

## Biosensor óptico para la detección de anomalías en los niveles de $\alpha$ 1-antitripsina en suero humano

B. Riquelme, P. Foresto, J. Valverde, R. Rasia

### Optical biosensor to detect abnormal levels of $\alpha$ 1-antitrypsin in human serum

#### Abstract

An optical biosensor has been developed to detect abnormal levels of  $\alpha$ 1-antitrypsin in human serum samples. This method applies light scattering properties exhibited by initially formed enzyme-inhibitor complexes and uses the curves of aggregation kinetics. It is independent of molecular hydrodynamics. Theoretical approaches showed that scattering properties of transient complexes obey the Rayleigh-Debye conditions. Experiments were performed on the Trypsin/ $\alpha$ 1-antitrypsin system. Measurements were performed in newborn, adult and pregnant sera containing  $\alpha$ 1-antitrypsin in the Trypsin excess region. The solution was excited by a He-Ne laser beam (3mW,  $\lambda=632,8$  nm). So, the particles formed during the reaction are scattering centers for the interacting light. The intensity of the scattered light at  $90^\circ$  from incident beam ( $I_{90}$ ) depends on the nature of those scattering centers. The rate of increase in scattered intensity depends on the variation in size and shape of the scatterers, being independent of its original size. Peak: values ( $V_{max}$ ) of the first derivative ( $V_{90}=dI_{90}/dt$ ) linearly correlate with the concentration of  $\alpha$ 1-antitrypsin originally present in the sample. Results are displayed 5 minutes after the initiation of the experimental process. Such speed is of great importance in the immunobiochemistry determinations.

Key Words: Optical biosensor, Light Scattering, immunocomplexes,  $\alpha$ 1-antitrypsin.

#### Resumen

Se ha desarrollado un biosensor óptico para detectar niveles anormales de  $\alpha$ 1-antitripsina en muestras de suero humano. Se basa en el análisis de las propiedades de dispersión de la luz exhibidas por los complejos enzima-inhibidor iniciales. Utiliza curvas de cinética de agregación y es independiente de la hidrodinámica molecular. El análisis teórico muestra que el esparcimiento lumínico de los complejos transitorios obedecen las condiciones de Rayleigh-Debye. Se realizaron experimentos en el sistema Tripsina/ $\alpha$ 1-antitripsina. Las mediciones se realizaron en la región de exceso de tripsina con sueros de recién nacido, adulto y embarazada. La solución fue excitada por un láser de He-Ne (3mW,  $\lambda=632,8$  nm), en consecuencia las partículas formadas durante la reacción eran centros dispersores para la luz interactuante. La intensidad de la luz dispersada a  $90^\circ$  de la dirección incidente ( $I_{90}$ ) depende de la naturaleza de esos centros dispersores. El aumento en la intensidad dispersada depende de la variación del tamaño y forma de los dispersores siendo independiente de su tamaño original. Los valores máximos ( $V_{max}$ ) de la primer derivada ( $V_{90}=dI_{90}/dt$ ) correlacionan linealmente con la concentración de  $\alpha$ 1-antitripsina originalmente presente en la muestra. Los resultados se obtienen 5 minutos después de iniciado el proceso experimental. Tal velocidad es de gran importancia en las determinaciones de inmuno-bioquímica.

Palabras Claves: Biosensor óptico. Esparcimiento Lumínico. Inmunocomplejos.  $\alpha$ 1-antitripsina.

1 Dpto. Química Física, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.  
2 Grupo de Óptica Física Aplicada a la Biología, Instituto de Física de Rosario (CONICET - UNR).

## Introducción

El mantenimiento de la salud requiere un equilibrio entre los sistemas defensivos y ofensivos del cuerpo. Tal equilibrio entendido desde el nivel molecular es el balance entre las enzimas que activan las proteínas y las antiproteasas que actúan como sus inhibidores. De importancia particular es el grupo de enzimas estrechamente relacionadas, las serinas proteasas que son responsables de activar las cascadas inflamatorias del plasma como: la coagulación, el derrame de kinina, la fibrinólisis y la activación del complemento. El inicio por estas enzimas de las cascadas plasmáticas es controlado por un grupo apropiadamente especializado de inhibidores de proteasa. Estos inhibidores de serina proteasa pertenecen a la misma familia de proteínas, las serpinas, y en consecuencia poseen una estructura molecular y un mecanismo común. El arquetipo de la familia de las serpinas es la  $\alpha$ 1-antitripsina, el inhibidor de mayor concentración en plasma humano<sup>1</sup>. La  $\alpha$ 1-antitripsina recibió su nombre de su identificación como una globulina  $\alpha$ 1 y del método original usado por medir su actividad<sup>2</sup>.

La  $\alpha$ 1-antitripsina, una glicoproteína de fase aguda de reacción consiste en una sola cadena polipeptídica con cuatro cadenas laterales de carbohidratos, y representa aproximadamente el 90% de la fracción  $\alpha$ 1 en la electroforesis de proteína de suero humano. Es el mayor inhibidor de enzimas proteolíticas y muestra un amplio espectro de actividad antiproteolítica.

Laurell y Eriksson 1963, fueron los primeros en reconocer una deficiencia hereditaria de la proteína  $\alpha$ 1-antitripsina. Observaron que las deficiencias severas e intermedias eran el resultado de la herencia homocigota y heterocigota de un gen anormal<sup>3</sup>.

La  $\alpha$ 1-antitripsina parece tener una función protectora porque neutraliza enzimas proteolíticas liberadas en los fluidos del cuerpo, predominantemente por la destrucción de granulocitos y macrófagos. Durante la inflamación aguda y la infección severa, y en pacientes con desórdenes del hígado se observa un rápido incremento en los niveles de  $\alpha$ 1-antitripsina de hasta tres veces el nivel normal. Valores aumentados de  $\alpha$ 1-antitripsina en suero también se encuentran durante el embarazo, y durante el uso de medicación anticonceptiva. Aparte de la reducción debido a deficiencias genéticas, los niveles de  $\alpha$ 1-antitripsina en suero pueden reducirse en nefrosis, en enteropatías con pérdida de proteína, en infantes con enfermedad de la membrana idiopática hialina, y en infantes pretérmino con síndrome respiratorio<sup>4</sup>.

La  $\alpha$ 1-antitripsina inhibe y/o neutraliza extracelular-

mente un gran número de enzimas proteolíticas, como proteasas granulocíticas neutras incluyendo la elastasa y colagenasa, las tripsina y chimotripsina, la plasmina, el cofactor del factor- Hageman, urokinasa, kallikrein, y cathepsina G y D<sup>2</sup>.

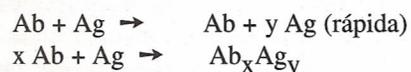
Los programas de detección de deficiencias de  $\alpha$ 1-antitripsina son indicados en la actualidad ya que el enfisema pulmonar sintomático no ocurre en individuos con esta deficiencia si ellos toman las medidas preventivas correspondientes. El testeo en pacientes con enfisema podría llevar a la detección precoz de deficiencias en miembros de su familia lo que podría permitir tomar las medidas preventivas necesarias para que el enfisema no evolucione<sup>5</sup>.

Existen diferentes métodos para las mediciones cuantitativas de  $\alpha$ 1-antitripsina como las técnicas de inmuno difusión radial (IDR), electro inmuno difusión (EID) y nefelometría, el ensayo enzimático y el método de electroforesis cruzada. Cada uno tiene ventajas y desventajas. Las concentraciones de  $\alpha$ 1-antitripsina en el suero de adulto sano obtenidas por IDR se encuentran entre 200 y 400 mg%<sup>6</sup>.

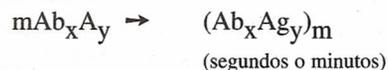
En el presente trabajo se aplica la técnica de light scattering o esparcimiento lumínico (LS) para determinar la concentración de  $\alpha$ 1-antitripsina en suero humano. Para ello se investiga la cinética de agregación de complejos transitorios formados durante la reacción de la enzima tripsina con su ligando inhibidor,  $\alpha$ 1-antitripsina.

Se considera que esta reacción y la formación subsecuente de los complejos ocurren en forma similar a la reacción de un antígeno (Ag) con su anticuerpo (Ab). Estas reacciones han sido estudiadas extensivamente por técnicas de LS<sup>7,8</sup>, Y ocurren en tres etapas:

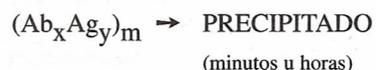
1er. ETAPA



2da. ETAPA (formación de los complejos transitorios)



3er. ETAPA (formación del precipitado)



Estos estudios han verificado que la 2<sup>a</sup> etapa es la reacción principalmente contribuyente a la dispersión de la luz observado durante las fases intermedias de la reacción. Esto es que porque el primer paso es muy lento como para ser observado, mientras que al final del proceso la intensidad cambia muy lentamente.

El cambio medido en luz dispersada es debido al aumento del tamaño de los centros dispersores. Esto ocurre "debido a la formación de complejos transitorios  $(Ab_xAg_y)_m$  en el tiempo. Buffone et al.<sup>2</sup> estimaron que el diámetro medio ( $d$ ) de los complejos  $(Ab_xAg_y)_m$  está aproximadamente entre 450 y 700nm. En consecuencia, usando una longitud de onda de luz incidente  $\lambda \sim 600$  nm, resulta  $d \sim \lambda$  y cada partícula puede subdividirse en elementos de volumen, donde cada elemento se trata como un dispersor de Rayleigh, excitado por el campo incidente que se asume que no es perturbado por la presencia de las partículas restantes. Este caso puede ser considerado estar dentro de la llamada dispersión de Rayleigh-Debye. La intensidad de luz dispersada es<sup>9,10</sup>:

$$I(\theta) = P(\theta) I_0(\theta), [1]$$

donde  $P(\theta)$  es el factor de tamaño y forma, e  $I(\theta)$  es la intensidad de luz dispersada a un ángulo  $\theta$  por la misma partícula que se comporta como un dispersor de Rayleigh:

$$I(\theta) = I_0 \frac{8\pi^4}{r^2 \lambda^4} \alpha^2 (1 + \cos^2 \theta) [2]$$

Aquí  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente,  $r$  es la distancia media desde el centro dispersor al cual  $I$  es medido, y  $\alpha$  es la polarizabilidad del dispersor. Si hay  $N$  partículas dispersantes en un  $cm^3$  de suspensión,  $C$  es la concentración en  $g/cm^3$  y si la solución es muy diluida, la polarizabilidad de los  $N$  dispersores está dada por:

$$\alpha = \frac{n}{2\pi} \frac{dn}{dC} \frac{M}{N_A}$$

donde  $n$  es el índice de refracción del solvente (el índice de refracción de la partícula no es demasiado diferente del medio circundante),  $M$  es el peso molecular promedio pesado de las especies dispersoras, la  $dn/dC$  es el cambio en el índice de refracción de la suspensión debido a la formación de centros dispersores, y  $N_A$  es el número de Avogadro<sup>5</sup>.

Diferenciando la ecuación [1] con respecto al tiempo,

$$V(\theta) = dI(\theta)/dt = dI(\theta)/dt P(\theta) + dP(\theta)/dt I(\theta).$$

En soluciones diluidas  $\alpha$  es prácticamente constante. Por consiguiente:

$$\frac{d\alpha^2}{dt} \sim 0$$

y, desde la ecuación [2]:

$$\frac{dI(\theta)}{dt} \sim 0$$

Entonces resulta la siguiente ecuación:

$$v(\theta) \frac{dI(\theta)}{dt} \cong I(\theta) \frac{dP(\theta)}{dt}, [3]$$

donde  $V(\theta)$  indica el cambio de la intensidad de luz dispersada en el tiempo bajo las condiciones de Rayleigh-Debye, sólo depende de la velocidad a la que el tamaño y la forma de los dispersores están cambiando. Por consiguiente, debe ser independiente del tamaño molecular absoluto del complejo de Ab-Ag inicialmente formado en la 1<sup>er</sup> etapa.

Las propiedades de los complejos transitorios fueron estudiadas aplicando el método de luz dispersada a 90° desde la dirección de la luz incidente. Estos complejos fueron producidos cuando una suspensión acuosa de Tripsina reaccionó contra la al-antitripsina presente en el suero.

## Materiales y Métodos

### Materiales

Tripsina: Solución isotónica de Tripsina (SIGMA, T-8128, Tipo II: Crudo, lote 70H0439) purificada desde páncreas de porcino al 0.1%. Actividad de la Tripsina: 1.130 BAEE unidades/mg sólido (pH 7.0, A<sub>237</sub>, en 3ml de volumen).

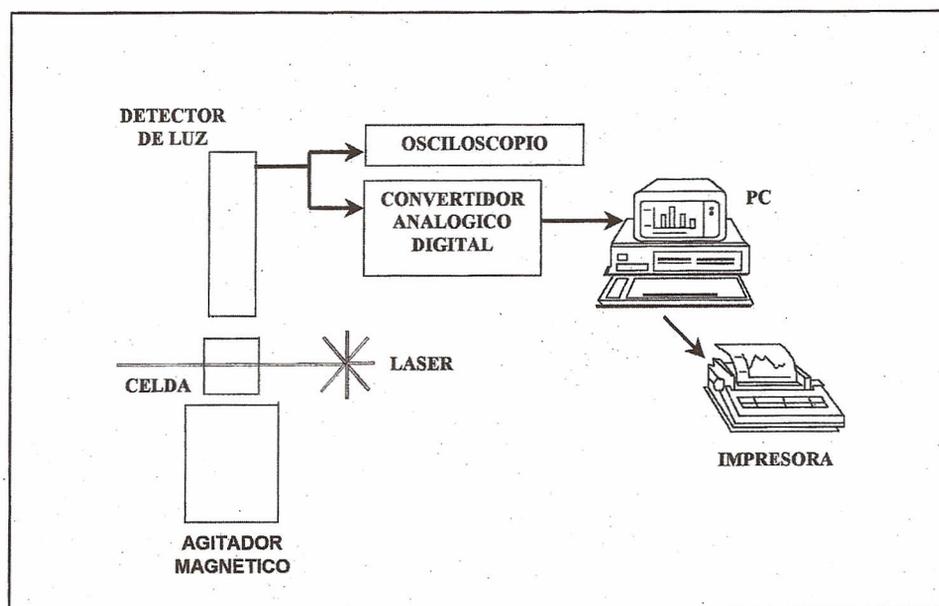
$\alpha$ 1-antitripsina: Suero humano no diluido de 8 adultos, 3 mujeres embarazadas y 5 recién nacidos sanos. Los sueros fueron almacenados a 4°C hasta su uso. La  $\alpha$ 1-antitripsina en suero sin diluir permanecen estables 4°C durante semanas, pero deben ser almacenadas a -20°C o menos si se la desea guardar por un período mayor.

Celda contenedora: construida en vidrio Pyrex con el fondo negro mate. Diámetro externo = 2.58 cm, diámetro interno = 2.23 cm, altura = 1.50 cm.

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico, y la solución fue preparada utilizando agua destilada deionizada. La celda fue lavada repetidamente antes de su uso con agua destilada deionizada para remover cualquier posible fuente de contaminación.

### Montaje experimental

En la figura 1 se muestra un esquema del montaje experimental utilizado. La solución contenida en la



**Figura 1** Esquema del montaje experimental del biosensor.

celda es excitada por un haz láser de He-Ne de 3mW de potencia ( $\lambda = 632.8$  nm). El detector de luz utilizado fue un tubo fotomultiplicador (RCA 6342A) alimentado por una fuente estabilizada (500 a 1000 V). El convertor analógico digital convierte la señal y permite el almacenamiento de los datos en un disco de computadora para su inmediato procesamiento.

Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente controlada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

#### Método

La componente biológica de este biosensor consiste en la tripsina la cual es enfrentada con el suero humano que contiene  $\alpha_1$ -antitripsina. Inicialmente se colocaron en la celda 3,5 ml de agua destilada adicionándole 100  $\mu\text{l}$  de la solución isotónica de tripsina al 0.1%. Luego se agregan 100  $\mu\text{l}$  de suero sin diluir y a partir de ese instante se registra la intensidad de luz dispersada a un ángulo de  $90^\circ$  con respecto a la dirección del haz incidente ( $I_{90}$ ).

Para homogeneizar la solución, las mediciones fueron realizadas con agitación constante cuidadosamente controlada para evitar turbulencias y burbujas. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado en los diferentes sueros (adultos, embarazadas y recién nacidos) en la región de exceso de Tripsina.

Cuando el haz láser de He-Ne ingresa lateralmente en la celda, excita las partículas en suspensión. En consecuencia, las partículas que se formaron durante la reacción se convierten en centros dispersores del haz láser

incidente, dependiendo la intensidad  $I_{90}$  de la naturaleza de dichas partículas.

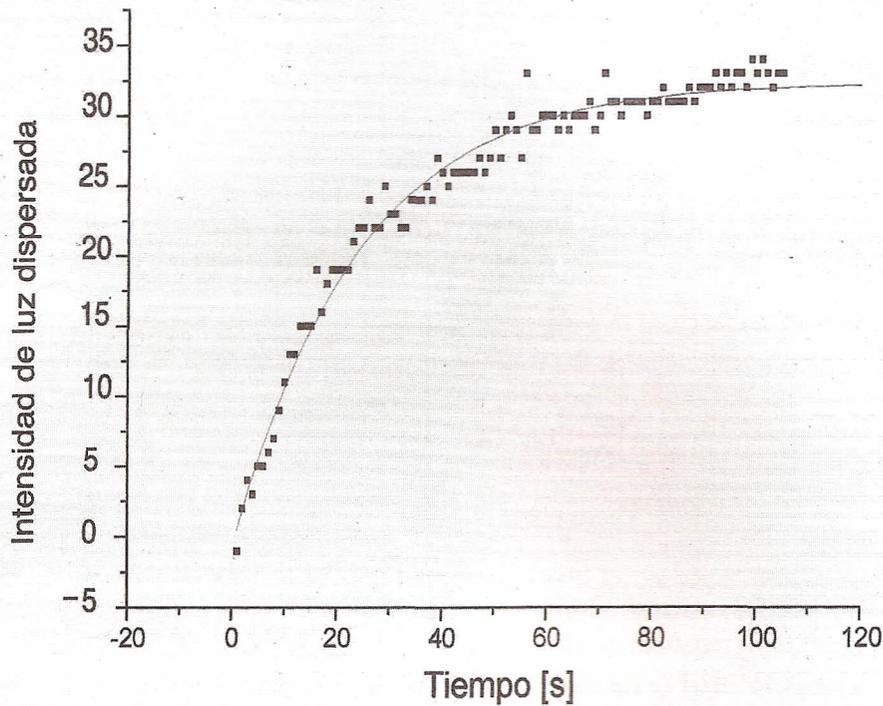
#### Resultados

Las curvas de cinética de agregación, como la mostrada en la figura 2, fueron obtenidas registrando  $I_{90}$  durante los 2 primeros minutos a partir del instante en el cual el suero era adicionado a la celda. Puede observarse claramente que la intensidad de la luz crece rápidamente luego del agregado del suero, alcanzando el valor máximo aproximadamente a los 30 segundos.

Un pool de sueros de adultos sanos fue considerado como estándar, estimando a partir de los valores de esta muestra las concentraciones desconocidas de  $\alpha_1$ -antitripsina en los otros sueros.

La figura 3 muestra las curvas cinéticas correspondientes al promedio de las determinaciones realizadas para los diferentes sueros (adulto, embarazada y recién nacido) en la región de exceso de Tripsina.

La señal de salida del detector fue digitalizada y transferida a una PC para obtener la primera derivada con respecto al tiempo de la intensidad dispersada ( $V_{90} = dI_{90}/dt$ ). El valor máximo de la derivada temporal de la intensidad de la luz dispersada ( $V_{\max} = (dI_{90}/dt)_{\max}$ ) depende de la concentración de  $\alpha_1$ -antitripsina presente en el suero. En la tabla 1 se encuentran los valores de  $V_{\max}$  e  $I_{\max}$  extraídos de las curvas de  $I_{90}$  en función del tiempo,



**Figura 2** Registro de la intensidad de luz dispersada por una muestra de un pool de suero de adultos sanos. Los puntos corresponden a los datos y la línea a una aproximación de estos puntos con una función exponencial.

	$V_{\max}$		$I_{\max}$	
	Valor Medio	SD	Valor Medio	SD
Recién nacidos	2.53	0.38	42.3	6.8
Estándar	4.13	0.26	32.8	0.98
Embarazadas	5.85	0.65	57.5	21.5

**Tabla I** Valores medios de  $V_{\max}$  e  $I_{\max}$   
Sueros normales de recién nacido, adulto y embarazada

En la tabla II se muestran los valores medios de la concentración de  $\alpha 1$ -antitripsina obtenidos a partir de los valores de  $V_{\max}$  (Tabla I). Para ello se consideró que la concentración media de  $\alpha 1$ -antitripsina en un pool de suero de adultos sanos es de 300 mg% (obtenida por IDR)

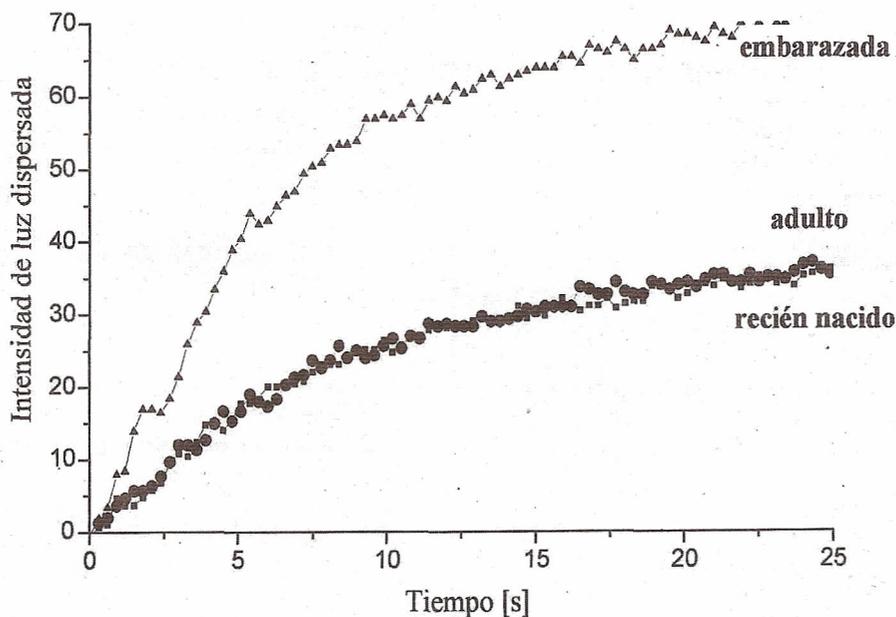
### Discusión y Conclusiones

Los cambios en la intensidad de la luz dispersada durante la formación del complejo Tripsina- $\alpha 1$  antitripsina ofrecen importante información acerca de la naturaleza de los complejos transitorios en solución.<sup>11</sup>

La  $I_{90}$  aumenta rápidamente desde el instante en el cual se inicia la reacción cuando la Tripsina se pone en contacto con su inhibidor, la  $\alpha 1$ -antitripsina. Esto sugiere

la formación de complejos transitorios en el dominio de Rayleigh-Debye a partir de los primeros segundos. El valor máximo de  $I_{90}$  es alcanzado aproximadamente 30 segundos después. Curvas similares a estas han sido obtenidas para el sistema IgG - anti IgG<sup>12</sup>,

El  $V_{\max}$  puede ser determinado para una reacción Tripsina- $\alpha 1$  antitripsina debido a que los complejos primarios se agregan rápidamente dando especies macromoleculares, cuyos pesos y tamaños aumentan en el tiempo. Estos valores permiten cuantificar la cantidad de  $\alpha 1$ -antitripsina en muestras de suero humano. Los resultados obtenidos de las concentraciones de  $\alpha 1$ -antitripsina en los diferentes sueros analizados concuerdan con los reportados en la bibliografía.<sup>6</sup>



**Figura 3**  $I_{90}$  en función del tiempo a partir del instante en el que se inicia la reacción. Las curvas corresponden a los valores medios obtenidos para los sueros de recién nacido, adulto y embarazada.

	Concentración de $\alpha$ 1- antitripsina	
	Valor Medio	SD
Recién nacidos	284	27
Adultos	300	19
Embarazadas	425	47

**Tabla II** Valores medio de la concentración de  $\alpha$ 1-antitripsina obtenidas utilizando el biosensor óptico. Sueros normales de recién nacidos, adultos y embarazadas

El biosensor basado en la técnica de dispersión de la luz (Light Scattering, LS) muestra algunas ventajas con respecto a la inmuno difusión radial (IDR) dado que LS es una técnica cinética independiente de la hidrodinámica molecular. Por otra parte,  $V_{max}$  depende sólo de la variación del tamaño y forma de los dispersores, siendo independiente del tamaño original del complejo enzima-inhibidor.

Si bien la cantidad de muestras analizadas no es suficiente como para realizar un estudio estadístico de las anomalías en los niveles de  $\alpha$ 1-antitripsina en suero humano, es suficiente como para demostrar la capacidad y sensibilidad de la técnica desarrollada para su detección. La ventaja más importante de esta técnica es que el resultado de una determinación es obtenido unos pocos minutos después de comenzado el pro-

ceso experimental (con la técnica de IDR, por ejemplo se requieren de 1 a 2 días). Esto es de gran importancia en las determinaciones inmuno-bioquímicas para bancos de sangre y neonatología.

## Referencias

- R. Carrel,  *$\alpha$ 1-Antitrypsin: Molecular Pathology, Leukocytes, and Tissue Damage* J. Clin. Invest. 78, pp. 1427-1431, 1986.
- J. O. Morse, *Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency*, New England Journal of Medicine 299, pp. 1045-1048, 1978.
- C. Laurell and S. Ericksson, *The electrophoretic alpha<sub>1</sub> globulin pattern of serum in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency*, Scand. J. Clin. & Lab. Invest. 15, pp. 132, 1963.
- N. Bohm,  *$\alpha$ 1 -Antitrypsin and its Deficiency States*, Path. Res. Pract. 168, 1-16, 1980.
- J. Lieberman, *Alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin Deficiency and Chronic Pulmonary Disease*, New York State Journal of Medicine, pp. 181-186, February 1976.
- G. Jackson, *Alpha<sub>1</sub>-antitripsina*, *Química Clínica. Métodos*, Ed. Panamericana, pp.158-162, 1990.
- Tengerdy, T. and Small, W. *Nature* 210, pp. 708-710, London, 1966.
- M. Kerker, *The scattering of light and other electromagnetic radiation*. Academic Press, New York and London, Chap. 3, pp. 31-39, and Chap. 8, pp. 414-417, 1969.
- G. Buffone, J. Savory and J. Hermans, *Evaluation of kinetic of light scattering as an approach to measurement of specific proteins with the centrifugal analyzer. II Theoretical consideration*. Clinical Chemistry 21 (2), pp. 1735-1746, 1975.
- K. Van Rolde, *Physical Biochemistry*, Prentice Hall: Englewood Cliffs, N. J., Chap. 9, 1971.
- G. Sittampalam, and G. Wilson, *Experimental Observations of Transient Light Scattering Complexes Formed during Immunoprecipitin Reactions*, Analytical Chemistry 56, pp. 2170-2175, 1984.
- B. Riquelme, P. Foresto, J. Valverde, R. Rasia, *Laser scattering method applied to determine the concentration of antigen or antibody in a solution* Special electronic editions of the Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ISBN: 958-9205-32-1), Cap. IX of the CD entitled: III RIAO & OPTILAS '98, 1998.