

ESTUDIO DE LA ADHESIÓN ERITROCITARIA MEDIADA POR ANTICUERPOS UTILIZANDO EL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

B. Riquelme, V. Danieli y M. D'Arrigo

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR
Grupo de Óptica Aplicada a la Biología – IFIR (CONICET-UNR)
Universidad Nacional de Rosario
Suipacha 531- 2000 Rosario - Argentina
e-mail: briquel@fbioyf.unr.edu.ar

Se estudió el fenómeno de adhesión intercelular utilizando como modelo la adhesión eritrocitaria mediada por anticuerpos específicos del sistema ABO, obteniéndose valores cuantitativos de los parámetros involucrados tales como de la energía de unión intercelular y su posible relación con los parámetros de deformabilidad celular. La energía de adhesión fue cuantificada indirectamente mediante el estudio de la disociación de los dobletes bajo el efecto de una tensión de corte determinada, utilizando un sistema de cámara de flujo controlado.

The main two objectives of this work were: to study the cellular adhesion phenomenon using erythrocyte adhesion mediated by specific antibodies of the ABO system as a model and to achieve quantitative values of the parameters involved in this phenomenon, like intercellular binding energy, and its possible relationship with cellular deformability parameters. As an experimental model, agglutinates of two group A erythrocytes (doublets) induced by specific monoclonal antibodies anti-A were used. Adhesion energy was indirectly quantified by the study of doublet dissociation under the effect of a given shear stress using a controlled flow chamber system.

KEY WORDS: erythrocyte adhesion, erythrocyte agglutination, dissociation energy, image processing

I. INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de interacción que conducen a la adhesión celular presentan un interés fundamental para las ciencias biológicas y médicas. La adhesión célula-célula es un fenómeno físico-químico crucial para la relación de la célula con su entorno. Por ello, es de gran importancia el desarrollo de métodos experimentales que permitan obtener resultados cuantitativos del fenómeno de adhesión celular.

La facilidad de disponer de glóbulos rojos y su relativa estabilidad, así como el conocimiento existente de las propiedades de su membrana, hacen que esta célula sea utilizada como modelo para el estudio de los mecanismos de las interacciones celulares. El estudio de la formación y ruptura de enlaces receptor-ligando en suspensiones eritrocitarias sujetas a una tensión de corte es de considerable importancia en la circulación sanguínea.

La aglutinación eritrocitaria resulta de la adhesión entre células mediadas por la unión específica o no-específica de los antígenos de la membrana (oligosacáridos) a macromoléculas multivalentes (anticuerpos o lectinas).

Los dos objetivos principales de este trabajo fueron estudiar el fenómeno de adhesión celular utilizando como modelo la adhesión eritrocitaria mediada por anticuerpos específicos del sistema ABO, y obtener valores cuantitativos de los parámetros involucrados en este fenómeno como la energía de unión intercelular y su posible relación con los parámetros de deformabilidad celular.

II. MATERIALES

Material biológico

Eritrocitos: se trabajó con sangre obtenida por punción venosa, anticoagulada con EDTA Na₂ de individuos sanos. Cada muestra fue centrifugada a 3000 g durante 5 minutos, luego de lo cual se descartó el plasma. Los eritrocitos fueron lavados tres veces en buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,4; 295 mOsm/kg) y finalmente resuspendidos en PBS conteniendo 0,25% de albúmina sérica humana. La manipulación de las muestras se realizó observando las normas de ética y bioseguridad establecidas en la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR.

Anticuerpo monoclonal: reactivo anti-A (Wiener lab.) purificado a partir de anticuerpos monoclonales secretados por líneas celulares de hibridomas de ratón.

Equipamiento

Cámara de Flujo: las experiencias se realizaron en una cámara de flujo transparente. El microcanal fue construido colocando una película de Teflón de 250 µm entre una base de acrílico y un portaobjetos de 0,2 mm y sellando con vacío (ver figura 1). La base de acrílico tiene dos aperturas rectangulares usadas como entrada y salida del fluido PBS-HSA por el canal. La entrada está conectada a una bomba peristáltica que permite variar la velocidad de flujo (caudal suministrado de 0 a 25 µl/seg).

Microscopio óptico invertido (National) con salidas para cámara de vídeo, cámara fotográfica y cámara polaroid.
 Cámara CCD "frame grabber" (Sony XC-75)
 PC equipada con sistema IPPlus de análisis digital de imágenes (Equipamiento Sony) y placa de adquisición y procesamiento.

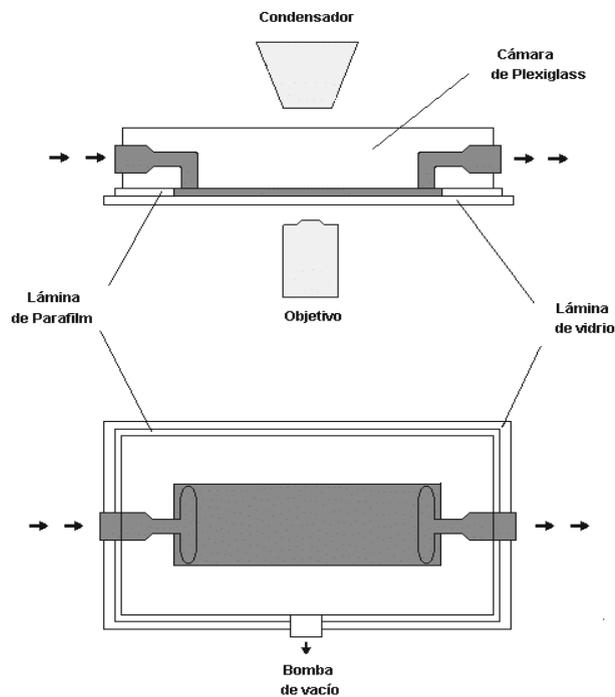


Figura 1. Esquema de la Cámara de Adhesión.

III. MÉTODO

El fenómeno de aglutinación de glóbulos rojos, inducida por anticuerpos monoclonales específicos del Sistema de Grupo Sanguíneo ABO, será utilizado como modelo experimental del mecanismo de reconocimiento específico ligando-receptor, para analizar el fenómeno de adhesión celular.

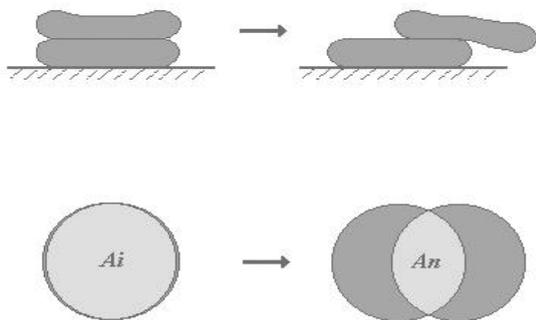


Figura 2. Representación esquemática de un doblete sometido a una tensión de corte, donde A_i es el área del glóbulo vista desde arriba al microscopio y A_n es el área de contacto entre ambos glóbulos.

Se evaluó la energía de adhesión determinando el trabajo requerido para separar fracciones de la superficie de contacto intercelular, de un aglutinado constituido por dos células

(doblete) por acción de una tensión de corte determinada. Esta tensión de corte se aplica bajo condiciones cinemáticas controladas, en un régimen de flujo laminar. Esto se realiza en la cámara de flujo, especialmente diseñada para obtener un flujo controlado y bien definido.

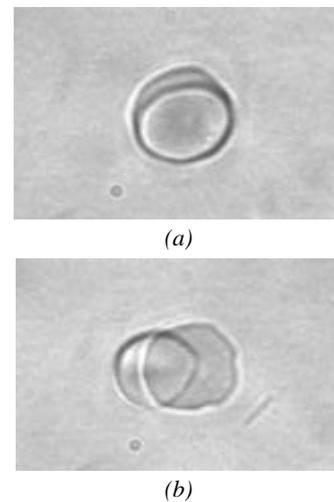


Figura 3. Imágenes registradas de un doblete: (a) en reposo Caudal = 0 ml/seg; PS = 0 %. (b) sometido a una tensión de corte Caudal = 14,7 ml/seg; PS = (52 ± 6) %.

Inicialmente los dobletes fueron inmovilizados dentro de la misma, sometiéndolos luego a distintas tensiones de corte durante intervalos de tiempo determinados. De esta manera, dicha tensión de corte aplicada es paralela a la superficie de contacto entre ambas células, observándose que la célula superior se desprendía progresivamente con el tiempo como así también con un aumento gradual de la tensión de corte. Se registraron imágenes microscópicas secuenciales con una cámara CCD adaptada a un microscopio óptico invertido y conectada a un sistema de vídeo digital. Luego se realizó el procesamiento digital de las imágenes, midiéndose las dimensiones geométricas que adoptan las células durante el proceso de deformación y disociación de los enlaces antígeno-anticuerpo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 3 se puede apreciar que a medida que se aumenta la tensión de corte (aumentando el caudal), el área de contacto entre ambas células va disminuyendo, lo que equivale a decir que su porcentaje de separación va aumentando.

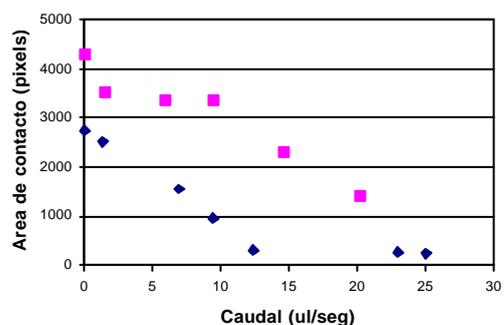


Figura 3. Área de contacto (A_n) entre los dos eritrocitos en función del Caudal para dos muestras diferentes

Se puede observar claramente que un eritrocito en reposo, visto desde el microscopio, posee una forma casi circular. Cuando este se somete a una tensión de corte, se deforma y adquiere una forma elíptica. A mayor diferencia entre los ejes mayor y menor de una elipse, esta posee mayor excentricidad. Por lo tanto, el valor de excentricidad es una medida de su deformabilidad.

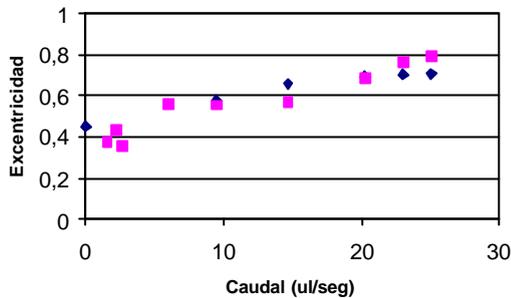


Figura 4: Excentricidad del eritrocito inferior en función del Caudal de flujo.

En la figura 4 se puede observar claramente un progresivo aumento de la excentricidad eritrocitaria con el aumento de la tensión de corte aplicada.

El porcentaje de separación entre ambas células fue obtenido de la siguiente manera:

$$PS = \frac{(A_i - A_n)}{A_i} \cdot 100$$

TABLA 1: VALORES OBTENIDOS DEL PORCENTAJE DE SEPARACIÓN PARA UNA MUESTRA DE SANGRE A TIPO AGLUTINADA CON EL ANTICUERPO ANTI-A (DILUCIÓN 1/6500).

Caudal (ml/seg)	PS
0	0
6	30 ± 4
14,7	52 ± 6
20,3	71 ± 6
23	92 ± 11
25	100

La energía de disociación (γ_d) es una medida indirecta de la energía de asociación, y se define como la energía necesaria para desagregar una unidad de área de membrana de dos células unidas, pudiendo expresarse como⁵:

$$\gamma_d = \frac{A \cdot \sigma_{50} \cdot d_{50}}{A_{50} \cdot 2}$$

donde σ_{50} es la tensión de corte para la cual, el porcentaje de separación entre ambas células es del 50%; d_{50} es la distancia recorrida; A_{50} el área de la célula superior para ese porcentaje, y A es el área total de la misma célula sin deformar.

El valor de σ_{50} fue calculado a partir de la siguiente ecuación⁵:

$$\sigma_{50} = \frac{6 \cdot \eta \cdot Q}{h^2 \cdot l}$$

donde η es la viscosidad del medio de suspensión (PBS-HSA), Q es el caudal aplicado, h es la altura y l es el largo del microcanal.

Finalmente, el valor obtenido para la energía de disociación de dos eritrocitos unidos por los anticuerpos monoclonales anti-A utilizados fue:

$$\gamma_d = 6,67 \cdot 10^{-8} \text{ Joule/m}^2$$

IV CONCLUSIONES

Queda demostrado que este método permite obtener parámetros como γ_d que conducirían a estimar el valor de la energía de adhesión entre dos eritrocitos unidos por anticuerpos. Al ser este parámetro directamente proporcional a la densidad superficial de las moléculas puente (anticuerpos, lectinas, etc.) y a la densidad antigénica de las células, su estimación es de indudable importancia. Por lo tanto, sería de interés utilizar este método en futuras determinaciones para otros tipos celulares y otros tipos de moléculas puente. Además brinda interesantes parámetros de deformabilidad de células sometidas a tensiones de corte en un flujo estacionario.

Referencias

- 1 - Zhu, C, Bao G, and Wang N. Annu. Rev. Biomed. Eng., **2**, 189-226 (2000).
- 2 - D'Arrigo M. "Incidencia de la relación estructura- función del sistema de grupo sanguíneo MN y del receptor CD44 en la adhesión eritrocitaria." Tesis Doctoral, Fac. Cs. Bioq. y Farm., Universidad Nacional de Rosario (2000).
- 3 - Rasia, R. et al.. Medicina, **60**, 570-572 (2000).
- 4 - Rasia, R. et al. Rheologica Acta, **39**, 595-600 (2000).
- 5 - Plá L. "Contribution a l'étude de l'affinité des anticorps monoclonaux par des méthodes d'optiques physique". Tesis Doctoral, Université Henri Poincare, Nancy 1, Francia (2000).
- 6 - Dumas D, Riquelme B, de Isla N. Leica Microsystem **7**, 2-6 (2003).
- 7 - Riquelme B, Dumas D, Valverde J, Rasia R., and Stoltz J. Proceedings of SPIE (2003).
- 8 - Long M, Goldsmith HL, Tees DFJ, Zhu C Biophysical J., **76**, 1112-28 (1999).
- 9 - Riquelme B, de Isla N, Valverde J R, Stoltz, JF and Rasia R Vox Sanguinis, **83**(2), 153 (2002).