

# Estudio de anticuerpos monoclonales mediante el procesamiento digital de imágenes de aglutinados eritrocitarios

Alicia Fontana  
Adriana Alessi  
Rodolfo Rasia  
Marcela García Rosasco

## Resumen

La interacción de antígenos, expresados sobre la membrana de los glóbulos rojos (GR), con anticuerpos específicos, conduce a la formación de aglutinados eritrocitarios. Los anticuerpos monoclonales (AcMo) muestran gran homogeneidad, especificidad definida y elevada afinidad, y pueden ser producidos en cantidades ilimitadas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el comportamiento de AcMo anti-A, anti-A<sub>1</sub> y anti-H, enfrentándolos a suspensiones de GR A<sub>1</sub>, A<sub>int</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>cordón</sub>. Las imágenes microscópicas de los aglutinados fueron digitalizadas, registradas y procesadas con un Procesador Digital de Imágenes, para así determinar el área proyectada de cada aglutinado y la cantidad de células presentes en cada uno. Los resultados expresados como porcentajes de partículas libres y aglutinadas, de diferentes tamaños, y distribuidos por intervalos de área, pusieron en evidencia diferencias en la capacidad de reacción de los AcMo. El procesamiento digital de imágenes de aglutinados, aparece como un instrumento valioso para el estudio objetivo de reactivos inmunohematológicos.

**Palabras clave:** anticuerpos monoclonales – procesamiento digital de imágenes – aglutinación – eritrocitos

## Title

Image processing system applied to the study of red blood cell agglutination by monoclonal antibodies

## Abstract

Antigens expressed on the red blood cell (RBC) membrane interact within specific antibodies leading to the formation of erythrocyte agglutinates. Monoclonal antibodies (MAb) show great homogeneity, high affinity and very definite specificity and can be produced in unlimited quantities. The objective of this work was to characterize the behavior of some MAb (anti-A, anti-A<sub>1</sub> and anti-H) reacting against RBC of A<sub>1</sub>, A<sub>int</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>cord</sub> phenotypes. Microscopic images of agglutinates were digitized, recorded and processed using a Digital Image Processor. The projected area of each agglutinate was measured and the number of cells contained in each one was calculated. Results expressed as percentages of free and agglutinated cells distributed by area intervals showed that this technique may find differences in the MAb reactivity. Then, the digital image processing of agglutinates appears as a valuable technique to characterize the immunological behavior of MAb.

**Key words:** monoclonal antibodies - digital image analysis - agglutination – erythrocytes

## Introducción

Los eritrocitos o glóbulos rojos (GR) son células bicóncavas, anucleadas en su estadio adulto, con un diámetro promedio de 7.5 a 8 micrones. En condiciones de reposo los eritrocitos tienden a apilarse en formaciones cilíndricas típicas denominadas “rouleaux” (Fig.1). Este fenómeno de agregación ocurre *in vivo* e *in vitro*, la unión es inespecífica y totalmente reversible en condiciones fisiológicas (1,2, 3).

Los GR expresan antígenos (Ag) proteicos y glicoproteicos pertenecientes a 26 sistemas de grupos sanguíneos descritos hasta el momento (referencia ISBT). En presencia de un anticuerpo (Ac) específicamente dirigido contra alguno de estos Ag, se produce una reacción de aglutinación. Este fenómeno se desarrolla en dos etapas, la primera es la fijación de las moléculas de Ac sobre los sitios antigénicos, en la segunda etapa, que se da casi simultáneamente, los Ac fijados a una célula toman contacto con sitios antigénicos de otras células, lo que culmina con la formación de una red denominada aglutinado (4,5).

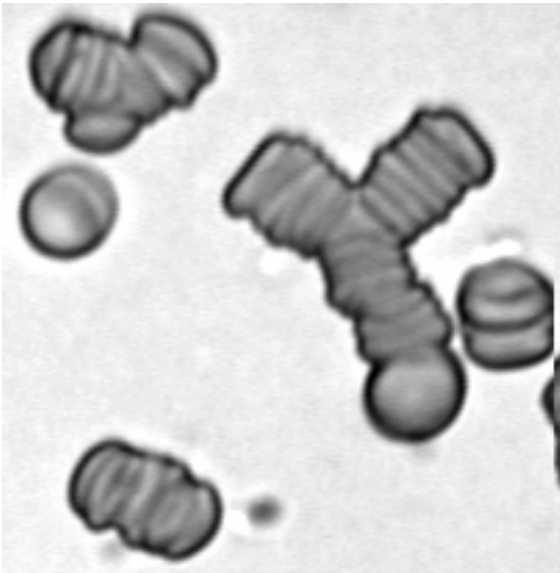


Figura 1 – Agregados eritrocitarios

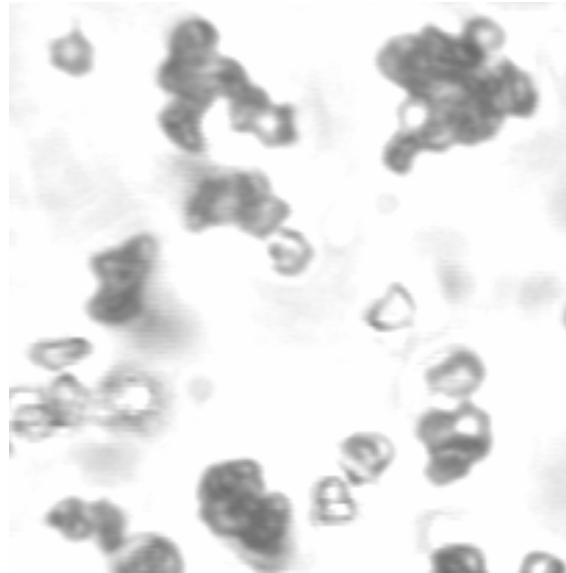


Figura 2 – Aglutinados eritrocitarios

Los Ag eritrocitarios de grupos sanguíneos presentan una estructura química determinada y su especificidad resulta de una complementariedad muy estrecha con los sitios de combinación específicos del Ac. El contacto se realiza por fuerzas de interacción intermoleculares no covalentes. La estabilidad de la unión AgAc es función de la exacta complementariedad entre ambos (6,7, 8).

La reacción entre las moléculas de Ac y las de Ag, presentes en la membrana del glóbulo rojo, es específica, reversible sólo *in vitro* y depende de varios factores:

- Número de sitios antigénicos en la membrana eritrocitaria
- Tamaño y número de sitios de reacción en la molécula de Ac
- Condiciones del medio de reacción: fuerza iónica, pH, constante dieléctrica y temperatura

Si se mantienen constantes todas las variables mencionadas, excepto una de ellas, se puede asumir que los cambios en la aglutinación producida serán función de esa variable.

Desde la década del 80 se han incorporado en la práctica diaria del laboratorio inmunohematológico los anticuerpos monoclonales (AcMo). Éstos son producidos a partir de la

fusión de linfocitos B y células de mieloma murino; los hibridomas resultantes tienen la capacidad de producir AcMo específicos a bajo costo y en cantidades ilimitadas. Día a día aparecen en el mercado nuevos AcMo por lo que resulta indispensable evaluar los nuevos reactivos.

La calidad de un reactivo monoclonal se mide por distintos parámetros: la especificidad, ligada a su capacidad de fijarse únicamente sobre su Ag propio, la afinidad, ligada al grado de asociación entre un Ac dado y su Ag específico y la avidéz (velocidad de reacción).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el comportamiento de algunos AcMo presentados en el *4th International Workshop on Monoclonal Antibodies against human red blood cells and related antigens* (Paris, 2001) frente a eritrocitos (GR) de diferentes subgrupos del grupo A, a través del análisis de las imágenes de aglutinados por procesamiento digital de imágenes.

### **Materiales y Métodos**

Las condiciones óptimas de trabajo fueron estandarizadas luego de pruebas previas correspondientes a cada variable de la reacción.

Suspensiones de eritrocitos A<sub>1</sub>, A<sub>int</sub> (intermedio), A<sub>2</sub>, A<sub>c</sub> (cordón) lavados y resuspendidos al 1% en solución de CNa 0,15M.

AcMo: identificados en el *4th International Workshop on Monoclonal Antibodies against human red blood cells and related antigens* (Paris, 2001) con los siguientes códigos:

anti-A:	2.9, 2.11, 2.16
anti-A <sub>1</sub> :	2.24
anti-H:	2.67, 2.73, 2.75

Se enfrentaron 50µl de cada suspensión celular y 50µl de cada reactivo diluido a título final 32. Cada mezcla se incubó 120 seg a temperatura ambiente y se colocó en un portaobjeto excavado sobre la platina de un microscopio óptico invertido, al cual se encuentra acoplada una cámara CCD conectada a un sistema de procesamiento digital de imágenes (IPPLUS).

Las imágenes de los aglutinados obtenidos para cada tipo de células, fueron digitalizadas y transferidas a una computadora conectada *on line* para calcular diferentes parámetros geométricos (perímetro y área de partículas aglutinadas y libres). Las medidas se hicieron sobre la base de una calibración previa, en donde se tomó el diámetro de un hematíe aislado como referencia.

El **área** proyectada resultó el parámetro geométrico más representativo del grado de aglutinación producida. Se dividieron, por intervalos, las áreas obtenidas y se calculó la cantidad de células pertenecientes a cada tamaño de aglutinados.

### **Resultados**

En las siguientes Tablas se presentan los resultados expresados como porcentajes de partículas libres (GR no aglutinados) y partículas aglutinadas (aglutinados de diferentes tamaños) distribuidos por intervalos de área.

**Tabla 1 - Análisis digital de imágenes. Areas de partículas libres y aglutinadas  
AcMo anti - A**

RANGO DE TAMAÑOS DE AGLUTINADOS		PORCENTAJE DE AGLUTINADOS EN FUNCION DE SU TAMAÑO											
		2,11				2,16				2,9			
Areas (mm <sup>2</sup> )	Nº de células	A <sub>1</sub>	A <sub>int</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>C</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>int</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>C</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>int</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>C</sub>
0 a 125	cel. no aglutinadas	0	41,7	0	34,0	17,5	3,6	7,0	45,5	0	5,0	40,8	60,5
125 a 250	2 a 3 células	12,5	8,3	7,1	34,0	3,2	3,6	27,0	45,5	5,4	0	20,4	20,9
250 a 500	4 a 8 células	12,5	0	2,4	25,0	6,3	14,3	46,0	9,0	0	10	8,2	18,6
500 a 1000	9 a 12 células	0	0	2,4	5,0	39,7	35,7	17,0	0	0	0	30,6	0
1000 a 3000	12 a 15 células	44,0	25,0	47,6	0	23,8	42,8	3,0	0	40,6	35,0	0	0
+ de 3000	+ de células	15	31,0	25,0	40,5	0	9,5	0	0	54,0	50,0	0	0

**Tabla 2 - Análisis digital de imágenes. Areas de partículas libres y aglutinadas  
AcMo anti - H**

RANGO DE TAMAÑOS DE AGLUTINADOS		PORCENTAJE DE AGLUTINADOS EN FUNCION DE SU TAMAÑO											
		2,67				2,73				2,75			
Areas (mm <sup>2</sup> )	Nº de células	A <sub>1</sub>	A <sub>int</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>C</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>int</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>C</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>int</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>C</sub>
0 a 125	cel. no aglutinadas	100	5	6	42	100	18	7,9	30	100	54,6	3	27,8
125 a 250	2 a 3 células	0	25	18	58	0	18	5,2	33,3	0	34,1	30,3	41,7
250 a 500	4 a 8 células	0	37	32	0	0	23	0	16,7	0	11,3	18,2	30,5
500 a 1000	9 a 12 células	0	33	44	0	0	41	2,6	20	0	0	48,5	0
1000 a 3000	12 a 15 células	0	0	0	0	0	0	39,5	0	0	0	0	0
+ de 3000	+ de células	15	0	0	0	0	0	44,8	0	0	0	0	0

**Tabla 3 - Análisis digital de imágenes. Areas de partículas libres y aglutinadas  
AcMo anti-A<sub>1</sub>**

RANGO DE TAMAÑOS DE AGLUTINADOS		PORCENTAJE DE AGLUTINADOS EN FUNCION DE SU TAMAÑO			
		2,24			
Areas (mm <sup>2</sup> )	Nº de células	A <sub>1</sub>	A <sub>int.</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>c</sub>
0 a 125	cel. no aglutinadas	0	6,7	100	49
125 a 250	2 a 3 células	0	0	0	39
250 a 500	4 a 8 células	0	0	0	7
500 a 1000	9 a 12 células	0	0	0	5
1000 a 3000	12 a 15 células	71,4	46,6	0	0
+ de 3000	+ de 15 células	28,6	46,7	0	0

Se observó que los AcMo 2.11 y 2.73 presentaron la mayor capacidad de reacción.

Reactivos anti-A: la aglutinación fue máxima para GR A<sub>1</sub>, decreciendo para A<sub>int.</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>c</sub> en ese orden.

Reactivos anti-H: se observó la mayor reacción con A<sub>2</sub> y A<sub>c</sub> y menor para A<sub>int.</sub>

Reactivo anti-A<sub>1</sub>: mostró reacción fuerte-mente positiva con los GR A<sub>1</sub>, más débil con los A<sub>int</sub> y negativa con los demás.

### Conclusiones

El análisis de las imágenes de aglutinación puso en evidencia diferencias en la capacidad de reacción de los distintos reactivos. El procesamiento digital de imágenes aparece como un instrumento de indudable valor para el estudio objetivo de reactivos de uso inmunohematológico.

### Bibliografía

1. **Stoltz, YF, Donner M.** Hemorheology: importance of erythrocyte aggregation. Clin Hemorheol, 1987; 7:15-23.
2. **Chien S, Sung LA.** Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. Clin Hemorheol, 1987; 7:71-91.
3. **P.Foresto, M.D'Arrigo, L.Racca, F.Fillipini, R. Gallo, J.Valverde, R.Rasia.** Comparative analysis of aggregate shape by digitized microscopic image. Application to hypertension. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2002, 26, 137-144
4. American Association of Blood Banks. Technical manual. 1990; 10<sup>th</sup> Ed.
5. **Moore BPL.** Techniques sérologiques et immunologiques. 1991; Société Canadienne de la Croix-Rouge

6. **Salmon Ch, Cartron JP, Rouger Ph.** Les groupes sanguins chez l'homme. 1997; Ed-Masson Paris
7. **Salmon Ch.** Les groupes sanguins ou l'écriture des genes. 1997; Ed-Masson Paris.
8. **Cartron YP, Rouger P.** Bases moléculaires des antigènes des groupes sanguins De l'Immunohématologie a la biologie moléculaire. 1998; Ed-Masson Paris.