymorphisme et de la fonction des groupes sanguins. *TCB*, 1996, vol 3, p 181-210.
- [13] Goldstein L. A., Zhou L., Picker C., Mintyr and Butcher E. A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell.* 1989, Vol 56, p 1063-1072.
- [14] Stamenkovic y. M., Amiot J. M. and Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 1989, vol 56, p 1059-1062.
- [15] Skalak R. and Zhu Ch. Rheological aspects of red cell aggregation. *Biorheology* 1990 vol 27, p 309-324.
- [16] Xia Z., Goldsmith HL., Van de Ven TGM. Kinetic of specific and non specific adhesion of red blood cells on glass. *Biophys J.* 1993, vol 65, p 1073-1083.
- [17] Lavalley P., Stoltz J., Senger B., Voegel JC. Red blood cell adhesion on a solid-liquid interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997.
- [18] Smith B.D., Thomas J.L. Abnormal erythrocyte endothelial adherence in ischemic heart disease. *Clinical hemorheology* 1990, vol. 10, p 241-253.
- [19] L. Plá, R. J. Rasia, J. Valverde. S. Muller, J.F. Stoltz. Evaluation of the energy of red blood cell agglutination by monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000, vol 277, p 381-385.