

# MÉTODO OPTOMECÁNICO PARA EL ANÁLISIS ENERGÉTICO DE LA HEMAGLUTINACIÓN INMUNOLÓGICA

**R. J. Rasía,**

*Instituto de Física de Rosario (CONICET), Universidad Nacional de Rosario,  
Boulevard 27 de Febrero 210 bis (2000) Rosario.*

**J. Valverde de Rasía y**

*Laboratorio de Inmunoematología y Hemorreología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas,  
Universidad Nacional de Rosario, Boulevard 27 de Febrero 210 bis (2000) Rosario.*

**J. F. Stoltz**

*Lab. Hemorreologie, Fac. Medecine, Univ. Nancy I, Francia.*

El fenómeno de la hemaglutinación es el resultado de la reacción antígeno/anticuerpo "in vitro". Se produce cuando los eritrocitos portadores de un antígeno (Ag) determinado son puestos en contacto con el anticuerpo (Ac) específico correspondiente al Ag, que actúa como un puente de enlace entre los eritrocitos, que de esa forma se aglutinan. La reacción es reversible y las células aglutinadas pueden ser parcial o totalmente disociadas si se suministra la energía necesaria. La retrodifusión láser es una herramienta muy sensible que ha sido exitosamente utilizada para analizar la agregación eritrocitaria. En este trabajo se propone la aplicación de la retrodifusión láser en un viscosímetro rotacional al estudio de la hemaglutinación inmunológica en el grupo A del sistema ABO. Las mediciones de la resistencia física de los enlaces entre células aglutinadas y la cinética de disociación se realizaron utilizando la retrodifusión láser. La disociación fue llevada a cabo por aplicación de una tensión de corte en un viscosímetro Couette transparente. Se obtiene una curva de intensidad retrodifundida, que se ajusta por una función exponencial del tipo:  $r'(t) = r(1 - \exp(-t.m))$ , donde  $r'(t)$  es el valor de intensidad instantáneo,  $r$  el correspondiente a la disociación total y  $m$  es el parámetro característico de la función. El valor de  $m$  aparece correlativo de la concentración del reactivo y por lo tanto de la potencia de la reacción.

Immunologic hemagglutination results from the "in vitro" antigen/antibody reaction, produced when erythrocytes carrying specific antigenic sites react against the corresponding antibody (Ab) contained in the suspending medium. Two red cells become agglutinated when an Ab links them. This is a reversible reaction and the agglutinates can be partially or fully dissociated if an adequate amount of energy is applied. Laser backscattering is an interesting tool which has been successfully applied to study erythrocyte aggregation. The application of the laser backscattering method to the kinetic analysis of mechanical dissociation of the red cell agglutinates, carried out in a transparent Couette viscometer is proposed in this paper. Red cell agglutinates were dissociated by applying a constant shear stress to the agglutinate suspension. Laser backscattering lets to follow the dissociation process. Dissociation curves were obtained and adjusted by an exponential function of the type:  $r'(t) = r(1 - \exp(-t.m))$ , where  $r'(t)$  and  $r$  are backscattered intensities taken at time  $t$  and at the end of the process respectively, and  $m$  is the parameter characterizing the function. The strength of the reaction depends on the Ab concentration which appears correlative of  $m$ .

## I. INTRODUCCIÓN

Los glóbulos son partículas que, en suspensión, colisionan entre ellos por movimiento browniano y se adhieren mutuamente para formar agregados de diferentes tamaños<sup>1</sup>, proceso reversible, pues basta una pequeña tensión de cisallamiento para producir la desagregación. Dos factores fundamentales intervienen en la agregación<sup>2</sup>:

- 1) las fuerzas de atracción intermolecular de Van der Waals y
- 2) la doble capa eléctrica que rodea los glóbulos y que se opone a la agregación por la repulsión electrostática.

Mills y Aufrere<sup>3</sup> y Mills y Snabre<sup>4</sup> analizaron teóricamente el fenómeno de la retrodifusión láser

por glóbulos en suspensión y propusieron un instrumento denominado Eritroagregámetro<sup>5</sup>, que aplica este fenómeno óptico al análisis del proceso de agregación. La intensidad retroreflejada es proporcional al número y tamaño de las partículas en suspensión. El Eritroagregámetro consta de un viscosímetro rotacional tipo Couette, de cilindros coaxiales. El cilindro interior es fijo, opaco y termostatizado. El cilindro exterior es de acrílico transparente y gira alrededor de su eje con velocidad controlada. Con la viscosidad del suero, a la máxima velocidad de rotación el gradiente de deformación genera una tensión de corte capaz de disociar completamente los aglutinados eritrocitos.

La hemaglutinación inmunológica es un fenómeno biofísico similar a la agregación. Los eritrocitos llevan sobre su membrana un número variable de antígenos específicos que pueden fijar los anticuerpos correspondientes (inmunoglobulinas) contenidos en el medio de suspensión. Las moléculas de inmunoglobulinas pueden fijarse simultáneamente a dos células adyacentes uniéndolas. La fijación de un anticuerpo (Ac) sobre un sitio antigénico (Ag) es una reacción que libera una pequeña cantidad de energía disipada en forma de calor. La intensidad de la reacción inmunológica se mide por el tamaño de los aglutinados y depende del número de sitios antigénicos existente sobre la membrana celular y de la concentración de anticuerpos presentes en el medio. La densidad de antígenos sobre la membrana eritrocitaria es el parámetro que define los subgrupos dentro de un grupo.

#### Constante de asociación del sistema Ag-Ac.

La combinación entre el sitio antigénico (Ag) y el sitio Anticuerpo (Ac) es una reacción bimo-lecular reversible que puede escribirse<sup>6</sup>:  $Ag + Ac \rightleftharpoons AgAc$ , donde  $AgAc$  es el inmunocomplejo. Si se denomina  $\Psi$  la constante de velocidad de asociación y  $\Psi'$  la constante de velocidad de disociación del complejo Ag-Ac, en equilibrio

$$K(\text{constante de asociación}) = \frac{(AgAc)}{(Ag)(Ac)} = \frac{\Psi}{\Psi'} \quad (1)$$

donde K mide la estabilidad del complejo Ag-Ac o afinidad intrínseca del Ag por el Ac.

La aglutinación eritrocitaria inmunológica se produce con liberación de una cantidad de energía. El enlace Ac-Ag puede disociarse si se suministra la energía equivalente a la liberada durante la reacción. La energía total liberada por la reacción se

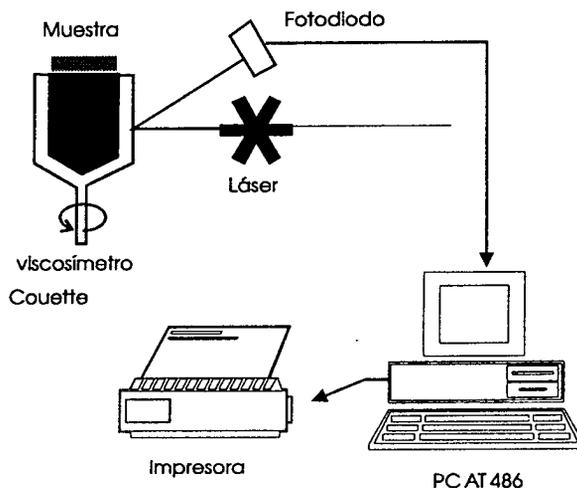


Fig. 1: Esquema del eritroagregámetro.

calcula por el producto del número enlaces (Ag-Ac) por la energía correspondiente a un enlace, pero se estima por el área superficial aglutinada de los hematíes y es proporcional al número de haptenos fijados a la membrana,

$$W = W_i \cdot N_i \quad (2)$$

donde  $W_i$  es la energía correspondiente a la fijación de un sitio antigénico, y  $N_i$  es el número de sitios antigénicos fijados sobre la membrana. La energía de disociación mecánica es la suma de la energía electrostática de repulsión del potencial  $\zeta$  de las células y del trabajo mecánico de las tensiones de corte aplicadas a la disociación.

Existen varios factores que describen el fenómeno de hemaglutinación inmunológica: (i) *La energía liberada*, estimada por la magnitud de las fuerzas hidrodinámicas requeridas para disociar totalmente los eritrocitos aglutinados, (ii) *La cinética de aglutinación*, caracterizada por el tiempo requerido para alcanzar el estado de equilibrio, y (iii) *La reacción de aglutinación*, caracterizada por el número de células incorporadas en cada aglutinado o por la relación entre el área aglutinada  $\sigma_A$  por unidad de volumen en el estado aglutinado y el área celular  $\sigma_0$  por unidad de volumen en el estado dispersado:  $\sigma_A/\sigma_0$ . Este cociente es función de la energía de fijación de la inmunoglobulina, de la concentración de anticuerpos en el medio y de la densidad de sitios antigénicos sobre cada célula.

El modelo de Mills y colaboradores<sup>3,4</sup>, supone que un haz láser que incide normalmente sobre la superficie de la lámina de superposición globular, contenida en el viscosímetro Couette, es atenuado por absorción y dispersión sobre las células. Este

proceso es gobernado por tres factores esenciales: la orientación de los glóbulos rojos con respecto a la dirección de incidencia del haz, la deformación de los glóbulos rojos y el estado de aglutinación de las células. La retroreflexión difusa  $r^*$  correspondiente a un haz de luz colimado que incide normalmente a la superficie de la suspensión es:

$$r^* = \exp(-k' \frac{\mu}{f}) \frac{r_\infty}{1 + k' + k'(\frac{\mu}{f} - r_\infty)} \quad (3)$$

donde  $r_\infty$  es la reflectancia difusa de una suspensión isotrópicamente iluminada,  $k'$  es un factor que define el espesor del trayecto de luz isotrópica,  $\mu$  es el coeficiente de absorción y  $f$  es el coeficiente de difusión lineal que se calcula con el camino libre de la luz ( $\lambda$ ), el parámetro de anisotropía  $g$ , el número de partículas por unidad de volumen ( $N_0$ ) y la fracción isotrópica de la superficie celular específica  $\sigma_i$

$$f = \frac{1-g}{2\lambda} = \frac{1-g}{4} \sigma_A \quad ; \quad \sigma_A = N_0 \sigma_i \quad (4)$$

Considerando las superficies de las áreas aglutinadas ( $\sigma_A$ ), de los glóbulos aislados ( $\sigma_0$ ), de los glóbulos aislados no orientados ( $\sigma$ ) y de los "aglutinados" ( $\sigma'$ ) y, las reflectancias difusas de los glóbulos aislados no orientados ( $r$ ) y de los "aglutinados" ( $r'$ ), se puede escribir:

$$\frac{\langle \sigma_A \rangle}{\langle \sigma_0 \rangle} = 1 - \frac{\langle \sigma' \rangle}{\langle \sigma \rangle} \equiv 1 - \frac{r'}{r} = G \quad (5)$$

$G$  es un índice de aglutinación fácilmente utilizable. El registro fotométrico de la intensidad retrodifundida durante la disociación por corte, suministra la cinética de disociación de los aglutinados. Las curvas de intensidad retrodifundida muestran un patrón típico

$$r'(t) = r_0' [1 - e^{-t/m}] \quad (6)$$

$r'(t)$  es el valor instantáneo de la intensidad relativa retrodifundida,  $r_0' = r'(t = \infty)$  corresponde a los eritrocitos monodispersos y  $m$  es el parámetro característico de la función. La regresión logarítmica genera una recta cuya pendiente es el valor medio de  $m$ . La inversa,  $\tau = 1/m$ , se define como *tiempo característico de la disociación* y está correlacionada con la potencia de la reacción. La integración de la

expresión (5) nos permite deducir que la energía de disociación  $W$  es:

$$W(t) = \kappa E_d(t) + \phi = \Psi \int_0^t G dt = \int_0^t \left(1 - \frac{r}{r'}\right) dt = \int_0^t \left(\frac{r-r'}{r}\right) dt$$

$\kappa$ ,  $\phi$  y  $\Psi$  son constantes de escala. Para cada proceso se puede estimar la energía relativa de disociación entre el comienzo ( $t = 0$ ) y el final del proceso ( $t = t_f$ ) haciendo (Fig. 2):

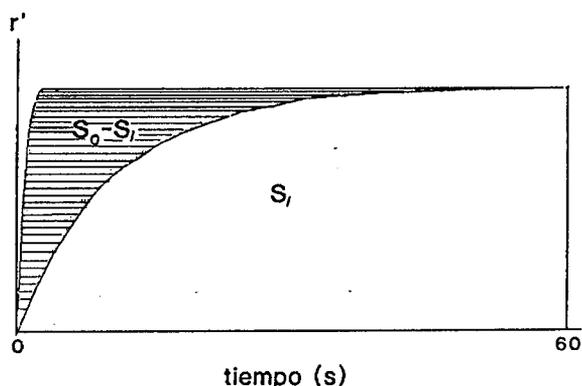


Fig. 2: Estimación de la energía relativa de disociación.

$$E_d = \frac{S_0 - S_i}{S_0} \quad ; \quad i = 0, 1, 2, \dots \quad (8)$$

donde  $S_0 = \int_0^{t_r} r(t) dt$  ;  $S_i = \int_0^{t_r} r_i'(t) dt$

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

Glóbulos rojos de diferentes grupos del sistema ABO ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_x B$  y  $A_m$ ) lavados y resuspendidos al 30.8 % de concentración en medio de suspensión, que fue preparado disolviendo albúmina humana en solución fisiológica, hasta alcanzar una viscosidad dinámica de 1.8 mPa.s, en el cual se dilufan los antisuecos en la denominada serie de dobles diluciones (1/2, 1/4, 1/8, 1/16...1/512). Se preparaba, además una suspensión control, con los mismos glóbulos rojos lavados, en medio albuminoso sin antisuecos. Al carecer de anticuerpos no se producía reacción de aglutinación.

El proceso de disociación de los aglutinados se realiza por cizalladura en el Eritroagregámetro.

Un volumen de suspensión de eritrocitos con la dilución adecuada de anticuerpos, homogeneizada, es introducida en el eritroagregámetro. Luego de 6 min. de reposo para completar la aglutinación se aplica la máxima velocidad de rotación durante 1 min., tiempo suficiente para disociar totalmente los aglutinados. Durante este período se registran y almacenan 6000 lecturas de retrodifusión y se traza en el monitor y se imprimen; la curva ( $r'$ ) vs. tiempo ( $t$ ) para los 6 primeros segundos de rotación y los resultados (Fig. 3). La intensidad de luz retrodifundida aumenta a la medida que los aglutinados se disocian. Un "soft" especialmente desarrollado co-

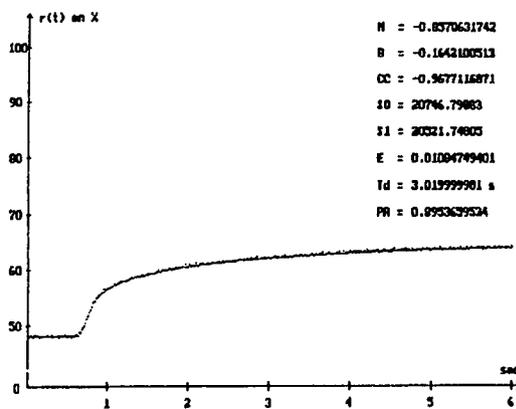


Fig. 3: Impresión de los resultados.

manda y controla el proceso. Los datos impresos son:  $m$  (inversa del tiempo característico de disociación),  $R$  (coeficiente de correlación del ajuste de la curva),  $T_d$  (tiempo de disociación correspondiente al 90 % de la disociación total),  $E_d$  (estimación de la energía de disociación) y  $PR$  (pendiente de la primera rama de la curva).

### III. RESULTADOS

En la Tabla I se presentan los resultados de estudios realizados sobre glóbulos rojos  $A_1$  provenientes de un mismo dador con diferentes diluciones de antisuero policlonal anti-A. El número de glóbulos rojos en cada muestra se estimó en  $3.7 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ . También se presentan los parámetros correspondientes al consumo de anticuerpos. Se deduce que la muestra ha consumido un equivalente a una dilución 1/9.68.

Dilución	$m$ [ $s^{-1}$ ]	$R$	$E_d$ [0/00]	$T_d$ [s]
1/4	0.209	0.957	175.7	44.23
1/8	0.307	0.897	133.0	24.91
1/16	0.421	0.924	43.0	5.93
1/32	0.979	0.952	19.3	1.84
1/64	2.571	0.938	12.4	0.45
1/128	3.275	0.802	3.4	0.37
Testigo	3.575	0.792	0.0	0.34
Consumo 1/8	2.383	0.904	13.3	0.44

Tabla I: Reacción de eritrocitos  $A_1$  / anti-A policlonal

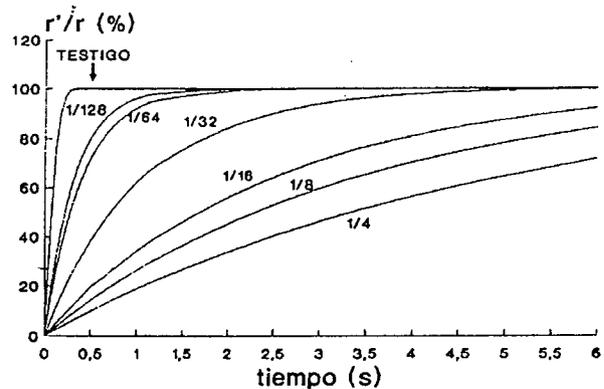


Fig. 4: Curvas de disociación experimental para glóbulos A frente a diluciones de anti-A

La Fig. 4 presenta las correspondientes curvas experimentales de disociación y la Fig. 5 muestra los diagramas de  $m$ ,  $E_d$  y  $T_d$ , en función del logaritmo de la dilución del antisuero, promediados sobre seis experiencias, notándose la correlación entre los valores de los parámetros diagramados y la dilución del antisuero.

Las curvas de  $m$  en función del logaritmo de la dilución presentaron un patrón hiperbólico (Fig. 5), por lo que se dedujo que su inversa ( $1/m$ ) podía ajustarse por la regresión lineal. Ésto se verificó y se aplicó en una serie de experimentos realizados con glóbulos  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_xB$  y  $A_m$  frente a la serie de doble diluciones de un suero policlonal anti-A (Fig. 6). Se comprobó que la pendiente y la altura de las rectas de regresión se correlacionan con la capacidad antigénica de los hematíes, es decir, cumplen una función similar a la constante de asociación  $K^6$ .

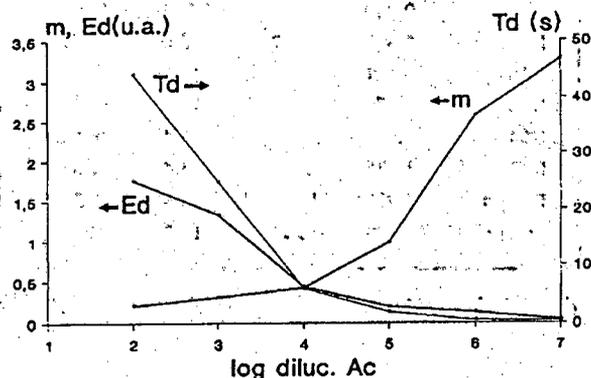


Fig. 5: Parámetros de disociación en función de la dilución del Ac.

#### IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en más de 400 experimentos, con el método propuesto, que aplica retrodifusión láser combinado con el proceso reomecánico de disociación de los aglutinados por tensiones de corte, avalan la efectividad del método. La dispersión de resultados es mínima (< 2 %) como lo es también el coeficiente de variación (< 1 %), determinado en pruebas ciegas realizadas por diferentes operadores. Ésto remarca la repetitividad y la objetividad del método, evidenciando una respuesta positiva a las expectativas creadas. Resultan significativas, por otra parte, las correlaciones entre los parámetros analizados y la constante de asociación, normalmente determinada por métodos termodinámicos. Es un método interesante para obtener una estimación de la energía de aglutinación y estudiar por esta vía la afinidad de los reactivos, como así también analizar la modificación de la capacidad antigénica celular y de la estructura de los anticuerpos por influencias oncogénicas.

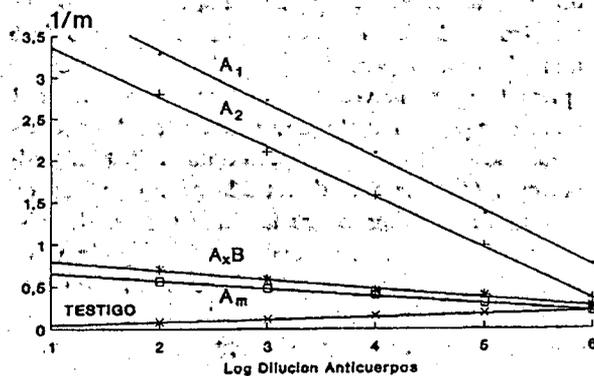


Fig. 6: Rectas de regresión de  $1/m$  en función del logaritmo de la dilución del Ac.

#### REFERENCIAS

1. Chien, S. *Aggregation of red blood cells: an electromechanical and colloid-chemical problem*. Adv. Chem. Ser.188, pp 3-38, (1990).
2. Pollack, W.; Hager, H. J.; Reckel, R.; Toren, D. A. and Singher, H. O. *A Study of the Forces Involved in the Second Stage of Hemagglutination*. Transfusion 5, (2), pp 158-183 (1965).
3. Mills, P. and Aufrère, J. *Diffusion multiple d'un faisceau lumineux par une suspension de particules. Application à l'étude de la suspension sanguine en Techniques Avancées en Hémostase*. DPIC-INPL Ed. (Nancy-France) pp 543-579 (1983).
4. Mills, P. and Snabre, P. *Agrégométrie optique de la suspension sanguine en Techniques Avancées en Hémostase*. DPIC-INPL Ed. (Nancy-France) pp 580-598 (1983).
5. Stoltz, J. F.; Paulus, F. et Donner, M. *Techniques d'approches de l'agrégation érythrocytaire en Hémostase et Agrégation Erythrocytaire*. E.M.I. Ed. pp 111-121 (1986).
6. Salmon, Ch.; Cartron, J. P. et Rouger, Ph. *Le système ABO* (Ch. 10) en Les groupes sanguins chez l'homme. Ed. Masson (Paris) pp 111-161 (1991).