

EQUIPO AUTOMATIZADO PARA EL ESTUDIO DE LA DISOCIACIÓN DE AGLUTINADOS CELULARES

AUTOMATIC DEVICE FOR THE STUDY OF CELLULAR AGGLUTINATED DISSOCIATION

Larisa Altube[♦], Aldo Marenzana^{*}, Juana Valverde^{♦*}, Gabriel Calviño[♦],
Patricia Foresto^{♦*}, Bibiana Riquelme^{♦*}

[♦]Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR

[♣] Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR)

Universidad Nacional de Rosario

27 de febrero 210 bis - 2000 Rosario - Argentina

e-mail: briquel@fbioyf.unr.edu.ar

Se desarrolló un equipo automatizado para el estudio de la cinética de disociación tanto de agregados como de aglutinados eritrocitarios. Este equipo se basa en el fenómeno de retrodifusión láser, donde la intensidad láser retrodifundida es inversamente proporcional al tamaño de las partículas. Se estudió el fenómeno de la adhesión intercelular para suspensiones de glóbulos rojos sin y con distintas concentraciones de anticuerpos a distintas velocidades de corte. Se obtuvieron valores cuantitativos de tensiones de corte crítica, que estarían relacionados con la energía específica de adhesión de los anticuerpos empleados. Este diseño experimental, permite estudiar el proceso de agregación y desagregación eritrocitaria, resultando de especial interés en aplicaciones clínicas, particularmente en las vasculopatías.

Palabras claves: adhesión eritrocitaria, retrodifusión láser, energía específica de adhesión, aglutinación eritrocitaria.

The main objective of this work was: to study the dissociation kinetics of aggregated and agglutinated erythrocytes employing an equipment developed to measure laser backscattering, where the light intensity is inversely proportional to the particle size. Intercellular adhesion phenomenon for erythrocyte suspensions with and without different antibody suspensions at different shear rates was studied. Quantitative critical shear stress values were obtained which would be related to specific adhesion energy of the employed antibodies. These experimental design, allows studying the erythrocyte aggregation and disaggregation processes, resulting of special interests for clinical applications, particularly in vasculopathies.

Keywords: erythrocyte adhesion, laser backscattering, specific adhesion energy, red blood cell agglutination.

I. Introducción

Se presenta el prototipo de un equipo automatizado desarrollado para el estudio de la disociación tanto de agregados como de aglutinados celulares. En particular, se presentan los resultados obtenidos para agregados y aglutinados de glóbulos rojos humanos (GR).

La agregación eritrocitaria se produce por la adhesión intercelular de GR mediada por proteínas plasmáticas que hacen las veces de puente entre las células. La naturaleza de esta unión es débil y reversible.

La aglutinación eritrocitaria resulta de la adhesión entre GR, mediadas por uniones fuertes entre antígenos de la membrana (oligosacáridos) y proteínas multivalentes (anticuerpos o lectinas).

El equipo, al igual que el eritroagregámetro (Regulest, France) se basa en la técnica de retrodifusión láser, donde la señal registrada es inversamente proporcional al tamaño de los aglutinados.

El equipo también ofrece la posibilidad de medir la agregación y desagregación celular.

II. Materiales

Material biológico

Suspensión de GR: se empleó sangre grupo A+ anticoagulada con heparina. Se prepara una suspensión al 40%, de GR lavados, en una solución de buffer fosfato salino conteniendo Dextran 70 al 4.1 %.

Preparación de aglutinados: Los aglutinados se preparan enfrentando volúmenes iguales^{1,2} de la suspensión de GR con distintas concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-A (Wiener) obtenidos por líneas celulares de hibridomas de ratón. Para las determinaciones en el equipo, se introducen 1.2 ml de la mezcla de reacción en el reservorio (ver figura 1).

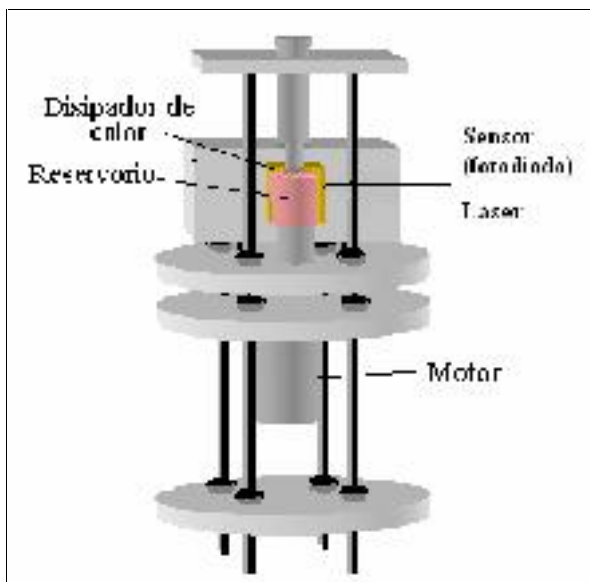


Figura 1. Esquema del equipo desarrollado.

Equipo desarrollado

El equipo consta de dos cilindros concéntricos, el interior fijo, y el otro, exterior, transparente y giratorio, accionado por un motor cuya velocidad de rotación es controlada por medio de una fuente de alimentación variable con el fin de aplicar sobre los aglutinados tensiones de corte definidas. Se hace incidir la luz de un diodo láser de una potencia de 5 mW y $\lambda = 785$ nm sobre la muestra. La señal de retrodifusión⁴ que es captada por un fotodiodo enfocado, ubicado sobre el láser, es enviada mediante una interfase a una PC por su puerto paralelo de impresora, donde es procesada por un software especialmente desarrollado para tal fin. La utilización del software permite variar el tiempo de registro de la señal y registrar la variación de la señal para las distintas las tensiones de corte aplicadas.

Para evaluar el funcionamiento del equipo, se colocan las suspensiones de la mezcla de reacción entre los dos cilindros del aparato y se las somete a velocidades de corte correspondientes a rotaciones del cilindro exterior comprendida en el rango de 0.3 - 7.6 Hz.

Protocolo de utilización

1. Colocar la muestra de reacción en el reservorio e introducirlo en el rotor del equipo.
2. Encender todas las unidades que nos permiten regular y controlar el movimiento del rotor.
3. Una vez encendido el motor del equipo, dejar transcurrir el tiempo predeterminado en el protocolo de trabajo.
4. Finalizada la operación y el registro de los datos requeridos, apagar todas las unidades y lavar el reservorio para posteriores mediciones.

III. Método

Se mide la retrodifusión láser de una suspensión de GR sin anticuerpo a distintas velocidades de corte. La medición se inicia luego de transcurridos 5 seg del

comienzo de la rotación del motor. La retrodifusión láser, que es inversamente proporcional al tamaño de los agregados, aumenta con las velocidades de corte empleadas, ya que los agregados se van disgregando haciéndose cada vez más pequeños. Cuando finalmente se alcanza la disociación total de los agregados, la retrodifusión es máxima e independiente de la velocidad de corte.

El mismo procedimiento se repite para las suspensiones de GR frente a las distintas concentraciones de anticuerpo (mezclas de reacción).

IV. Resultados

Se midieron los valores de retrodifusión láser para una velocidad de rotación constante, empleando suspensiones de GR sin anticuerpo. La medición se inicia desde el reposo obteniéndose curvas de desagregación (Figura 2).

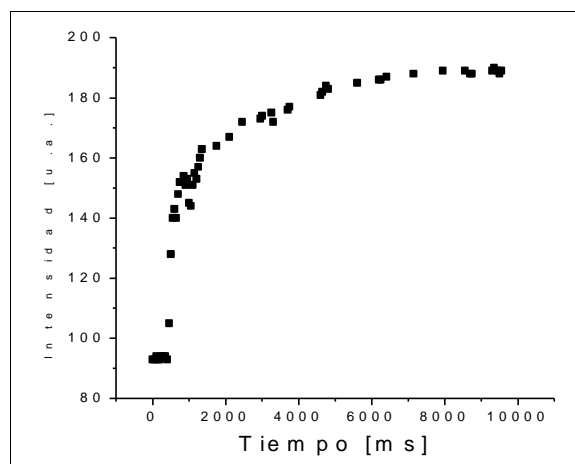


Figura 2: Curva de desagregación eritrocitaria.

La medición se reinicia con el apagado del motor, obteniéndose las curvas de agregación (Figura 3).

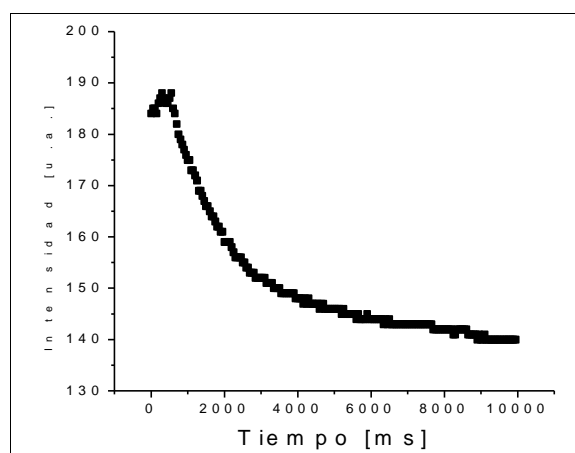


Figura 3: Curva de agregación eritrocitaria.

Se grafican los valores medios de la retrodifusión láser vs. las distintas velocidad de corte en escala semilogarítmica, para lograr apreciar las variaciones en la pendiente de la curva. Del gráfico (figura 4) se puede

obtener la velocidad de corte crítica $\dot{\gamma}_c$ para los agregados de GR, la cual es proporcional a la tensión de corte necesaria para alcanzar la desagregación completa de los GR⁵.

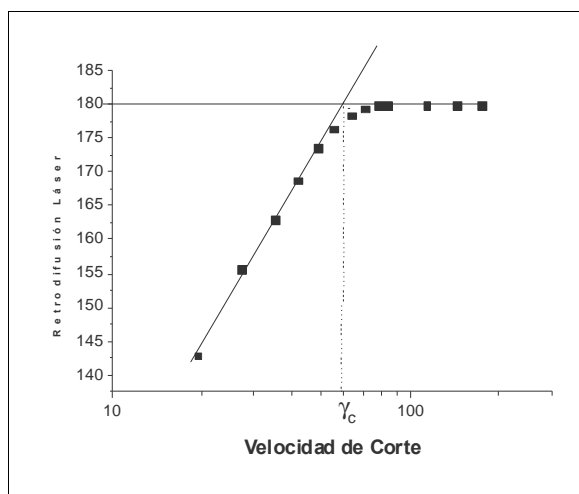


Figura 4: Obtención de velocidad de corte crítica para la desagregación.

Se repite el mismo procedimiento para suspensiones de GR con anticuerpos anti-A, obteniéndose los valores de las velocidades de corte críticas para aglutinados celulares (Tabla I).

TABLA I: VALORES DE LAS VELOCIDADES DE CORTE CRÍTICAS PARA AGLUTINADOS CELULARES

	Concentración de anti-A Vol/Vol	$\dot{\gamma}_c$ s ⁻¹
Control	0	59.7 ± 0.6
Anti-A 1/256	0.004	62.0 ± 0.6
Anti-A 1/128	0.008	71.6 ± 0.7

En la Tabla I se observa que la velocidad de corte crítica aumenta con la cantidad de anticuerpos en la suspensión, ya que la tensión de corte requerida para disgregar los aglutinados aumenta con la concentración de anticuerpo.

V. Conclusiones

El equipo desarrollado resulta de utilidad para analizar la cinética de aglutinación y obtener valores cuantitativos relacionados con las características específicas de adhesión de los anticuerpos analizados.

Este diseño experimental, permite estudiar el proceso de agregación³ y desagregación eritrocitaria, resultando de especial interés en aplicaciones clínicas, particularmente en las vasculopatías.

Referencias

- 1 – Plá L. “Contribution a l’etude de l’affinité des anticorps monoclonaux par des méthodes d’optique physique”. Tesis Doctoral, Université Henri Poincare, Nancy 1, Francia (2000).
- 2 – R. Rasia, J. Valverde, M. Gentils, G. Cauchois and J.F. Stoltz, Rheologic characterization of vegetal lectins by dissociation of induced erythrocyte agglutinates, Clin. Hemorheol. and Microcirc. 17 (1997), 333-340.
- 3 – Skalak and C. Zhu, Rheological aspects of red blood cell aggregation, Biorheol. 27 (1990), 309-325.
- 4 – R. Rasia, J. Valverde and J.F. Stoltz, Weak «A» blood subgroup discrimination by a rheo-optical method: a new application of laser backscattering, Optical Engineering 35, 1 (1996), 20-25.
- 5 – R. Rasia, J. Valverde, C. Botté and J.F. Stoltz, Approche rhéologique de la réaction de dissociation d’agglutinats immunologiques érythrocytaires: Application à des hématies du sous-groupe A, Transf. Clin. et Biol. 4 (1997), 203-211.